



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDA BOVO

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE ROFA E DE MATERIAIS
PARTICULADOS PROVENIENTES DA QUEIMA DE
BIOMASSA NA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE
CAMUNDONGOS**

Londrina
2007

FERNANDA BOVO

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE ROFA E DE MATERIAIS
PARTICULADOS PROVENIENTES DA QUEIMA DE
BIOMASSA NA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono

Londrina
2007

FERNANDA BOVO

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE ROFA E DE MATERIAIS PARTICULADOS
PROVENIENTES DA QUEIMA DE BIOMASSA NA RESPOSTA IMUNE
HUMORAL DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mario Augusto Ono
Universidade Estadual de Londrina

Prof Dra Maria Angélica Ehara Watanabe
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva.
Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo

Londrina, _____ de _____ 2007.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Adolfo Bovo e minha mãe Maria Quessada Bovo, e minha irmã Andréa Emília Bovo, pelo apoio e dedicação em todas as etapas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A meus pais José Adolfo Bovo e Maria Quessada, por nunca terem medido esforços para educação. A minha irmã Andréa Emília Bovo, pela dedicação e carinho que sempre teve comigo.

Ao meu orientador, prof. Dr Mário Augusto Ono, pelos conhecimentos e ensinamentos que foram transmitidos a mim durante os seis anos em que me orientou, os quais serão muito úteis durante a minha vida profissional.

Ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação, Mestrado em Patologia Experimental, pelos ensinamentos e conhecimentos a nós transmitidos durante o curso.

Ao prof. Dr Emerson Venâncio pela ajuda nos momentos de dúvidas, pelos conselhos e pela amizade.

Ao prof. Dr Rubens Cecchini, Dra Sueli Fuemi Yamada Ogatta e a prof Dra Eiko Itano pelo empréstimo de equipamentos.

A todos os meus colegas de laboratório, em especial a Tatiana Petroni e Raquely Moreira Lemos, que de alguma forma colaboraram para que este trabalho fosse concretizado, agradeço a todos vocês a atenção, a amizade e o companheirismo durante todo o tempo em que estivemos juntos.

A todos da minha turma de mestrado o meu muito obrigada, especialmente a Cristiane Akemi e Eliana de Vito, pela ajuda durante os experimentos.

Agradeço aos técnicos Jesus Antônio Vargas e Pedro Sebastião Dionízio Filho, pela ajuda na realização dos experimentos.

A todos do laboratório de poluição ambiental da faculdade de Medicina de São Paulo, em especial a Dra Mariângela Macchione, Dra Eliane Tigre e ao Dr Paulo Hilário Saldiva pela atenção e pelo fornecimento dos materiais particulados.

A CAPES, CNPq e UEL obrigada pelo apoio financeiro, sem este a realização desse trabalho não seria possível.

"É melhor lançar-se à luta em busca do triunfo, mesmo expondo-se ao insucesso, que formar fila com os pobres de espírito, que nem sofrem muito nem gozam muito".

Roosevelt.

BOVO, Fernanda. **Avaliação da ação de rofa e de materiais particulados provenientes da queima de biomassa na resposta imune humoral de camundongos**. 2007. 47 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

RESUMO

A poluição ambiental constitui um dos maiores problemas de saúde pública mundial. Diversos estudos epidemiológicos têm demonstrado associação entre altos níveis de materiais particulados (M.P.) e aumento de morbidade e mortalidade. Residual Oil Fly Ash (ROFA) e materiais provenientes de combustão de biomassa têm sido largamente utilizados em estudos experimentais com o intuito de elucidar o mecanismo de toxicidade induzido por poluição atmosférica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de partículas provenientes de queima de Biomassa e ROFA (proveniente de incinerador e de uma siderúrgica), no sistema imune humoral de camundongos. Foram avaliados níveis de anticorpos da classe IgG e IgM, e ativação do sistema complemento. Os resultados obtidos mostraram aumento de IgG sérica total no grupo exposto a ROFA após o 21 dia de exposição bem como aumento da ativação do sistema complemento pelas vias clássicas e alternativas nos soros expostos a todos M.P, sendo esta ativação dose dependente (exceto pela ROFA de incinerador na via alternativa). Os resultados obtidos sugerem que estes MP materiais exercem efeitos no sistema imune e que a composição das partículas, bem como a dose e o tempo de exposição, podem ser fatores importantes na ativação do sistema complemento e na resposta imune humoral de camundongos.

Palavras –chave: ROFA. Biomassa e resposta imune humoral.

BOVO, Fernanda. **Avaliação da ação de rofa e de materiais particulados provenientes da queima de biomassa na resposta imune humoral de camundongos.** 2007. 47 f. Dissertation (Master's Degree in Experimental Patology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

ABSTRAT

The ambient pollution is one of the biggest problems of world-wide public health. Several epidemiological studies have demonstrated associations between high levels of particulate matter (MP) and increase of morbidity and mortality. Residual Oil Fly Ash (ROFA) and matter result from biomass burning have been widely used in experimental studies, with the aim of elucidate the mechanism of toxicity induced by atmospheric pollution. The aim of this work was to evaluate the effect of matter from combuston of Biomass and ROFA (provide from a incinerator and from a steel company), in the humoral immune system of mice. It was evaluated levels of antibodies IgG and IgM, and activation of the complement system. The results showed an increase on sera IgG in the group exposed to ROFA after the 21^o day of exposition, as well as increase on activation of classical and alternative pathway of complement in the serum samples treated with all MP, being this activation dependent dose (except for the ROFA of incinerator in the alternative pathway). This data suggests that these MP may influence the immune system and that the composition of particles, as well as the dose and the time of exposition, may be important factors in the activation of the complement system and in the humoral immune of mice.

Keywords: ROFA. Biomass and Humoral Immune Response.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Classificação das médias diárias para PTS na estação de monitoramento “Santa Casa” em Curitiba no ano de 2005.....	13
Gráfico 2 –	Contribuição relativa das fontes de poluição do ar (MP 2,5) na cidade de São Paulo, bairro de Cerqueira César, em 1996/1997	14
Gráfico 3 –	Perfil da Resposta Imune - Níveis de Anticorpos da classe IgM em soros de camundongos expostos e não expostos <i>in vivo</i> a ROFA HU e SID, detectados pelo Método de ELISA .	34
Gráfico 4 –	Perfil da Resposta Imune - Níveis de Anticorpos da classe IgG classe em soros de camundongos expostos e não expostos <i>in vivo</i> a ROFA HU e SID, detectados pelo Método de ELISA	34
Gráfico 5 –	Perfil da Resposta Imune - Níveis de Anticorpos da classe IgM em soros de camundongos expostos <i>in vivo</i> a partículas de queima e não-queima de biomassa detectados pelo Método de ELISA.	36
Gráfico 6 –	Perfil da Resposta Imune – Níveis de Anticorpos da classe IgG em soros de camundongos expostos <i>in vivo</i> a partículas de queima e não- queima de biomassa detectados pelo Método de ELISA.	37
Gráfico 7 –	Análise da Via Clássica do sistema complemento em soros de camundongos expostos <i>in vitro</i> a materiais particulados.....	38
Gráfico 8 –	Análise da Via Alternativa do sistema complemento em soros de camundongos expostos <i>in vitro</i> a materiais particulados.....	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	A POLUIÇÃO DO AR	12
1.2	CLASSIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DOS POLUENTES	15
1.3	ROFA	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVOS GERAIS	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS	22
3.1.1	Experimento com ROFA.....	22
3.1.2	Experimentos com Partículas de Queima de Biomassa	24
3.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	24
3.2.1	Experimento com ROFA.....	24
3.2.2	Experimento com Partículas de Queima de Biomassa.....	25
3.3	IMUNIZAÇÕES	25
3.4	PREPARO DAS SUSPENSÕES DE POLUENTES	26
3.5	ADMINISTRAÇÃO DOS POLUENTES	26
3.6	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO	26
3.7	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM MP PROVENIENTES DE POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA.....	28
3.7.1	Preparação do Antígeno de Membrana de Eritrócitos de Carneiro	28
3.7.2	Ensaio de ELISA.....	28
3.7.3	Avaliação <i>in vitro</i> da Influência dos MP na Ativação do Sistema Complemento de Camundongos	29
3.7.3.1	Avaliação da ativação da via alternativa.....	30
3.7.3.2	Avaliação da via clássica.....	30
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5	CONCLUSÕES.....	41
	REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 A POLUIÇÃO DO AR

A poluição ambiental constitui um dos maiores problemas da humanidade, não somente em decorrência da influência nas mudanças climáticas global, mas também por sua ação prejudicial à saúde humana (ROCHA, 2005).

O meio ambiente sofre constantes modificações em virtude da agressão causada pela poluição. A maioria dos poluentes inaláveis presentes hoje na atmosfera são os materiais particulados (MP), que são capazes de provocar reações químicas ou fotoquímicas as quais contribuem para modificar o clima global e local (FITZGERALD, 1991; AUSSET et al., 1994).

Entretanto, de acordo com Bell et al. (2004), é na saúde que dados epidemiológicos mostram os maiores malefícios destes produtos, mesmo em doses abaixo das preconizadas como seguras pela maioria dos órgãos de controle de ar ambiental.

Uma associação clara tem sido demonstrada entre altas concentrações de MP, especialmente partículas com diâmetros menores que 10 µm (MP10), e a exacerbação de doenças respiratórias e cardiovasculares crônicas. Como no caso da exposição experimental humana por 2 horas a PM, onde foi encontrado aumentou neutrófilos no lavado brônquico alveolar (BELL et al., 2004; HARDER et al., 2001).

A correlação existente entre MP e determinadas doenças como as cardiovasculares e asma, entre outras, relatada em estudos epidemiológicos é confirmada por ensaios toxicológicos experimentais em voluntários e animais. Exposições por inalação mostram que MP10 tem efeito inflamatório agudo nas vias aéreas em humanos, resultando em ativação de mastócitos e de neutrófilos, bem como, no aumento destes últimos. (SALVI et al., 1999; STENFORS et al., 2004).

As principais fontes de poluição são produzidas por tráfego de veículos e por grandes empresas, tais como as siderúrgicas entre outras. A queima de biomassa (incêndios florestais, queima de lenha ou palha de açúcar) mais freqüente em centros rurais, também compõe uma parcela importante dos agentes

poluidores, o que mostra que a poluição não se encontra restrita a grandes centros urbanos. (ARBEX et al, 2004).

Estudos sobre os níveis de poluição, em grandes centros urbanos, mostram concentrações muito elevadas de material particulado atmosférico, com média anual de 200 a 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e pico de concentração exercendo 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (U.N.ENVIRONMENT PROGRAM AND WORLD HEALTH ORGANIZATION). Para um adulto, assumindo um volume total inalado de 20 m^3 em 24 horas, mais de 20000 μg de partículas podem ser inaladas durante um pico de poluição do material particulado (NEMMAR et al., 2003).

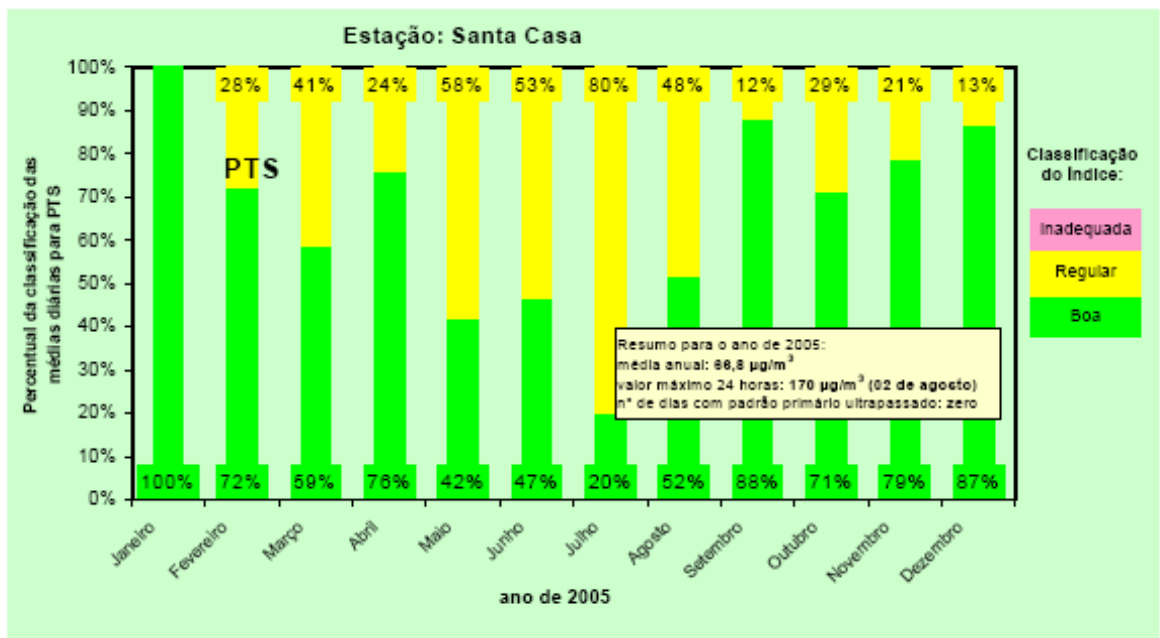


Gráfico 1 – Classificação das médias diárias para PTS na estação de monitoramento “Santa Casa” em Curitiba no ano de 2005.

Fonte: IAP (2005).

O Instituto Ambiental do Paraná (IAP), vem monitorando regularmente a qualidade do ar de Curitiba e região metropolitana, desde 1985. Os estudos feitos pelo IAP mostram que a média de Partículas Totais em suspensão em Curitiba foi de 71,3 e 66,8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (2004 e 2005 respectivamente) e Araucária 39,7 e 13,53 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (2004 e 2005 respectivamente). Dados deste órgão mostram que no ano de 2005, houve meses em que a média das concentrações diárias de Partículas

Totais em Suspensão (PTS) apresentou níveis regulares por mais da metade do mês (meses de maio, junho e julho - figura 1), o que mostra a importância e necessidade do monitoramento ambiental rígido neste estado.

No estado de São Paulo a Companhia de Saneamento Ambiental é o órgão responsável pelo monitoramento da qualidade do ar deste estado. Dados deste órgão mostram que no bairro de Cerqueira César (SP), os principais agentes responsáveis pela poluição ambiental nos anos de 1996 e 1997 são os veículos (37%), Carbono secundário (30%) Sulfatos secundários (20%) entre outros, dados (figura 2).

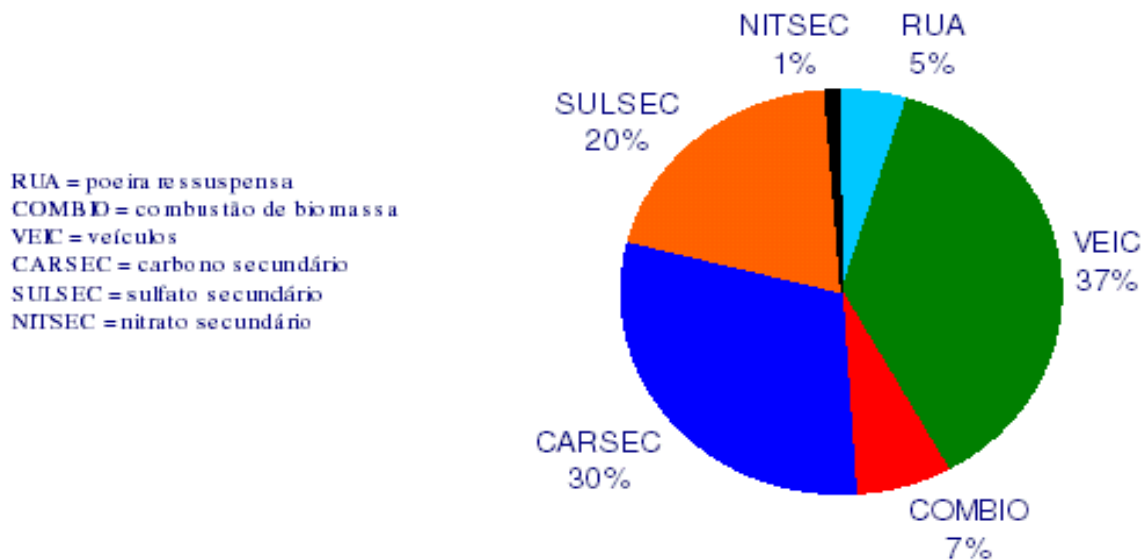


Gráfico 2 – Contribuição relativa das fontes de poluição do ar (MP 2,5) na cidade de São Paulo, bairro de Cerqueira César, em 1996/1997.

Fonte: CETESB (2005)

Apesar de um grande número de estudos acerca dos efeitos provocados por estes materiais, tanto na saúde quanto na qualidade de vida, o verdadeiro mecanismo das alterações provocadas pela poluição, seja por curtos ou longos períodos de exposição, continua incerto.

1.2 CLASSIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DOS POLUENTES

Os poluentes atmosféricos são formados por diversos elementos ou compostos químicos e podem apresentar-se sob a forma gasosa, sólida ou líquida. Os compostos sólidos constituem o material particulado que podem ser de fontes naturais (*spray* marinho, solo, vegetação e erupções vulcânicas) ou antrópicas, como é o caso da combustão industrial, doméstica e dos veículos automotores, especialmente aqueles movidos a óleo diesel (BERUBE et al., 1999).

Os principais poluentes atmosféricos em São Paulo e Região Metropolitana, bem como suas fontes , segundo a CETESB, estão resumidos na tabela 2.

Tabela 1 — Fontes, característica e efeitos dos principais poluentes na atmosfera.

POLUENTE	CARACTERÍSTICAS	FONTES PRINCIPAIS	EFEITOS GERAIS SOBRE A SAÚDE	EFEITOS GERAIS AO MEIO AMBIENTE
Partículas Totais em Suspensão (PTS)	Partículas de material sólido ou líquido que ficam suspensas no ar, na forma de poeira, neblina, aerossol, fumaça, fuligem, etc. Faixa de tamanho < 100 micra.	Processos industriais, veículos motorizados (exaustão), poeira de rua ressuspenso, queima de biomassa. Fontes naturais: pólen, aerossol marinho e solo.	Quanto menor o tamanho da partícula, maior o efeito à saúde. Causam efeitos significativos em pessoas com doença pulmonar, asma e bronquite.	Danos à vegetação, deterioração da visibilidade e contaminação do solo.
Partículas Inaláveis (MP ₁₀) e Fumaça	Partículas de material sólido ou líquido que ficam suspensas no ar, na forma de poeira, neblina, aerossol, fumaça, fuligem, etc. Faixa de tamanho < 10 micra.	Processos de combustão (indústria e veículos automotores), aerossol secundário (formado na atmosfera).	Aumento de atendimentos hospitalares e mortes prematuras.	Danos à vegetação, deterioração da visibilidade e contaminação do solo.
Dióxido de Enxofre (SO ₂)	Gás incolor, com forte odor, semelhante ao gás produzido na queima de palcos de fósforos. Pode ser transformado a SO ₃ , que na presença de vapor de água, passa rapidamente a H ₂ SO ₄ . É um importante precursor dos sulfatos, um dos principais componentes das partículas inaláveis.	Processos que utilizam queima de óleo combustível, refinaria de petróleo, veículos a diesel, polpa e papel.	Desconforto na respiração, doenças respiratórias, agravamento de doenças respiratórias e cardiovasculares já existentes. Pessoas com asma, doenças crônicas de coração e pulmão são mais sensíveis ao SO ₂ .	Pode levar à formação de chuva ácida, causar corrosão aos materiais e danos à vegetação: folhas e colheitas.
Dióxido de Nitrogênio (NO ₂)	Gás marrom avermelhado, com odor forte e muito irritante. Pode levar à formação de ácido nítrico, nitratos (o qual contribui para o aumento das partículas inaláveis na atmosfera) e compostos orgânicos tóxicos.	Processos de combustão envolvendo veículos automotores, processos industriais, usinas térmicas que utilizam óleo ou gás, incinerações.	Aumento da sensibilidade à asma e à bronquite, abatar a resistência às infecções respiratórias.	Pode levar à formação de chuva ácida, danos à vegetação e à colheita.
Monóxido de Carbono (CO)	Gás incolor, inodoro e inespido.	Combustão incompleta em veículos automotores.	Altos níveis de CO estão associados a prejuízo dos reflexos, da capacidade de estimar intervalos de tempo, no aprendizado, de trabalho e visual.	
Ozônio (O ₃)	Gás incolor, inodoro nas concentrações ambientais e o principal componente da névoa fotoquímica.	Não é emitido diretamente à atmosfera. É produzido fotoquimicamente pela radiação solar sobre os óxidos de nitrogênio e compostos orgânicos voláteis.	Irritação nos olhos e vias respiratórias, diminuição da capacidade pulmonar. Exposição a altas concentrações pode resultar em sensações de aperto no peito, tosse e chiado na respiração. O O ₃ tem sido associado ao aumento de admissões hospitalares.	Danos às colheitas, à vegetação natural, plantações agrícolas; plantas ornamentais.

Fonte: CETESB (2005)

Trabalhos demonstram que as características químicas do MP são dependentes de um grande número de fatores tais como: condições atmosféricas (luminosidade, temperatura, velocidade dos ventos), fontes de emissão e o tamanho das partículas. Apesar da diversidade nas propriedades das diferentes amostras de MP, vários constituintes comuns são identificados incluindo o carbono elementar, alguns compostos orgânicos, traços de metais, Sulfatos e Nitratos em forma de aerossol e material biológico (CARNELLEY; LE, 2001).

Partículas Totais em Suspensão (PTS) ou MP compreendem partículas de qualquer tamanho suspensas no ar, sendo que as maiores que 30 - 70 μm permanecem pouco tempo em suspensão antes de serem depositadas. Esses materiais podem ser classificados de acordo com seu diâmetro aerodinâmico: MP 10 bruto (menor que 10 μm), MP 2,5 fino (menor que 2,5 μm) e Ultrafinas (UF) ou nanopartículas (menor que 0,1 μm). Eles penetram no trato respiratório sendo capazes de passar através da barreira sanguínea (SEATON et al., 1995).

O tamanho das partículas inaladas é um fator importante na determinação do efeito que essas irão exercer nos organismos, uma vez que as partículas maiores que 10 μm ficam depositadas nas vias aéreas superiores e são removidas pela atividade ciliar. As menores que 10 μm , especialmente as com diâmetros menores que 2,5 μm , geralmente resultantes da oxidação incompleta de materiais de carbono (GHIO et al., 2002) têm potencial para serem depositadas nos alvéolos e parecem ser as maiores responsáveis pelos efeitos provocados por esses poluentes. É sabido ainda, que exposições crônicas às partículas finas estão altamente associadas com aumentos no índice de doenças crônicas, incluindo câncer pulmonar e problemas cardiovasculares (POPE et al., 2002).

O sistema de *clearance* mucociliar é uma das defesas individuais mais importantes contra agentes inalados (MACCHIONE et al., 1995; WARNNER et al., 1996). Este sistema é baseado no transporte contínuo do muco das vias áreas para a orofaringe pelo batimento ciliar (MACCHIONE et al., 1999). Os poluentes podem provocar irritação da mucosa nasal com edema e alteração das características do muco (SALDIVA et al., 1992; 1994) o que pode provocar obstrução nasal crônica e infecção (TREVINO, 1996).

Os diversos poluentes emitidos no ar pela queima de biomassa para obtenção de energia e de outros materiais pelas indústrias, contêm muitos metais como Vanádio(V), Ferro(Fe), Níquel(Ni), e Zinco (Zn); (RENDALL et al., 1994). Para

estudos dos efeitos desses componentes na saúde dos indivíduos, diversos MP têm sido utilizados, porém, um dos grandes problemas está em reproduzir as condições do ar inalado em ambientes poluídos, em laboratórios experimentais. Assim, o MP *Residual Oil Fly Ash* (ROFA) tem sido largamente utilizado para verificar efeitos toxicológicos em animais e humanos, devido à sua rica composição em diversos metais e à baixa presença de compostos orgânicos, o que apresenta-se de grande utilidade em estudos para hipótese de efeitos biológicos mediados especialmente por metais (GHIO et al., 2002).

Há poucos dados sobre quais características das partículas seriam responsáveis pelos efeitos à saúde, ou seja, qual a influência de características como, tamanho do material, área de superfície e componentes químicos e biológicos na patogenia da poluição.

Estudos recentes têm investigado os mecanismos de ação do MP e, embora poucos dados estejam disponíveis sobre o assunto, acredita-se que estresse oxidativo, reação inflamatória e efeitos moduladores do sistema imune estejam envolvidos (AMARANTE, 2003).

1.3 ROFA

ROFA é o termo utilizado para o Material Particulado produzido pela queima de combustíveis fósseis (GHIO et al., 2002)

Esse MP apresenta uma composição peculiar, rica em metais e pobre em compostos orgânicos (BYRNE; KOSTA., 1978) e, devido a sua composição, tem sido largamente utilizado experimentalmente em estudos que avaliam a resposta imune aos diversos MP, bem como, na hipótese de serem, os compostos metálicos presentes no ar, os maiores responsáveis pelos efeitos verificados na imunidade dos indivíduos expostos à poluição (GHIO et al., 2002).

Miyabara et al (1998) e Fujieda (1998) em experimentos com animais e humanos, respectivamente, demonstraram que ROFA e outros produtos da combustão de diesel, podem agir como adjuvantes no sistema imune, além de promovendo o aumento da inflamação alérgica

Dreher et al., Gavett et al. (1997) e Kodavanti et al. (1998), em estudos sobre os mecanismos de toxicidade, sugeriram a possibilidade dos metais de transição solúveis atuar como um dos fatores determinantes na injúria pulmonar produzida após exposição à ROFA. Além disso, segundo Samet et al.(1998), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) são produzidos por células epiteliais respiratórias quando desafiadas com ROFA.

Experimentos em animais instilados com ROFA têm demonstrado estresse oxidativo nos pulmões, que pode ser reproduzido com tratamento com Vanádio (KADIISKA et al, 1997). Além disso, a inalação ou instilação de concentrações equivalentes de ROFA provoca respostas inflamatórias semelhantes nos pulmões, o que mostra que a exposição dos animais por inalação ou por instilação podem ser utilizadas experimentalmente, uma vez que mostram resultados semelhantes (COSTA et al., 1998) e esta inflamação persiste por mais de 96 horas, além disso, a reversão acontece lentamente (PRITCHARD et al., 1996).

Biomassa

O Brasil é o maior produtor de cana – de – açúcar do mundo. Atualmente, 4,5 milhões de hectares do território nacional são utilizados para o plantio de cana, representando um por cento das terras cultiváveis ou o espaço equivalente a duas vezes o Estado do Piauí (EMBRAPA, 2004).

A queima deliberada ou acidental de vegetação e a fumaça gerada decorrente dessa queima, causam um impacto importante sobre a saúde das populações expostas. Esse impacto inclui aumento da mortalidade, das admissões hospitalares, das visitas à emergência e da utilização de medicamentos, devido a doenças respiratórias e cardiovasculares, além de diminuição da função pulmonar (WHO, 1999).

A combustão é um processo químico pelo qual um material reage rapidamente com o oxigênio do ar produzindo luz e calor intenso e, no caso da biomassa, faz-se em três estágios: ignição, combustão com chama e combustão com ausência de chama (ARBEX et al., 2004).

A incineração de biomassa (qualquer matéria de origem vegetal ou animal utilizada como fonte de energia) é a maior fonte doméstica de energia nos países em desenvolvimento (WHO, 2000). Cerca de 80% da combustão de biomassa ocorre nos trópicos. Ela é a maior fonte de produção de gases tóxicos,

material particulado e gases do efeito estufa no planeta (CRUTZEN; ANDRAE, 1990), influenciando química e fisicamente a atmosfera, produzindo espécies químicas que mudam significativamente o pH da água da chuva (LACAUX et al., 1992; LOSNO et al., 1991) e afetando o balanço térmico da atmosfera pela interferência na quantidade de radiação solar refletida para o espaço (WARD et al., 1992).

Vários estudos epidemiológicos mostraram associação entre o nível de poluição atmosférica e efeitos na imunidade dos indivíduos. Porém, apesar dos estudos experimentais com o intuito de propor um mecanismo imunológico para tais efeitos, não se pode afirmar ao certo qual ou quais as principais células e eventos imunes são os principais responsáveis por estes danos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito de ROFA e de Materiais Particulados provenientes da Queima de Biomassa na Resposta Imune Humoral de camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito *in vivo* de ROFA e de Materiais Particulados provenientes da Queima de Biomassa sobre os níveis de anticorpos séricos da classe IgG e IgM em camundongos.
- Avaliar o efeito *in vitro* de ROFA e de Materiais Particulados provenientes da Queima de Biomassa nas vias Clássica e Alternativa do complemento de camundongos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

Esta fase do experimento foi realizada em parceria com o Laboratório de Poluição Experimental (LPAE) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

3.1.1 Experimento com ROFA

Foram utilizados dois tipos de poluentes neste experimento. As partículas designadas de ROFA HU representam o MP obtido do incinerador movido por óleo diesel do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. As partículas denominadas ROFA SID representam MP retido no precipitador eletrostático instalado em uma grande siderúrgica no Brasil. Para controle do experimento, foi utilizada água destilada estéril.

Os elementos componentes das ROFA HU e SID foram determinados por Medeiros Júnior et al. (2004) pelo método ativação com *Nêutrons* e encontram-se na Tabela 1.

Tabela 2 – Concentrações dos elementos químicos nas ROFA SID e HU determinadas por análise da ativação de *Nêutrons* com as médias e correspondentes desvios padrões (Fe em percentagem).

Elemento Químico	ROFA HU	ROFA SID
As $\mu\text{g g}^{-1}$	9,3 \pm 10	61,0 \pm 1,0
Br $\mu\text{g g}^{-1}$	8,7 \pm 0,6	1482 \pm 19
Ce $\mu\text{g g}^{-1}$	51,1 \pm 0,4	16,3 \pm 0,3
Co $\mu\text{g g}^{-1}$	122,9 \pm 3,1	9,90 \pm 0,25
Cr $\mu\text{g g}^{-1}$	32,4 \pm 0,4	107,7 \pm 1,4
Fe (%)	3,28 \pm 0,07	44,6 \pm 0,1
La $\mu\text{g g}^{-1}$	972 \pm 12	10,3 \pm 0,1
Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	1977 \pm 14	3884 \pm 24
Rb $\mu\text{g g}^{-1}$	11,4 \pm 1,1	719,7 \pm 1,0
Sb $\mu\text{g g}^{-1}$	39,8 \pm 0,7	2,27 \pm 0,09
Se $\mu\text{g g}^{-1}$	20,5 \pm 0,2	154,4 \pm 0,8
V $\mu\text{g g}^{-1}$	1816 \pm 220	35 \pm 4
Zn $\mu\text{g g}^{-1}$	115,7 \pm 1,5	491,9 \pm 3,1

A ROFA HU apresentou altas concentrações de Ce, Co, La e V, enquanto que 44,6% da composição ROFA SID foi de Ferro.

Os outros elementos encontrados em alta concentração foram Br, Cr, Mn, Rb, Se e Zn. Quase todas as partículas tiveram diâmetros menores que 10 μm , sendo que a média e desvio padrão foram de 1,2 \pm 2,18 μm para ROFA HU e 1,2 \pm 2,24 μm para ROFA SID.

Aproximadamente 98% das ROFA HU e SID apresentaram diâmetros menores que 2,5 μm .

3.1.2 Experimentos com Partículas de Queima de Biomassa

Foram colhidas Partículas Totais em Suspensão na cidade de Araraquara no Sudeste do Brasil durante 497 dias; dentre os quais 175 dias não havia queima de cana-de-açúcar e 318 dias com queima de cana. A concentração diária das PTS ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) foram obtidas utilizando o equipamento *Handi-Vol*.

As partículas obtidas foram incubadas em estufa a 50 °C até que suas massas, após repetidas pesagens, ficasse constante em decorrência da eliminação de toda a água retida nos filtros. Com isto, foi possível determinação da massa do Material Particulado (MP) + massa do filtro (F). Uma vez que tínhamos a massa do filtro sem partícula (F), pode-se determinar a massa do MP, pela equação:

$$\text{Massa de MP + F} - \text{massa de F} = \text{a massa de MP ou PTS}$$

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Em cada um dos experimentos foram utilizados 30 camundongos suíços, machos, com peso entre 20-30 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina, os quais foram mantidos sob ambientalização no biotério setorial do Centro de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina, por 7 dias antes do início dos experimentos com água e ração comercial *ad libitum*. Os 30 animais foram distribuídos em 5 grupos (6 animais em cada grupo) e receberam tratamento com diferentes MP por instilação nasal, diariamente durante os 28 dias de experimento.

3.2.1 Experimento com ROFA

Grupo Controle - grupo exposto apenas à água destilada estéril

Grupo ROFA HU 1 - grupo exposto a 1 $\mu\text{g}/\text{dia}$ de ROFA HU

Grupo ROFA HU 10 - grupo exposto a 10 µg/dia de ROFA HU

Grupo ROFA SID 1 - grupo exposto a 1 µg/dia de ROFA SID

Grupo ROFA SID 10 - grupo exposto a 10 µg/dia de ROFA SID

3.2.2 Experimento com Partículas de Queima de Biomassa

Grupo Controle - grupo exposto apenas à água destilada estéril.

Grupo Queima 1 - grupo exposto a 1 µg/dia de partículas de queima de biomassa.

Grupo Queima 10 - grupo exposto a 10 µg/dia de partículas de queima de biomassa.

Grupo Não Queima 1 - grupo exposto a 1 µg/dia de MP provenientes de períodos sem queima biomassa.

Grupo Não Queima 10 - grupo exposto a 10 µg/dia de MP proveniente de períodos sem queima biomassa.

3.3 IMUNIZAÇÕES

Em ambos os experimentos os camundongos foram submetidos a três imunizações com antígeno (eritrócitos de carneiro 2%) via intraperitoneal (IP), nos dias 0, 7 e 14.

O antígeno inoculado foi preparado pela adição de eritrócitos de carneiro (lavadas três vezes com salina 0,85%) a solução de Tampão Fosfato-Salina (PBS) estéril, na concentração final de 2%. Foram inoculados 200µL desta suspensão em todos os camundongos.

3.4 PREPARO DAS SUSPENSÕES DE POLUENTES

Nos experimentos com ROFA HU e SID, as partículas foram preparadas segundo Medeiros Junior et al. (2004), tendo sido modificado o veículo descrito (salina), por água destilada. As partículas foram pesadas e diluídas em água destilada estéril, na concentração de 1 mg/mL. Para o experimento com partículas de queima de biomassa, o MP retido em filtros foram retiradas do filtro e diluído em água destilada estéril, na concentração de 1 mg/mL. Essas suspensões foram submetidas ao sonicador durante três tempos de 20 minutos, aliqüotadas em tubos do tipo *ependorf* e estocadas sob refrigeração. Para a concentração de 0,1 mg/mL, efetuou-se a diluição da solução estoque em mesmo veículo estéril. Antes das instilações diárias, as suspensões eram submetidas a vigorosas agitações.

Para os experimentos de avaliação de hemólise pelo sistema complemento, as concentrações de 1 µg/ µL e 10 µg/ µl das suspensões dos MP acima tiveram suas concentrações de NaCl alteradas para 0,85%.

3.5 ADMINISTRAÇÃO DOS POLUENTES

A administração do poluentes foi efetuada segundo a técnica descrita por Medeiros Junior et al. (2004) Foram administrados, com micropipeta, 10 µL das suspensões citadas no item 3.4 em uma das narinas do animal acordado, diariamente pelo período de 28 dias. Essa instilação provoca um reflexo de apnéia seguida de uma profunda inspiração que leva o líquido até os pulmões.

3.6 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO

Nos dois experimentos realizados as amostras de soros foram colhidas imediatamente antes à primeira imunização (dia 0), e nos dias 7, 14, 21 e

28 dos experimentos, tendo sido realizado no 28º dia, sangria total por punção cardíaca, com posterior sacrifício dos animais.

Para a obtenção dos soros, os animais foram anestesiados com éter etílico e 50 µL de sangue foi colhido pela veia caudal com imediata cauterização do local.

O sangue obtido foi centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos, o soro separado e armazenado a -20°C.

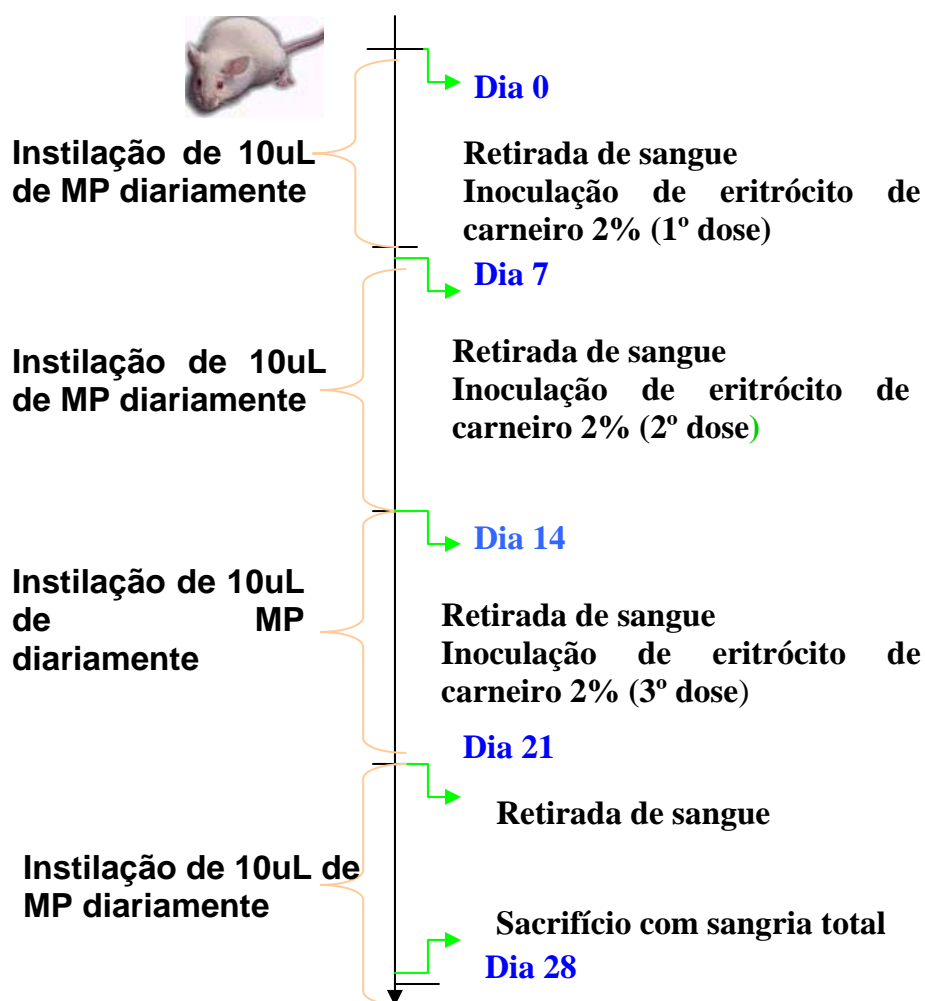


Figura 1 – Delineamento do experimento da avaliação do efeito de MP na resposta imune humoral (IgM e IgG) de camundongos imunizados com eritrócitos de carneiro.

3.7 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM MP PROVENIENTES DE POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA

3.7.1 Preparação do Antígeno de Membrana de Eritrócitos de Carneiro

A preparação do antígeno foi efetuada conforme a técnica descrita por Dodge et al. (1963) e modificada por Ladics (2006).

Foram colhidos, por punção venosa, 20 mL de sangue de carneiro em tubos plásticos contendo o mesmo volume da solução anticoagulante Alsever. O material foi incubado overnight a 4 °C e centrifugado por 15 minutos a 1000 g. O sobrenadante foi retirado e o precipitado, após três lavagens com salina 0,9%, foi ressuscitado em 32 mL de solução TRIS-HCl (0,15 M) com EDTA (0,1 mM, pH 7,6).

A suspensão foi novamente centrifugada a 4 °C por 30 minutos à 25000g. O precipitado obtido foi diluído em 38 mL do mesmo tampão, centrifugado e, esse processo foi repetido até que toda a hemoglobina visível fosse retirada. A solução sem hemoglobina visível obtida foi filtrada e novamente submetida à centrifugação, nas mesmas condições anteriores, sendo que este último pellet foi ressuscitado em solução SDS 0,1 %. Foram feitas alíquotas de 1 mL e estocadas à -20°C.

A concentração de proteínas foi dosada pelo método de Bradford (1976)

3.7.2 Ensaio de ELISA

Microplacas de poliestireno de 96 cavidades (COSTAR[®]) foram sensibilizadas com 100 µl do antígeno de membrana de eritrócitos de carneiro (1mg/mL) (item 3.7.1) em tampão Carbonato (pH 9,6) e incubadas a 4 °C durante 18 horas. As placas foram lavadas com solução de Tampão Fosfato Salina (PBS) -

Tween 20 % por três vezes e bloqueadas com 150 μ l de solução PBS - Leite desnatado 1 % por uma hora. A seguir as placas foram novamente lavadas com PBS - Tween e incubadas por 1 hora a 25 °C com os soros diluídos 1:100 em PBS-Leite 1%. Novas lavagens com PBS - Tween foram realizadas e adicionou-se 100 μ l de substrato, anti- IgG ou anti - IgM de camundongo e incubou-se por mais uma hora. O mesmo procedimento de lavagem foi realizado e em seguida 100 μ l de substrato (10 ml de tampão acetato de sódio 0,1 M; 100 μ l de peróxido de oxigênio e 100 μ l de Tetrametilbenzidina (TMBZ) foi incubado por quinze minutos, a reação foi bloqueada pela adição de 50 μ l de Ácido Sulfúrico 1N, sendo a absorbância determinada em *Multi-Skan* a 450nm.

3.7.3 Avaliação *in vitro* da Influência dos MP na Ativação do Sistema Complemento de Camundongos

Para avaliar a habilidade dos vários materiais particulados em ativar o sistema complemento de camundongos, foi obtido uma mistura de soros (sangria por punção cardíaca de 20 animais) de camundongos suíços não infectados. Os soros obtidos foram aliquotados e armazenados a -20°C até a realização do ensaio.

Para a avaliação da hemólise foram utilizadas suspensões de eritrócitos de carneiro (via clássica) e de coelho (via alternativa).nestes experimentos.

Para o preparo da suspensão de eritrócitos de carneiro foram colhidos, por punção venosa, 5 mL de sangue de carneiro em tubos plásticos contendo o mesmo volume da solução anticoagulante Alsever. O material foi incubado *overnight* a 4 °C e centrifugado por 15 minutos à 1000 g. Os eritrócitos do *pellet* foram lavados três vezes com tampão HEPES e após a centrifugação final, ressuspendidas no mesmo tampão na concentração final de 0,6%.

Para o preparo da suspensão de eritrócitos de coelho foram colhidos, por punção cardíaca, 5 mL de sangue de coelho em tubos plásticos contendo o mesmo volume da solução anticoagulante Alsever. O material foi incubado *overnight* a 4 °C e centrifugado por 15 minutos à 1000 g. Os eritrócitos do *pellet* foram lavados três vezes com Tampão HEPES Mg⁺²/EGTA após a

centrifugação final, ressuspendidas no mesmo tampão na concentração final de 0,6%.

3.7.3.1 Avaliação da ativação da via alternativa

Foram incubados 100 µl da mistura de soros de camundongos, com 10 µl da suspensão de 0,1 e 1 mg/mL das partículas (ROFA HU, ROFA SID, Queima e Não Queima de Biomassa), por 90 minutos a 37°C em microplacas de 96 cavidades de fundo chato. Adicionou-se em seguida, 50 µl da suspensão de eritrócitos de coelho 0,6%, seguido da adição de 50 µl do tampão diluente. As placas foram incubadas durante 90 minutos sendo o volume transferido para tubos tipo *ependorf*, os quais foram centrifugados à 2000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante transferido para placas de fundo chato para posterior leitura à 405 nm.

3.7.3.2 Avaliação da via clássica

Obtenção de Anticorpos Anti - hemácias de carneiro

Foram inoculados IP em camundongos suíços com peso entre 20-30g, 200 µl de suspensão estéril, de eritrócitos de carneiro 2% e obteve-se o soro desses animais seis dias após a inoculação. O soro obtido foi incubado a 50°C por 30 minutos para inativação do complemento.

Realização do Ensaio

Foram incubados 80 µl da mistura de soros de camundongos (item 3.7.3), com 10 µl da suspensão de 0,1 e 1 mg/mL das partículas (ROFA HU, ROFA SID, Queima e Não Queima de Biomassa), por 90 minutos a 37°C em microplacas de fundo chato de 96 cavidades. Adicionou-se em seguida, 50µl da suspensão de eritrócitos de carneiro 0,6% em Tampão Hapes e ainda 50 µl de anticorpo anti-eritrócitos de carneiro diluído 1/10 em mesmo tampão. As placas foram incubadas por 90 minutos e o volume transferido para tubos tipo *ependorf*, que foram

centrifugados a 2000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante transferido para placas de fundo chato para leitura a 405 nm.

Como controles foram utilizados os respectivos tampões e um segundo controle foi realizado com suspensão de partículas de grafite na concentração de 1mg/dL(nos mesmo volumes dos poluentes)

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As amostras foram analisadas estatisticamente pelo teste Tuckey sendo considerado significativo o resultado, quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A imunotoxicidade pode ser definida como os efeitos adversos de agentes ou produtos químicos no Sistema Imune (KAROL, 1998). Existem quatro tipos de efeitos adversos que podem ser imunomediados: imunossupressão, imunoestimulação, hipersensibilidade e autoimunidade (DESCOTES, 2006).

Diversos agentes têm sido associados com imunossupressão em animais, incluindo agentes químicos, bioaerossóis e agentes físicos como luz ultravioleta (SIPES et al., 1997). Imunoestimulação pode ser resultado de exposição química. Uma das mais importantes doenças alérgicas, no contexto da exposição ocupacional e ambiental, é a hipersensibilidade respiratória, que é causada por baixas concentrações de moléculas de baixa massa molecular e por altas concentrações de moléculas de alta massa molecular (GRAHAN et al., 1997).

Apesar da descrição de inúmeros modelos de ensaios toxicológicos empregados para a avaliação imunotoxicológica de elementos ou compostos químicos, não há um consenso do melhor ensaio a ser empregado. Vários fatores, entre eles as propriedades da própria substância, tamanho, solubilidade entre outros, devem ser levados em conta para a escolha do melhor ensaio a ser utilizado.

A análise imunotoxicológica da Resposta Imune Humoral geralmente é realizada por ensaio de Células Formadoras de Placa (PFC) que detecta Anticorpo IgM para eritrócitos de carneiro (SBRC). É um teste bastante sensível dentre os empregados para avaliar efeitos imunotoxicológicos em exposições a agentes químicos (TEMPLE et al., 1993).

Outro ensaio mais recentemente utilizado em análises imunotoxicológicas da Resposta Imune Humoral é o ELISA para detecção de anticorpos IgM contra eritrócitos de carneiro (LADICS, 2006).

Estudos com vários agentes químicos imunotóxicos demonstraram que ELISA para detecção de anticorpos IgM para hemácias foi pelo menos tão sensível quanto o método de PFC (TEMPLE et al., 1993; 1995).

O ensaio de ELISA, por outro lado, apresenta várias vantagens sobre o método de PFC. Pode ser processado em horas, enquanto PFC requer vários dias, além disso, ELISA diminui o número de animais empregados por estudo, uma vez que os animais não precisam ser sacrificados para a obtenção das

amostras de soro. As amostras de soro obtidas podem ser otimizadas e empregadas na dosagem de outras classes de anticorpos (JOHNSON et al., 2000) como é o caso desse trabalho, onde além de IgM, anticorpos da classe IgG também foram analisadas.

Todos os anos milhões de pessoas morrem ou sofrem sérios danos à saúde, causado pela poluição do ar. Fortes evidências epidemiológicas emergiram, especialmente na última década, demonstrando a associação entre a concentração de M.P. ambiental e o aumento da morbidade e mortalidade, os indivíduos portadores de doenças respiratórias (asma, e doenças obstrutivas crônicas), e aqueles portadores de doenças cardiovasculares são especialmente atingidos (ARBEX et al, 2004).

Apesar do aumento de estudos a respeito dos efeitos desses poluentes à saúde, os verdadeiros mecanismos biológicos envolvidos ainda não estão bem definidos, não está esclarecido quais características e componentes dos poluentes são os responsáveis por seus efeitos tóxicos ao organismo, o que mostra a importância de trabalhos nesta área (MUDWAY et al, 2004; OLIVEIRA et al, 2006).

As duas classes de imunoglobulinas componentes da Resposta Imune avaliadas neste trabalho são moléculas de grande importância na defesa aos variados antígenos, e por este motivo foram escolhidas. Os anticorpos da classe IgM são os que aparecem no início da resposta imune humoral, e tendem a apresentar níveis mais elevados nas primeiras semanas após o contato com os antígenos. As imunoglobulinas da classe IgG, aparecem mais tardiamente em relação as IgM, e têm seus títulos mais elevados após as primeiras semana de contato com o antígeno.

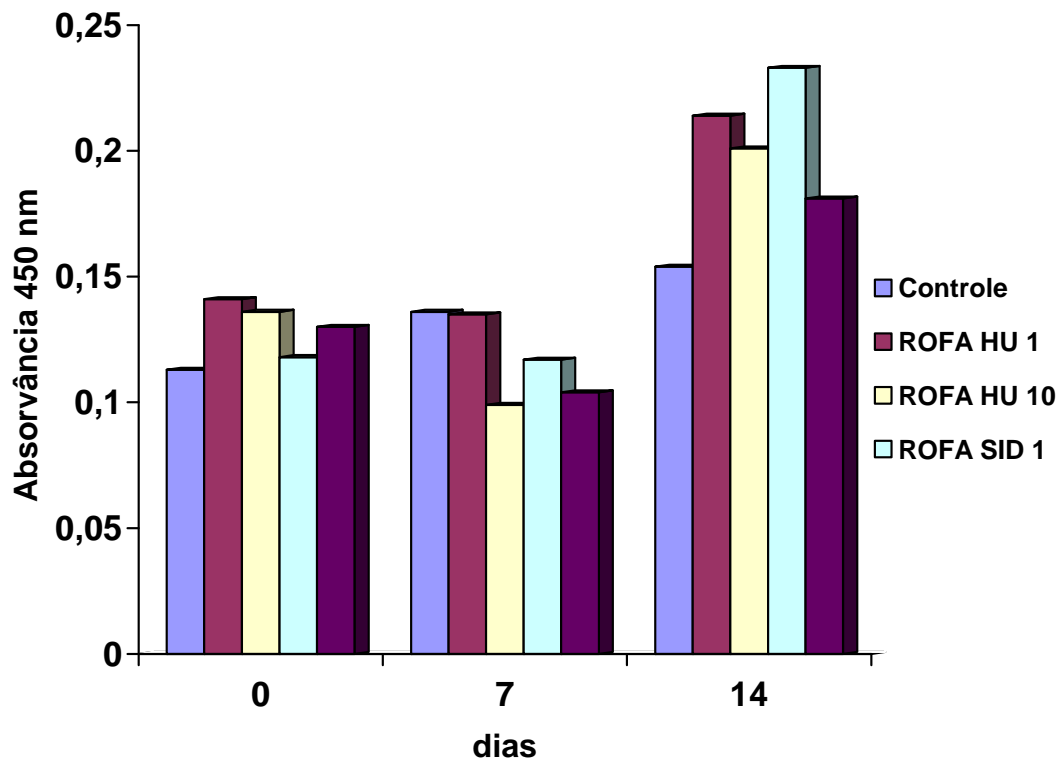


Gráfico 3 – Perfil da Resposta Imune - Níveis de Anticorpos da classe IgM em soros de camundongos expostos e não expostos *in vivo* a ROFA HU e SID, detectados pelo Método de ELISA .

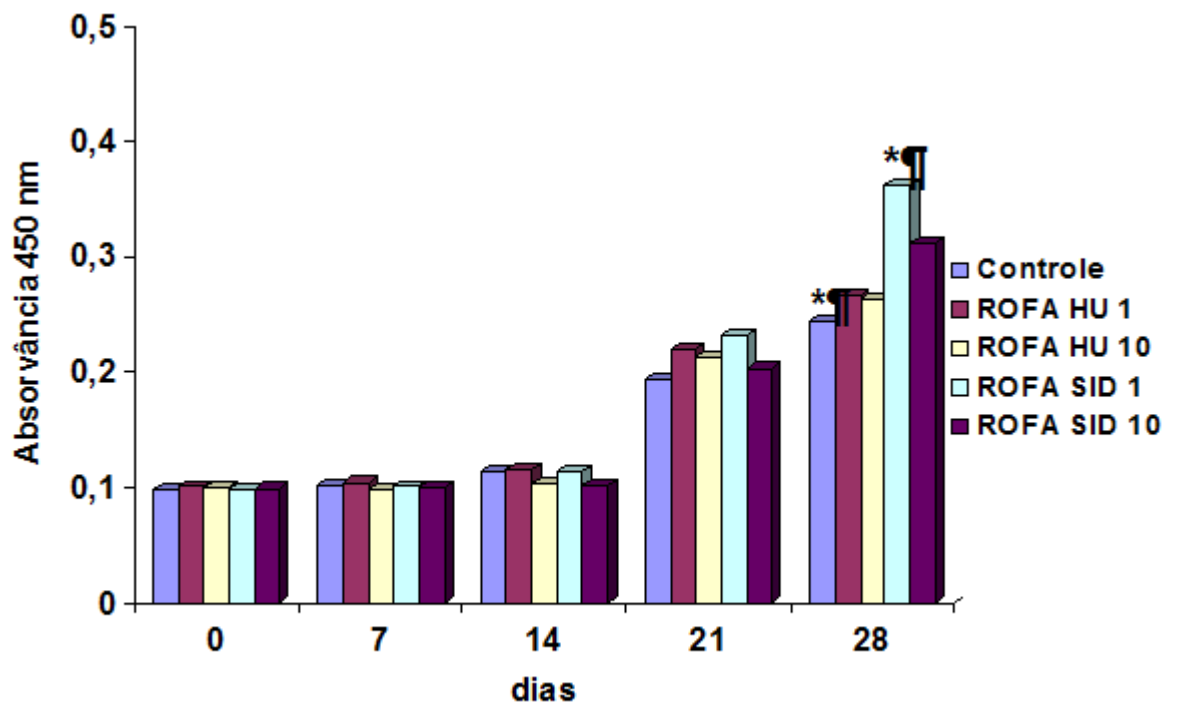


Gráfico 4 – Perfil da Resposta Imune - Níveis de Anticorpos da classe IgG classe em soros de camundongos expostos e não expostos *in vivo* a ROFA HU e SID, detectados pelo Método de ELISA .

Os resultados obtidos mostram que nos grupos de camundongos expostos a ROFA não houve diferenças significativas estatisticamente entre os animais do grupo controle e os tratados com M.P., embora tenha sido observado uma tendência dos grupos HU e SID, em ambas as doses, a apresentarem níveis mais elevados de imunoglobulinas da classe IgM em relação ao grupo controle (figura 1).

A figura 2 mostra a resposta imune produzida por camundongos imunizados com eritrócitos de carneiro e expostos por 28 dias a ROFA. A partir do 14º dia há um aumento nos níveis de anticorpos da classe IgG. Esta imunestimulação foi significativa estatisticamente, no grupo de animais expostos a ROFA SID 1µg em relação ao grupo de animais não expostos a MP, no 28º dia de experimento (figura 2).

Foi verificado ainda, uma tendência em todos os grupos expostos a ROFA a apresentarem maiores níveis destes anticorpos em relação ao grupo controle (figura 2).

Estes dados estão de acordo com Leonardi et al (2000), que relataram aumento de linfócitos B (dosados por citometria de fluxo) bem como de IgG total em crianças de 9 a 11 anos, expostas a MP na Bulgária, República Tcheca, Hungria, Polônia, Romênia e Eslováquia.

Winkler et al. (1996) também relataram aumento nos níveis plasmáticos de anticorpos da classe IgG no soro de mulheres que habitavam ambientes poluídos na Alemanha, quando comparadas a mulheres que habitavam áreas não poluídas.

Considerando-se que em nosso trabalho o tempo de exposição e as doses utilizadas para as duas ROFA foram iguais, os resultados de diferentes níveis de anticorpos obtidos, sugerem que a composição e a origem da ROFA são fatores importantes no efeito destes materiais na resposta imune humoral.

Outros trabalhos mostram que a composição das partículas, incluindo a acidez e os metais de transição, o conteúdo de hidrocarbonetos além da biodisponibilização destes tóxicos, são fatores considerados importantes na determinação da atividade biológica das partículas.(MUDNAY et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005).

Os dados aqui obtidos sugerem que há uma imunoestimulação provocada pelas partículas provavelmente, desviando para uma Resposta tipo TH₂. Porém, ensaios com dosagens de citocinas ou subclasses de IgG são necessários para avaliar o perfil de resposta predominante.

No Brasil, a utilização de álcool hidratado como combustível de veículos automotores, ou mistura álcool/gasolina, trouxe benefícios para o meio ambiente e para a saúde da população. Porém, esse aumento na utilização do álcool provocou um substancial aumento da área utilizada para cultivo de cana-de-açúcar no Brasil. Nas regiões em que há cultivo e colheita de cana, a qualidade do ar foi prejudicada devido o aumento na quantidade de cana queimada, o que gera aumento de poluentes atmosféricos (ARBEX et al., 2004; DUCLOS, 1990).

Estudos a respeito do efeito de materiais particulados provenientes da queima de biomassa no sistema imune são escassos. No Brasil, onde esta cultura agrícola apresenta grande importância ambiental e econômica, estudos sobre os possíveis impactos na saúde de indivíduos frequentemente expostos a esses materiais são de fundamental importância.

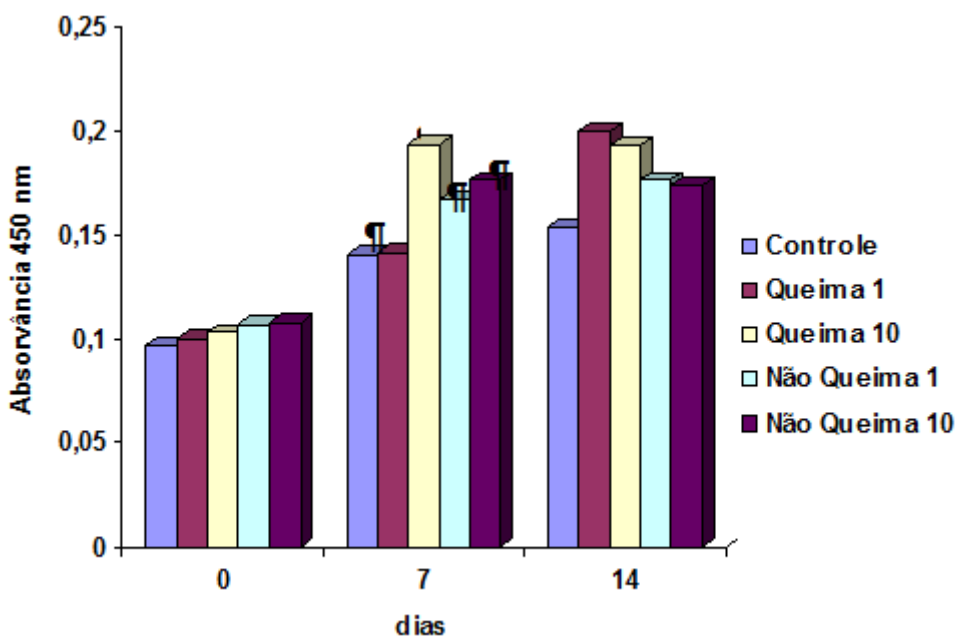


Gráfico 5 – Perfil da Resposta Imune - Níveis de Anticorpos da classe IgM em soros de camundongos expostos *in vivo* a partículas de queima e não-queima de biomassa detectados pelo Método de ELISA.

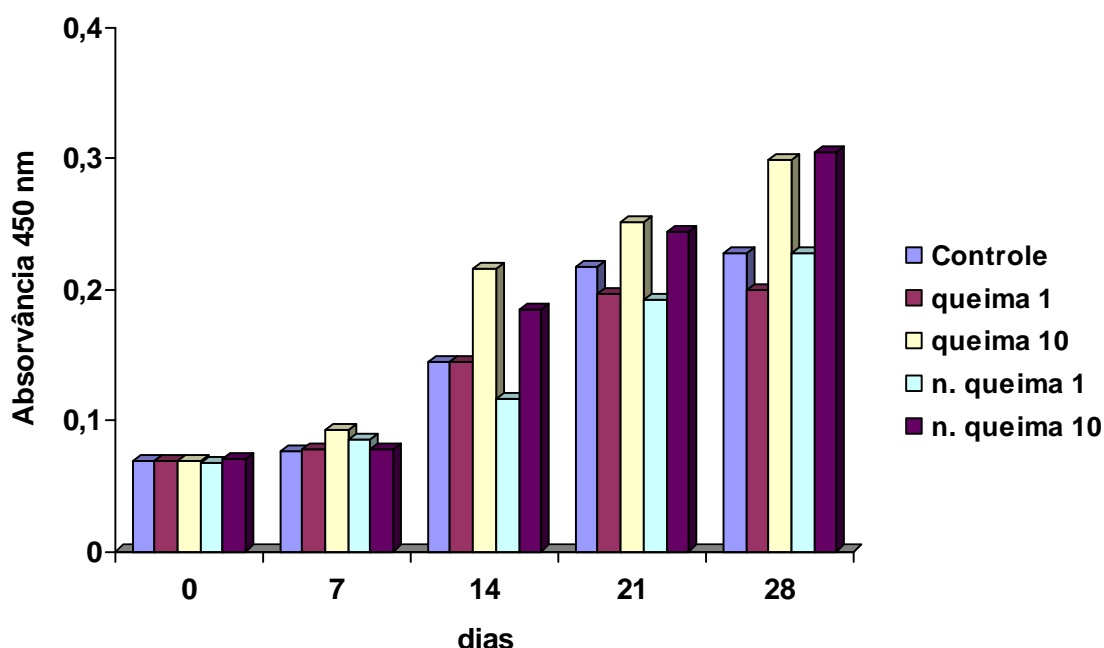


Gráfico 6 – Perfil da Resposta Imune – Níveis de Anticorpos da classe IgG em soros de camundongos expostos *in vivo* a partículas de queima e não- queima de biomassa detectados pelo Método de ELISA.

Os resultados obtidos mostram que nos grupos de camundongos expostos a partículas de queima de biomassa não houve diferenças significativas estatisticamente nos níveis de anticorpos destes animais em relação ao grupo controle, embora tenha sido observado uma tendência a maiores níveis de IgM em todos os grupos expostos aos M.P. quando comparado ao grupo não exposto (figura 3). Esta tendência também pode ser visualizada nos níveis de imunoglobulinas da classe IgG, nos grupos expostos a maiores doses de MP (figura 4).

Estes dados sugerem que os efeitos na saúde provenientes da queima de cana-de-açúcar podem permanecer mesmo após os períodos de combustão. E que a queima de biomassa é pelo menos tão tóxica quanto o M.P. emitido por empresas da

Considerando que o sistema complemento é um dos principais mecanismos efetores do sistema imune (KIRSCHFINK; MOLLNES, 2003), neste trabalho avaliou-se o efeito dos diferentes materiais particulados no sistema complemento de camundongos.

O efeito dos MP no sistema complemento foi avaliado por meio de incubações dos materiais de queima de biomassa e de ROFA SID e ROFA HU, com soros de camundongos. A percentagem de hemólise dos eritrócitos em cada grupo foi calculada e comparada com a hemólise obtida no grupo controle.

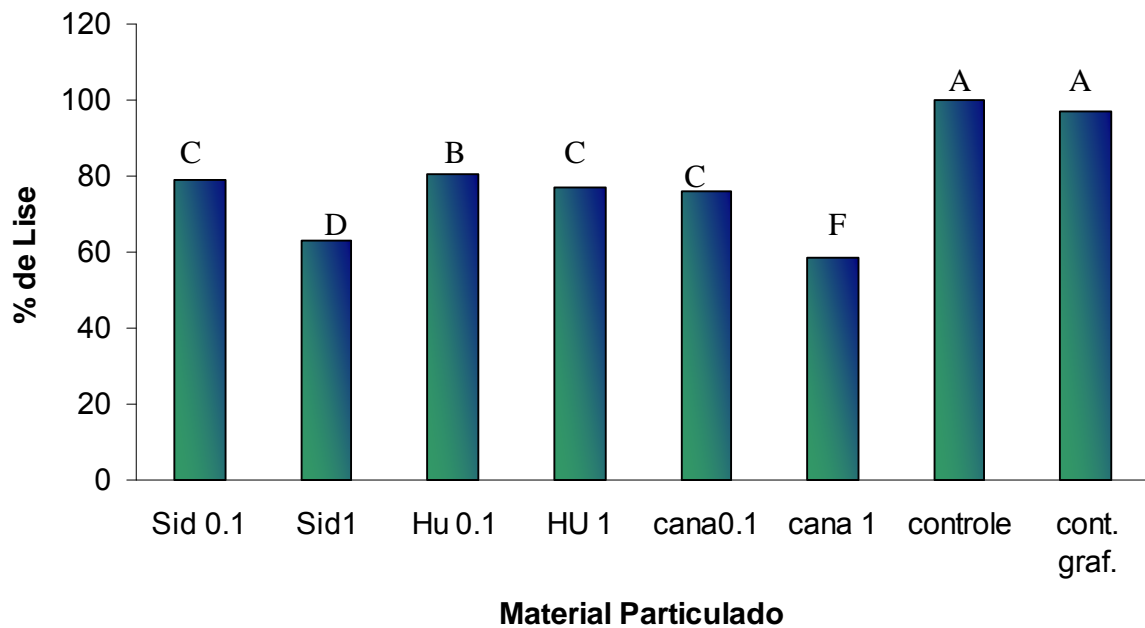


Gráfico 7 – Análise da Via Clássica do sistema complemento em soros de camundongos expostos *in vitro* a materiais particulados.

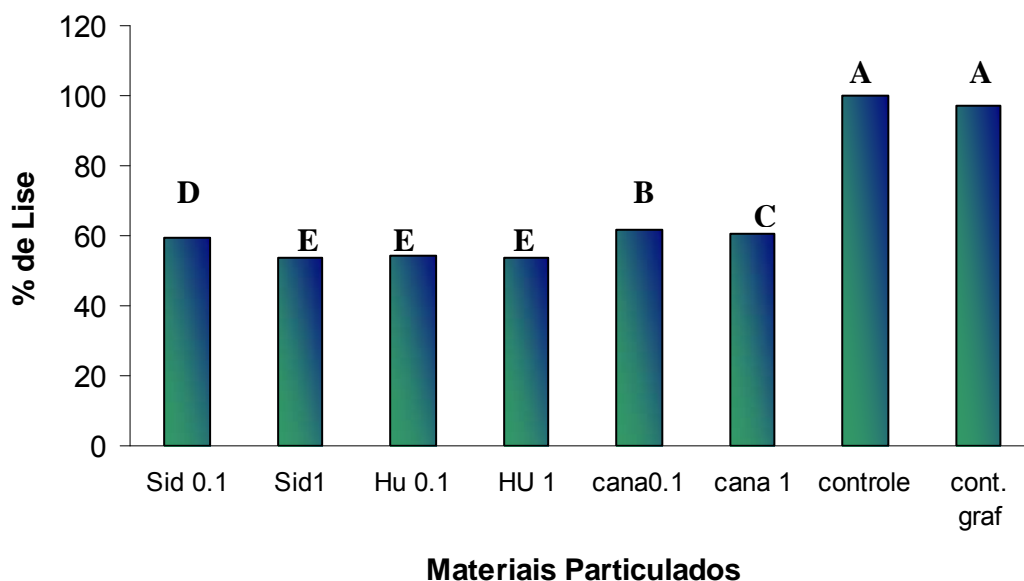


Gráfico 8 – Análise da Via Alternativa do sistema complemento em soros de camundongos expostos *in vitro* a materiais particulados.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as partículas provenientes de queima de biomassa, ROFA SID e ROFA HU são capazes de ativar a cascata do complemento tanto pela via clássica quanto pela via alternativa, uma vez que houve diminuição significativa na lise dos eritrócitos em todos os grupos expostos aos poluentes quando comparado ao controle sem partículas (figuras 5 e 6) e ao controle com partículas de carbono.

Estes dados estão de acordo com trabalhos em crianças no Japão (SHIMA et al., 1999) e adultos (HADNAGY et al., 1996), que mostram que indivíduos expostos a poluição atmosférica podem apresentar aumentos nas concentrações séricas de produtos da ativação do complemento.

Winkler et al (1996), na Alemanha, obteve valores de percentagem de componentes do sistema complemento acima dos normais no soro, comparando populações de mulheres de ambientes poluídos com não poluídos.

Trabalhos com MP provenientes de fumaça de cigarro e também com partículas de combustão de diesel, mostraram que esses materiais ativam a via alternativa do complemento (ROBBINS et al., 1991; KANIMITSU et al., 1998).

Os dados apresentados na Figura 5 mostram que a diminuição provocada na lise de eritrócitos do carneiro pela via clássica do complemento, pode

ser dose dependente, uma vez que as maiores doses de MP apresentaram menores percentagens de lise.

Na Via Alternativa (figura 6), a diminuição na hemólise obtida, não foi dose dependente nos grupos expostos as partículas provenientes da queima de biomassa e HU, uma vez que não houve diferenças significativas estatisticamente entre as doses testadas destes grupos. Apenas os grupos expostos às partículas ROFA SID mostraram diminuição dose dependente de hemólise (figura 6).

Estes dados estão de acordo com Beukelman et al. (1986) que mostraram que a atividade do complemento sofre depressão dose-dependente em camundongos expostos a partículas de poeira doméstica na via clássica porém não na via alternativa do complemento

Considerando a frequência com que indivíduos podem estar expostos a MP proveniente de grandes centros urbanos e industriais, ou ainda a MP oriundos de áreas de queima de biomassa é importante que estudos a respeito dos efeitos induzidos por poluentes no sistema imune sejam realizados.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que os MPs avaliados podem interferir na resposta imune humoral de camundongo.

O impacto de poluentes do ar no sistema imune continuará a ser estudado em nosso laboratório em busca dos possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos observados neste estudo.

5 CONCLUSÕES

- ROFA proveniente da siderúrgica induziu aumento nos níveis de anticorpos da classe IgG em camundongos expostos por mais de 21 dias a estes materiais.
- Os materiais particulados provenientes da queima de biomassa bem como ROFA ativam o sistema complemento pelas Vias Clássicas e Alternativas.
- A ativação das Vias Clássicas e Alternativas do complemento foram dose dependentes nos animais expostos a materiais particulados provenientes da queima de biomassa e ROFA (exceto pela ROFA HU na via alternativa).

REFERÊNCIAS

AMARANTE, A. P. C. **Associação entre M.P. atmosférico e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e sintomas respiratórios em pacientes com asma brônquica na cidade de São Paulo** – Tese - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2003.

AUSSET, P. et al. Présence constante de cendres volantes industrielles dans les croûtes noires d'altération superficielles de monuments français em calcaire compact. **Acad. Sci.**, v.318, n.2, p.493-499, 1994.

ARBEX, M. A.; CANÇADO, J. E. D.; PEREIRA, L. A. A. Queima de biomassa e efeitos na saúde. **J.Bras Pneumol.**, v.30, n.2, p.158-175, 2004.

BELL, M. L.; SAMET, J. M.; DOMINICI, F. Time-series studies of particulate matter. **Annu Rev Public Health.**, v.25, p.247-280, 2004.

BERUBE, K. A; JONES, T. P.; WILLIAMSON, B. J. et al Physicochemical characterisation of diesel exhaust particles: Factors for assessing biological activity. **Atmospheric Environment.**, v.33, p.1599-1614, 1999.

BEUKELMAN, C. J. et al. House dust allergen activates the classical Complement pathway in mouse serum **Imunology Letters.**, v.13, p.159-164, 1986.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.

BYRNE, A. R.; KOSTA, L. Vanadium in foods and in human body fluids and tissues. **Sci Total Environ.**, v.10, p.17-30, 1978.

CARNELLEY, T.; LE, C. **Correlation between chemical characteristics and biological reactivity of particulate matter in ambient air**. Edimonton: Division Alberta, 2001.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). Secretaria do Estado do Meio Ambiente. **Relatório de qualidade do ar do estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, 2005. Disponível em: <url:http://www.cetesb.sp.gov.br>.

COSTA, D. L. et al. Pulmonary Toxicity of residual oil fly ash in the rat: inhalation versus intratracheal installation. **Toxicol Sci.**, v.42, p.404, 1998.

CRUTZEN, P. J.; ANDREAE, M.O. Biomass burning in the tropics; impacts on atmospheric chemistry and biogeochemical cycles. **Science**, v.250, p.1669-78, 1990.

DESCOTES, J. Methods of evaluating immunotoxicity Expert Opinion on Drug **Metabolism & Toxicology**, v.2, n.2, p.249-259, 2006.

DODGE, J. T.; MITCHELL, C.; HANAHAN, D. J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. **Arch Biochem.**, v.100, p.119-130, 1963.

DREHER, K. L. et al. Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury. **J.Toxicol Environ Health**, v.50, n.285-305, 1997.

DUCLOS, P.; SANDERSON, L. M.; LIPSETT, M. The 1987 Forest Fire Disaster in California: assessment of emergency room visits. **Environ Health.**, v.45, p.53-8.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Agroecologia da cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://www.cana.cnpm.embrapa.br/agroeco.html>>. Acesso em: 8 jan. 2004.

FITZGERALD, J. W. Marine aerosols: a review. **Atmos.Environ.**, v.25, p.533-545, 1991.

FUJIEDA, S.; SANCHEZ, D. D.; SAXON A. Combined Nasal Challenge with Diesel Exhaust Particles and Allergen Induces *In Vivo* IgE Isotype Switching. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.**, v.19, n.3, p.507-512, 1998

GAVETT, S. H. et al. Metal and sulfate composition of residual oil fly ash determines airway hyperreactivity and lung injury in rats., **Environ Res**, v.72, p.162-172, 1997.

GHIO, A. J. et al. Biologic effects of oil fly ash., **Environ. Health Perspectives**, v.110, n.1, p.89-94, 2002.

GRAHAM, C.; ROSENKRANZ, H. S.; KAROL, M. H. Structure-activity model of chemicals that cause human respiratory sensitization. **Regul Toxicol Pharmacol.**, v.26, p.296-306, 1997.

HADNAGY, W.; R. Stiller-Winkler; H. Idel. Immunological alterations in sera of persons living in areas with different air pollution. **Toxicol. Lett.**, v.88, p.147-153, 1996.

HANAHAN, D.J.; Ekholm, J.E. The preparation of red cell ghosts (membranes). *Methods in Enzymology*; **Biomembranes.**, v.31, p.168-172, 1974.

HARDER, S.D. et al. Inhalation of PM_{2.5} does not modulate host defense or immune parameters in blood or lung of normal human subjects. **Environ Health Perspect.**, v.109, p.599-604, 2001.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ (IAP). **Relatório anual da qualidade do ar de Curitiba e Região Metropolitana**, 2005. Disponível em: <<http://www.pr.gov.br/meioambiente/iap>>.

JOHNSON, C. W.; WILLIAMS, C. B.; COPELAND, M. J. Sensitivity of the SRBC PFC assay versus ELISA for detection of immunosuppression by TCDD and TCDD-like congeners. **Toxicology**, v.156, p.1-11, 2000.

KADIISKA; M. B. et al. In vivo evidence of free radical formation in the rat lung after exposure to an emission source air pollution particle. **Chem Res Toxicol.**, v.10, p.1104-1108, 1997.

KANIMITSU, H. et al. Complement activation by diesel exhaust particles (DEP). **Biol.Pharm.Bull.**, v.21, p.129-132, 1998.

KAROL, M. H. Target organs and system: methodologies to asses. **Imune System.**, v.106, p.533-540, 1998.

KIRSCHFINK, M.; MOLLNES, T. E. Modern complement analysis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.**, v.10, p.982-989, 2003.

KODAVANTI, U. P. et al. Pulmonary responses to oil fly ash particles in the rat differ by virtue of their specific soluble metals. **Toxicol Sci.**, v.43, p.204-212, 1998.

LACAUX, J. P.; LOEMBA-NDEMBI, J.; LEFEIVERE, B. Biogenic emissions and biomass burning influences on the chemistry of the fogwater and stratiform precipitations in the African equatorial Forest. **Atmospheric Environment.**, v.26, p.541-51, 1992.

LADICS, G. S. Use of SRBC antibody response for immunotoxicity testing. **Methods**, v.41, p.9-19, 2006.

LEONARDI, G. S.; HOUTHUIJS, D.; STEERENBRG, P. A. Immune biomarkers in relation to exposure to particulate matter: a cross-sectional survey in 17 cities of Central Europe. **Inhalation Toxicology**, v.12, p.1-14, 2000.

LOSNO, R. et al. Major ions in marine rainwater with attention to sources of alkaline and acidic species. **Atmospheric Environment**, v.25, p.763-70, 1991

LUSTER, M. I. et al. Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity. **Fund. Appl. Toxicol.**, v.10, p.2-19, 1988

MACCHIONE, M. et al. Acute effects of inhalable particles on the frog palate mucociliary epithelium. **Environ Health Perspect.**, v.107, n.10, p.829–833, 1999.

MACCHIONE, M. et al. Methods for studying respiratory mucus and mucus clearance. **Br. J. Med. Biol. Res.**, v.28, p.1347-1355, 1995.

MEDEIROS JUNIOR, N. et al. Acute pulmonary and hematological effects of two types of particle surrogates are influenced by their elemental composition. **Env. Research.**, v.95, p.62-70, 2004.

MIYABARA, Y. et al. Murine strain differences in airway inflammation caused by diesel exhaust particles. **Eur. Respir. J.**, v.11, p.291-298, 1998.

MUDWAY, I. S. et al. An in vitro and in vivo investigation of the effects of diesel exhaust on human airway lining fluid antioxidants. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v.423, p.200-212., 2004

NEMMAR, A.; HOET, P., et al. Diesel exhaust particles in lung acutely enhance experimental peripheral thrombosis. **Circulation**, v.107, n.8, p.1202-1208, 2003.

OHTOSHI, T.; TAKIZAWA H.; OKAZAKI H. et al. Diesel exhaust particles stimulate human airway epithelial cells to produce cytokines relevant to airway inflammation in vitro. **J Allergy Clin Immunol.**, v.101, p.778-85, 1998.

OLIVEIRA, R. C. et al. Anti-oxidants reduce the acute adverse effects of Residual oil fly ash on the frog palate mucociliary epithelium. **Environmental Research.**, v.98, p.349-354, 2005.

POPE, C. A. et al Lung cancer, cardiopulmonary mortality and long term exposure to fine particulate air pollution. **JAMA**, v.2897, p.1132-1141, 2002.

PRITCHARD, R. J. et al. Oxidant generation and lung injury after particulate air pollution exposure increase with the concentrations of associated metals. **Inhal Toxicol.**, v.8, p.457-477, 1996.

RENDALL, R. E. G.; PHILLIPS, J. I.; RENTON, K. A. Death following exposure to fine particulate Nickel from a metal arc process. **Ann Occup. Hyg.**, v.38, n.6, p. 921-930, 1994.

RICHTER, J. H.; HUGHES H.G. Marine atmospheric effects on electro-optical systems performance. **Optical Engineering.**, v.30, n.11, p.1804-1820, 1991.

ROBBINS, R. A. et al. Complement activation by cigarette smoke. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol.**, v.260, p.254-259, 1991.

ROCHA, F. M. N **Relação da poluição atmosférica com a citologia nasal em pacientes com rinite alérgica, residentes na cidade de São Paulo, nas diferentes estações do ano.** 2005. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SALDIVA, P. H. N. et al. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. **Environ. Res.**, v.57, p.19-33, 1992.

SALDIVA, P. H. N. et al Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo, Brazil: a preliminary report. **Environ. Res.**, v.65, p.218.-225, 1994.

SALVI, S. et al Acute Inflammatory Responses in the Airways and Peripheral Blood After Short-Term Exposure to Diesel Exhaust in Healthy Human Volunteers **Am J Respir Crit Care Med.**, v.159, p.702-709, 1999.

SAMET, J. M. et al Activation of MAPKs inhuman bronchial epithelial cells exposed to metals. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v.19, p.551-558, 1998.

SEATON, A. et al. Particulate air pollution and acute health effects. **Lancet.**, v.345, p.176-178, 1995.

SHIMA, M. et al. Serum complement levels in children in communities with different levels of air pollution in Japan. **Arch. Environ. Health.**, v.54, p.264-270, 1999.

SIPES, I. G. et al. **Comprehensive toxicology. toxicology of the immune system.** Oxford: Pergamon, 1997.

STENFORS, N. et al. Different airway inflammatory responses in asthmatic and healthy humans exposed to diesel. **European Respiratory Journal.**, v.23, p.82-86, 2004.

TEMPLE, L. et al. Comparison of ELISA and plaque forming cell assay (PFC) for measuring the response to SRBC in rats and mice treated with benzo(a)pyrene or cyclophosphamide. **Fund.Appl. Toxicol.**, v.21, p.412-419, 1993

TEMPLE, L. et al. ELISA to measure SRBC-specific IgM: method and data evaluation. **Methods in Immunotoxicology**, v.2, p.137-157, 1995.

TREVINO, R. J. Air pollution and its effect on the upper respiratory tract and on allergic rhinosinusitis. **Otolaryngol Head Neck Surg.** v.114, n.2, p.239-41, 1996

U.N.ENVIRONMENT PROGRAM AND WORLD HEALTH ORGANIZATION. Air pollution in the World's megacities: **A report from UN Environment Programme and WHO Environment.**, v.36, p.5-37.

WARNER, A; SALATHÉ, M.; O' RIORDAN, T. G. Mucocilliary clearance in the airways. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.154, p.1868-1962, 1996.

WARD, D. E. et al. Smoke and fire characteristics for cerrado and deforestation burns in Brazil - Base-B Experiment. **Journal of Geophysical Research.**, v.97, p.14601-19, 1992.

WINKLER-STILLER, R.; IDEL, H.; LENG, G. Influence of air pollution on Humoral Immune Response. **J.Clin Epidemiol.**, v.49, n.5, p.527-534, 1996.