

©Copyright, 2006. Todos os direitos são reservados. Será permitida a reprodução integral ou parcial dos artigos, ocasião em que deverá ser observada a obrigatoriedade de indicação da propriedade dos seus direitos autorais pela INTERFACEHS, com a citação completa da fonte. Em caso de dúvidas, consulte a secretaria: interfacehs@interfacehs.com.br

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR PARTÍCULAS DO AR AMBIENTE COM *ESCHERICHIA COLI* ABRIGANDO UMA FUSÃO *katG':lacZ*

Mariangela Macchione PhD ¹ ; Paulo Hilário Nascimento Saldiva PhD ² ; Beatriz González-Flecha PhD ³

¹ PhD, Molecular and Integrative Physiological Sciences, Department of Environmental Health, Harvard School of Public Health, Boston, MA 02115; Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, Faculdade de Medicina da USP – Av. Dr. Arnaldo 455. 01246-903 São Paulo – SP – Brasil. mmacchione@lim05.fm.usp.br.

² PhD, Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, Faculdade de Medicina da USP.

³ PhD, Molecular and Integrative Physiological Sciences, Department of Environmental Health, Harvard School of Public Health, Boston, MA 02115.

RESUMO

Graças à sua habilidade para sentir e responder aos aumentos intracelulares nos peróxidos ou ânions superóxido, a bactéria tem sido considerada um biossensor específico, potencialmente útil para detectar mudanças em níveis de oxidantes do meio ambiente. O presente estudo testa o possível uso de *Escherichia coli* abrigando um gene repórter *katG':lacZ* como sensor de aumentos de peróxido de hidrogênio por partículas aéreas urbanas (UAP). Essa cepa abriga a fusão *katG':lacZ* dentro do ADN cromossômico e conseqüentemente expressa β-galactosidase abaixo de um controle de um promotor de catalase hidroperoxidase (*katG*). *katG* é um membro do regulon OxyR, isto é, ele é regulado transcricionalmente em resposta ao aumento no peróxido de

hidrogênio. Nossos dados mostraram que mudanças no peróxido de hidrogênio intracelular induzido por relevantes concentrações de partículas do ar urbano estão abaixo dos níveis requeridos para detecção pelo OxyR. Entretanto, cotratamentos com partículas (100 µg/ml) e peróxido de hidrogênio (75 µM) levaram a uma significativa ativação de OxyR, resposta dependente (17%) ($p < 0,001$, comparado com H₂O₂ sozinho), sugerindo um importante papel de metal catalisando reação de Fenton no mecanismo de produção de peróxido de hidrogênio por partículas do ar ambiente.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; H₂O₂; partículas aéreas urbanas; metal; OxyR; biossensores.

Níveis ambientais de partículas urbanas têm sido consistentemente associados ao aumento da morbidade (ATKINSON et al., 1999; SCHWELA, 2000) e mortalidade (LADEN et al., 2007; ELLIOTT et al., 2007; RUIZ-GODOY et al., 2007; KAISER, 2000) em doenças respiratórias e cardiovasculares. Além disso, recentes evidências apontam que a exposição a partículas desencadeia inflamação respiratória e sistêmica (GODLESKI, 2006), tanto quanto mudanças no tono vascular (MARTINS et al., 2006; BROOK et al., 2004). Por causa da complexidade química do aerossol urbano, ainda não se tem uma determinação precisa dos mecanismos patogênicos das partículas associadas aos efeitos adversos na saúde.

O material particulado (PM) exibe propriedades oxidantes que podem causar dano tecidual e celular (TAO; GONZÁLEZ-FLECHA; KOBZIK, 2003). A capacidade oxidativa do PM tem sido atribuída à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) dentro da célula através de reações tipo Fenton catalisada por metais e também quinonas que sofrem reações redox presentes na superfície do PM (STOHS; BAGCHI, 1995). Um recente estudo do nosso laboratório conseguiu evidenciar que a inalação com PM de fato aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) intracelulares *in vivo* (GURGUEIRA et al., 2002).

A habilidade de diferentes PM em produzir ERO e a resposta biológica que essas partículas produzem variam consideravelmente dependendo da composição e das características físicas das partículas, e, em menor escala, da massa total das partículas (GURGUEIRA et al., 2002; GODLESKI et al., 2002). Vários métodos têm sido desenvolvidos para medir a capacidade oxidante de amostras de PM em uma tentativa de promover e estimar o potencial de diferentes amostras de PM e identificar respostas oxidantes mediadas por ERO em sistemas biológicos. Aust e colaboradores (AUST et al., 2002) propuseram um ensaio celular *in vitro* para quantificar a produção de ERO através de metais de transição e assim determinar o potencial de PM gerar ERO, baseado na detecção espectrofotométrica de metal de transição catalisando produção de radical hidroxil (AUST et al., 2002). Sugerimos uma estratégia que consiste em utilizar um

bioensaio enzimático que poderia ser usado para acessar o potencial das partículas para gerar ERO (HATZIS et al., 2006), com base em achados indicando que diferentes composições inibem Cu/Zn superóxido dismutase, Mn superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione reductase *in vitro* e que os modelos de inibição formam enzimas e partículas específicas. Entretanto, ambos os ensaios podem subestimar a habilidade de PM gerar ERO por mecanismos outros que reação tipo Fenton ou interações diretas entre proteínas e PM que também ocorrem em sistemas celulares.

As bactérias estão envolvidas com a resposta genética específica no intuito de adaptar-se a mudanças nos níveis de oxidantes no seu meio ambiente. A proteína OxyR (34 kDa) é um sensor redox e regulador transcricional codificado pela *oxyR* (AUST et al., 2002). O *locus oxyR* foi identificado na *E. coli* (CHRISTMAN et al., 1985) como o sítio de mutação que confere aumento de resistência ao H₂O₂ hidroperóxidos orgânicos, mas para nenhum ânion superóxido gerado no sistema. A proteína reguladora *oxyR* inclui catalase-hidroperoxidase I (HP-I), o produto do gene *katG* uma alquilhidroperoxidase reductase, glutathione reductase, e Dps uma proteína ligada ao ADN (CHRISTMAN et al., 1985; ALTUVIA et al., 1994). A habilidade de OxyR acessar mudanças nos níveis de H₂O₂ *in vivo* tem sido mostrada em estudos que seguem a expressão da *oxyR* regulando o gene *katG* (codificando catalase-hidroperoxidase I) após o tratamento com H₂O₂. A expressão do gene foi monitorada pela medida de níveis de ARNm ou atividade de β-galactosidase da fusão do operon *katG':lacZ* usado como um sistema “repórter”.

A ideia do uso da bactéria como biossensor peróxido sensível já foi explorada anteriormente (BELKIN et al., 1996). Esses autores mostraram uma modesta porém promissora resposta ao fumo de cigarro e etanol em *E. coli* abrigando uma fusão *katG':luxA,B* (BELKIN et al., 1996). Nós argumentamos que a bactéria carregando o “repórter” *katG':lacZ* poderia ser usada para testar a hipótese de que PM tem habilidade para aumentar oxidantes intracelulares e especificamente quantificar aumentos de H₂O₂ intracelular induzido por PM.

Escolhemos a cepa BGF931 porque ela abriga uma simples cópia do “repórter” em seu cromossomo e conseqüentemente seleciona a atividade basal da β -galactosidase que é reduzida tanto quanto aquela obtida com o plasmídeo, dando uma especificidade alta para a resposta. A cepa BGF933 abriga a mesma fusão, embora seja *oxyR*-deficiente; por esta razão ela é utilizada como controle negativo do estudo (GONZÁLEZ-FLECHA; DEMPLE, 1995; GONZÁLEZ-FLECHA; DEMPLE, 1997). Neste estudo utilizamos partículas do ar urbano (UAP) da cidade de Washington (DC), para avaliar seus efeitos em BGF931.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes. Ampicilina; tetraciclina; estreptomicina; peróxido hidrogênio e ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactosídeo) foram utilizados da Sigma Chem. Co. Caldo de cultura Luria-Bertani (LB) foi utilizado da VWR.

Cepas de bactéria. As cepas de *E. coli* utilizadas neste estudo foram BGF931 (como RK4936, mas $\lambda[\Phi(katG':lacZ)]$) e BGF933 (como TA4112($\Delta oxyR$), mas $\lambda[\Phi(KatG':lacZ)]$). Estas foram inseridas em uma cópia simples da fusão *katG':lacZ* dentro do ADN cromossômico de um competente *oxyR* (RK4936) e uma cepa deficiente (TA4112), respectivamente. A pureza das cepas foi verificada pelos seus fenótipos Lac⁺ Amp^s (GONZÁLEZ-FLECHA; DEMPLE, 1995).

Condições de Crescimento. As células foram inoculadas em caldo de cultura Luria-Bertani (LB) (MILLER, 1992) contendo quantidades apropriadas de antibiótico e incubadas durante a noite a uma temperatura de 37°C sob suave agitação (200 rpm). Para as medidas experimentais, as culturas saturadas foram diluídas cem vezes em caldo de cultura LB e incubada a 37°C por 3 horas com agitação de 200 rpm. Antibióticos foram usados com as seguintes concentrações (em $\mu\text{g/ml}$): tetraciclina, 12,5; estreptomicina, 50; ampicilina: 100.

Tratamento com H₂O₂. Culturas de células em fase exponencial foram tratadas com 50 µM de H₂O₂ e incubadas por 1 hora a 37 °C sob agitação de 200 rpm. Para os tempos indicados, 1 ml de amostra da cultura foi tomado e analisado para a atividade de β-galactosidase.

Tratamento com Partículas de Ar Urbano (UAP). Material Padrão de Referência 1649 foi obtido da NIST (Urban Dust, NIST, Washington, USA). A composição elementar do UAP está descrita na Tabela 1. Estoques de trabalho foram preparados em solução salina estéril, sonicadas por 30 seg e guardadas a -20°C até o uso. As suspensões foram novamente sonicadas por 10 seg imediatamente antes do uso no ensaio. Culturas na fase exponencial das células foram tratadas com 10, 25, 50, 75, 100 ou 500 µg/ml UAP e incubadas por um ou dois dias com agitação.

Preparação e tratamento de protoplasto. 50 ml da cultura exponencial foram centrifugadas a 3.000 x g por 10 min a 4°C. Precipitados das células foram ressuspensos em 2,5 ml de 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), contendo 20% de sacarose em gelo. Na ressuspensão das células, foi então adicionado 0,5 ml lisozima (5 mg/ml em 250 mM Tris-HCl, pH 8,0) incubado por 5 min a 4°C, adicionado 1 ml de 0,25 M EDTA (pH 8,0) gelado, e incubados por 5 min a 0-4°C. 50 mM Tris-HCl foram então adicionados lentamente, e a suspensão foi incubada por 15 min a 37°C para quebrar a parede da célula bacteriana. Protoplastos foram ressuspensos em 20 ml de 10% (p/v) de sacarose e adicionados ao meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) contendo 10 mM MgCl₂ a 37°C. As suspensões foram gentilmente agitadas e incubadas por 15 min em temperatura ambiente. As suspensões de protoplastos foram tratadas com 100 µM H₂O₂ ou 500 ou 1000 µg/ml UAP e incubadas a 37°C. A atividade da β-galactosidase foi medida após 60, 120 e 180 min de incubação.

Atividade da β -galactosidase. A atividade da β -galactosidase (β -gal) foi obtida através do tratamento das células com sulfato dodecil sódico- CHCl_4 , como descrito por Miller. Resumidamente, 0,1 ml da cultura foi misturado com 0,9 ml tampão Z adicionado com 15 μl 1% SDS e 15 μl Cl_3CH , agitado por 15 seg e adicionado 0,2 ml 4mg/ml ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactoside) em 0,1M de tampão fosfato (pH 7,0). Acúmulo de o-nitrofenol foi medido a 420-550 nm. Densidade celular foi medida como absorvância a 660 nm.

Estatística. Valores na Tabela 2 são expressos como média \pm DP dos quatro experimentos. Diferenças entre os valores médios foram analisados usando o método Two Way ANOVA/Holm-Sidak. O nível de significância é 0,05.

RESULTADOS

Tratamento com UAP em cepa de *Escherichia coli* que contém o gene repórter dependente OxyR. A regulação transcripcional do *oxyR*-dependente da fusão *katG':lacZ* em resposta ao tratamento com oxidantes particulados ou solúveis foi inicialmente avaliada em culturas em fase exponencial de cepas *E. coli* BGF931 e BGF933. Estas cepas abrigam a fusão *katG':lacZ* dentro de seus ADN cromossômicos (GONZÁLEZ-FLECHA; DEMPLE, 1995) e além disso expressam β -galactosidase sob o controle transcripcional do promotor da catalase hidroperoxidase I (*katG*). *katG* é um membro do regulon OxyR, isto é, ele é regulado em resposta ao aumento de peróxido de hidrogênio intracelular. Argumentamos que esta bactéria, carregando este sistema repórter, poderia ser usada para testar a hipótese de que o material particulado tem a habilidade de aumentar oxidantes intracelulares, e para quantificar se PM poderia aumentar H_2O_2 intracelular. Escolhemos a cepa BGF931 porque ela abriga a simples cópia do repórter em seu cromossomo e, além disso, a atividade basal da β -galactosidase é reduzida tanto quanto aquela obtida com o plasmídeo, dando uma especificidade alta para a resposta. A cepa BGF933 abriga a mesma fusão, só que é *oxyR*-deficiente, por esta razão ela é utilizada como controle negativo do estudo (GONZÁLEZ-FLECHA; DEMPLE, 1995;

GONZÁLEZ-FLECHA; DEMPLE, 1997). A indução da β -galactosidase por H_2O_2 em BGF931 mas não por BGF933 foi confirmada na Figura 1.

Tratamos, então, culturas de células em fase exponencial com 10, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g/ml}$ de UAP, e medimos β -galactosidase para 0-60 min (Figura 2). Nossos dados não apontaram nenhuma indução significativa de *katG::lacZ* em resposta ao tratamento com UAP. Para confirmar que a falta de resposta não se deveu a concentração de partículas insuficiente ou tempo insuficiente, usamos altas doses, 100 $\mu\text{g/ml}$ (dados não mostrados) ou 500 $\mu\text{g/ml}$, e seguimos a atividade da β -galactosidase por período de dois dias (Figura 3). As amostras foram coletadas a cada 30 min por 6 horas no primeiro dia (Figura 3A) e a cada 30 min por 6 horas no segundo dia (Figura 3B). Culturas saturadas foram diluídas 1-100 vezes em LB fresco na manhã do segundo dia. Achamos que a atividade de β -galactosidase foi indistinguível nas células tratadas e não tratadas (Figura 3).

Tratamento de UAP em protoplastos de *Escherichia coli*. Testamos o possível efeito de a parede bacteriana servir como uma barreira física para a internalização do PM. Para isto, preparamos protoplastos de *E. coli* e os tratamos com diferentes quantidades de UAP em suspensão (Figura 4). Achamos um pequeno aumento na atividade da β -galactosidase nos protoplastos tratados com UAP por 180 min, entretanto esse aumento não foi estatisticamente significativo (Figura 4).

Efeito sinérgico do H_2O_2 e UAP. Finalmente, testamos a possível potencialização do efeito do UAP pelo co-tratamento com H_2O_2 . UAP foram ministrados às células bacterianas para concentrações fixas de 100 $\mu\text{g/ml}$ e adicionadas com 75 μM H_2O_2 (Tabela 2). Os tratamentos controles incluem UAP sozinho e H_2O_2 sozinho. As diferenças nos valores médios entre os diferentes níveis dos grupos são maiores que o esperado pelas mudanças admitidas por efeitos nas diferenças dos tempos. Existe uma diferença estatisticamente significativa ($p = <0,001$). Para isolar quais grupos diferem de outros foi utilizado o teste de comparação múltipla. As diferenças nos valores médios entre os

diferentes níveis de tempo são maiores do que seria esperado pelas mudanças admitidas por efeitos de diferenças no grupo. Existe uma diferença estatisticamente significativa ($p = <0,001$). O efeito de diferentes níveis de grupo depende do nível de tempo presente. Existe uma interação estatisticamente significativa entre grupo e tempo ($p = <0,001$). Nossos dados mostram um aumento significativo na atividade da β -galactosidase após ambos os tratamentos H_2O_2 e $H_2O_2 + UAP$ com ativação transcripcional máxima para 15 min. Indução de *katG':lacZ* foi significativamente mais alta nas células tratadas com H_2O_2 e UAP que em células tratadas com H_2O_2 sozinha (Tabela 2).

DISCUSSÃO

A habilidade de OxyR para perceber mudanças nos níveis de H_2O_2 *in vivo* tem sido mostrada em estudos que seguem a expressão de *oxyR* regulando o gene *katG* (codificando catalase-hidroperoxidase I) após o tratamento com H_2O_2 . A expressão do gene foi monitorada medindo níveis de ARNm ou a atividade de β -galactosidase da fusão do operon *katG':lacZ*. Uma larga variedade de estímulos foi ensaiada entre a administração da simples dose padrão de 5-100 μM H_2O_2 (HATZIS et al., 2006; CHRISTMAN et al., 1985; DEMPLE; HALBROOK, 1983; MORGAN et al., 1986; TAO et al., 1989) para uso do sistema de geração de H_2O_2 no compartimento extracelular (GONZÁLEZ-FLECHA; DEMPLE, 1995). Esse experimento tem mostrado que a magnitude da resposta depende do tipo de estímulo tanto quanto da sua intensidade. Estímulos tipo pulso dão um aumento transiente na atividade dependente de *oxyR* que responde após 10 min de tratamento (GONZÁLEZ-FLECHA; DEMPLE, 1995). O estímulo tipo rampa (aumento gradual) produz respostas muito mais altas para a mesma razão H_2O_2 /catalase (GONZÁLEZ-FLECHA; DEMPLE, 1995), indicando uma interação dinâmica entre as taxas de produção e eliminação do H_2O_2 , por um lado, e as taxas de ativação e inativação de OxyR, por outro lado.

No presente estudo testamos o possível uso de *E. coli* abrigando um repórter *katG':lacZ* para monitorar aumentos no H_2O_2 intracelular através da exposição com partículas de ar urbanas (PM). Usamos o padrão NIST como partículas de ar ambiente, para ter uma amostra de composição homogênea e bem caracterizada (Tabela 1), uma vantagem técnica sobre partículas ambientes “do mundo real” ou partículas ambientes concentradas (CAPs). A composição média de metal do UAP é comparável aquela observada para amostras de CAPs obtidos em nosso laboratório (GURGUEIRA et al., 2002; RHODEN et al., 2005). Entretanto, partículas de UAP são ricas em Fe, Br e Pb (Tabela 1). As partículas de UAP têm mostrado efeitos biológicos similares aos CAPs em sistemas *in vivo* (RHODEN et al., 2004) e *in vitro* (IMRICH et al., 1999).

Nós testamos UAP para concentrações entre 10 $\mu\text{g/ml}$ to 1 mg/ml . Oberdorster & Yu (OBERDORSTER; YU, 1999) calcularam que a dose alveolar do PM depositado em ratos respirando 10-1000 $\mu\text{g PM/m}^3$ durante 24 horas seria de 0,33-33 μg (OBERDORSTER; YU, 1999). Assumindo um número total de células alveolares de $\sim 120 \times 10^6$ por pulmão (CRAPO et al., 1980), a dose estimada por célula seria 0,003-0,280 $\mu\text{g CAPs}/10^6$ células alveolares. Mais recentemente, cálculos feitos por Nel et al. indicam uma deposição de 4 $\mu\text{g/cm}^2/24$ horas de partículas ambientes finas em humanos expostos ao meio ambiente poluído da Califórnia (NEL, comunicação pessoal). Essa concentração estimada alcança concentrações reais do meio ambiente de PM, e está na mesma ordem de grandeza que as usadas nesses estudos e em muitos experimentos *in vitro* (50 $\mu\text{g}/10^6$ células = 7,6 $\mu\text{g/cm}^2$). UAP tomados sozinhos e para baixas e altas doses não demonstraram nenhuma indução significativa de *katG* como se percebe pela falta de mudanças na atividade de β -galactosidase após 60 min (Figura 2), 360 min (Figura 3 A), ou 2 dias (Figura 3 B). Entretanto, uma ativação significativa foi observada quando células foram tratadas com UAP na presença de H_2O_2 (Tabela 2). O poluente induzindo estresse oxidativo poderia ser derivado da ação direta de oxidantes ou da liberação de mediadores inflamatórios associados com células inflamatórias ativadas. Realmente, estudos epidemiológicos têm demonstrado que

indivíduos com condições inflamatórias pulmonares crônicas, como DPOC, são mais suscetíveis aos efeitos adversos dos níveis ambientes de PM. Nossos resultados promovem plausibilidade biológica para os achados epidemiológicos (MARTINS et al., 2002).

Buscando verificar a falta de resposta do OxyR para as partículas sozinhas, fizemos experimentos com protoplastos, onde a parede bacteriana é removida mas a parte bioquímica da célula permanece intacta. Nossos dados mostram que o protoplasto de BGF931 responde ao H_2O_2 com um aumento de três vezes na atividade da β -galactosidase, mas permanece não responsivo para UAP (Figura 4).

Recentemente relatamos que 100 μ g/ml CAPs aumenta H_2O_2 intracelular por duas vezes em cultura primária de célula epitelial alveolar (GURGUEIRA et al., no prelo). Se assumirmos um aumento similar na célula bacteriana, conhecendo que a concentração “steady-state” de H_2O_2 em fase exponencial de *E. coli* é 0,25 μ M (GONZÁLEZ-FLECHA; DEMPLE, 1997), terminaríamos com concentrações de H_2O_2 em intervalos submicromolares, para menos que 10-50 vezes abaixo dos níveis relatados para ativar o regulon OxyR. Para recorrer essa possibilidade, tratamos as células com UAP na presença de 50, 75 ou 100 μ M H_2O_2 (Tabela 2), que está dentro do intervalo de níveis oxidantes presentes nos sítios inflamatórios (FELDMAN et al., 1994). UAP significativamente aumenta a resposta bacteriana para 75 e 100 μ M H_2O_2 . De fato, o efeito do UAP e H_2O_2 foi sinérgico, sugerindo uma interação entre componentes das partículas e H_2O_2 . Reação tipo Fenton catalisada por metais adsorvidos na superfície das partículas poderia somar-se a isto.

Vários estudos sugerem que metais de transmissão seriam possíveis mediadores de PM, induzindo dano de via aérea e inflamação (HETLAND et al., 2000; JIMENEZ et al., 2000; KENNEDY et al., 1998; PRAHALAD et al., 1999). Partículas urbanas contêm quantidades traços de metais de transição, que têm produzido ERO em sistemas livres de células (DONALDSON et al., 1997; WU et

al., 2001; GILMOUR et al., 1996). Suspensão de PM também ativa vias de sinalização dependentes de oxidantes em células epiteliais do pulmão, via mecanismos dependentes de metais de transição (JIMENEZ et al., 2000; KENNEDY et al., 1998; WU et al., 2001). Finalmente, estudos com animais também indicam que respostas inflamatórias dirigidas por instilação de PM são proporcionais ao conteúdo de metais ionizáveis solúveis (PRITCHARD et al., 1996).

Nossos resultados mostram clara ativação de OxyR-dependente *katG* pela UAP e H₂O₂, indicando um importante papel para metal catalisando reação tipo Fenton em mecanismo de produção de H₂O₂ pelo PM. Nossos resultados sustentam o conceito segundo o qual a ativação de OxyR pelo UAP é potencializada pelo meio ambiente preexistente.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado por NIH (RO1 HL/ES68073) e por EPA (R827353).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTUVIA, S. et al. The dps promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and sigma S stationary phase. *Mol. Microbiol.*, v.13, n.2, p.265-272, July 1994.

ATKINSON, R. W. et al. Short-term associations between outdoor air pollution and visits to accident and emergency departments in London for respiratory complaints. *Eur. Respir. J.*, UK, v.13, p.257-265, Feb. 1999.

AUST, A. E. et al. *Particle characteristics responsible for effects on human lung epithelial cells*. Boston (MA): Health Effects Institute, 2002.

BELKIN, S. et al. Oxidative stress detection with *Escherichia coli* harboring a *katG'::lux* fusion. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.62, p.2252-2256, July 1996.

BROOK, R. D. et al. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for health care professionals from the expert panel on population and prevention science of the American Heart Association. *Circulation*, v.109, n.21, p.2655-2671, June 2004.

CHRISTMAN, M. F. et al. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell*, v.41, p.753-762, July 1985.

CRAPO, J. D. et al. Structural and biochemical changes in rat lungs occurring during exposures to lethal and adaptive doses of oxygen. *Am. Review of Respiratory Disease*, v.122, p.123-143, 1980.

DEMPLE, B.; HALBROOK, J. Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature*, v.304, p.466-468, Aug. 1983.

DONALDSON, K. et al. Free radical activity of PM10: iron-mediated generation of hydroxyl radicals. *Environmental Health Perspectives*, v.105, Suppl 5, p.1285-1289, Sep. 1997.

ELLIOTT, P. et al. Long-term associations of outdoor air pollution with mortality in Great Britain. *Thorax*, v.62, n.12, p.1088-1094, Dec. 2007.

FELDMAN, C. et al. Oxidant-mediated ciliary dysfunction in human respiratory epithelium. *Free Rad Biol & Med.*, v.17, n.1, p.1-10, July 1994.

GILMOUR, P. S. et al. Adverse health effects of PM10 particles: involvement of iron in generation of hydroxyl radical. *Occup. Environ. Med.*, v.53, n.12, p.817-822, Dec. 1996.

GODLESKI, J. J. et al. Composition of inhaled urban air particles determines acute pulmonary responses. *Ann. Occup. Hyg.*, v.46, p.419-424, 2002.

GODLESKI, J. J. Responses of the heart to ambient particle inhalation. *Clin. Occup. Environ. Med.*, v.5, n.4, p.849-864, Review, 2006.

GONZÁLEZ-FLECHA, B.; DEMPLE, B. Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v.179, p.382-388, Jan. 1997.

GONZÁLEZ-FLECHA, B.; DEMPLE, B. Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, v.270, p.13681-13687, June 1995.

GURGUEIRA, S. A. et al. Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environm. Health Perspect.*, v.110, p.749-755, Aug. 2002.

GURGUEIRA, S. et al. H₂O₂-mediated proinflammatory and toxic responses to ambient air particles in primary alveolar type II cells. In: _____. *Air Pollution Research Trends*. New York: Nova Science Publishers, 2008. (no prelo).

HATZIS, C. et al. Ambient particulate matter exhibits direct and selective inhibitory effects on oxidative stress enzymes. *Environ. Sci. Technol.*, v.40, p.2805-2811, Apr. 2006.

HETLAND, R. B. et al. Mineral and/or metal content as critical determinants of particle-induced release of IL-6 and IL-8 from A549 cells. *Journal of Toxicology & Environmental Health*, v.60, p.47-65, May 2000.

IMRICH, A. et al. Lipopolysaccharide priming amplifies lung macrophage tumor necrosis factor production in response to air particles. *Toxicol Appl Pharmacol.*, v.159, p.117-124, Sep. 1999.

JIMENEZ, L. A. et al. Activation of NF-kappaB by PM(10) occurs via an iron-mediated mechanism in the absence of IkappaB degradation. *Toxicology & Applied Pharmacology*, v.166, p.101-110, July 2000.

KAISER, J. Evidence mounts that tiny particles can kill, *Science*, v.289, p.22-23, July 2000.

KENNEDY, T. et al. Copper-dependent inflammation and nuclear factor-kappaB activation by particulate air pollution. *American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology*, v.19, p.366-378, Sep. 1998.

LADEN, F. et al. Cause-specific mortality in the Unionized U. S. trucking industry. *Environ. Health Perspect.*, v.115, n.8, p.1192-1196, Aug. 2007.

MARTINS, L. C. et al. Air pollution and emergency room visits due to chronic lower respiratory diseases in the elderly: an ecological time-series in São Paulo, Brazil. *J Occup. Environ. Med.*, v.44, n.7, p.622-627, July 2002.

MARTINS, L. C. et al. The effects of air pollution on cardiovascular diseases: lag structures. *Rev. Saúde Pública*, v.40, n.4, p.677-683, Aug. 2006.

MILLER, J. H. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory, 1992.

MORGAN, R. W. et al. Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.83, p.8059-8063, Nov. 1986.

OBERDORSTER, G.; YU, C. P. Lung dosimetry—considerations for non inhalation studies. *Exp. Lung Res.*, v.25, p.1-6, Jan.-Feb. 1999.

PRAHALAD, A. K. et al. Ambient air particles: effects on cellular oxidant radical generation in relation to particulate elemental chemistry. *Toxicology & Applied Pharmacology*, v.158, p.81-91, July 1999.

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

RHODEN, C. R. et al. N-acetylcysteine prevents lung inflammation after short-term inhalation exposure to concentrated ambient particles. *Toxicol. Sci*, v.79, p.209-303, June 2004.

RHODEN, C. R. et al. PM-Induced Cardiac Oxidative Stress Is Mediated by Autonomic Stimulation. *Biochem Biophys Acta*, v.1725, p.305-313, Oct. 2005.

RUIZ-GODOY, L. et al. Mortality due to lung cancer in Mexico. *Lung Cancer*, v.58, n.2, p.184-190, Nov. 2007.

SCHWELA, D. Air pollution and health in urban areas. *Reviews on Environmental Health*, v.15, p.13-42, Jan.-June 2000.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.*, v.18, p.321-336, Feb. 1995.

TAO, F.; GONZÁLEZ-FLECHA, B.; KOBZIK, L. Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. *Free Radic. Biol. & Med.*, v.35, p.327-340, Aug. 2003.

TAO, K. et al. Molecular cloning and nucleotide sequencing of oxyR, the positive regulatory gene of a regulon for an adaptive response to oxidative stress in *Escherichia coli*: homologies between OxyR protein and a family of bacterial activator proteins. *Molecular & General Genetics*, v.218, p.371-376, Sep. 1989.

WU, W. et al. Activation of the EGF receptor signaling pathway in airway epithelial cells exposed to Utah Valley PM. *American Journal of Physiology – Lung Cellular & Molecular Physiology*, v.281, p.1483-1489, Aug. 2001.

Artigo recebido em 17.10.2008. Aprovado em 09.02.2009

[LEGENDAS DAS FIGURAS]

Figura 1 – Atividade da β -Galactosidase em BGF931 e BGF933 tratados com 50 μ M H₂O₂ e incubados por 60 min a 37°C sob agitação. Eles foram inseridos em uma cópia simples da fusão *katG'::lacZ* dentro de um ADN cromossômico da cepa do *oxyR* competente (RK4936) (BGF931) e deficiente (TA4112) (BGF933). O primeiro apresenta aumento da transcrição do *OxyR* dependente do promotor *katG'*, uma ativação transcripcional de *katG'::lacZ* pelo peróxido de hidrogênio.

Figura 2 – A atividade de β -Galactosidase em BGF931 tratado com partículas do ar ambiente. Partículas de UAP (10, 25, 50, 75 e 100 μ g/ml) foram adicionadas para o tempo 0. Para os tempos indicados, amostras de cultura foram retiradas e ensaiadas para atividade de β -Galactosidase.

Figura 3 – Atividade de β -Galactosidase em BGF931 tratados com partículas de ar ambiente. Culturas em fase exponencial de BGF931 foram tratadas com 500 μ g/ml UAP e incubadas por dois dias a 37°C sob agitação. As Figuras 3A e B mostram os primeiros 360 min do primeiro e do segundo dia de tratamento, respectivamente.

Figura 4 – Atividade da β -Galactosidase em protoplastos de BGF931 tratados com H₂O₂ ou UAP. Protoplastos preparados recentemente foram tratados com 100 μ M H₂O₂, 500 μ g/ml ou 1 mg/ml UAP e incubados por 180 min. Para os tempos indicados, amostras foram retiradas e ensaiadas para atividade de β -Galactosidase.

Tabela 1 – Composição média de UAP

	Fração em massa (µg/g)
Na	ND
	9,2 ± 0,3
Al	0,06 ± 0,01
Si	ND
S	32,7 ± 9
Cl	2,8 ± 0,1
K	ND
Ca	ND
Ti	ND
V	0,34 ± 0,01
Cr	0,21 ± 0,01
Mn	0,24 ± 0,08
Fe	29,8 ± 0,7
Ni	0,17 ± 0,01
Cu	0,22 ± 0,01
Zn	1,68 ± 0,04
Br	11,9 ± 0,01
Cd	0,02
Ba	0,57 ± 0,02
Pb	12,4 ± 0,4

Fonte: Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia. Material de Referência Padrão 1649a.

Tabela 2 – Potencialização do efeito do UAP pelo cotratamento com H₂O₂ através da ativação transcricional de *oxyR::lacZ*

Tempo (min)	Controle	UAP (100 µg/ml)	H₂O₂ (75 µM)	H₂O₂ + UAP
0	165 ± 64	172 ± 32	276 ± 66	241 ± 63
15	188 ± 37	196 ± 36	623 ± 41 ^a	731 ± 44 ^{b,c}
30	164 ± 17	177 ± 18	521 ± 40 ^a	540 ± 46 ^b
45	191 ± 21	195 ± 25	497 ± 37 ^a	505 ± 28 ^b
60	184 ± 25	219 ± 25	448 ± 22 ^a	472 ± 41 ^b

^a e ^b p < 0,001 comparado com controle e UAP.

^c p < 0,01 comparado com H₂O₂.

As medidas foram determinadas em β-galactosidase (U/l).

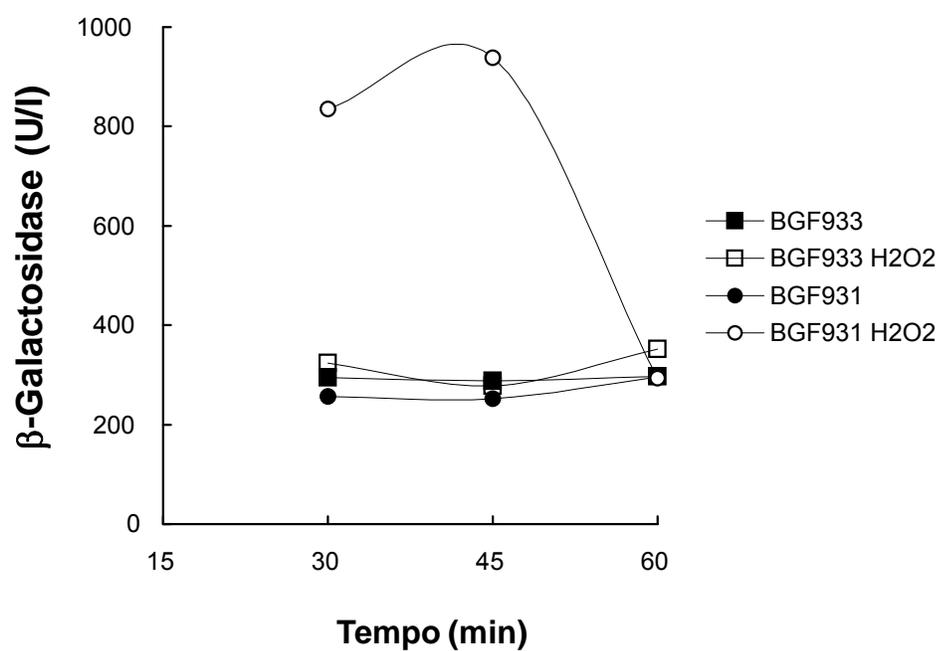


Figura 1

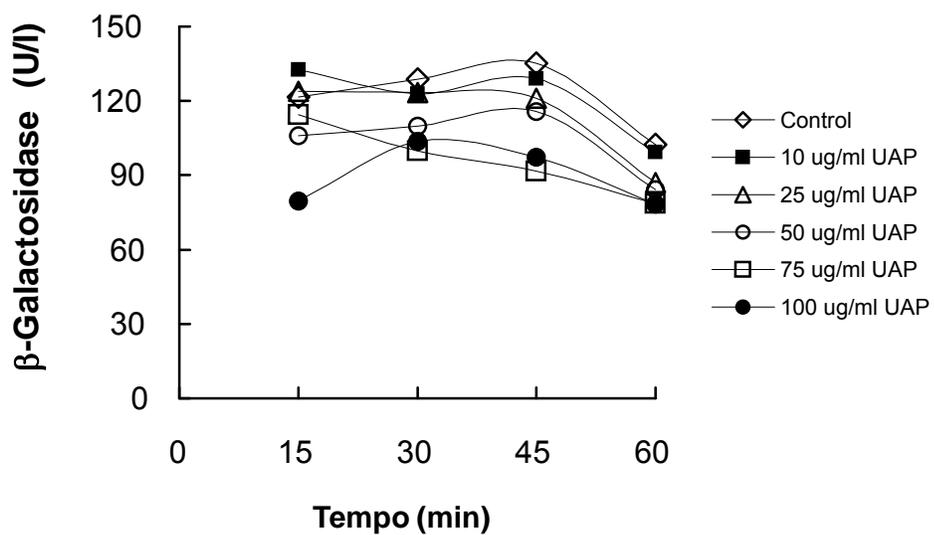


Figura 2

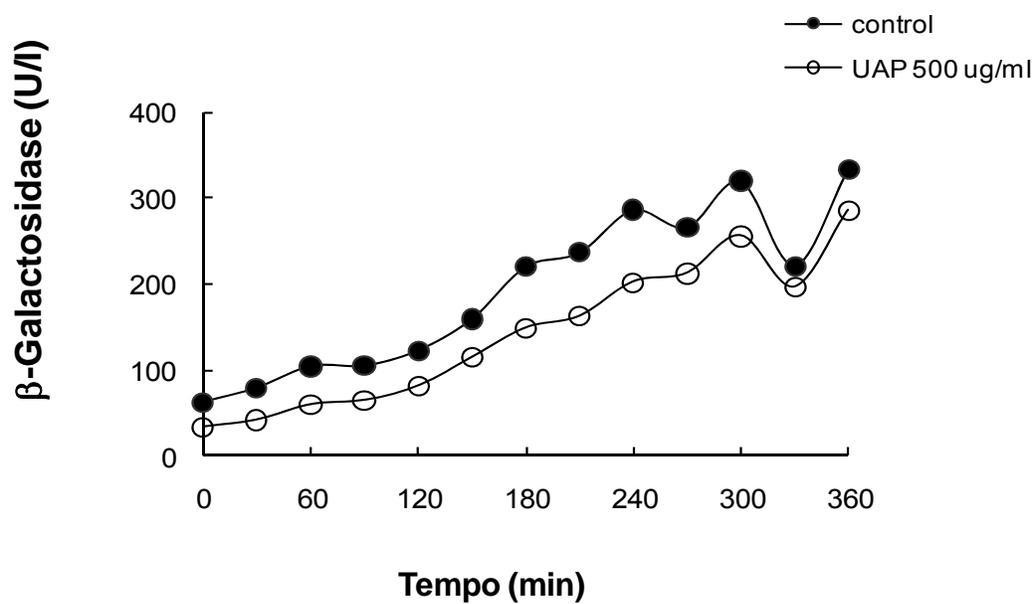


Figura 3 A

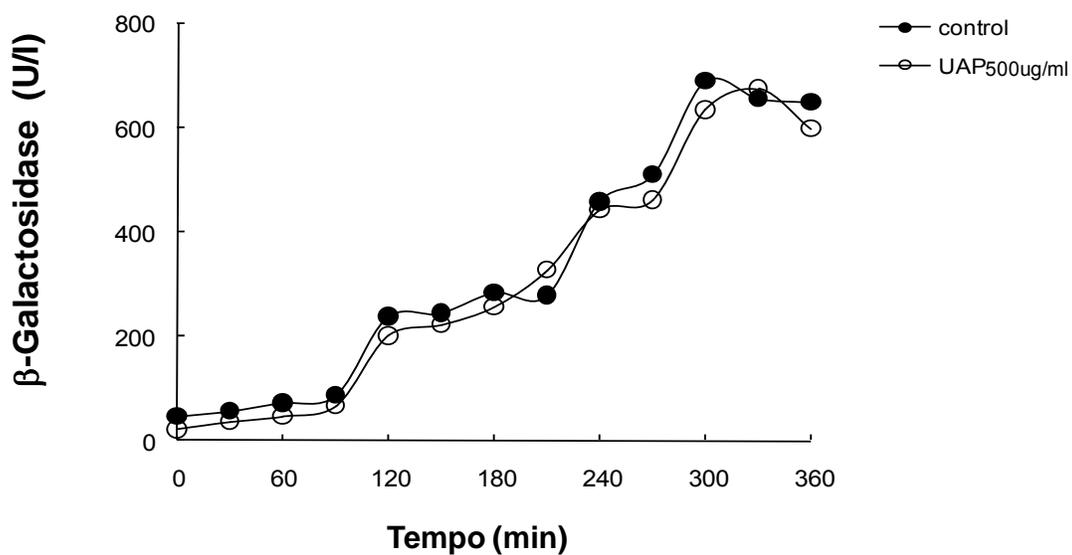


Figura 3 B

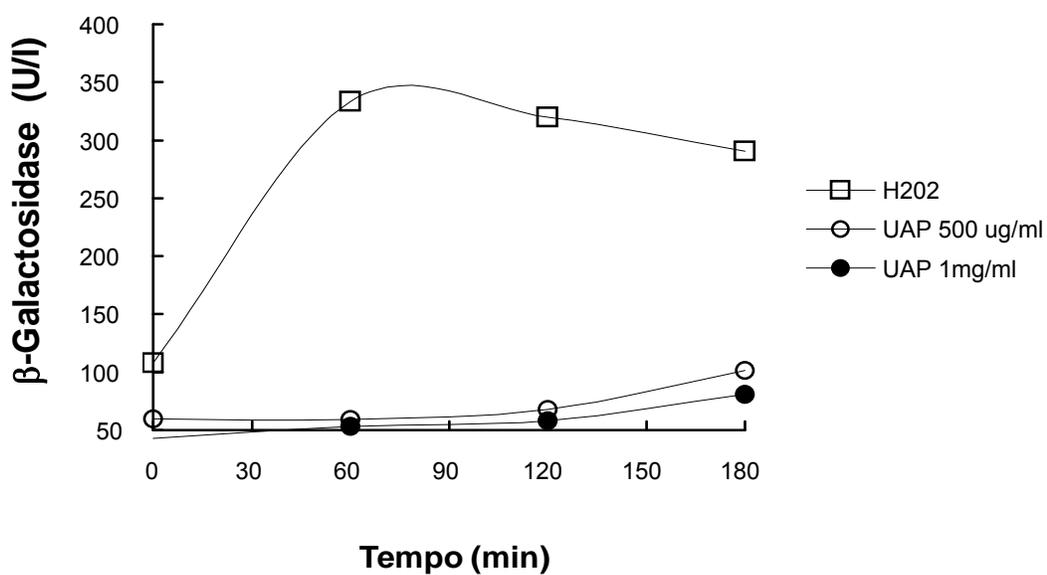


Figura 4