MARJORIE PARIS COLOMBINI

**Exposição aguda ao material particulado total em suspensão
proveniente de diferentes fontes e suas repercussões nas
respostas inflamatórias, sistêmica e local, em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Medicina

Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Alfésio Luis Ferreira Braga

São Paulo

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Colombini, Marjorie Paris

Exposição aguda ao material particulado total em suspensão proveniente de diferentes fontes e suas repercussões nas respostas inflamatórias, sistêmica e local, em ratos / Marjorie Paris Colombini. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientador: Alfésio Luis Ferreira Braga.

Descritores: 1.Poluição do ar 2.Óxido nítrico 3.Fator VIII 4.Estresse oxidativo
5.Isoprostanos 6.Ratos Wistar 7.Pulmão 8.Coração

USP/FM/SBD-240/07

Tudo posso Naquele que me fortalece.

Filipenses 4:13

Dedico este trabalho ao meu amado irmão gêmeo,
Nelson Eduardo, por seu brilhantismo profissional e
exemplo, por ter me incentivado a trilhar o caminho da
Medicina, a que tanto ama, e por não ter medido
esforços para fazer de mim sua colega.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço aos meus amados pais, Nelson e Maria José, pelo altruísmo e amor incondicional com que me apoiaram e incentivaram em cada etapa de minha vida, fazendo-me acreditar na possibilidade de cada sonho. Eu nada seria sem esse amor e nada teria sido possível.

Agradeço aos meus adorados filhos, Alexandre e Rodrigo, grandes amigos, pelo amor, amizade e por me apoiarem irrestritamente durante a realização deste trabalho.

"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alfésio Luis Ferreira Braga, minha máxima gratidão por seu apoio irrestrito, pelo exemplo, pelo estímulo, paciência e, principalmente, pela amizade com que guiou este trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, por ter me aberto todas as portas do Laboratório de Poluição Atmosférica e Experimental do Departamento de Patologia da FMUSP, por sua bondade, seu conhecimento e criatividade sem os quais nada teria sido possível.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Pereira, por sua ajuda, apoio e amizade durante a realização deste trabalho.

À Profª Drª Lourdes Martins, pelo seu inestimável auxílio na execução da análise estatística.

À bióloga, Drª Dolores Helena R. F. Rivero, minha máxima gratidão pelo auxílio na realização de toda a parte experimental desse estudo, por sua criatividade, empenho e estímulo. Esse trabalho é tão seu quanto meu.

À bióloga, Drª Regiani C. Oliveira, por seu enorme auxílio na realização da análise de composição elementar dos diferentes materiais utilizados nesse estudo, sem a qual nenhuma conclusão teria sido possível. Por sua amizade e incentivo. Esse trabalho é nosso.

À Profª Drª Thaís Mauad, por me permitir utilizar sua metodologia e materiais no estudo imunohistoquímico, realizado no Laboratório de Imunohistoquímica do Departamento de Patologia, FMUSP.

Ao Prof. Dr. Milton Arruda por ter me aberto as portas do Laboratório de Terapêutica Experimental I, FMUSP, ter me fornecido os materiais e disponibilizado a metodologia para a determinação do óxido nítrico exalado.

Ao Dr. Marcos Gonçalves Munhoz, Diretor do Serviço de Hematologia da Divisão do Laboratório Central, HC FMUSP, por sua amizade, apoio e compreensão nos momentos em que precisei ausentar-me para a realização deste trabalho.

À bióloga, Dr^a Beatriz M. Saraiva-Romanholo, por dispor de seu tempo para a realização da determinação do óxido nítrico exalado, por seu conhecimento, sua simpatia e apoio.

À biomédica, Sandra de Moraes, minha máxima gratidão por sua infinita paciência, amizade e pela realização técnica do estudo imunohistoquímico.

À bióloga, Dr^a Heloisa Bueno, por ter me auxiliado na aquisição dos animais e coleta dos órgãos.

À bióloga, Dr^a Ana Júlia de Faria Coimbra Lichtensfels, por ter me auxiliado na coleta dos órgãos dos animais.

Em especial, aos meus filhos Alexandre e Rodrigo, por deixarem seus afazeres para me auxiliarem na obtenção dos órgãos dos animais e na realização dos cortes para o estudo anátomo-patológico.

Ao Prof. Dr. Edwin Roger Parra, do Laboratório LIM-05, por ter me auxiliado na realização das fotos das lâminas com marcação positiva na reação de imunohistoquímica.

À Prof^a Dr^a Maria Beatriz Guimarães Costa, médica chefe do Serviço de Hematologia e Citologia da Divisão do Laboratório Central, HC FMUSP, "*in memoriam*", minha saudade e gratidão pelo incentivo à realização deste estudo, e pela realização dos laudos dos mielogramas.

Aos amigos, Dra Aparecida de Cássia Carvalho e Dr. Nelson Medeiros Júnior, ambos médicos-chefes do Serviço de Hematologia e Citologia da Divisão do Laboratório Central, HC FMUSP, minha gratidão pelo inestimável auxílio na avaliação dos mielogramas.

Aos amigos do Laboratório de Coagulação e Hemostasia da Divisão do Laboratório Central, HC FMUSP: Ruth Mizuta, Ivani da Costa, Magna de Oliveira, Isolete Baptista, Najla Florêncio Chehade, Ananias Araújo da Silva, pela participação na concretização desta tese.

Aos amigos do Laboratório de Hematologia da Divisão do Laboratório Central, Hospital das Clínicas da FMUSP, pelo auxílio na concretização desta tese.

Ao grupo de colaboradores da técnica do Laboratório de Anatomia Patológica, pela confecção dos cortes e lâminas para o estudo anátomo-patológico.

Ao David e Carlos Eduardo por terem auxiliado nos cuidados dos animais no biotério, e na realização dos cortes dos órgãos para o estudo da anatomia patológica.

À secretária do Departamento de Patologia da FMUSP, Sra. Liduvina, pela amizade e auxílio com os processos burocráticos.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta obra se concretizasse.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Quadros

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	3
1.1 Classificação dos Agentes Poluentes do Ar	5
1.2 Evidências dos Efeitos Adversos Produzidos pela Poluição do Ar no Sistema Cardiorespiratório.....	10
1.3 Prováveis Mecanismos Biológicos Envolvidos nos Efeitos Adversos Cardiorespiratórios	15
1.3.1 Poluição do Ar e Indução de Doença por Estresse Oxidativo ...	19
1.3.2 Poluição do Ar e Óxido Nítrico	22
1.3.3 Poluição e Trombose	25
1.4 Relevância dos Parâmetros Hematológicos e de Hemostasia em Estudos de Poluição	26
1.4.1 Hemograma	28
1.4.2 Velocidade de Hemossedimentação Eritrocitária (VHS).....	28
1.4.3 Reticulócito	30
1.4.4 Mielograma	30
1.4.5 Proteína C Reativa (PCR)	31
1.4.6 Citoquinas	32
1.4.7 Fibrinogênio.....	33
1.4.8 Fator VIII	34
1.4.9 Coagulograma.....	35
2. OBJETIVOS.....	37
2.1 Geral.....	38
2.2 Específicos	38
3. MÉTODOS	40
3.1 Obtenção das Amostras de PTS, Análise da Composição Elementar, Extração dos Filtros e Preparo das Soluções Aquosas	41
3.2 Animais	43
3.3 Obtenção e Análise do Óxido Nítrico Exalado, e Instalação do Particulado Total em Suspensão (PTS)	43

3.4	Obtenção das Amostras Sanguíneas	45
3.5	Análise Laboratorial dos Parâmetros Hematológicos e de Hemostasia	46
3.5.1	Parâmetros Hematológicos: Hemograma e Reticulócitos	46
3.5.2	Parâmetros de Hemostasia: Fator VIII, Fibrinogênio, Tempo de Protrombina e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada.....	47
3.6	Análise da Medula Óssea	47
3.7	Análise Histológica Pulmonar e Cardíaca	48
3.8	Análise do Estresse Oxidativo	49
3.9	Análise Estatística	50
4.	RESULTADOS.....	51
4.1	Análise das Partículas	52
4.2	Análise Descritiva dos Animais Utilizados	53
4.3	Análise do Óxido Nítrico Exalado (eNO)	54
4.4	Análise dos Marcadores Hematológicos, de Hemostasia e da Medula Óssea	55
4.5	Análise Histológica Pulmonar e Cardíaca	57
4.6	Análise do Estresse Oxidativo	62
5.	DISCUSSÃO.....	65
6.	CONCLUSÕES.....	73
7.	ANEXOS.....	76
Anexo A.	Termo de Aprovação do Protocolo de Pesquisa	77
Anexo B.	Média, desvio padrão, valores mínimos e máximos da série vermelha do hemograma não afetados pelo PTS	78
Anexo C.	Média, desvio padrão, valores mínimos e máximos dos componentes da série branca do hemograma não afetados pelo PTS	79
Anexo D.	Média, desvio padrão, valores mínimos e máximos dos marcadores hemostáticos não afetados pelo PTS	80
Anexo E.	Submissão do artigo “Composition of ambient particles influences pulmonary and systemic inflammatory responses in rats” ao American Journal Respiratory and Critical Care Medicine – American Thoracic Society, número Blue-200705-744OC	81
8.	REFERÊNCIAS.....	82

Lista de Abreviaturas

DNA	Ácido dexoxiribonucléico
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
NMMAPS	Estudo Nacional de Morbidade, Mortalidade, e Poluição do Ar
US EPA	Agência Americana de Proteção Ambiental
et al.	e colaboradores
HE	Hematoxilina eosina
IL	Interleucina
IFN – ?	Gama interferon
IgE	Imunoglobulina E
GM-CSF	Fator de crescimento da colônia granulocítica-macrofágica
P	Nível de significância estatística (probabilidade de erro tipo I)
PTS	Particulado Total em Suspensão
RNA	Ácido ribonucléico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TP	Tempo de Protrombina
TTPa	Tempo de Tromboplastina Parcial ativada

Lista de Símbolos e Siglas

<	menor
>	maior
=	igual
%	percentual
°C	graus Celsius
µg/mL	micrograma por mililitro
µg/m ³	micrograma por metro cúbico
µm	micrômetro
µL	microlitros
CI	intervalo de confiança
h	hora
kg	quilograma
mg	miligrama
mg/dL	miligrama por decilitro
mg/Kg	miligrama por kilo
mL	mililitro
mm ³	milímetro cúbico
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CO	monóxido de carbono
CO ₂	dióxido de carbono
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
eFNO	fração do óxido nítrico exalado

Fe^{2+}	ferro
Fe^{3+}	ferro
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
NO	óxido nítrico
NO_x	óxido de nitrogênio
NO_2	dióxido de nitrogênio
O_3	ozônio
O_2^-	superóxido
OH	hidróxido de hidrogênio
SO_2	dióxido de enxofre
SNO	sintetase de óxido nítrico
SNOe	sintetase óxido nítrico endotelial
SNOi	sintetase óxido nítrico indutível
SNO _n	sintetase óxido nítrico neuronal
PM	material particulado
PM_{10}	particulado com diâmetro inferior a 10 μm
$\text{PM}_{2,5}$	particulado com diâmetro inferior a 2,5 μm
PM_1	particulado com diâmetro inferior a 1 μm
ppb	partes por bilhão
ppm	partes por milhão
ROS	espécie reativa de oxigênio
SOD	superóxido desmutase
XRF	fluorescência de raio-X

Lista de Quadros

Quadro 1.	Classificação dos poluentes do ar	7
Quadro 2.	Padrões primários para poluentes do ar segundo Agência de Proteção Ambiental Americana	8
Quadro 3.	Padrões primários para poluentes do ar segundo o Conselho Nacional de Meio Ambiente (2007)	9
Quadro 4.	Possíveis mecanismos de efeitos adversos à saúde relacionados aos poluentes.....	16
Quadro 5.	Mecanismos de respostas de fase aguda no organismo, adaptado de Heinrich et al. (1990).....	27

Lista de Figuras

Figura 1. Média e desvio padrão do delta do NO exalado (eNO) medido nos quatro grupos analisados	54
Figura 2. Fotomicrografia de parênquima pulmonar dos animais expostos ao PTS automotivo	58
Figura 3. Fotomicrografia de parênquima pulmonar dos animais expostos ao PTS proveniente da queima de cana-de-açúcar	59
Figura 4. Fotomicrografia de parênquima pulmonar dos animais expostos ao PTS industrial	60
Figura 5. Fotomicrografia de parênquima pulmonar dos animais expostos ao Black Carbon	61
Figura 6. Aspectos da reação de imunohistoquímica para o marcador isoprostano (8-Epi-Prostaglandina F _{2a}) em pulmão	62
Figura 7. Aspectos da reação de imunohistoquímica para o marcador isoprostano (8-Epi-Prostaglandina F _{2a}) em coração	63
Figure 8. Prováveis mecanismos fisiopatológicos desencadeados pela composição elementar dos diferentes PTS e o impacto potencial no sistema cardiovascular	71

Lista de Tabelas

Tabela 1. Análise da composição dos elementos inorgânicos das amostras de PTS	52
Tabela 2. Média e desvio padrão do peso dos animais.....	53
Tabela 3. Média, desvio padrão, valores mínimos e máximos dos marcadores hematológicos, hemostáticos e da medula óssea afetados pelo PTS	56
Tabela 4. Médias e desvio padrão da análise do estresse oxidativo	64

Resumo

Colombini MP. *Exposição aguda ao material particulado total em suspensão proveniente de diferentes fontes e suas repercussões nas respostas inflamatórias, sistêmica e local, em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 92p.

Introdução: Poluição do ar está associada ao aumento da morbidade e mortalidade e essas associações persistem mesmo a baixas concentrações do poluente e a exposições agudas. **Objetivos:** Avaliar a associação entre componentes de três diferentes fontes do Particulado Total em Suspensão (PTS) e resposta aguda inflamatória, local e sistêmica, em ratos saudáveis. **Métodos:** PTS proveniente de fonte automotiva, industrial e da queima da cana de açúcar foram coletados em filtros de fibra de vidro, extraídos em água destilada por ultrassonificação, e instilados na traquéia de 45 ratos (15 em cada grupo). Vinte microgramas por mililitro dos PTS foram administrados em cada animal. A mesma quantidade de partículas de grafite em água destilada foi utilizada como controle. Marcadores inflamatórios de resposta local e sistêmica foram mensurados 24 horas após a exposição. **Resultados:** PTS proveniente da fonte automotiva apresentou altas concentrações de enxofre, ferro, chumbo e cobre e produziram efeito adverso local e sistêmico, evidenciado pelo aumento do óxido nítrico exalado ($6,22 \text{ ppm} \pm 3,8$), do número de plaquetas ($743,7 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 73,4$), e dos níveis do fibrinogênio ($312,1 \pm 42,7 \text{ mg/dL}$) e fator VIII ($185,1 \pm 37,2\%$), maiores dos que os observados no grupo controle ($p < 0,05$). O PTS proveniente da queima da cana de açúcar, com altas concentrações de ferro e cobre, e moderadas de enxofre produziram maior estresse oxidativo pulmonar e cardíaco em comparação ao grupo-controle e fonte automotiva ($p < 0,05$). O PTS gerado a partir da fonte industrial, com significativa concentração de ferro e cobre, e alta quantia de cálcio mostrou maior resposta oxidativa pulmonar e cardíaca em comparação ao grupo-controle, embora com discreta resposta inflamatória sistêmica ($p > 0,05$). **Conclusão:** Os resultados mostram que em doses baixas e agudamente, a exposição ao material particulado total em suspensão induz respostas inflamatórias locais e sistêmicas e pode alterar os componentes da hemostasia. Estas respostas foram influenciadas e moduladas pela composição elementar dos materiais analisados. Além disso, estes resultados subsidiam os achados epidemiológicos que associam exposição ao material particulado com morbidade e mortalidade cardiovasculares.

Descritores: 1.Poluição do ar 2.Óxido nítrico 3.Fator VIII 4.Estresse oxidativo 5.Isoprostanos 6.Ratos Wistar 7.Pulmão 8.Coração

Summary

Colombini MP. *Acute exposure to total suspended particles from different sources and their impacts on both systemic and local inflammatory responses in rats* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 92p.

Background: Air pollution is associated with both increased morbidity and mortality. These associations persist even at lower concentrations and short-term exposure. **Objectives:** To assess the impact of the components of three different sources of Total Suspended Particles (TSP) on local and systemic inflammatory responses in healthy rats. **Methods:** TSP from automotive, industrial and biomass burning sources were collected in specific glass-fiber filters, extracted in distilled water by ultrasound and instilled into the trachea of 45 rats (15 in each group). Twenty micrograms for milliliter of TSP were administered to each animal. The same amount of graphite particles (carbon black) in distilled water was used as control. Inflammatory markers of local and systemic responses were measured 24 hours after the exposure. **Results:** Automotive-generated TSP presented high percentages of sulfur, iron and copper, producing local and systemic adverse effects evidenced by increases in exhaled nitric oxide ($6.22 \text{ ppm} \pm 3.8$), platelets ($743.7 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 73.4$), fibrinogen ($312.1 \pm 42.7 \text{ mg/dL}$) and factor VIII ($185.1 \pm 37.2 \%$) levels, which proved higher than those observed in the black carbon group ($p < 0,05$). Biomass burning TSP with high percentage of iron and copper and moderate levels of sulfur produced the greatest pulmonary and cardiac oxidative stresses compared to the black carbon and automotive groups ($p < 0,05$). Industry-generated TSP with relevant amounts of iron, copper, and high percentages of calcium showed higher pulmonary and cardiac oxidative responses than those observed for the control group, along with a slightly systemic response ($p > 0,05$). **Conclusion:** The results showed that the acute exposure to the total suspended particles at low concentrations induces local and systemic inflammatory responses and can change the hemostasis components. These effects were influenced and modulated by the elementary composition of the analyzed materials. Moreover, these results subsidize the epidemiological findings that associate exposure to the particulate matter with cardiovascular morbidity and mortality.

Descriptors: 1.Air pollution 2.Nitric oxide 3.Factor VIII 4.Oxidative stress 5.Isoprostane 6. Wistar rats 7.Lung 8.Heart

1 . INTRODUÇÃO

Na primeira metade do século passado, pelo menos três episódios de extrema poluição despertaram enorme interesse na comunidade científica mundial, levando ao questionamento sobre os efeitos adversos à saúde humana provocados pela poluição, e à busca por respostas. Inúmeros estudos enfatizaram a severidade dos episódios de poluição do ar. Um dos primeiros, e bem documentado, ocorreu num pequeno vale industrial de Meuse River, na Bélgica. De primeiro a cinco de Dezembro de 1930, uma intensa névoa de poluição provocou mais de 60 mortes, uma taxa de mortalidade 10 vezes maior que o normal; e centenas de pessoas desenvolveram doença respiratória freqüentemente acompanhada por insuficiência cardíaca. Em Outubro de 1948, houve o episódio de Donora, também um vale industrial, na Pensilvânia. Cerca de 14.000 moradores apresentaram algum tipo de sinal clínico em decorrência do efeito dos poluentes, com 400 hospitalizações e 20 óbitos. Em Londres, Inglaterra, em Dezembro de 1952, ocorreu o mais dramático dos episódios de poluição. Uma massa de ar estagnada, com elevada concentração de dióxido de enxofre e particulado ambiental, que durou de 4 a 5 dias, resultou em aproximadamente 4000 mortes, e embora causas respiratórias tenham sido responsabilizadas pelo aumento relativo na mortalidade, o número de mortes devido a causas cardiovasculares foi bastante expressivo, deixando claro que ambos, pulmão e coração, são afetados pela poluição (Pope et al., 1995; Helfand et al., 2001).

Desde então, inúmeros estudos epidemiológicos têm reconhecido a relação entre poluição do ar atmosférico e aumento da morbidade e mortalidade cardiorespiratória (Pope et al., 1995; Katsouyanni et al., 1997; Samet et al., 2000a; Dockery, 2001; Pope et al., 2004; Brook et al., 2004; Pope et al., 2006), em especial em grupos de indivíduos susceptíveis, como o dos idosos e crianças (Schwartz, Morris, 1995; Braga et al., 2001a; Conceição et al., 2001; Mar TF et al., 2005; Martins et al., 2006), particularmente quando associados à exposição crônica, e mais recentemente, detectou-se que essas associações persistem mesmo a baixas concentrações de poluentes e a exposições agudas (Le Tertre et al., 2002; Analitis et al., 2006).

1.1 Classificação dos Agentes Poluentes do Ar

Poluição do ar é uma mistura heterogênea de gases, líquidos e material particulado, derivada de uma variedade de fontes, das quais, a principal é a combustão de produtos fósseis. Os poluentes podem ser classificados pela fonte de origem, pela composição química, tamanho, e modo de liberação nos ambientes internos e externos (Brook et al., 2004).

Poluentes diretamente emitidos na atmosfera são conhecidos como primários, enquanto que poluentes que resultam de reações químicas com outros poluentes ou gases atmosféricos são conhecidos como poluentes secundários (Bernstein et al., 2004). Essa distinção é importante, pois a

redução do precursor não leva obrigatoriamente à diminuição proporcional do poluente secundário. Por exemplo, níveis de ozônio podem paradoxalmente aumentar quando a emissão de óxido de nitrogênio é diminuída.

O material particulado em suspensão, denominado material particulado (PM) é classificado em três categorias. Particulado grosso, com diâmetro aerodinâmico de 2,5 a 10 μm , são partículas derivadas do solo, pó de estrada (por exemplo, freio e pó de pneu), escombros de construções, ou agregados de pequenas partículas em combustão; particulado fino, com diâmetro aerodinâmico $< 2,5 \mu\text{m}$, e partículas ultrafinas, com diâmetro aerodinâmico $< 0,1 \mu\text{m}$, primariamente formadas durante a combustão de produtos fósseis. Os exemplos listados no Quadro 1 distinguem os poluentes primários e secundários, internos e externos, gasosos e particulados.

Quadro 1. Classificação dos poluentes do ar**A. Poluentes primários e secundários**

1. *Primário*: poluentes emitidos diretamente na atmosfera, como por exemplo: SO₂, algumas espécies de NO_x, CO, PM.
2. *Secundário*: poluentes que se formam no ar como resultado de reações químicas com outros poluentes e gases, como por exemplo: ozônio e alguns particulados.

B. Poluentes internos e externos**1. Poluentes Internos**

- (a) Fontes: combustão, culinária, ressuspensão de partículas, materiais de construção, ar condicionado, fumaça de cigarro, aquecimento, agentes biológicos.
- (b) Produtos: combustão de produtos – fumaça de tabaco e madeira, CO, CO₂, aldeídos, álcool, cetonas, álcalis, agentes microbianos, poeiras orgânicas.

2. Poluentes externos

- (a) Fontes: industrial, comercial, urbana, regional, natural, agrícola.
- (b) Produtos: SO₂, NO_x, CO, PM, benzeno, aldeídos

C. Poluentes gasosos e particulados

1. Gasosos: SO₂, NO_x, CO, benzeno, aldeídos, 1,3-butadieno
2. Particulados: PM_{2,5}, PM₁₀, PM ultrafinas (< 0,1 μm)

A Agência de Proteção Ambiental Americana (US EPA) estabeleceu uma série de regulamentos para o controle dos níveis ambientais de $PM_{2,5}$ e PM_{10} , ozônio, dióxido de nitrogênio (NO_2) e dióxido de enxofre (SO_2) (Quadro 2), refletindo em relação a essa questão, as preocupações da saúde pública sensibilizada pelas muitas evidências demonstradas por inúmeros estudos epidemiológicos (Bernstein et al., 2004).

Quadro 2. Padrões primários para poluentes do ar segundo Agência de Proteção Ambiental Americana

Poluente	Período de tempo	
PM_{10} ($\mu g/m^3$)	150 (24 h)	50 (anual)
$PM_{2,5}$ ($\mu g/m^3$)	65 (24 h)	15 (anual)
Ozônio (ppm)	0.12 (1 h)	0.08 (8 h)
NO_2 (ppm)	-	0.053 (anual)
SO_2 (ppm)	0.14 (24 h)	0.03 (anual)

Em especial, muitos desses estudos demonstraram a relação entre aumentos da morbimortalidade cardiorespiratória e aumento nos níveis ambientais de $PM_{2,5}$ e PM_{10} .

Em nosso meio, a preocupação das autoridades governamentais com os problemas ligados à poluição do ar atmosférico data de época não muito

remota. Em 1990, o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) adotou padrões de qualidade do ar para os poluentes primários e para o ozônio com base nos padrões adotados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (CETESB, 2007). Os padrões nacionais estão apresentados no Quadro 3.

Quadro 3. Padrões primários para poluentes do ar segundo o Conselho Nacional de Meio Ambiente (atualizado em 2007)

Poluente	Período de tempo	
PTS ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	240 (24 h)	80 (média anual)
PM ₁₀ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	150 (24 h)	50 (média anual)
Ozônio ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	160 (1 h)	-
NO ₂ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	320 (1h)	100 (anual)
SO ₂ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	365 (24 h)	80 (anual)
CO (ppm)	35 (1 h)	9 (8 h)

1.2 Evidências dos Efeitos Adversos Produzidos pela Poluição do Ar no Sistema Cardiorespiratório

Revisão realizada por Portney e Mullahy (1990) mostra haver evidências da associação entre o particulado total em suspensão (PTS) e condições pulmonares como o enfisema, a bronquiolite crônica e a asma. Em 1994, Schwartz demonstra o aumento do risco relativo de 1.06 (95% CI = 1.03-1.10) para mortalidade, a cada aumento de $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ nos níveis de PTS, um risco relativo ainda maior para a doença cardiovascular (1.08) e para a população idosa (1.09). Igualmente, Rossi et al. (1999) evidenciam clara associação entre a exposição ao PTS e os efeitos cardiovasculares. Arbex et al. (2007) afirmam que um aumento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ na concentração média (5 dias) do PTS gerado pela queima da cana-de-açúcar, na cidade de Araraquara, tem um efeito agudo nas admissões hospitalares por asma, elevando o número dessas admissões em 11,6% (95% CI 5.4 a 17.7).

Muitos autores têm registrado associações entre poluição do ar e taxa de mortalidade diária em cidades dos Estados Unidos, Europa, América Latina e Ásia (Dockery, Schwartz, 1995; Samet et al., 2000b; Katsouyanni et al., 2001; Braga et al., 2001b; Dockery, 2001), embora não com a mesma magnitude observada no episódio ocorrido em Londres, nos anos 50.

O Estudo Harvard envolvendo seis cidades americanas (Harvard Six Cities Study), aponta associação entre $\text{PM}_{2,5}$ e admissões cardiovasculares, e, em menor extensão, entre a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Laden et al., 2000). Esses achados são também confirmados para o PM_{10}

por Janssen et al. (2002), em estudo avaliando hospitalizações em 14 cidades americanas.

Em 2000, Schwartz demonstra, em estudo envolvendo 10 cidades americanas, que a poluição está primeiramente associada a mortes não hospitalares, representadas por mortes súbitas, muitas das quais por arritmia e infarto do miocárdio.

O aumento agudo na concentração do material particulado (PM) ambiental vem sendo relacionado a complicações isquêmicas cardiovasculares como, por exemplo, a ativação do processo aterosclerótico; as exacerbações de sintomas cardíacos em função da ocorrência de arritmias e a piora da falência cardíaca (Routledge et al., 2003; Brook et al., 2004).

A relação entre a presença de partículas no ar atmosférico e a diminuição na taxa de variabilidade cardíaca (Santos et al; 2005) e o aumento na frequência cardíaca também tem sido referida (Magari et al., 2002). Esses achados sugerem a possibilidade da ocorrência do comprometimento do controle autonômico cardíaco devido à toxicidade provocada pelo material particulado, diretamente no coração.

A elevação na taxa das admissões hospitalares e de morte prematura por doenças respiratórias e cardíacas tem sido verificada (Samet et al., 2000a; Sunyer et al., 2000; Peters et al., 2004), especialmente, em indivíduos com doença cardiopulmonar crônica preexistente, como por exemplo, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doença

coronariana ou falência cardíaca (Goldberg et al., 2001; Le Tertre et al., 2002; Goldberg et al., 2003; Dockery et al., 2005).

Atualmente, evidências apontam também para a relação entre a exposição crônica e aguda à poluição e a elevação dos níveis de risco para mortalidade por acidente vascular cerebral, e admissões hospitalares por essa causa (Maheswaran et al., 2005).

O Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo vem desenvolvendo estudos experimentais e epidemiológicos, e tem evidenciado os efeitos nocivos da poluição do ar à saúde. Saldiva et al. (1994) constata clara associação entre óxido de nitrogênio e morte por doenças respiratórias, em crianças com menos de 05 anos, na cidade de São Paulo. Da mesma forma, Braga et al. (2001b) concluem que a poluição aérea exerce uma nítida influência deletéria sobre a saúde da população pediátrica (crianças menores de dois anos) e de adolescentes (entre 14 e 19 anos) na cidade de São Paulo, comprovando que efeitos adversos de diversos poluentes (PM_{10} , O_3 , SO_2 , CO e NO_2) estão presentes, o que implica tratar a poluição como uma mistura de elementos prejudiciais, que devem ser combatidos conjuntamente.

Estudando os efeitos da poluição sobre populações susceptíveis, Saldiva et al. (1995) apontam um excessivo número de mortes em pessoas com mais de 65 anos associado à exposição ao PM_{10} na cidade de São Paulo, sendo que para cada aumento de $100 \mu g/m^3$ na concentração do PM_{10} foi observado um aumento de 13% na mortalidade geral. Esta

associação persiste mesmo quando a análise é realizada controlando-se o clima e a sazonalidade, e mostra ser dose-dependente, não apresentando limiar de segurança, sendo os efeitos observados antes mesmo que o padrão médio anual do poluente seja atingido.

Em estudo avaliando a morbidade cardiovascular em São Paulo, Lin et al. (2003) observam existir associação entre o aumento dos níveis do monóxido de carbono (CO) e o aumento no atendimento diário de emergência por isquemia cardiovascular (infarto agudo do miocárdio e angina). Cançado et al. (2006) demonstram que a elevação em $10,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ nos níveis do $\text{PM}_{2,5}$, e em $42,9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ no PM_{10} devida a emissões da queima da cana-de-açúcar, na cidade de Piracicaba, está associada ao aumento de 21,4% (95% CI, 4,3-38,5) e 31,03% (95% CI, 1,25-60,21) nas admissões hospitalares por causa respiratória em crianças (menores de 13 anos de idade) e idosos (maiores de 64 anos de idade), respectivamente.

O Estudo Nacional de Morbidade, Mortalidade e Poluição do Ar (NMMAPS) é o maior estudo longitudinal até o momento (Samet et al., 2000b), e os resultados mostram associações positivas do PM_{10} com mortalidade cardiorespiratória e admissões hospitalares por doenças cardiovasculares, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e pneumonia, em pacientes acima de 65 anos vivendo em uma variedade de ambientes, em 90 diferentes cidades americanas. Em análise subsequente com correção dos erros estatísticos, Dominici e Burnett (2003) demonstraram o aumento de 0,34% (95% CI, 0.1-0.57) na mortalidade cardiorespiratória para cada aumento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ no PM_{10} .

Cinco mil indivíduos vivendo próximo a rodovias de grande tráfego, na Holanda, foram acompanhados por oito anos, por Hoek et al. (2002), e uma maior associação com mortalidade cardiorespiratória para esse grupo foi constatada, na comparação com indivíduos que vivem em regiões com menores níveis de poluição ambiental.

Em estudo tipo coorte envolvendo 6.338 indivíduos adventistas do sétimo dia, na Califórnia, é clara a associação entre a exposição crônica ao PM e O₃ e mortalidade respiratória (Abbey et al., 1999).

Outra questão de grande importância é a forte relação existente entre a composição gasosa dos poluentes (CO, NO₂, SO₂, e O₃) e o material particulado presente no ar atmosférico, de tal modo, que informações adicionais relativas a essa composição são fornecidas regularmente pelo Regulamento Federal dos Estados Unidos da América. Estudo envolvendo 29 cidades européias, realizado por Katsouyanni et al. (2001), conclui que nas cidades com maiores níveis de NO₂, a associação positiva para mortalidade e PM₁₀ é significativamente maior. Geralmente, as associações são bem mais fortes quando poluentes gasosos estão envolvidos. Uma forte associação entre mortalidade cardiovascular e poluente gasoso também é registrada por Goldberg et al. (2001).

Alguns investigadores têm aventado a hipótese de que poluentes gasosos podem agir como indicadores para a existência, na mistura de poluentes, de demais partículas, como por exemplo, a presença do monóxido de carbono indicando a presença de partículas ultrafinas próximo a fontes de combustão (Brook et al., 2004).

1.3 Prováveis Mecanismos Biológicos Envolvidos nos Efeitos Adversos Cardiorespiratórios

Estudos experimentais em animais demonstram com maior frequência que a exposição a partículas de combustão urbana pode produzir inflamação pulmonar (Saldiva et al., 2002), aumento nos níveis plasmáticos do fibrinogênio (Medeiros et al., 2004), bradicardia (Campen et al., 2002) e redução na taxa de variabilidade cardíaca (Rivero et al., 2005), importante condição de risco para morte súbita.

Em estudos observacionais em seres humanos fica clara a relação entre a exposição a partículas de combustão urbana e a inflamação pulmonar (Ghio et al., 2000; Ghio, Delvin, 2001; Schaumann et al., 2004), a elevação do número de neutrófilos polimorfonucleares e das plaquetas, em amostras de sangue de indivíduos saudáveis (Delfino et al., 2005), o aumento dos níveis plasmáticos do fibrinogênio (Ghio et al., 2000; Pekkanen et al., 2000; Schwartz, 2001; Ghio et al., 2003; Holgate et al., 2003), o aumento da viscosidade plasmática (Peters et al., 1997), o aumento dos níveis de diversas citocinas, em especial a IL-6, como revisado por Delfino et al. (2005), o aumento dos níveis da pressão sanguínea e redução da taxa de variabilidade cardíaca (Pope et al., 1999; Santos et al., 2005) e morte por arritmia (Dockery et al., 2005; Rich et al., 2006).

Aumentos dos níveis de fibrinogênio, e contagem de neutrófilos têm sido associados à doença coronariana (Schwartz, 2001), morte súbita (Routledge et al., 2003) e infarto agudo do miocárdio (Peters et al., 2004).

A despeito de todas as evidências estabelecidas por inúmeros estudos, o exato mecanismo biológico, ou mecanismos responsáveis pelos efeitos diversos à saúde não têm sido identificados. Fatores dependentes do receptor, como os genéticos e de co-morbidade, bem como as características de composição e aerodinâmica das partículas desempenham um importante papel na patogênese da inflamação induzida pela partícula. Os possíveis mecanismos biológicos associando poluição do ar e doença cardíaca envolvem efeitos diretos dos poluentes no sistema cardiovascular, sangue e receptores pulmonares, e/ ou efeitos indiretos mediados por estresse oxidativo pulmonar e resposta inflamatória (Brook et al., 2004). Um número de possibilidades está listado no Quadro 4.

Quadro 4. Possíveis mecanismos de efeitos adversos à saúde relacionados aos poluentes

1. Inflamação pulmonar induzida pelo material particulado e poluentes gasosos.
2. Geração de radicais livres e estresse oxidativo produzido pelos metais de transição.
3. Estimulação da atividade do sistema nervoso autonômico, que regula a taxa de variabilidade cardíaca e reatividade das vias aéreas.
4. Indução a estados pró-coagulantes de maneira indireta e após acesso ao sistema circulatório.

Devido à variabilidade de perfis químicos das partículas ambientais, os componentes mais importantes não têm sido positivamente determinados, embora os constituintes mais comuns sejam conhecidos, a saber: o carbono orgânico e elementar, os nitratos, os sulfatos, uma variedade de metais, e endotoxinas bacterianas. Estudos experimentais com ratos sugerem que respostas biológicas adversas ao PM se relacionam mais à composição do particulado, dependente da fonte emissora, e das condições climáticas do que à massa da partícula (Ghio, Delvin, 2001).

O Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental vem tentando elucidar não somente os efeitos do material particulado relacionados à sua dimensão (PM_{10} , $PM_{2.5}$ e $PM_{0.1}$), como também à sua toxicidade. Saldiva et al. (2002) afirmam que exposição aguda ao concentrado de partículas induz a uma importante reação inflamatória nos pulmões dos animais expostos, e que essa reação é influenciada pela composição das partículas.

Muitos metais de transição (ferro, cobre, vanádio, zinco, cromo, cobalto, cádmio e níquel) têm sido sugeridos como potenciais agentes na indução da resposta inflamatória ao material particulado, uma vez que se associam mais constantemente a partículas de menor tamanho, e exibem um grande potencial oxidativo (Stohs, Bagchi, 1995; Ercal et al., 2001; Schaumann et al., 2004).

Embora considerável quantidade de dados relacione o particulado grosso e fino aos efeitos adversos à saúde, muito pouco se sabe a respeito das partículas ultrafinas ($PM < 0,1\mu m$), que são mais abundantes,

potencialmente mais tóxicas, e até o presente momento sem padronização para o controle de seus níveis no ar ambiental.

Mais recentemente, diversos autores vêm considerando que partículas ultrafinas possam penetrar no sistema circulatório (Nemmar et al., 2002a; Geiser et al., 2005) e exercerem maior efeito tóxico que $PM_{2,5}$ e PM_{10} por terem maior conteúdo de metais de transição e substâncias químicas redutoras, o que também explicaria os efeitos adversos cardíacos ocorridos em poucas horas, como por exemplo, o infarto agudo do miocárdio (Dockery, Stone, 2007).

Alteração no tônus vascular, especificamente, vasoconstrição arterial, foi detectada em indivíduos saudáveis, após exposição a altos níveis de concentrado de partículas ambientais e ozônio (Brook et al., 2004).

A habilidade que os metais de transição, presentes no material particulado, apresentam de induzir toxicidade pulmonar através do estresse oxidativo, potencializando a resposta inflamatória (Wilson et al., 2002), também tem sido sugerida na doença vascular, especialmente na injúria cardíaca, como a aterogênese, a trombose arterial e a falência cardíaca (Gurgueira et al., 2002; Madamanchi et al., 2005a, 2005b).

Em adição aos metais, os efeitos do material particulado podem ser mediados ou modificados por poluentes gasosos. Monóxido de carbono (CO) atmosférico e níveis de NO_2 têm sido associados a admissões hospitalares por doença isquêmica cardíaca e ao aumento do risco de depressão do segmento ST durante exercícios, em pacientes com doença arterial coronariana estável (Bhatnagar, 2004).

A inflamação pulmonar provocada pela inalação dos diversos tipos de poluentes pode ser avaliada de forma não invasiva, pela determinação do óxido nítrico exalado, um mensageiro biológico com múltiplas funções. Sua importância e principais características serão discutidas mais adiante.

1.3.1 Poluição do Ar e Indução de Doença por Estresse Oxidativo

Estudos recentes têm demonstrado que metais como o ferro, o cobre, o cádmio, o mercúrio, o níquel, o chumbo e o vanádio, encontram-se adsorvidos na superfície das partículas de poluentes e induzem uma resposta inflamatória por gerarem altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), também conhecidas como radicais livres de oxigênio (Ercal et al., 2001). Radicais livres de oxigênio são aqueles nos quais o elétron não pareado está num átomo de oxigênio.

Esses radicais são resultantes de uma situação de desequilíbrio entre pró-oxidação e antioxidação, devido a uma inadequada disponibilidade de substâncias neutralizadoras, referidas como antioxidantes. A elevação endógena de seus níveis caracteriza o processo do estresse oxidativo, no qual os lipídios, tanto em membranas internas, como em membranas plasmáticas, as proteínas e o DNA celular são oxidados (Stohs, Bagchi, 1995; Ercal et al., 2001).

Os radicais livres de oxigênio desempenham um papel central na patogênese de muitas doenças pulmonares, e mais recentemente, tem sido

provado participarem do início e progressão das disfunções cardiovasculares, associadas a doenças como hipertensão, diabetes mellitus, hiperlipidemia, doença isquêmica e falência cardíaca crônica (Taniyama, Griendling, 2003).

Vários sistemas biológicos geram naturalmente esses radicais livres de oxigênio, e eles também podem ser produzidos nesses mesmos sistemas a partir da exposição a substâncias exógenas. Um dos mais comuns e importantes radicais livres de oxigênio é ânion superóxido (O_2^-), que pode ser transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH), altamente reativo na presença de ferro (Fe^{2+} e Fe^{3+}) e outros elementos traços (metais de transição).

Nos pulmões, ROS são gerados a partir de fontes endógenas, como por exemplo, mitocôndrias, microsossomos, retículo endoplasmático, núcleo, células fagocitárias e células endoteliais; e exógenas, como poluentes aéreos, tabaco, gases tóxicos, vapores, substâncias químicas, solventes orgânicos, pesticidas, e toxinas contidas no ar ambiental (Vallyathan, Shi, 1997).

Para que ocorra a peroxidação lipídica é necessária a presença de metais no estado 2^+ e 3^+ , como por exemplo, o Fe^{3+} , provavelmente, na forma complexada a uma molécula de dióxido de oxigênio, permitindo que a reação de Fenton aconteça. Os passos na geração de radicais livres através da reação de Fenton, mediados pelo ferro, estão sumarizados abaixo:

O Fe^{2+} e Fe^{3+} atuam como catalisadores, não sofrendo mudança no estado de oxidação. Mínimas quantidades de ferro são capazes de gerar significativas quantidades de radicais OH (Bayir, 2005).

Os principais representantes do sistema antioxidante de defesa são a enzima superóxido desmutase (SOD), a vitamina E (tocoferol), a vitamina C (ácido ascórbico), a pré-vitamina A (beta-caroteno) e a vitamina A (retinol).

Há evidências de que a deficiência dos antioxidantes, além de enfraquecer os mecanismos de defesa, pode contribuir para o aumento da inflamação das vias aéreas induzida pelo material particulado, aumentar a susceptibilidade à infecção e à asma (Bernstein et al., 2004). Tal condição pode explicar a existência de indivíduos mais susceptíveis aos efeitos adversos durante a exposição a poluentes, na comparação com indivíduos com defesas antioxidantes normais.

Em adição ao potencial de dano oxidativo direto, a exposição a espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode resultar na produção de uma categoria de compostos prostaglandinas like, biologicamente ativas, denominadas isoprostanos. Isoprostanos são gerados quando radicais livres de oxigênio (H_2O_2 e superóxido) reagem com ácidos graxos não saturados, como por exemplo, o ácido araquidônico presente nas membranas fosfolipídicas, e com ácidos graxos polisaturados resultando em peroxidação lipídica e conseqüente injúria celular (Cowley, 2003). Conseqüentemente, o isoprostano tem sido considerado um marcador do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica, em um grande número de patologias, incluindo inúmeras condições pulmonares.

Acentuada elevação dos níveis de isoprostano tem sido observada no ar exalado de pacientes asmáticos (Shahid et al., 2005), na doença pulmonar obstrutiva crônica e no lavado brônquico de pacientes com doença pulmonar intersticial (Cowley, 2003). Outros estudos têm ligado fortemente o estresse oxidativo à patogênese de doenças inflamatórias crônicas, doenças neurodegenerativas, algumas neoplasias, e alguns tipos de doenças gastrointestinais, além das doenças cardiovasculares (Opara, 2006).

1.3.2 Poluição do Ar e Óxido Nítrico

Poucos estudos têm examinado o efeito da exposição à poluição atmosférica no óxido nítrico exalado. van Amsterdam et al. (1999) compararam níveis de poluição aérea ambiental e níveis de óxido nítrico exalado em 16 indivíduos adultos não fumantes, por 14 dias consecutivos, e uma forte associação foi encontrada para o monóxido de carbono (CO) e o óxido de nitrogênio (NO_x). Outro estudo realizado com indivíduos idosos (Adamkiewicz et al., 2004) mostra aumentos na fração exalada de NO (eFNO), de forma aguda (24 horas), associados ao aumento da concentração média do PM_{2,5} no ar atmosférico. Delfino et al. (2006) assinalaram forte associação positiva entre eFNO e o aumento médio (2dias) na concentração de poluentes, em crianças asmáticas.

A análise por quimioluminescência permite mensurar concentrações do óxido nítrico contidas na amostra através da reação deste gás com o

ozônio. Há produção de dióxido de nitrogênio (NO_2) num estado excitado e, como este, move-se para um estado de repouso, ocorre emissão de luz que é estequiometricamente relacionada com a concentração do gás NO presente na amostra. Estudos demonstram que a mensuração de NO em ar expirado pode representar uma medida não invasiva da inflamação aérea. Especificamente, óxido nítrico exalado tem sido considerado marcador para os pacientes com tosse crônica, DPOC e asma (Adamkiewicz et al., 2004).

Várias outras doenças pulmonares apresentam níveis elevados de NO. Por exemplo: bronquietasias, fibrose cística, sarcoidose, doença pulmonar obstrutiva crônica, infecções do trato respiratório alto (virais). Condições associadas a baixos níveis de NO exalado são a hipertensão pulmonar, hipotermia, displasia broncopulmonar, uso de álcool, tabaco, cafeína e outras drogas (Laurindo, Leite, 2003).

O óxido nítrico é um mensageiro intracelular gasoso, com vida média bastante reduzida. Tem importantes e amplas funções biológicas incluindo neurotransmissão, função imune, inflamatória e defesa do hospedeiro, sendo muitos desses processos relevantes à fisiopatologia pulmonar e cardiovascular.

No sistema respiratório, o NO regula tanto o tônus vascular, como o brônquico, promovendo dilatação em ambos, facilita a coordenação dos movimentos ciliares das células epiteliais, e é um importante neurotransmissor para os neurônios não-adrenérgicos e não-colinérgicos presentes na parede brônquica. Essa molécula pode ser detectada no gás exalado, com variação na concentração nos indivíduos saudáveis e com doença.

A síntese do óxido nítrico se dá a partir do aminoácido L-arginina por meio de uma reação catalítica de desaminação que envolve uma família de enzimas denominadas sintetases do óxido nítrico (SNO) que regulam a produção nos sistemas biológicos e são classificadas como tipo I ou neuronal (SNO_N), tipo II ou indutível (SNO_I), e tipo III ou endotelial (SNO_E) (Laurindo, Leite, 2003).

Enquanto as isoformas da sintetase óxido nítrico catalisam a mesma reação, a regulação da atividade dessas enzimas se dá de forma distinta. As sintetases, neuronal e endotelial, são ativas e produzem baixas quantidades de NO, na dependência das mudanças da concentração intracelular de cálcio. Em contraste, a sintetase NO_I não é influenciada pelo fluxo de cálcio, possibilitando a produção de grandes quantidades de NO quando na presença de citocinas, como por exemplo, o fator de necrose tumoral, interleucina 1 -beta e gama interferon (Laurindo, Leite, 2003).

Nos pacientes asmáticos, foi demonstrado que o aumento nos níveis de NO exalado deve-se à ação da SNO_I, presente nas células epiteliais das vias aéreas, quando na presença de citocinas inflamatórias, e essa produção parece ser inibida na presença de glucorticóides (Adamkiewicz et al., 2004).

A localização celular das várias isoformas do NO tem sido investigada por imunohistoquímica e técnicas de hibridização DNA. Nos pulmões de humanos, a SNO_N localiza-se no epitélio das vias aéreas e nervos da submucosa, a SNO_I tem sido documentada no epitélio das vias aéreas e células inflamatórias (macrófagos e neutrófilos), enquanto que a SNO_E existe no epitélio pulmonar e endotélio vascular.

1.3.3 Poluição e Trombose

Como já citado no item 1.3, mudanças na composição sanguínea resultantes da exposição à poluição do ar apresentam um grande potencial para efeitos adversos, em especial nos indivíduos com doença cardiovascular.

A hipótese de que a inflamação pulmonar desencadeada pela poluição aja como gatilho para a hipercoagulabilidade, tem sido sugerida por muitos estudos epidemiológicos, conforme revisão realizada por Delfino et al. (2005).

Secundariamente à inflamação pulmonar, observa-se o aumento dos níveis das citocinas inflamatórias, como as interleucinas IL-1, IL-6 e IL-8, e o fator de necrose tumoral (TNF- α); aumento dos níveis de proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa e o fibrinogênio, este último, um componente chave na coagulação sanguínea (Brook et al., 2004; Delfino et al., 2006).

Seaton et al. (1995) consideraram a possibilidade das partículas inaladas penetrarem na corrente sanguínea, e de forma direta interagirem com as plaquetas, com conseqüente alteração na coagulabilidade sanguínea. Posteriormente, Nemmar et al. (2002b), em estudo experimental, concluem que a presença de partículas ultrafinas na circulação pode afetar a hemostasia, levando a uma tendência pró-trombótica.

Estudos tipo coorte têm demonstrado que níveis aumentados das proteínas de fase aguda, citocinas e fatores hemostáticos são indicativos de um estado trombofílico ou de ativação endotelial, condições de risco para indivíduos com doença cardíaca preexistente, aumentando em muito a possibilidade da ocorrência de eventos oclusivos coronarianos e mortalidade cardiovascular (Delfino et al., 2005).

1.4 Relevância dos Parâmetros Hematológicos e de Hemostasia em Estudos de Poluição

Inúmeros parâmetros laboratoriais séricos e plasmáticos são utilizados na avaliação dos efeitos biológicos, em resposta à exposição crônica e aguda aos poluentes atmosféricos. Dentre eles destacam-se algumas proteínas de fase aguda, consideradas marcadores do processo inflamatório sistêmico.

A resposta de fase aguda é uma resposta do organismo a distúrbios da homeostase, secundários à presença de dano tecidual, processos infecciosos, processos inflamatórios, neoplasias ou desordens imunológicas. Ela acontece no sentido de restaurar a homeostase fisiológica, conforme esquematizado no Quadro 5 (Heinrich et al., 1990) e consiste em uma reação local, no sítio da injúria, caracterizada por um número de respostas, como a dilatação dos vasos sanguíneos, o acúmulo e a ativação de células nucleadas, como, granulócitos e monócitos, que por sua vez liberam citocinas de fase aguda. Adicionalmente, fibroblastos e células endoteliais são hábeis em produzir citocinas.

Miller et al., em 1951, demonstram que o fígado é o maior órgão para a síntese das proteínas de fase aguda. Uma vez que o aumento dos níveis dessas proteínas se dá em local distinto do fígado, a existência de mediadores hormônios-like foi sugerida. Células normalmente presentes no local da injúria tecidual, como, por exemplo, os leucócitos, os monócitos e macrófagos, foram propostas como possíveis produtoras desses mediadores.

Tais mediadores agem como receptores específicos em diferentes células-alvo levando a uma reação sistêmica caracterizada por leucocitose, aumento da taxa de hemossedimentação eritrocitária, proteína C reativa, haptoglobina, aumento dos níveis de fibrinogênio, fator VIII da coagulação, entre outras manifestações.

Quadro 5. Mecanismos de respostas de fase aguda no organismo, adaptado de Heinrich et al. (1990).

1.4.1 Hemograma

O hemograma tem como finalidade avaliar as séries sanguíneas, a saber: a vermelha, a leucocitária e a plaquetária, permitindo o estudo de inúmeras condições hematológicas, como anemias, leucemias, infecções bacterianas e virais, entre outras, sinalizando ainda, a existência de processos inflamatórios.

Na inflamação aguda, observa-se alteração no fluxo sanguíneo caracterizado por vasodilatação, migração dos leucócitos circulantes para a área afetada, possibilitada pela marginação dos leucócitos na parede dos vasos e transmigração através do endotélio vascular (diapedese).

Frente à presença de processos inflamatórios, as três séries estudadas no hemograma podem sofrer alteração dependendo da intensidade, extensão e tempo de instalação do processo inflamatório. As alterações no hematócrito, nos leucócitos e nas plaquetas são as de maior importância, pois, quando em níveis aumentados, podem contribuir para o aumento da viscosidade sanguínea, e conseqüentemente, ao agravamento da isquemia em pacientes portadores de condições de risco para eventos isquêmicos (Peters et al., 1997; Lowe, 2005, 2006).

1.4.2 Velocidade de Hemossedimentação Eritrocitária (VHS)

A velocidade de hemossedimentação eritrocitária (VHS) é um teste não específico, freqüentemente usado como indicador de atividade de

doença. Reflete a tendência das células vermelhas do sangue de sedimentarem mais rapidamente em face de alguns estados de doença, usualmente, pelo aumento na concentração plasmática do fibrinogênio, imunoglobulinas e outras proteínas reativas de fase aguda.

Causas comuns de elevação da taxa de hemossedimentação eritrocitária são: a infecção, processos inflamatórios, neoplasias, gravidez, doenças reumatológicas e alguns outros estados crônicos de doença, como, por exemplo, a infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida. Embora sua elevação ocorra mais tardiamente na doença aguda, é sensível no rastreamento dos processos acima citados e no controle do tratamento de algumas doenças infecciosas ou inflamatórias (Nelson, Morris, 1995). É mensurada pela metodologia de Westergreen ou Wintrobe e, mais recentemente, de forma automatizada através da adaptação desses métodos.

Esse marcador de resposta inflamatória sistêmica vem sendo utilizado em estudos que investigam efeitos da exposição à poluição atmosférica em humanos (Delfino et al., 2005). Estudos evidenciam que os marcadores de baixo grau inflamatório, como contagem global de leucócitos, a velocidade de hemossedimentação eritrocitária, o hematócrito e a viscosidade plasmática, mostram associação com a doença cardiovascular, acidente vascular cerebral e mortalidade, embora com modesto risco relativo (Lowe, 2006).

1.4.3 Reticulócito

O reticulócito é uma célula integrante da série vermelha, num estágio maturativo que antecede o do eritrócito, anucleada, possui restos de RNA no citoplasma, permitindo sua classificação em mais imaturo, quanto maior a quantidade de RNA citoplasmático, ou mais maduro na condição inversa; e apresenta maior volume. Em condições de estresse suficiente para estimular a linhagem eritrocitária da medula óssea, ocorre liberação dos elementos imaturos para a circulação como, por exemplo, os reticulócitos, que atravessam os sinusóides da medula óssea e entram na circulação, transformando-se em eritrócitos após 24 horas.

A exposição à poluição atmosférica tem sido considerada por alguns autores estímulo suficiente para provocar a liberação dos elementos medulares (Suwa et al., 2002).

1.4.4 Mielograma

O mielograma é útil na investigação diagnóstica e acompanhamento de inúmeras doenças que acometem a medula óssea, como as hematológicas, as de depósito e as parasitárias. A medula óssea é responsável pela hematopoese e seu ritmo de produção dos elementos do sangue depende da demanda de cada série, separadamente. As principais séries constituintes da hematopoese são: a granulocítica, a eritroblástica, a

megacariocítica, a linfoplasmocitária e a monocítica. A realização do mielograma permite avaliar quantitativa e qualitativamente a medula óssea.

A possibilidade de estimulação da medula óssea através de mediadores inflamatórios liberados pelo processo inflamatório pulmonar, desencadeado pela exposição a poluentes atmosféricos, tem sido proposta (Suwa et al., 2002). Em consequência dessa estimulação ocorreria o aumento na síntese medular dos neutrófilos e a liberação desses elementos para a circulação, assim como o aumento na síntese medular dos reticulócitos.

1.4.5 Proteína C Reativa (PCR)

A proteína C reativa (PCR) é uma das principais proteínas de fase aguda, pois sua concentração pode aumentar precocemente 10 a 100 vezes, nas primeiras 24 horas de processos infecciosos, inflamatórios, infarto do miocárdio, neoplasia, etc. (Heinrich et al., 1990). Além de permitir discriminar processo infeccioso bacteriano (níveis mais altos) de processo infeccioso viral (níveis mais baixos), sua dosagem pode ser usada como indicador de risco para doença cardiovascular de forma independente dos outros fatores de risco já conhecidos, uma vez que sinaliza a existência de processo inflamatório crônico.

Em estudos prospectivos, tem sido demonstrada a associação entre esse marcador e o risco para doença cardiovascular, similar ao do

fibrinogênio (Lowe, 2005, 2006), e uma associação positiva frente à exposição a níveis aumentados de PM₁₀ no ar atmosférico (Seaton et al., 1999; Routledge et al., 2003).

1.4.6 Citoquinas

Citoquinas são fatores humorais secretados por células ativadas imunologicamente como, por exemplo, os macrófagos, quando estes são ativados pela presença de antígenos ou de outras citoquinas. Funcionalmente são organizadas em grupos de acordo com suas principais atividades (Kishiyama, Adelman, 2000):

- 1) as que promovem e mediam a imunidade natural, como a IL-1, IL-6, interferon (IFN- γ) e IL-8;
- 2) as que dão suporte a processos inflamatórios alérgicos, como a IL-4 (promotoras da produção da IgE), IL-3, IL-9 e IL-10; promovem crescimento das células mastocitárias, e estimulam o fator de crescimento da colônia granulocítica-macrofágica (GM-CSF);
- 3) as que controlam a atividade reguladora linfocitária, como a IL-10, produzida pelos linfócitos helper TH2, e IFN- γ , produzido pelo linfócito helper TH1;
- 4) as que agem como fator de crescimento hematopoiético, como a IL-7 e o GM-CSF.

Citoquinas que mediam resposta inflamatória, como a IL-6, têm sido investigadas no lavado brônquio alveolar, em humanos voluntários, saudáveis, expostos à poluição atmosférica, com clara associação ao processo inflamatório pulmonar (Ghio, Devlin, 2000); e têm sido também utilizadas como marcadores no estudo das alterações hematológicas consequentes à exposição aos poluentes atmosféricos (Delfino et al., 2005).

1.4.7 Fibrinogênio

O fibrinogênio é uma proteína dimérica, de alto peso molecular, sintetizada primariamente nas células do parênquima hepático, e participa dos estágios finais do processo da coagulação sanguínea, onde, sob ação da trombina, é clivado, permitindo a formação do coágulo de fibrina. Sua síntese é marcadamente aumentada durante estados de estresse, como dano tecidual, processos infecciosos e inflamatórios, por tratar-se de uma proteína de fase-aguda. O fibrinogênio pertence ao grupo classe II das proteínas reativas, e sua formação é induzida pela IL-6. O aumento na produção da IL-6 pelas células inflamatórias estimula os hepatócitos a aumentarem a síntese de proteínas de fase aguda tipo II (Kishiyama, Adelman, 2000).

Dados epidemiológicos indicam que altos níveis de fibrinogênio plasmático estão associados ao aumento do infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (Eisenberg et al., 2003). A associação do fibrinogênio plasmático com eventos vasculares e não vasculares, e morte (Fibrinogen

Studies Collaboration, 2005) pode resultar de efeitos não específicos na resposta inflamatória (Lowe, 2005), como os provocados por condições adversas de vida, e ambientais, como, por exemplo, baixa condição sócio-econômica, infecções e tabagismo.

Atualmente, inúmeros estudos experimentais e epidemiológicos têm ressaltado aumentos dos níveis do fibrinogênio em resposta à exposição aos poluentes atmosféricos (Pekkanen et al., 2000; Brook et al., 2004; Delfino et al., 2006).

1.4.8 Fator VIII

O fator VIII da coagulação é uma glicoproteína que participa da fase intermediária da via intrínseca da cascata da coagulação. É aparentemente sintetizada pelo fígado e endotélio, e secretada no plasma, onde circula complexado à molécula de von Willebrand. O fator VIII funciona como um cofator na coagulação sanguínea, acelerando a conversão de fator X a X ativado, na presença de fator X ativado, cálcio e fosfolípide. É considerado uma proteína de fase aguda em humanos, e recentemente foi demonstrado ser responsiva a IL-6. (Ichinose, Davie, 1994).

Os efeitos do PTS sobre o fator VIII da coagulação não são conhecidos e, sendo este fator reconhecidamente associado à doença trombótica venosa (Kamphuisen et al., 2001; Kyrle et al., 2003; Lowe, 2005, 2006), faz-se necessário estudar o impacto da exposição ao PTS sobre esse marcador de risco trombótico.

1.4.9 Coagulograma

O estudo das proteínas da coagulação envolve o estudo das diferentes vias de ativação da cascata da coagulação, a saber, via intrínseca, extrínseca e comum que são avaliadas nos testes que compõem o coagulograma.

A avaliação da via extrínseca se dá através do teste denominado Tempo de Protrombina (TP) que avalia o fator VII e os fatores da via comum, X, V, II e I; enquanto os fatores XII, XI, IX, VIII são avaliados pela via intrínseca através do Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa).

Os mecanismos que associam poluição e alterações nos fatores de coagulação sanguínea permanecem incertos, sendo a inflamação um dos contribuintes principais, uma vez que promove a síntese do fator tecidual em leucócitos e células endoteliais estimuladas por citocinas inflamatórias, proteínas de fase aguda e espécies reativas de oxigênio (Baccarelli et al., 2007). A exposição do sangue a fatores que ativam a via extrínseca da coagulação (via fator VII) é monitorada pelo TP.

Os níveis plasmáticos de poucos fatores da coagulação têm sido investigados como potenciais mediadores da hipercoagulabilidade relacionada à poluição atmosférica, especificamente, o fibrinogênio e o fator VII (Seaton et al., 1999; Baccarelli et al., 2007). A associação entre exposição aos agentes poluentes do ar e hipercoagulabilidade, não tem sido determinada pelos testes globais da coagulação.

Até o presente momento, na literatura, a análise dos efeitos biológicos provocados pelo material particulado sugere um mecanismo de toxicidade, porém, sem elucidar todas as etapas, nem tampouco, seus componentes. Assim sendo, a realização de estudos experimentais controlados se faz necessária no intuito de complementar os achados epidemiológicos que têm mostrado uma associação clara entre poluição atmosférica e morbimortalidade por doenças cardiovasculares. A hipótese de que ocorra efeito direto do material particulado sobre o músculo cardíaco, à semelhança dos pulmões, merece ser investigada. Além disso, é preciso melhor caracterizar a influência da composição dos poluentes atmosféricos liberados por diferentes fontes de emissão sobre a resposta biológica local e sistêmica.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar os efeitos agudos da exposição a baixas concentrações de material particulado total em suspensão, emitido por diferentes fontes, sobre marcadores inflamatórios locais e sistêmicos em diferentes tecidos de ratos.

2.2 Específicos

1. Caracterizar a composição inorgânica dos materiais particulados provenientes de três diferentes fontes de poluentes, a saber, automotiva, industrial e da queima de biomassa, especialmente no que diz respeito aos metais de transição.

2. Analisar a resposta biológica local pela exposição aguda a baixas concentrações de material particulado total em suspensão, de diferentes fontes de emissão, através da mensuração do óxido nítrico exalado pulmonar e da avaliação do estresse oxidativo tecidual pulmonar e cardíaco, utilizando marcador específico para o isoprostano 8-Epi-Prostaglandina F_{2a}.

3. Analisar a resposta sistêmica provocada pela exposição aguda a baixas concentrações do material particulado total em suspensão, de diferentes fontes de emissão, através dos seguintes marcadores hematológicos: hemograma completo (séries vermelha, leucocitária e plaquetária), reticulócitos, relação granulocítica-eritrocítica medular, fibrinogênio, fator VIII, tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada.

3. MÉTODOS

Toda a parte experimental do presente estudo foi realizada no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O protocolo do experimento foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo A).

3.1 Obtenção das Amostras de PTS, Análise da Composição Elementar, Extração dos Filtros e Preparo das Soluções Aquosas

As partículas foram coletadas em filtros de fibra de vidro, com 12 mm de diâmetro e baixa espessura, secos previamente a 50°C, durante 24 horas, e pesados antes e após a coleta das partículas.

As partículas totais em suspensão (PTS) foram coletadas usando amostrador de alto volume (HIVOL, Energética® Brasil). Para obtenção do PTS de São Paulo (fonte automotiva), o amostrador foi colocado em uma área externa da Faculdade de Medicina situada em uma intersecção com

grande tráfego, aproximadamente a 15 metros acima do nível da rua. O PTS de Cubatão, um centro industrial petroquímico e químico do estado de São Paulo, foi obtido com o amostrador localizado em um posto de gasolina perto de uma grande siderúrgica.

O PTS gerado a partir da queima da cana-de-açúcar foi obtido na cidade de Araraquara, Estado de São Paulo, durante o período da queima dessa planta (de Maio a Outubro).

A concentração dos metais de transição foi determinada através da análise de dispersão de energia raio-X fluorescente (ED-XRF, *energy dispersive X-ray fluorescence*), também conhecida como fluorescência de raio-X não dispersiva, em aparelho da marca Shimadzu®, modelo EDX-700HS (Shimadzu Corporation, Analytical Instruments Division®, Kyoto, Japão). A determinação da composição elementar do material particulado coletado em filtros requer a análise de um filtro não exposto, cujo resultado é utilizado para se obter os valores dos elementos constituintes do filtro. Estes valores são descontados dos valores encontrados na amostra. Os resultados da análise de FRX são apresentados através da média do percentual de cada elemento em relação à área total varrida para todos os filtros analisados.

Posteriormente à análise de raio-X fluorescente, as partículas aderidas aos filtros foram extraídas por processo de agitação ultra-sônica em meio aquoso. Foram preparadas suspensões de PTS em água destilada na concentração de 20 µg/mL, e estas foram armazenadas sob refrigeração entre a 2 e 8°C.

3.2 Animais

Ratos Wistar adultos machos, com três meses de idade, pesando entre 300 e 350 g, foram obtidos no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Campinas, no Estado de São Paulo. Os animais foram mantidos a 22-23°C, em ciclos diários, alternando 12 horas em ambiente escuro e 12 horas em ambiente claro, com controle da umidade relativa do ar. Foram alimentados com ração e água *ad libitum*. (Medeiros et al., 2004; Rivero et al., 2005).

Os animais foram divididos em quatro grupos de 15 animais, assim definidos:

- a) Grupo I: Utilizado como controle. Recebeu instilação da solução de Black Carbon, um grafite inerte (BC);
- b) Grupo II: Recebeu instilação da solução PTS de São Paulo;
- c) Grupo III: Recebeu instilação da solução PTS de Cubatão;
- d) Grupo IV: Recebeu instilação da solução PTS de Araraquara.

3.3 Obtenção e Análise do Óxido Nítrico Exalado, e Instilação do Particulado Total em Suspensão (PTS)

Os sessenta ratos foram submetidos à entubação orotraqueal sob anestesia com Rompum[®] (Xilasina, 0,4 ml/rato, via intraperitoneal) e Ketamina-S(+)[®] (Cloridrato de Ketamina, 50 mg/kg de peso, via

intraperitoneal), usando-se um laringoscópio pediátrico adaptado e um tubo de polietileno com 16 mm de diâmetro, inserido para servir como tubo endotraqueal.

Após a anestesia, e previamente à instilação das amostras de PTS e do material-controle, foram coletadas amostras do óxido nítrico exalado (eNO) com os animais sob ventilação mecânica, própria para roedores (modelo 683; Harvard Apparatus®; Holliston, MA) e ajustada para manter uma ventilação normal (frequência respiratória de 70 inspirações/min e volume total de 10 ml/kg ou peso corpóreo). Na porção inspiratória do ventilador foi conectado um filtro para reduzir a zero a concentração de óxido nítrico no ar de entrada, e na porção expiratória, um balão impermeável ao óxido nítrico, aluminizado, com capacidade volumétrica de 1,5 litro, próprio para esse tipo de coleta (Mylar Bag®; Sievers Instrumentes Inc.®, Boulder, CO). O tempo de coleta foi de cinco minutos (Prado et al., 2004).

Decorrido esse tempo, os balões foram selados e o óxido nítrico mensurado por quimioluminescência, em analisador de resposta rápida (Model 280 NOA –Nitric Oxide Analyser – Sievers Instrumentes® Inc., Boulder, CO), calibrado com mistura padrão de NO (N₂ a 45 ppm, White Martins Gases Industriais®, São Paulo, SP, Brasil). A concentração média do óxido nítrico foi registrada em partes por bilhão (ppb), como índice da concentração do óxido nítrico no ar exalado.

Posteriormente à coleta do eNO, procedeu-se à instilação de um mililitro da solução específica em cada rato, através da cânula, de maneira

fracionada, respeitando-se intervalos de, pelo menos, três inspirações. Após recobrem a consciência, os animais retornavam às suas gaiolas localizadas no biotério, e lá permaneceram por 24 horas.

Decorridas 24 horas da instilação dos poluentes, os animais foram anestesiados com Nembutal[®] (pentobarbital sódico, 50 mg/kg de peso corpóreo, via intraperitoneal), submetidos à entubação orotraqueal, e amostras do eNO (pós-instilação) foram coletadas e mensuradas conforme metodologia acima citada.

3.4 Obtenção das Amostras Sanguíneas

Realizada a coleta do eNO (pós-instilação), os animais foram exsanguinados via aorta abdominal, e amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo anticoagulante EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético) e citrato a 3,2%, padronizados para os exames hematológicos e de hemostasia, respectivamente.

3.5 Análise Laboratorial dos Parâmetros Hematológicos e de Hemostasia

3.5.1 Parâmetros Hematológicos: Hemograma e Reticulócitos

A contagem automatizada das células sanguíneas (células brancas, células vermelhas e plaquetas) e dos reticulócitos foi mensurada em equipamento hemocitômetro XE 2000, da Sysmex®, Roche®, através da associação de metodologias, a saber: impedância elétrica para avaliação dos eritrócitos e das plaquetas, dispersão a laser associada à citotóxicidade para classificação do tamanho e complexidade nuclear dos leucócitos, e citometria de fluxo associada à coloração fluorescente para a avaliação dos reticulócitos.

A contagem diferencial dos leucócitos foi confirmada em método manual de contagem de lâmina sob microscopia óptica. As lâminas foram coradas pela coloração de Leishman, um corante amplamente utilizado em hematologia laboratorial. A coloração se deu em duas etapas: na primeira, as lâminas foram cobertas com solução pura do corante por cinco minutos (fase de fixação), e na segunda, água em pequena quantidade foi adicionada por mais quinze minutos (fase de coloração propriamente dita). Logo após, as lâminas foram lavadas com água corrente, e secas ao ar. A contagem diferencial foi realizada em sistema cego de identificação, com contagem de 100 células em aumento final de 400x.

3.5.2 Parâmetros de Hemostasia: Fator VIII, Fibrinogênio, Tempo de Protrombina e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

A determinação do Fator VIII da coagulação foi mensurada por metodologia coagulométrica *one-step* utilizando-se plasma deficiente em fator VIII[®], da Helena Laboratories[®]. Os níveis funcionais do fibrinogênio (Fibriquik[®], BioMérieux[®] S.A., Etoile, França) foram determinados por método de Clauss modificado (metodologia coagulométrica). O tempo de Protrombina (Simplastin Excel S[®]) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (Platelin LS[®]) foram mensurados por metodologia coagulométrica, utilizando-se reagentes da BioMérieux[®] S.A., Etoile, França. Todos os marcadores de hemostasia foram determinados em plasma citratado e mensurados em equipamento Thrombolyzer Rack Rotor (Behnk Elektronik[®] - Organon Teknica[®]), totalmente automatizado.

Por problemas metodológicos, no presente estudo não foram avaliados os seguintes parâmetros: a velocidade de hemossedimentação eritrocitária, a proteína C reativa e as interleucinas.

3.6 Análise da Medula Óssea

A medula óssea foi coletada do fêmur dos animais por transsecção do osso na parte proximal, para permitir a exposição da

medula, imediatamente após a exsanguinação dos animais. Em seguida, a medula óssea foi aspirada com auxílio de seringa e agulha, e uma extensão ou *imprint* foi realizada em lâmina para microscopia. Foram feitas duas lâminas por animal, secas ao ar e coradas com coloração de Leishman, a mesma utilizada na contagem diferencial dos leucócitos, descrita no item 3.5.1.

A análise e a contagem das células medulares foram realizadas por médico patologista clínico habilitado, em sistema cego de identificação, em microscopia óptica com aumento final de 1000x. Foram avaliadas 250 células por lâmina, sendo classificadas em: granulocíticas precursoras (mieloblastos, promielócitos, mielócitos e metamielócitos) e granulocíticas maduras (bastonetes e segmentados), eritroblastos, linfócitos, plasmócitos, e a relação granulocítica-eritrocítica foi determinada, sendo esta última, a de nosso interesse.

3.7 Análise Histológica Pulmonar e Cardíaca

Após a coleta das amostras sanguíneas e medula óssea, os pulmões e o coração de cada animal, por grupo, foram cuidadosamente dissecados *in bloc* para o estudo histológico. Um cateter plástico foi introduzido no lúmen traqueal e solução de formalina tamponada foi instilada nos pulmões, a uma pressão constante de 25 cm de H₂O, mantida por 24 horas. Durante o

processo de fixação, os blocos coração e pulmão foram mantidos imersos em solução tamponada de formalina. Depois de completado o processo de fixação, cortes sagitais dos lobos pulmonares e secções transversais de ambos os ventrículos foram realizados, e submetidos aos procedimentos histológicos de rotina para o embebimento por parafina. Cortes finos de cinco milímetros de espessura foram preparados e corados com hematoxilina-eosina (HE) para estudo histológico descritivo.

3.8 Análise do Estresse Oxidativo

O potencial oxidativo de cada uma das partículas foi avaliado por metodologia imunohistoquímica, através do uso de um marcador estável, o anticorpo anti-8-Epi-Prostaglandina F_{2a} (Isoprostane assay kit, goat anti-8-Epi-PGF2Alpha[®], Oxford Biomedical Research[®]). A imunohistoquímica utilizada para a pesquisa do anticorpo em tecido parafinado foi realizada pelo método biotina-estreptavidina peroxidase.

Os órgãos escolhidos foram os pulmões e o coração. Duas lâminas de cada órgão, por animal, previamente parafinadas, foram codificadas e analisadas por médico patologista habilitado, que desconhecia a codificação das lâminas. Foram realizadas duas leituras em momentos distintos (intra-observador) e a concordância entre as leituras foi estimada pelo coeficiente de correlação de Kappa, sendo aceitável um valor maior que 70%. A intensidade da positividade da reação foi avaliada, em cada lâmina, e

quantificada de acordo com escore qualitativo pré-definido, como ausente, leve, moderado e intenso, e transformada em variáveis numéricas discretas, zero, 1, 2 e 3, respectivamente.

3.9 Análise Estatística

Análises descritivas foram realizadas para todas as variáveis. Os resultados das variáveis quantitativas foram expressos como medidas de tendência central e de dispersão. Os resultados das variáveis qualitativas foram expressos por valores absolutos e relativos.

A comparação entre os grupos, dos efeitos à exposição aos diferentes PTS, nos desfechos adotados, foi realizada pela análise de variância (ANOVA) para as variáveis com distribuição normal, e pelo teste de Kruskal Wallis para aquelas que não satisfizeram essa condição. Quando demonstrada diferença entre grupos, o teste de Tukey foi adotado para identificar os grupos divergentes (SPSS versão 13; SPSS Inc.®, Chicago, IL). O nível estatístico de significância adotado foi de 5%.

4. *RESULTADOS*

4.1 Análise das Partículas

A Tabela 1 apresenta a análise da composição dos elementos inorgânicos presentes em cada uma das amostras de PTS, obtidas por análise de fluorescência por raio-X.

Tabela 1. Análise da composição dos elementos inorgânicos das amostras de PTS

Elementos dos PTS	FONTES DE PTS		
	São Paulo	Cubatão	Araraquara
	Média % (DP*)	Média % (DP)	Média % (DP)
Al (Alumínio)	0,003 (0)	- [†]	-
Si (Sílica)	0,004 (0)	1,280 (0)	0,002 (0)
S (Enxofre)	47,320 (5,50)	5,420 (4,07)	20,780 (4,07)
K (Potássio)	0,004 (0)	0,003 (0)	0,003 (0)
Ca (Cálcio)	2,650 (1,77)	36,060 (4,76)	0,200 (0,30)
Fe (Ferro)	47,790 (0,57)	53,340 (3,37)	73,280 (5,11)
Cu (Cobre)	1,160 (0,49)	3,140 (0,03)	5,110 (2,51)
Zn (Zinco)	0,004 (0)	-	0,003 (0)
Sr (Estrôncio)	0,110 (0,12)	0,680 (0)	0,003 (0)
Zr (Zircônio)	0,004 (0)	-	0,003 (0)
Ba (Bário)	0,004 (0)	-	0,003 (0)
Pb (Chumbo)	1,220 (0,60)	0,080 (0,27)	0,580 (0,27)
V (Vanádio)	0,003 (0)	-	0,002 (0)

*Desvio padrão; [†] Abaixo do limite de detecção.

O PTS de São Paulo, representativo da fonte automotiva, apresentou altas concentrações de enxofre (dióxido de enxofre) e chumbo, e menores de ferro e cobre, na comparação com os grupos de Cubatão e Araraquara. O PTS proveniente de fonte industrial (Cubatão) apresentou altas concentrações de cálcio, moderadas concentrações de ferro e cobre, enquanto que o PTS gerado pela queima de cana-de-açúcar (Araraquara) mostrou altas concentrações de ferro e de cobre, seguidas por moderadas concentrações de enxofre na comparação com os demais grupos.

4.2 Análise Descritiva dos Animais Utilizados

Todos os animais utilizados no estudo pertenciam à mesma raça, gênero e possuíam a mesma idade, diferindo somente em relação ao peso. A Tabela 2 mostra a variável de peso entre os grupos dos animais.

Tabela 2. Média e desvio padrão do peso dos animais

Grupos de animais	Peso médio (gramas)	Desvio Padrão
Black Carbon	332,3	14,8
São Paulo	345,4	27,1
Cubatão	335,1	31,0
Araraquara	340,2	16,5

4.3 Análise do Óxido Nítrico Exalado (eNO)

A Figura 1 mostra o delta do óxido nítrico exalado (determinações pré e pós-exposição) mensurado por análise de quimioluminescência.

Figura 1. Média e desvio padrão do delta do NO exalado (eNO) medido nos quatro grupos analisados

Todos os particulados totais em suspensão foram capazes de promover aumento das concentrações do eNO quando comparados ao grupo-controle (black carbon), mas o PTS de origem automotiva foi o único grupo com significância estatística na comparação com os demais ($p = 0,04$).

4.4 Análise dos Marcadores Hematológicos, de Hemostasia e da Medula Óssea

A tabela 3 mostra os marcadores hematológicos, de hemostasia e da medula óssea, relacionados à inflamação, que foram afetados pelo PTS.

Uma intensa resposta inflamatória foi observada no grupo exposto ao PTS proveniente de fonte automotiva, com aumentos dos níveis do fibrinogênio, fator VIII e plaquetas de 26.36% ($p = 0,03$), 53.86% ($p = 0,03$) e 20.75% ($p < 0,001$), respectivamente, comparado ao grupo black carbon.

O PTS originado pela queima da cana-de-açúcar foi capaz de produzir resposta inflamatória sistêmica evidenciada pelo aumento de 49,45% dos níveis plasmáticos do fator VIII comparado ao grupo-controle ($p < 0,05$), e de 2,4% dos níveis do fibrinogênio ($p > 0,05$).

O PTS de origem industrial produziu discreto aumento dos níveis do fator VIII e aumento de 22,22 % na contagem global dos leucócitos, embora, ambos sem significância estatística na comparação com o grupo-controle, e demais grupos ($p > 0,05$); e não foi observada alteração do nível plasmático do fibrinogênio. Esse grupo foi o único a apresentar efeito sobre a medula óssea, com aumento da relação granulocítica - eritrocítica, sugerindo maior liberação de leucócitos pela medula óssea após exposição, embora sem significância estatística.

Tabela 3. Média, desvio padrão, valores mínimos e máximos dos marcadores hematológicos, hemostáticos e da medula óssea afetados pelo PTS, com e sem significância estatística.

Parâmetros	Black Carbon	São Paulo	Cubatão	Araraquara
	Média (DP*)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
	Min [†] – Max [‡]	Min – Max	Min – Max	Min – Max
Leucócitos (10 ³ /mm ³)	3,4 (1,8) 1,6 - 8,3	3,0 (1,0) 1,4 - 5,2	4,1 (2,0) 9,9 - 8,6	3,0 (1,1) 1,3 – 5,2
Neutrófilos	1,0 (0,2)	1,2 (0,8)	1,6 (1,3)	0,9 (0,2)
Bastonetes (10 ³ /mm ³)	1,0 - 2,0	0,0 - 3,0	1,0 – 6,0	0,0 - 1,0
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	615,9 (98,25) 46,4 - 793,0	743,7* (73,4) 585,0 - 891,0	645,5 (109,0) 387,0 - 903,0	479,0 (230,8) 240,0 - 716,0
Fator VIII (%)	120,3 (24,2) 86,0 - 153,0	185,1** (37,1) 146,0 - 286,0	129,2 (33,0) 92,4 – 190,0	179,8** (42,7) 101,0 – 523,0
Fibrinogênio (mg/mL)	246,9 (32,9) 194,0 - 325,0	312,0* (42,7) 249,0 - 389,0	236,8 (37,8) 198,0 - 335,0	252,8 (40,5) 201,0 – 359,0
R G/E [¶]	1,2 (0)	2,5 (1,2)	3,5 (3,0)	2,9 (1,5)
Medular	1,2 - 1,2	1,0 - 4,4	1,5 – 9,6	1,5 - 6,6

*Desvio padrão; [†] Mínimo; [‡] Máximo; [¶] Relação Granulocítica/Eritrocítica;

* Diferente do grupo Black Carbon, Cubatão, e Araquara (p < 0,05);

** Diferente do grupo Black Carbon (p < 0,05).

Exposição aguda ao PTS de origem automotiva, industrial e proveniente da queima da cana-de-açúcar não foi capaz de produzir alteração nos seguintes parâmetros laboratoriais: contagem global de células vermelhas (RBC), hemoglobina, hematócrito, índices hematimétricos (volume corpuscular médio - VCM, concentração média de hemoglobina –

HCM), reticulócitos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos, tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada (Anexos B, C e D).

Os valores do TTPa não puderam ser considerados pois a padronização existente no laboratório de Coagulação da DLC, HC FMUSP, considera todo resultado encurtado, em segundos, igual ao valor mínimo de normalidade adotado. Sendo assim, os resultados encurtados do TTPa que refletiam a existência de altos níveis plasmáticos do fator VIII, foram considerados normais, ou seja, com tempos de 25 segundos, e uma relação igual a 1. Infelizmente, não foi possível recuperar, no arquivo do equipamento utilizado para o processamento das amostras, os reais valores obtidos, em especial, os dos grupos com alteração nos níveis do fator VIII.

Os valores do Tempo de Protrombina relacionados à razão normatizada internacional (INR) não foram considerados, por ser esse parâmetro de utilidade em pacientes que fazem uso de anticoagulação oral, não sendo essa uma condição dos animais, nesse experimento.

4.5 Análise Histológica Pulmonar e Cardíaca

A instilação das partículas provenientes de diferentes fontes promoveu mudanças inflamatórias no parênquima pulmonar. Os achados mais consistentes foram focos de infiltrados no parênquima pulmonar, constituídos por células polimorfonucleares e macrófagos nas áreas centro-acinares e bronquiólite respiratória. Esses achados foram mais intensos nos

animais que receberam partículas originadas de fonte de tráfego (Figura 2, setas). O padrão focal observado nas lesões deveu-se provavelmente ao procedimento de instilação, uma situação que pode favorecer o acesso das partículas às áreas dependentes do pulmão. Nenhuma mudança histológica aparente foi observada no coração.

Figura 2. Fotomicrografia de parênquima pulmonar dos animais expostos ao PTS automotivo (coloração HE, 400x)

A Figura 3 mostra o padrão histológico observado no tecido pulmonar de ratos expostos ao material particulado coletado em Araraquara. Foram observadas áreas de inflamação ativa, com células polimorfonucleares no lúmen dos alvéolos pulmonares (setas).

Figura 3. Fotomicrografia de parênquima pulmonar dos animais expostos ao PTS proveniente da queima da cana-de-açúcar (coloração HE, 400x)

A Figura 4 mostra o padrão histológico observado no tecido pulmonar de ratos expostos ao material particulado coletado em Cubatão. Foram observados focos de maior acúmulo de macrófagos no lúmen dos alvéolos pulmonares (setas).

Figura 4. Fotomicrografia de parênquima pulmonar dos animais expostos ao PTS industrial (coloração HE, 400x)

A Figura 5 mostra o padrão histológico observado no tecido pulmonar de ratos expostos ao black carbon (grupo-controle). Foram observadas raras alterações teciduais, representadas pela presença de eventuais macrófagos no lúmen dos alvéolos pulmonares.

Figura 5. Fotomicrografia de parênquima pulmonar dos animais expostos ao Black Carbon (coloração HE, 400x)

4.6 Análise do Estresse Oxidativo

A figura 6 mostra os cortes histológicos pulmonares (A e B) dos animais expostos ao PTS da queima da cana-de-açúcar, que apresentaram marcação positiva para o anticorpo anti-8-Epi-Prostaglandina F_{2a} (Isoprostano), na reação de imunohistoquímica. A marcação positiva foi observada no bronquíolo terminal (seta 1) e na artéria bronquíolo terminal (seta 2), na camada muscular.

Figura 6. Aspectos da reação de imunohistoquímica para o marcador isoprostano (8-Epi-Prostaglandina F_{2a}) em pulmão (A e B) (400x)

A figura 7 mostra os cortes histológicos do coração (A e B) dos animais expostos ao PTS da queima da cana-de-açúcar, que apresentaram marcação positiva para o anticorpo anti-8-Epi-Prostaglandina F_{2a} (Isoprostano), na reação de imunohistoquímica. A marcação positiva reflete a ocorrência de peroxidação lipídica e, foi observada no tecido conjuntivo presente entre os fascículos, denominado perímísio (setas).

Figura 7. Aspectos da reação de imunohistoquímica para o marcador isoprostano (8-Epi-Prostaglandina F_{2a}) em coração (A e B) (400x)

A tabela 4 mostra os valores de tendência central e de dispersão do escore quantitativo para estresse oxidativo induzido nos pulmões e coração pelos diferentes PTS. Os coeficientes de correlação de concordância de Kappa para as análises do pulmão e do coração foram 0,88 e 0,83, respectivamente.

Tabela 4. Médias e desvio padrão da análise do estresse oxidativo

Tecidos	Estresse Oxidativo			
	Black Carbon	São Paulo	Cubatão	Araraquara
	Média (DP*)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
	Min [†] – Max [‡]	Min – Max	Min - Max	Min - Max
Pulmões	0,89 (0,78)	1,50 (0,71)	2,00 (0,94) *	2,40 (0,70) *
	0 - 2	0 – 2	1 - 3	1 - 3
Coração	1,22 (0,67)	1,20 (1,14)	1,89 (0,93)	2,33 (0,71) **
	0 - 2	0 - 3	1 - 3	1 - 3

*Desvio padrão; [†] Mínimo; [‡] Máximo; * Diferente do grupo Black Carbon ($p < 0,05$);

** Diferente dos grupos Black Carbon e São Paulo ($p < 0,05$).

Uma significativa resposta oxidativa foi observada nos pulmões e coração de ratos expostos ao PTS derivado da queima da cana-de-açúcar ($p < 0,001$). O PTS de origem industrial induziu alterações significativas nos pulmões ($p = 0,02$) e menores no coração ($p > 0,05$). O grupo automotivo apresentou um efeito muito discreto nos pulmões, e nenhum efeito no coração ($p > 0,05$).

5. *DISCUSSÃO*

Os resultados obtidos mostraram que uma única administração de pequena quantidade de partículas atmosféricas (20 µg) via intratraqueal foi capaz de desencadear resposta inflamatória pulmonar e sistêmica e que a composição das partículas afetou a magnitude do dano induzido local e sistemicamente.

A metodologia adotada em nosso estudo, incluindo o cuidado com os animais, a instilação intratraqueal e a análise dos órgãos é parte de um protocolo de pesquisa que tem sido utilizado pelo nosso grupo (Medeiros et al., 2004; Rivero et al., 2005).

O PTS gerado a partir de fonte automotiva, que apresentou as maiores concentrações de enxofre e chumbo, seguidas por menores de ferro e cobre, na comparação com os demais grupos, foi capaz de produzir a mais intensa inflamação pulmonar expressada pela histologia pulmonar e pelos níveis de óxido nítrico exalado, este último, um reconhecido marcador de processo inflamatório (Shahid et al., 2005; Delfino et al., 2006). É reconhecido que a resposta inflamatória pulmonar induz a liberação de substâncias pró-trombóticas na circulação (Brook et al., 2004; Routledge, Ayres, 2005; Delfino et al., 2005), expandindo a área de influência dos efeitos adversos provocados pela poluição. Ambos os PTS, o de origem industrial e o proveniente da queima da cana-de-açúcar não foram capazes de produzir tão notável aumento nos níveis do óxido nítrico exalado.

Esse resultado pode ser atribuído, principalmente, à presença de espécies químicas emitidas pelos veículos, tais como metais e hidrocarbonetos. É também importante notar que partículas de tráfego exibiram altas concentrações de enxofre (Tabela 1). A forma predominante de enxofre (S) no $PM_{2,5}$ é a SO_3 (sulfato secundário), um derivado da oxidação do dióxido de enxofre, que quando em contato com alguns metais de transição, como por exemplo o ferro, é convertido em ácido sulfúrico e sulfato ácido, ambos poderosos agentes irritantes para os pulmões, como demonstrado em experimentos animais (Rall, 1974; Künzli, Tager, 2006). Misturas de enxofre e material particulado são freqüentemente mais tóxicas do que o enxofre isoladamente, e a toxicidade depende da concentração de enxofre e da natureza e do tamanho das partículas (Künzli, Tager, 2006).

O presente estudo também demonstrou que pequena quantidade de PTS administrada a ratos foi capaz de promover aumento nos níveis plasmáticos do fator VIII e do fibrinogênio. Novamente, esses efeitos foram mais intensos nas partículas derivadas da fonte automotiva e, em uma menor extensão, nas partículas produzidas pela queima da cana-de-açúcar. Resposta sistêmica de fase aguda, como a expressada por esses dois marcadores hemostáticos tem sido considerada condição de risco para ruptura da placa de ateroma em indivíduos coronariopatas e para trombose (Routledge, Ayres, 2005). Outro efeito observado foi o aumento na contagem de plaquetas, também considerado um fator de risco associado à trombose, pois colabora para o aumento da viscosidade sanguínea (Pekkanen et al., 2000). Estudos prévios têm enfatizado os efeitos das partículas ($PM_{2,5}$, PM_{10} ,

e PTS) no fibrinogênio, levando em consideração a massa (Pekkanen et al., 2000; Brook et al., 2004; Delfino et al., 2005; Vermeylen et al., 2005) ao invés de sua composição. Os resultados encontrados reforçam a utilidade da especificação química das partículas na avaliação da toxicidade.

As partículas coletadas na área industrial foram hábeis em promover estresse oxidativo nos pulmões e em menor extensão no coração, sendo esses efeitos maiores do que os observados para o PTS de fonte automotiva. Por outro lado, houve discreta inflamação sistêmica representada por um pequeno aumento nos níveis do fator VIII, no intervalo de tempo estudado. A magnitude dessa resposta poderia ser explicada pelo alto percentual de cálcio existente na amostra. Na literatura, tem sido demonstrado que calcita (CaCO_3) apresenta a habilidade de reduzir a biodisponibilidade de metais para a acidificação, agindo como uma espécie de quelante, ou seja, diminuindo a disponibilidade destes metais para provocar efeitos adversos à saúde (Zhang, Huang 2005). Investigações por períodos de tempo prolongados talvez pudessem evidenciar a presença de respostas inflamatórias dependentes de proteínas de fase aguda.

Esse grupo foi o único que produziu aumentos na contagem global dos leucócitos, no número dos neutrófilos bastonetes e na relação granulocítica-eritrocítica medular, ambas as alterações consideradas fatores de risco cardiovascular (Routledge et al., 2003; Delfino et al., 2005). Esses efeitos são apontados por outros autores e sugerem ativação direta da inflamação celular (Nemmar et al., 2002a; Brook et al., 2004).

No PTS gerado a partir da queima da cana-de-açúcar foi observada a presença de ferro e cobre em alto percentual, na comparação com os demais grupos, e um maior efeito oxidativo pulmonar e cardíaco (Tabela 4). Alguns autores têm atribuído aos metais de transição, em especial, ao ferro e ao cobre, a capacidade de induzir injúria oxidativa não somente pulmonar, mas também cardíaca (Costa, Dreher, 1997; Campen et al., 2002; Routledge et al., 2003; Künzli et al., 2006).

A resposta inflamatória sistêmica, embora menor nesse grupo em comparação com a produzida pelo PTS de fonte automotiva, também é relevante do ponto de vista do risco trombótico e da exacerbação de doença isquêmica cardiovascular pré-existente, uma vez que, estudos prévios correlacionam aumento de 1% nos níveis de fibrinogênio com o risco de 1,7% para o infarto agudo do miocárdio (Meade et al., 1993).

Não é possível afirmar se o efeito oxidativo cardíaco observado neste estudo reflete a ocorrência de um processo tóxico, no entanto, Madamanchi et al. (2005) afirmam que vários modelos animais de estresse oxidativo cardíaco têm sustentado a idéia de que as espécies reativas de oxigênio têm um papel causal na aterosclerose e demais doenças cardiovasculares. O efeito oxidativo cardíaco tem sido considerado por muitos autores fator de risco para a ocorrência de disfunção da regulação autonômica cardíaca e, conseqüentemente, para a ocorrência de arritmias, mudanças na taxa de variabilidade cardíaca e vasoconstrição (Costa, Dreher, 1997; Campell et al., 2001; Gurgueira et al., 2002; Magari et al., 2002; Routledge et al., 2003; Brook et al., 2004; Delfino et al., 2005; Rhoden et al., 2005; Bhatnagar,

2006). Na tentativa de explicar os rápidos efeitos adversos ocorridos no sistema cardiovascular, como o infarto agudo do miocárdio, poucas horas após a exposição à poluição, muitos autores têm postulado a possibilidade de componentes solúveis do material particulado, como por exemplo, os metais de transição que se associam ao $PM_{2,5}$, serem capazes de rapidamente cruzarem a barreira epitelial pulmonar em direção à circulação, ocasionando efeitos diretos no sistema cardiovascular, fígado e sangue (Nemmar et al., 2002a; Brook et al., 2004; Geiser et al., 2005; Routledge, Ayres, 2005).

A Figura 8 apresenta de forma esquemática os prováveis mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos desfechos observados para cada um dos grupos de poluentes, apresentados anteriormente e o impacto potencial desses efeitos no sistema cardiovascular.

Figura 8. Prováveis mecanismos fisiopatológicos desencadeados pela composição elementar dos diferentes PTS e o impacto potencial no sistema cardiovascular

Os mecanismos responsáveis pelas diferentes respostas observadas entre as partículas, ou seja, uma maior inflamação pulmonar induzida pela fonte automotiva, uma maior oxidação cardíaca induzida pela queima de biomassa, e uma mais intensa alteração na contagem de células sanguíneas nas partículas industriais, não puderam ser plenamente avaliados nesse estudo, devido a algumas limitações intrínsecas em nossos dados. Embora tenha sido realizada a análise elementar das partículas, conhecemos pouco do estado de valência dos elementos presentes nas partículas, e não temos nenhuma informação a respeito dos componentes orgânicos.

Nossos esforços foram direcionados para detectar inflamação e não explorar a patogênese dos eventos observados. Entretanto, a despeito das

limitações acima mencionadas, há em nossa opinião, informações úteis no presente estudo. Primeiramente, foram detectadas evidências de inflamação e estresse oxidativo, este último, evidenciado através da peroxidação lipídica, tanto local como sistemicamente, face a doses muito baixas de partículas ambientais, sustentando o conceito de que, agudamente, o aerossol ambiente pode induzir inflamação subclínica mesmo a baixas concentrações. Além disso, a magnitude e o tipo de resposta foram afetados pela fonte emissora das partículas, indicando que somente a massa das partículas não é um bom estimador da exposição. Estes achados apresentam subsídios para suportar os resultados observados em inúmeros estudos epidemiológicos que avaliam morbidade e mortalidade cardiovasculares após exposições agudas ao material particulado.

6 . CONCLUSÕES

O modelo experimental utilizado foi adequado para a avaliação e comparação dos efeitos locais (pulmonar e cardíaco) e sistêmicos produzidos pela inalação dos diferentes tipos de material particulado total em suspensão, permitindo as seguintes conclusões:

- 1) A análise da composição elementar dos diferentes PTS mostrou predomínio de enxofre e ferro na fonte automotiva, predomínio de cálcio e ferro no PTS industrial e, predomínio de ferro e cobre no material proveniente da queima da cana-de-açúcar;
- 2) O particulado total em suspensão pode induzir, agudamente, inflamação subclínica mesmo a baixas concentrações;
- 3) A inflamação pulmonar, mesmo que subclínica, ocorrida em decorrência da inalação do particulado total em suspensão leva a uma inflamação sistêmica, evidenciada pelo aumento dos níveis plasmáticos dos componentes da coagulação, fator VIII e fibrinogênio;
- 4) O particulado total em suspensão pode induzir, agudamente, estresse oxidativo em sítio pulmonar e extrapulmonar, como ficou evidenciado pelos achados no tecido cardíaco;

- 5) A fonte emissora das partículas afeta o tipo e a magnitude da resposta inflamatória.

Anexo A Termo de Aprovação do Protocolo de Pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO – BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 28.08.03, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 585/03, intitulado: "A exposição aguda ao material particulado fino e suas repercussões nos sistemas respiratórios e cardiovasculares nos marcadores sorológicos de resposta inflamatória, endotelial e de hemostasia em ratos" apresentado pelo Departamento de Patologia.

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. Alfésio Luís Ferreira Braga

Pesquisador(a) Executante: Dra. Marjorie Paris Colombini

CAPPesq, 1 de setembro de 2003.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

Anexo B. Média, desvio padrão, valores mínimos e máximos da série vermelha do hemograma não afetados pelo PTS

Parâmetros	Black Carbon	São Paulo	Cubatão	Araraquara
	Média (DP*) Min [†] – Max [‡]	Média (DP) Min – Max	Média (DP) Min – Max	Média (DP) Min – Max
Eritrócitos (10 ⁶ /mm ³)	7,83 (0,65) 6,53 – 8,96	7,68 (0,46) 7,15 – 8,69	8,1 (0,5) 7,4 – 9,2	7,57 (0,6) 6,48 – 8,54
Hemoglobina (g/dL)	14,0 (1,45) 11,0 – 16,70	14,8 (0,83) 13,7 – 17,1	14,3 (0,65) 13,2 – 15,5	13,4 (0,91) 11,6 – 14,7
Hematócrito (%)	41,3 (4,6) 32,9 – 49,3	43,5 (2,6) 40,2 – 49,8	42,8 (1,7) 39,9 – 45,8	40,2 (2,6) 35,1 – 43,8
VCM	52,3 (2,35) 48,5 – 57,9	55,9 (1,54) 53,1 – 58,3	53,1 (2,0) 49,3 – 56,6	53,2 (1,8) 49,2 – 56,2
HCM	17,8 (0,75) 16,8 – 20,0	19,1 (0,6) 18,2 – 20,4	17,7 (0,62) 16,7 – 18,8	17,7 (0,49) 16,6 – 18,4
CHCM	33,9 (0,78) 31,6 – 34,8	34,2 (0,57) 33,3 – 35,8	31,3 (1,67) 33,7 – 34,5	33,3 (0,45) 32,6 – 34,
RDW	16,9 (1,9) 12,8 – 19,2	15,7 (5,26) 11,4 – 29,1	16,6 (2,47) 12,4 – 21,2	16,3 (2,36) 12,0 – 20,0
Reticulócitos (%)	3,2 (0,42) 2,6 – 3,8	2,8 (0,84) 1,3 – 4,2	2,2 (0,55) 1,0 – 3,0	2,9 (0,66) 2,2 – 4,4

*Desvio padrão; [†] Mínimo; [‡] Máximo

Anexo C. Média, desvio padrão, valores mínimos e máximos dos componentes da série branca do hemograma não afetados pelo PTS

Parâmetros	Black Carbon	São Paulo	Cubatão	Araraquara
	Média (DP*) Min [†] – Max [‡]	Média (DP) Min – Max	Média (DP) Min – Max	Média (DP) Min – Max
Neutrófilos (10 ³ /mm ³)	24,7 (14,0) 11,0 – 68,0	21,2 (11,7) 1,0 – 40,0	25,2 (11,4) 2,0 – 49,0	24,6 (11,6) 9,0 – 47,0
Neutrófilos segmentados (10 ³ /mm ³)	23,6 (13,9) 10,0 – 67,0	19,9 (11,1) 1,0 – 38,0	23,6 (10,9) 1,0 – 47,0	23,7 (11,5) 9,0 – 46,0
Linfócitos (10 ³ /mm ³)	72,4 (14,2) 31,0 – 88,0	74,9 (12,6) 56,0 – 96,0	71,2 (11,4) 50,0 – 97,0	72,0 (12,2) 50,0 – 90,0
Monócitos (10 ³ /mm ³)	2,6 (1,8) 1,0 – 6,0	3,0 (1,5) 1,0 – 6,0	3,13 (1,5) 1,0 – 6,0	2,7 (2,1) 1,0 – 7,0
Eosinófilos (10 ³ /mm ³)	0,2 (0,4) 0 – 1,0	0,6 (0,8) 0 – 2,0	0,4 (0,9) 0 – 3,0	0,5 (0,9) 0 – 3,0
Basófilos (10 ³ /mm ³)	0	0	0	0

*Desvio padrão; [†] Mínimo; [‡] Máximo.

Anexo D. Média, desvio padrão, valores mínimos e máximos dos marcadores hemostáticos não afetados pelo PTS

Parâmetros	Black Carbon	São Paulo	Cubatão	Araraquara
	Média (DP*) Min [†] – Max [‡]	Média (DP) Min – Max	Média (DP) Min – Max	Média (DP) Min – Max
Tempo de Protrombina (segundos)	25,8 (1,45) 23,9 – 29,0	26,6 (2,13) 23,7 – 32,3	22,1 (4,82) 14,6 – 28,5	21,6 (4,81) 14,8 – 28,8
Atividade de Protrombina (%)	36,4 (2,86) 31,7 – 41,2	35,1 (3,49) 27,6 – 40,7	47,8 (14,33) 32,4 – 75,0	49,0 (14,6) 32,0 – 72,0

*Desvio padrão; [†] Mínimo; [‡] Máximo.

Anexo E. Submissão do artigo “Composition of ambient particles influences pulmonary and systemic inflammatory responses in rats” ao American Journal Respiratory and Critical Care Medicine – American Thoracic Society, número Blue-200705-744OC

American Thoracic Society - Manuscript Central [TM]

Página 1 de 1

Respiratory and Critical Care Medicine

powered by
ScholarOne
Manuscript Central

? Get Help
Instructions and

Successful Submission Confirmation May 18, 2007 09:36

Your manuscript has been successfully uploaded to American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. You will receive future communications via e-mail.

Your manuscript number is: **Blue-200705-744OC**

Please make note of your manuscript number. You will receive an e-mail from Blue within 24 hours of the end of this process, confirming receipt of your submission.

[Print This Page](#)

[Return to the Author Center](#)

[Log Out](#)

Manuscript Central™ v1.8 (patent pending). Copyright © ScholarOne, Inc., 2007. All Rights Reserved.
Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. Terms and Conditions of Use
ScholarOne Privacy Policy

<http://atsjournals.manuscriptcentral.com/>

18/5/2007

8. REFERÊNCIAS

Abbey DE, Nishino N, McDonnell WF, Burchette RJ, Knutsen SF, Beeson WL, Yang JX. Long-term inhalable particles and other air pollutants related to mortality in nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:373-82.

Adamkiewicz G, Ebelt S, Syring M, Slater J, Speizer FE, Schwartz J, Suh H, Gold DR. Association between air pollution exposure and exhaled nitric oxide in an elderly population. *Thorax* 2004;59:204-9.

Analitis A, Katsouyanni K, Dimakopoulou K, Samoli E, Nikoloulopoulos AK, Aristidis K, Petasakis Y, Touloumi G, Schwartz J, Anderson HR, Cambra K, Forastiere F, Zmirou D, Vonk JM, Clancy L, Kriz B, Bobvos J, Pekkanen J. Short-term effects of ambient particles on cardiovascular and respiratory mortality. *Epidemiology*. 2006;17:230-3.

Arbex MA, Martins LC, de Oliveira RC, Pereira LAA, Arbex FF, Cançado JED, Saldiva PHN, Braga ALF. Air pollution from biomass burning and asthma hospital admissions in a sugar cane plantation area in Brazil. *J Epidemiol Community Health*. 2007 61:395-400.

Baccarelli A, Zanobetti A, Martinelli I, Grillo P, Hou L, Giacomini S, Bonzini M, Lanzani G, Mannucci PM, Bertazzi PA, Schwartz J. Effects of exposure to air pollution on blood coagulation. *J Thromb Haemost*. 2007;2:252-60.

Bayir H. Reactive oxygen species. *Crit Care Med*. 2005; 33:498-501.

Bernstein JA, Alexis N, Barnes C, Bernstein IL, Bernstein JA, Nel A, Peden D, Diaz-Sanchez D, Tarlo SM, Williams PB. Health effects of air pollution. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 114:1116-23. Review.

Bhatnagar A. Cardiovascular pathophysiology of environmental pollutants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286:479-85.

Bhatnagar A. Environmental cardiology: studying mechanistic links between pollution and heart disease. *Circulation Research*. 2006;99:692-705.

Braga ALF, Saldiva PHN, Pereira LAA, Menezes JJC, Conceição GMS, Lin CA, Zanobetti A, Schwartz J, Dockery DW. Health effects of air pollution exposure on children and adolescents in São Paulo, Brazil. *Pediatric Pulmonology*. 2001a; 31:106-13.

Braga ALF, Zanobetti A, Schwartz J. The lag structure between particulate air pollution and respiratory and cardiovascular deaths in 10 US cities. *J Occup Environ Med*. 2001b;43:927-33.

Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, Mittleman M, Samet J, Smith SC, Tager I. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation*. 2004; 109:2655-71.

Campen MJ, Nolan JP, Schladweiler MCJ, Kodavanti UP, Costa DL, Watkinson WP. Cardiac and thermoregulatory effects of instilled particulate matter-associated transition metals in healthy and cardiopulmonary-compromised rats. *J Toxicol Environ Health*. 2002;65:1615-31.

Cançado JED, Saldiva PHN, Pereira LAA, Lara LBLS, Artaxo P, Martinelli LA, Arbex MA, Zanobetti A, Braga ALF. The impact of sugar cane-burning emissions on the respiratory system of children and the elderly. *Environ Health Perspect*. 2006;114:725-9.

CETESB – Relatório de qualidade do ar do Estado de São Paulo 2006. Série Relatório-Secretaria de Estado do Meio Ambiente. São Paulo: CETESB; 2007. Disponível em: URL: <http://www.cetesb.sp.gov.br/AR>. Acesso em: 25/05/2007.

Conceição GMS, Miraglia SGEK, Kishi HS, Saldiva PHN, Singer JM. Air pollution and child mortality: a time series study in São Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect*. 2001; 109:347-50.

Costa DL, Dreher KL. Bioavailable transition metals in particulate matter mediate cardiopulmonary injury in healthy and compromised animal models. *Environ Health Perspect*. 1997;105:1053-60.

Cowley EA. Isoprostane-mediated secretion from human airway epithelial cells. *Mol Pharmacol*. 2003;64:298-307.

Delfino RJ, Sioutas C, Malik S. Potential role of ultrafine particles in associations between airborne particle mass and cardiovascular health. *Environ Health Perspect*. 2005; 113:934-46.

Delfino RJ, Staimer N, Gillen D, Tjoa T, Sioutas C, Fung K, George SC, Kleinman MT. Personal and ambient air pollution is associated with increased exhaled nitric oxide in children with asthma. *Environ Health Perspect.* 2006;114:1736-43.

Dockery DW, Schwartz J. Particulate air pollution and mortality: more than the Philadelphia story. *Epidemiology.* 1995;6:629-32.

Dockery DW. Epidemiologic evidence of cardiovascular effects of particulate air pollution. *Environ Health Perspect.* 2001; 109:483-6.

Dockery DW., Luttmann-Gibson H. Rich DQ. Link MS. Schwartz JD. Gold DR. Koutrakis P. Verrier RL. Mittleman MA. Particulate air pollution and nonfatal cardiac events. Part II. Association of air pollution with confirmed arrhythmias recorded by implanted defibrillators. *Res Rep Health Eff Inst.* 2005;124:83-126; discussion 127-48.

Dockery DW, Stone PH. Cardiovascular risks from fine particulate air pollution. *N Engl J Med.* 2007; 356:511-3.

Dominici F, Burnetti RT. Risk models for particulate air pollution. *J Toxicol Environ Health A.* 2003;66:1883-9. Review

Eisenberg MS, Rabbani LE, Loscalzo J. The relationship between thrombosis and atherosclerosis. In: Loscalzo J, Schsfer AI. *Thrombosis and Hemorrhage.* 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Willkins. 2003. p. 628-47.

Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem.* 2001; 6:529-39.

Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schürch S, Kreylling W, Schutz H, Semmler M, Hof VI, Heyder J, Gehr P. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect.* 2005;113:1555-60.

Ghio AJ, Kim C, Devlin RB. Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162: 981-8.

Ghio A, Delvin R. Inflammatory lung injury after bronchial instillation of air pollution particles. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164:704-8.

Ghio AJ, Hall A, Bassett MA, Cassio WE, Devlin RB. Exposure to concentrated ambient air particles alters hematologic indices in humans. *Inhal Toxicol*. 2003;15:1465-78.

Goldberg MS, Burnett RT, Bailar III JC, Tamblyn R, Ernst P, Flegel K, Brook J, Bonvalot Y, Singh R, Valois MF, Vincent R. Identification of persons with cardiorespiratory conditions who are at risk of dying from the acute effects of ambient air particles. *Environ Health Perspect*. 2001;109:487-94.

Goldberg MS, Burnett RT, Valois MF, Flegel K, Bailar III JC, Brook J, Vincent R, Radon K. Associations between ambient air pollution and daily mortality among persons with congestive heart failure. *Environ Res*. 2003;91:8-20.

Gurgueira SA, Lawrence J, Coull B, Murthy GGK, González-Flecha B. Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environ Health Perspect*. 2002;110:749-55.

Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*. 1990;265:621-36.

Helfand WH, Lazarus J, Donora TP. Pennsylvania: an environmental disaster of 20th Century. *Am J Pulic Health*. 2001;91:553-4.

Hoek G, Brunekreef B, Goldbohm S, Fischer P, van den Brandt PA. Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: a cohort study. *Lancet*. 2002;360:1203-9.

Holgate ST, Devlin RB, Wilson SJ, Frew AJ. Health effects of acute exposure to air pollution. Part II: Healthy subjects exposed to concentrated ambient particles. *Res Rep Health Eff Inst*. 2003;31-50 discussion 51-67.

Ichinose A, Davie EW. The blood coagulation factors: their cDNAs, Genes, and expression. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW. *Hemostasis and Thrombosis – Basic Principles and Clinical Practice*. 3rd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company;1994. p. 19-54.

Janssen NAH, Schwartz J, Zanobetti A, Suh HH. Air conditioning and source-specific particles as modifiers of the effect of PM(10) on hospital admissions for heart and lung disease. *Environ Health Perspect*. 2002;110:43-9.

Kamphuisen PW, Eikenboom JCJ, Bertina RM. Elevated factor VIII and the risk of thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:731.

Katsouyanni K, Touloumi G, Spix C, Schwartz J, Balducci F, Medina S, Rossi G, Wojtyniak B, Sunyer J, Bacharova L, Schouten JP, Ponka A, Anderson HR. Short term effects of ambient sulphur dioxide and particulate matter on mortality in 12 European cities: results from time series data from the APHEA project. *BMJ.* 1997;314:1658-63.

Katsouyanni K, Touloumi G, Samoli E, Gryparis A, Le Tertre A, Monopolis Y, Rossi G, Zmirou D, Ballester F, Boumghar A, Anderson HR, Wojtyniak B, Paldy A, Braunstein R, Pekkanen J, Schindler C, Schwartz J. Confounding and effect modification in the short-term effects of ambient particles on total mortality: results from 29 European cities within the APHEA2 project. *Epidemiology.* 2001;12:521-31.

Kishiyama JL, Adelman DC. Allergic & immunologic disorders. In: Tierney LM, McPhee SJ, Papadakis MA. *Current Medical Diagnosis & Treatment*. 39th. São Francisco: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2000.783-806.

Künzli N, Tager IB. Air pollution: from lung to heart. *Swiss Med Wkly.* 2005;135:697-702.

Künzli N, Mudway S, Götschi T, Shi T, Kelly FJ, Cook S, Burney P, Forsberg B, Gauderman JW, Hazenkamp ME, Heinrich J, Jarvis D, Norbäck D, Payo-Losa F, Poli A, Sunyer J, Borm PJA. Comparison of oxidative properties, light absorbance, and total and elemental mass concentration of ambient PM_{2,5} collected at 20 european sites. *Environ Health Perspect.* 2006;114:684-90.

Kyrle PA, Minar E, Hirschl M, Bialonczyk C, Stain M, Shneider B, Weltermann A, Speiser W, Lechner K, Eichinger S. High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 2003; 343:457-62.

Laden F., Neas LM., Dockery DW., Schwartz J. Association of fine particulate matter from different sources with daily mortality in six U.S. cities. *Environ Health Perspect.* 2000; 108:941-7.

Laurindo FRM, Leite PF. Mecanismos de síntese do óxido nítrico. In: Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP, editores. *Endotélíio*. São Paulo: Atheneu; 2003. p. 43-51.

Le Tertre A, Medina S, Samoli E, Forsberg B, Michelozzi P, Boumghar A, Vonk JM, Bellini A, Atkinson R, Ayres JG, Sunyer J, Schwartz J, Katsouyanni K. Short-term effects of particulate air pollution on cardiovascular diseases in eight European cities. *J Epidemiol Community Health.* 2002;56:773-9.

Lin CA, Pereira LAA, Conceição GMS, Kishi HS, Milani R Jr., Braga ALF, Saldiva PHN. Association between air pollution and ischemic cardiovascular emergency room visits. *Environ Res.* 2003;92:57-63.

Lowe GDO. Circulating inflammatory markers and risks of cardiovascular and non-cardiovascular disease. *J Thromb Haemost.* 2005; 3:1618-27.

Lowe GDO. Can haematological tests predict cardiovascular risk? The 2005 Kettle Lecture. *Br J Haematol.* 2006;133:232-50.

Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005a;25:29-38.

Madamanchi NR, Hakim ZS, Runge MS. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *J Thromb Haemost.* 2005b;3:254-67. Review.

Magari SR, Schwartz J, Williams PL, Hauser R, Smith TJ, Christiani DC. The association of particulate air metal concentrations with heart rate variability. *Environ Health Perspect.* 2002; 110:875-80.

Maheswaran R, Haining RP, Brindley P, Law J, Pearson T, Fryers, PR, Wise S, Campbell, MJ. Outdoor air pollution and stroke in Sheffield, United Kingdom: a small-area level geographical study. *Stroke.* 2005; 36: 239-43.

Mar TF, Koenig JQ, Jansen K, Sullivan J, Kaufman J, Trenga CA, Siahpush SH, Liu L-JS, Neas L. Fine Particulate Air Pollution and Cardiorespiratory Effects in the Elderly. *Epidemiology* 2005; 16:681-7.

Martins LC, Pereira LAA, Lin CA, Santos UP, Prioli G, Luiz OC, Saldiva PHN, Braga ALF. Efeitos da poluição do ar nas doenças cardiovasculares: estruturas lag. *Rev Saude Publica.* 2006, 40:677-83.

Meade TW, Ruddock V, Stirling Y, Chakrabarti R, Miller GJ. Fibrinolytic activity, clotting factors, and long-term incidence of ischaemic heart disease in the Northwick Park Heart Study. *Lancet.* 1993;342:1076-9.

Medeiros NJr, Rivero DH, Kasahara DI, Saiki M, Godleski JJ, Koutrakis P, Capelozzi VL, Saldiva PHN, Antonangelo L. Acute pulmonary and hematological effects of two types of particle surrogates are influenced by their elemental composition. *Environ Res.* 2004; 95: 62-70.

Miller LL, Bly CG, Watson ML, Bale WF. The dominant role of the liver in plasma protein synthesis. *J Exp Med.* 1995;94:431-53.

- Nelson DA, Morris MW. Exame básico do sangue. In: Henry JB. *Diagnósticos Clínicos & Tratamento Por Métodos Laboratoriais*. 18ª ed. São Paulo: Editora Manole Ltda; 1995. p. 641-99.
- Nemmar A, Hoet PHM, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*. 2002a;105:411-4.
- Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PHM, Dinsdale D, Smith T, Xu H, Vermeylen J, Nemery B. Ultrafine particles affect experimental thrombosis in an *in vivo* hamster model. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002b;166:998-1004.
- Opara EC. Oxidative stress. *Dis Mon*. 2006;52:183-98. Review.
- Pekkanen J, Brunner EJ, Aderson HR, Tiittanen P, Atkinson RW. Daily concentrations of air pollution and plasma fibrinogen in London. *Occup Environ Med*. 2000;57:818-22.
- Peters A, Döring A, Wichmann HE, Koenig W. Increased plasma viscosity during an air pollution episode: a link to mortality? *Lancet*. 1997;349:1582-7.
- Peters A, von Klot S, Heier M, Trentinaglia I, Hörmann A, Wichmann HE, Löwel H. Exposure to traffic and the onset of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2004; 351:1721-30.
- Pope III CA, Dockery DW, Schwartz J. Review of epidemiological evidence of health effects of particulate air pollution. *Inhal Toxicol*. 1995;7:1-18.
- Pope III CA, Verrier RL, Lovett EG, Larson AC, Raizenne ME, Kanner RE, Schwartz J, Villegas M, Gold DR, Dockery DW. Heart rate variability associated with particulate air pollution. *Am Heart J*. 1999;138:890-9.
- Pope III CA, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Godleski, JJ. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation*. 2004; 109:71-7.
- Pope III CA, Muhlestein JB, May HT, Renlund DG, Anderson JL, Horne BD. Ischemic heart disease events triggered by short-term exposure to fine particulate air pollution. *Circulation*. 2006; 114:2443-8.
- Portney PR, Mullahy J. Urban air quality and chronic respiratory disease. *Reg. Sci. Urban Econ*. 1990; 20:407-18.

Prado CM, Leick-Maldonado EA, Arata V, Kasahara DI, Martins MA, Tiberio IF. Neurokinins and inflammatory cell iNOS expression in guinea pigs with chronic allergic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005; Epub 2004 Dec 3.

Rall PD. Review of the health effects of sulfur oxides. *Environ Health Perspect*. 1974;8:97-121.

Rhoden CR, Wellenius GA, Ghelfi E, Lawrence J, González-Flecha B. PM-induced cardiac oxidative stress and dysfunction are mediated by autonomic stimulation. *Biochim Biophys Acta*. 2005;3:305-13.

Rich DQ, Kim MH, Turner JR, Mittleman MA, Schwartz J, Catalano PJ, Dockery DW. Association of ventricular arrhythmias detected by implantable cardioverter defibrillator and ambient air pollutants in the St Louis, Missouri metropolitan area. *Occup & Environ Med*. 2006; 63:591-6.

Rivero DHRF, Sasaki C, Filho Lorenzi G, Saldiva PH. PM_{2.5} induces acute electrocardiographic alterations in healthy rats. *Environ Res*. 2005;99:262-6.

Rossi G, Vigotti MA, Zanobetti A, Repetto F, Gianelle V, Schwartz J. Air pollution and cause-specific mortality in Milan, Italy, 1980-1989. *Arch Environ Health*. 1999;54:158-64.

Routledge HC, Ayres JG, Townend JN. Why cardiologists should be interested in air pollution. *Heart*. 2003;89:1383-8. Review.

Routledge HC, Ayres JG. Air pollution and heart. *Occup Med (London)*. 2005;55:439-47. Review.

Saldiva PHN, Lichtenfels AJFC, Paiva PSO, Barone IA., Martins MA, Massad E, Pereira JCR, Xavier VP, Singer JM, Böhm GM. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo, Brazil: a preliminary report. *Environ Res*. 1994;65:218-25.

Saldiva PHN, Pope III CA, Schwartz J, Dockery DW, Lichtenfels AJ, Salge JM, Barone I, Böhm GM. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in São Paulo, Brazil. *Arch Environ Health*. 1995;50:159-63.

Saldiva PHN, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GKG, Diaz E, Koutrakis P, Suh H, Tsuda A, Godleski JJ. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 165:1610-7.

Samet JM, Dominici F, Curriero FC, Coursac I, Zeger SL. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities. *N Engl J Med*. 2000a;343:1742-9.

Samet JM., Dominici F., Zeger SL., Schwartz J., Dockery DW. The National Morbidity, Mortality, and Air Pollution Study. Part I: methods and methodologic issues. *Res Rep Health Eff Inst*. 2000b; 94:5-14; discussion 75-84.

Santos UP, Braga ALF, Giorgi DMA, Pereira LAA, Grupi CJ, Lin CA, Bussacos MA, Zanetta DMT, Saldiva PHN, Terra Filho M. Effects of air pollution on blood pressure and heart rate variability: a panel study of vehicular traffic controllers in the city of São Paulo, Brazil. *Eur Heart J*. 2005;26:193-200.

Schaumann F, Born PJA, Herbrich A, Knoch J, Pitz M, Schins RPF, Luetting B, Hohlfeld JM, Heinrich J, Krug N. Meta-rich ambient particles (Particulate Matter 2,5) cause airway inflammation in healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 170:898-903.

Schwartz J. Total suspended particulate matter and daily mortality in Cincinnati, Ohio. *Environ Health Perspect*. 1994;102:186-9.

Schwartz J., Morris R. Air pollution and hospital admissions for cardiovascular disease in Detroit, Michigan. *Am J Epidemiol*. 1995; 142:23-35.

Schwartz J. Air pollution and blood markers of cardiovascular risk. *Environ Health Perspect*. 2001; 109:405-9.

Seaton A, MacNee W, Donaldson K, Godden D. Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet*. 1995;345:176-8.

Seaton A, Soutar A, Crawford V, Elton R, McNerlan S, Cherrie J, Watt M, Agius R, Stout R. Particulate air pollution and the blood. *Thorax* 1999;54:1027-32.

Shahid SK, Kharitonov SA, Wilson NM, Bush A, Barnes PJ. Exhaled 8-isoprostane in childhood asthma. *Respir Res*. 2005;6:79.

Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*. 1995;18:321-36.

Sunyer J, Schwartz J, Tobias A, Macfarlane D, Garcia J, Antó JM. Patients with chronic obstructive pulmonary disease are at increased risk of death associated with urban particle air pollution: a case-crossover analysis. *Am J Epidemiol*. 2000; 151:50-6.

Suwa T, Hogg JC, Vincent R, Mukae H, Fujii T, van Eeden SF. Ambient air particulates stimulate alveolar macrophages of smokers to promote differentiation of myeloid precursor cells. *Exp Lung Res*. 2002;28:1-18.

Taniyama Y, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in the vasculature molecular and cellular mechanisms. *Hipertension*. 2003;42:1075-81.

Vallyathan V, Shi X. The role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung diseases. *Environ Health Perspect*. 1997;105:165-77.

van Amsterdam JGC, Verlaan BPJ, van Loveren H, Elzakker BGV, Vos SG, Opperhuizen A, Steerenberg PA. Air pollution is associated with increased level of exhaled nitric oxide in nonsmoking healthy subjects. *Arch Environ Health*. 1999;54:331-5.

Vermeylen J, Nemmar A, Nemery B, Hoylaerts MF. Ambient air pollution and acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost*. 2005;3:1955-61.

Zhang Q, Huang X. Addition of calcite reduces iron's bioavailability in the Pennsylvania coals - potential use of calcite for the prevention of coal workers' lung diseases. *J Toxicol Environ Health A*. 2005;68:1663-79.

Wilson MR, Lightbody JH, Donaldson K, Sales J, Stone V. Interactions between ultrafine particles and transition metals *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002;184:172-9.