DANIEL SIQUIEROLI VILAS BOAS

Trabalhadores da cidade de São Paulo expostos à poluição atmosférica:
avaliação da genotoxicidade

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

Programa de: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Hilário
Nascimento Saldiva

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Vilas Boas, Daniel Siquieroli

Trabalhadores da cidade de São Paulo expostos à poluição atmosférica :
avaliação genotoxicidade / Daniel Siquieroli Vilas Boas. -- São Paulo, 2016.

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

Programa de Patologia.

Orientador: Paulo Hilário Nascimento Saldiva.

Descritores: 1.Poluição do ar 2.Inflamação 3.Interleucina-10 4.Fator de
necrose tumoral alfa 5.Micronúcleos com defeito cromossômico 6.Repressão
epigenética

USP/FM/DBD-156/16

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Joaquim** e **Silvia** e ao meu irmão, **Gustavo**:

Amor para mim é ser capaz de permitir
Que aquele que eu amo exista como tal,
Como ele mesmo.
Isso é o mais pleno amor.
Dar a liberdade dele existir
Ao meu lado, do jeito que ele é.

À Prof^a. Dr^a. **Mônica Valéria Marquezini**: você me apoiou, você me fez ver, você não me deixou cair, você foi a minha força, você foi meus olhos, você foi a minha voz, você esteve sempre ao meu lado. Eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Paulo Hilário Nascimento Saldiva**, professor titular da Disciplina de Patologia da Faculdade de Medicina – USP, por nos ter abrigado em seu laboratório e programa de pós-graduação e pela orientação dada durante este trabalho.

À Prof^a. Dr^a. **Odaly Tofolletto** por ter me apresentado o “mundo” celular e molecular, por todo apoio dado durante minha especialização, mestrado e pelo suporte nas análises desse trabalho.

À Prof^a. Dr^a. **Maria Lúcia Bueno Garcia** por todas as sugestões e correções realizadas nesse trabalho.

À minha grande amiga **Monique Matsuda**, cuja paciência, dedicação, conhecimento, companhia e ensinamentos foram fundamentais para o meu desenvolvimento profissional e para a realização deste trabalho.

À minha grande amiga **Paloma Krempel**, pela paciência, conhecimento, ensinamentos e auxílios dados para a realização deste trabalho.

À grande amiga e mentora Prof^a. Dra. **Marilene Bargas Rodrigues Alves**, professora titular da Disciplina de Biologia da Universidade Santa

Cecília – UNISANTA, pelas oportunidades que me concedeu, pelo crédito e confiança, pela amizade e por integrar-me em sua “dupla-hélice” há 16 anos.

À amiga Prof^a. Ms. **Inês Esteves**, professora titular da Disciplina de Cálculo e ao amigo Prof. Ms. **Marcos Antônio de Jesus**, professor titular da Disciplina de Bioestatística da Universidade Santa Cecília – UNISANTA, pelo auxílio dado na análise estatística dos dados.

Agradeço especialmente aos **participantes** desse projeto que se predispuseram a colaborar com nosso estudo nos permitindo buscar incessantemente respostas para nossos questionamentos, contribuindo para o progresso científico e tecnológico e cujo dia-a-dia expressa a verdadeira busca pela vida em harmonia.

Agradeço à Família Teixeira, no nome da Prof^a. Dr^a. **Sílvia Ângela Teixeira Penteado**, Magnífica Reitora da Universidade Santa Cecília - UNISANTA e da Prof^a. Dr^a. **Lúcia Maria Teixeira**, Exma. Presidente do Instituto Superior de Educação Santa Cecília - ISESC pelo auxílio que me foi concedido para a realização desse projeto. Como disse Chico Xavier: “teu ambiente de trabalho é o que elegeste espontaneamente para a tua realização”. Estou certo de que elegi o local correto pois cada dia de trabalho nessa instituição representa uma nova realização para mim.

Agradeço também ao **CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** e à **FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pelos apoios financeiros dados a este projeto. Processos nºs. 18-555223/06 e 50110-0/14, respectivamente.

De longe, o mundo parece azul e verde,
E as montanhas cobertas de neve [parecem] brancas.

De longe, o oceano encontra o rio,
E a águia se lança em voo.

De longe, existe harmonia,
E ela ecoa através da terra.

É a voz da esperança, é a voz da paz, é a voz de cada homem.

De longe, nós todos temos o suficiente,
E ninguém está na penúria.

E não existem armas, bombas e nenhuma doença,
Não existem bocas famintas para alimentar...

De longe, nós somos instrumentos,
Desfilando numa banda comum,

Tocando sons de esperança, tocando sons de paz:
São as canções de cada homem.

Deus está nos observando de longe...

De longe você parece como [se fosse] meu amigo,
Mesmo que nós estejamos em guerra.

De longe eu simplesmente não consigo entender
O motivo desta luta toda.

De longe, existe harmonia, e ela ecoa através da terra.
E é a esperança das esperanças, é o amor dos amantes,
É o coração de cada homem.

Deus está nos observando de longe...

Gold, J; Midler, B

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	xi
Lista de figuras	xiv
Lista de tabelas	xvii
Resumo	xviii
Abstract	xix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	09
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
4. MÉTODOS.....	57
5. RESULTADOS.....	75
6. DISCUSSÃO.....	95
7. CONCLUSÕES.....	107
8. ANEXOS.....	111
9. REFERÊNCIAS.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	Adenina
C	Citosina
CB	Célula Binucleada
5-mC	5-Metil-Citosina
cDNA	DNA complementar
CET	Companhia de Engenharia de Tráfego
CETESB	Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental
CH ₃	Radical metil
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO	Monóxido de carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COV	Composto Orgânico Volátil
CO _x	Óxidos de carbono
CPFAH	Concentrador de Partículas Finas Ambientais de Harvard
CpG	Dinucleotídeo citosina-guanina
CtB	Citocalasina B
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FM	Faculdade de Medicina
G	Guanina
HC	Hospital das Clínicas
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
IFN	Interferon
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10

IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-15	Interleucina-15
IL-16	Interleucina-16
IL-18	Interleucina-18
IL-19	Interleucina-19
IL-20	Interleucina-20
ISCN	<i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>
kb	KiloBase
kD	KiloDalton
L.min ⁻¹	Litros por minuto
LPAE	Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental
µg.m ⁻³	Micrograma por metro cúbico
µm	Micrômetro
MN	Micronúcleo
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MCT	Ministério da Ciência e Tecnologia
NBUD	Broto nuclear (<i>Nuclear Bud</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK	Linfócito <i>Natural Killer</i>
nm	Nanômetro
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
NO _x	Óxidos de nitrogênio
O ₃	Ozônio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator Ativador de Plaquetas (<i>Platelet-Activating Factor</i>)
PM	Material Particulado (<i>Particulate Matter</i>)
PM _{0,1}	Material Particulado Ultrafino; 0,1µm de diâmetro
PM _{2,5}	Material Particulado Fino; 2,5µm de diâmetro
PM ₁₀	Material Particulado Grosso, 10µm de diâmetro
PNP	Ponte Nucleoplasmática

PPSUS	Projeto de Pesquisa para o Sistema Único de Saúde
PTS	Partículas Totais em Suspensão
rpm	Rotações por Minuto
SO ₂	Dióxido de enxofre
SO _x	Óxidos de enxofre
T	Temperatura
TNF	Fator de Necrose Tumoral (<i>Tumoral Necrosis Factor</i>)
U	Uracila
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema da distribuição da área de superfície de aerossóis atmosféricos indicando as modas principais de tamanho das partículas, fontes e mecanismos de formação e remoção do material particulado.....	22
Figura 2	Deposição de PM no trato respiratório humano.....	28
Figura 3	Diagrama de ciclos celulares em vários cenários. A) Ciclo celular normal com produção de células mononucleadas; B) Ciclo celular normal com bloqueio por CtB com produção de células binucleadas e (cont).....	38
Figura 4	Diagrama de um corte longitudinal de mucosa oral normal, com a representação dos vários tipos celulares analisados no ensaio de micronúcleo: célula diferenciada normal, célula diferenciada com MN (cont).....	40
Figura 5	A metilação do DNA é estabelecida e mantida pelas DNA metiltransferases que adicionam um radical metil (-CH ₃) na posição 5 de uma citosina de um dinucleotídeo CpG do DNA (cont).....	43
Figura 6	Interação entre gene-ambiente versus epigene-ambiente: modelo de possíveis rotas genéticas e epigenéticas associando exposição ambiental aos efeitos na saúde.....	44
Figura 7	Vias de sinalização dos principais marcadores inflamatórios. Destaques para o TNF-alfa, citocina pró-inflamatória e para a IL-10, citocina imunossupressora.....	48
Figura 8	Mapeamento genômico (A) e citogenético (B) do gene TNF no cromossomo 6 humano.....	50
Figura 9	Mapeamento genômico (A) e citogenético (B) do gene IL-10 no cromossomo 1 humano.....	54
Figura 10	Descrição da casuística do estudo: variação do número de participantes do recrutamento ao encerramento da pesquisa.....	60

Figura 11	Foto aérea da Cidade de São Paulo obtida em 20/04/16, mostrando a Área Urbana correspondente à área de classe III do CONAMA e a Área Periurbana, correspondente à área de classe I (cont).....	62
Figura 12	Imagem de satélite da cidade de São Paulo com a identificação dos locais de exposição ocupacional à poluição atmosférica dos participantes dos grupos de estudo (cont).....	63
Figura 13	Componentes principais do amostrador de material particulado fino com vazão de 4L.m^{-1} , com impactador desenvolvido pela Escola de Saúde Pública de Harvard, adaptado para uso individual pelo LPAE da FMUSP.....	66
Figura 14	Filtros de policarbonato antes (claro) e após (escuros) a concentração de PM.....	67
Figura 15	Tubos passivos para amostragem de gases. (A) Frasco para suporte (1) e filtro (2) tratado para absorção de NO_2 . (B) Suporte utilizado para acomodar os tubos de amostragem.....	68
Figura 16	Valores médios dos poluentes $\text{PM}_{2,5}$ (A) e NO_2 (B) amostrados nos grupos urbano (AU) e periurbano (APU).....	79
Figura 17	Valores individuais dos poluentes $\text{PM}_{2,5}$ (A) e NO_2 (B) amostrados na pesquisa.....	81
Figura 18	Valores médios das frequências de células micronucleadas (CMN) e de micronúcleos (MN) na mucosa oral (MO) (A) e CMN, MN e Índice de Divisão Nuclear considerando a Citotoxicidade (cont).....	83
Figura 19	Valores individuais das frequências de células micronucleadas (CMN) (A) e de micronúcleos (MN) (B) na mucosa oral (MO) e CMN (C), MN (D) e do Índice de Divisão Nuclear considerando (cont).....	84
Figura 20	Correlação de Spearman entre as frequências de micronúcleos encontradas nas células da mucosa oral e em cultura de linfócitos ($r = 0,8106$; $p < 0,0001$).....	85
Figura 21	Correlação de Spearman entre as frequências de micronúcleos de mucosa oral e o $\text{PM}_{2,5}$ (A), entre micronúcleos de mucosa oral e NO_2 (B), entre micronúcleos de cultura de linfócitos (cont).....	85

Figura 22	Fotomicrografias obtidas por microscopia de luz de linfócito binucleado (A), linfócitos binucleados micronucleados (B-E), linfócito necrótico (F), células da mucosa oral normal (G) (cont).....	86
Figura 23	Sequências de bases nitrogenadas das regiões promotoras dos genes IL-10 (A) e TNF-alfa (B) com a indicação das posições dos dinucleotídeos CpG testados para a metilação em cada caso.....	88
Figura 24	Perfil de metilação dos dinucleotídeo CpG analisados no gene IL-10 (A) e TNF-alfa (B), em cada um dos grupos experimentais.....	89
Figura 25	Perfil médio de metilação dos genes IL-10 (A) e TNF-alfa (B) identificados nos grupos urbano (AU) e periurbano (APU) deste estudo.....	91
Figura 26	Correlação de Spearman entre o perfil médio de metilação do gene IL-10 e o PM _{2,5} (A), entre o perfil médio de metilação do gene IL-10 e o NO ₂ (B), entre o perfil médio de metilação (cont).....	92
Figura 27	Representação das regiões promotoras dos genes IL-10 (A) e TNF-alfa (C), com as indicações dos dinucleotídeos CpG estudados. Os círculos pretos indicam sítios hipermetilados e os brancos (cont).....	93
Figura 28	Análise de Regressão entre os resíduos das frequências de micronúcleos em mucosa oral e o perfil de metilação da IL-10 (A), entre os resíduos das frequências de micronúcleos em linfócitos (cont).....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estatística descritiva dos dados antropométricos dos participantes do estudo.....	77
Tabela 2	Dados vitais dos participantes do estudo.....	78
Tabela 3	Estatística descritiva dos valores de poluição amostrados no estudo.....	78
Tabela 4	Estatística descritiva das frequências de células micronucleadas e micronúcleos na mucosa oral dos participantes da pesquisa.....	82
Tabela 5	Estatística descritiva das frequências de células micronucleadas, micronúcleos e do índice de divisão nuclear em cultura de linfócitos dos participantes da pesquisa.....	82
Tabela 6	Estatística descritiva do perfil de metilação das regiões promotoras dos genes IL-10 e TNF-alfa nos grupos experimentais.....	88

RESUMO

Vilas Boas, DS. *Trabalhadores da cidade de São Paulo expostos à poluição atmosférica: avaliação da genotoxicidade* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Os problemas da poluição atmosférica atingem todos os grandes centros urbanos, em particular as megacidades com população maior do que 10 milhões de habitantes. Emissões veiculares e industriais destacam-se entre as principais responsáveis pelas altas concentrações de poluentes do ar nesses centros urbanos. Os diferentes componentes da poluição atmosférica, a dose e o tempo de exposição, podem levar a diversos impactos na saúde humana. Esse estudo teve por objetivo avaliar a genotoxicidade da poluição atmosférica ($PM_{2,5}$ e NO_2) e sua correlação com modificações no perfil de metilação das citocinas IL-10 e TNF-alfa, em trabalhadores da cidade de São Paulo/SP ocupacionalmente expostos. Participaram deste estudo 57 indivíduos do gênero masculino, com idades variando entre 28 e 66 anos de idade, trabalhadores em turnos diários de atividades externas na cidade de São Paulo e, portanto, ocupacionalmente expostos à poluição atmosférica. Foram recrutadas 3 categorias de profissionais: 1) controladores de tráfego ($n=18$); 2) taxistas ($n=21$) e profissionais do Instituto Florestal ($n=18$). Esses trabalhadores foram divididos em dois grupos em função dos locais de trabalho e exposição: 1) grupo área urbana (AU), composto pelos controladores de tráfego e taxistas e 2) grupo área periurbana (APU), composto pelos profissionais do Instituto Florestal. Amostradores individuais de poluição atmosférica foram utilizados para a coleta dos poluentes $PM_{2,5}$ e NO_2 . A análise da genotoxicidade foi realizada pelo teste de micronúcleos nas células epiteliais da mucosa oral e em linfócitos do sangue periférico. O perfil de metilação das citocinas IL-10 e TNF-alfa foi realizado por sequenciamento de nova geração. Nossos resultados mostraram uma diferença na concentração do $PM_{2,5}$ entre os grupos ($AU=32,92\mu g.m^{-3}$, $APU=25,77\mu g.m^{-3}$; $p=0,0311$). Não foi encontrada diferença na concentração de NO_2 entre os grupos. Foram encontradas diferenças nas frequências de micronúcleos, tanto em mucosa oral ($AU=2,78\%$, $APU=1,16\%$; $p<0,0001$) quanto em linfócitos periféricos ($AU=1,51\%$, $APU=0,73\%$; $p<0,0001$). Também foi encontrada diferença na metilação média do gene IL-10 entre os grupos ($AU=25\%$, $APU=30\%$; $p=0,0120$). Não foi encontrada diferença na metilação média do gene TNF-alfa entre os grupos. Concluímos que os trabalhadores da área urbana da cidade estão expostos a maiores concentrações de $PM_{2,5}$, possuem maiores frequências de micronúcleos tanto em células da mucosa oral quanto em linfócitos periféricos e apresentam um perfil de hipometilação do gene IL-10 em comparação com os trabalhadores da área periurbana da cidade.

Descritores: poluição do ar; inflamação; interleucina-10; fator de necrose tumoral alfa; micronúcleos com defeito cromossômico; repressão epigenética.

ABSTRACT

Vilas Boas, DS. *Workers of São Paulo exposed to air pollution: assessment of the genotoxicity* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

The problems of air pollution affect all major urban centers, particularly megacities with populations greater than 10 million. Vehicular and industrial emissions stand out among the main responsible for the high concentrations of air pollutants in these urban centers. The different components of air pollution, the dose and time of exposure, can lead to different impacts on human health. This study aimed to evaluate the genotoxicity of air pollution (PM_{2.5} and NO₂) and its correlation with changes in the methylation profile of the cytokines IL-10 and TNF-alpha in workers of São Paulo/SP occupationally exposed. The study included 57 male individuals, with age range between 28 and 66 years old, workers in daily shifts of outdoor activities in the São Paulo city and therefore occupationally exposed to air pollution. Were recruited professional of three categories: 1) traffic controllers (n=18); 2) taxi drivers (n=21) and professionals from the Forestry Institute (n=18). These workers were divided into two groups according to workplaces and exposure: 1) urban area group (UA), composed of traffic controllers and taxi drivers and 2) peri-urban area group (PUA), composed of professionals from the Forestry Institute. Individual samplers of air pollution were used for the collection of PM_{2.5} and NO₂ pollutants. The analysis was performed by genotoxicity micronucleus test in the buccal mucosa epithelial cells and in peripheral blood lymphocytes. The methylation profile of the cytokines IL-10 and TNF-alpha was done by next generation sequencing. Our results showed a difference in PM_{2.5} concentration between the groups (UA=32,92µg.m⁻³, PUA=25,77µg.m⁻³; p=0,0311). No difference was found in NO₂ concentrations between groups. Differences were found in the frequency of micronuclei in both buccal mucosa (UA=2,78%, PUA=1,16%; p<0,0001) and in peripheral lymphocytes (UA=1,51%, PUA=0,73%; p<0.0001). Difference was also found in average methylation of the IL-10 gene between the groups (UA=25%, PUA=30%; p=0,0120). There was no difference in the average methylation of TNF-alpha gene between the groups. We conclude that the workers of the urban area of the city are exposed to higher concentrations of PM_{2.5}, have higher frequencies of micronuclei in both the buccal mucosa cells and in peripheral lymphocytes and have a hypomethylation profile of IL-10 gene in comparison with workers the peri-urban area of the city.

Descriptors: air pollution; inflammation; interleukin-10; tumor necrosis factor-alpha; micronuclei chromosome-defective; epigenetic repression.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

1

Introdução

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

1. INTRODUÇÃO

O presente estudo deu continuidade à linha de pesquisa dos subprojetos clínicos e de pesquisa envolvendo indicação de exposição e biomonitoramento do projeto temático intitulado “Avaliação da toxicidade da poluição por material particulado gerado por diferentes fontes emissoras: proposição de estudos clínicos e experimentais” referente aos editais MCT-CNPq/CT-Saúde, nº 18-555223/06 e FAPESP-PPSUS, nº 50110-0/14, patrocinadores deste estudo, coordenado pelo Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP).

A proposta geral desta pesquisa foi realizar uma análise responsável dos efeitos da exposição aos poluentes atmosféricos de diferentes origens sobre a saúde humana. Para este fim, foi usada uma estratégia, onde a unidade de referência foi o indivíduo exposto à poluição, através do uso de uma tecnologia (de medida de exposição à poluição atmosférica individual) original e inovadora desenvolvida especialmente para esse projeto pela Escola de Saúde Pública da Universidade de Harvard e adaptada para uso individual pelo Engenheiro do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE) da FM-USP, Dr. Paulo Afonso de André (Demokritou *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2004). A avaliação dos efeitos dos poluentes atmosféricos sobre a saúde humana foi realizada em dois contextos: o genotóxico e o epigenético.

A questão da poluição atmosférica atinge todos os grandes centros urbanos, em particular as megacidades com população maior do que 10 milhões de habitantes. Nestas megacidades, uma dificuldade crescente é a

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

identificação e quantificação de fontes poluidoras (Carvalho *et al.*, 2015), que têm importantes impactos nas políticas de redução de emissões e na minimização do impacto na saúde da população (Saldiva *et al.*, 1992; 1994; 1995; Cançado *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2006).

Emissões veiculares e industriais destacam-se entre as principais responsáveis pelos altos níveis de poluentes na atmosfera em grandes centros urbanos. O grande desafio nestas áreas com qualidade do ar comprometida é determinar a contribuição quantitativa das diferentes fontes de emissões para as concentrações de material particulado e de gases. A quantificação detalhada dos diferentes processos de emissão, formação, transporte, deposição e reatividade química desses compostos é um desafio científico (Seinfeld e Pandis, 2006).

O poluente de referência escolhido nesta pesquisa foi o aerossol atmosférico que é o mais consistentemente associado aos efeitos adversos da poluição do ar e permite a sua coleta *in situ* para análises mais detalhadas *a posteriori*. O aerossol é composto, entre outros, pelo material particulado (PM) em suspensão, que se refere a uma mistura de partículas sólidas e/ou líquidas que variam em forma, composição e origem. De modo geral, pode-se definir a distribuição do PM como trimodal, com frações grossa, fina e ultrafina.

O PM fino (PM_{2,5}), material amostrado nesse estudo, possui diâmetro aerodinâmico entre 0,1 a 2,5µm e é derivado, de maneira geral, de processos de combustão de automotores, indústrias ou usinas termoeletricas e queima de biomassa (Baird, 2002). Contém partículas primárias, produzidas diretamente pelas fontes emissoras, bem como partículas secundárias (principalmente

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

sulfatos e nitratos), geradas pelo processo de conversão de gás em partículas, a partir de óxidos de enxofre e óxidos de nitrogênio.

Fazem parte do PM_{2,5} partículas de carvão produzidas pela combustão dos combustíveis fósseis, que possuem adsorvidos à sua superfície diferentes elementos e compostos, tais como metais pesados e hidrocarbonetos (Kampa e Castanas, 2008).

A extensão da ação dos poluentes e os seus mecanismos de atuação no organismo humano são alguns dos principais temas que ainda exigem da comunidade científica um grande esforço para elucidação. Sabe-se que pessoas que passam longos períodos nas ruas, muitas vezes presas nos congestionamentos, são submetidas a doses maiores de poluentes e ficam mais tempo expostas aos mesmos, tornando-se mais vulneráveis aos seus efeitos adversos (Cançado *et al.*, 2006).

Os diferentes componentes da poluição atmosférica, a dose e o tempo de exposição, podem levar a diversos impactos na saúde humana. Os efeitos à saúde dependem do tipo de poluente, sua concentração, tempo de exposição e suscetibilidade individual (Kampa e Castanas, 2008). Nos últimos anos, acumularam-se evidências de que o PM aumenta a morbimortalidade cardiovascular e respiratória. O aumento da mortalidade ocorre ou concomitantemente ao aumento dos níveis de PM ou 1 a 5 dias após sua emissão/exposição (Pope, 2000).

As informações mais relevantes no monitoramento ambiental são obtidas pela mudança no comportamento do indivíduo exposto (impactos sobre

O biomonitoramento de efeito biológico em humanos é um dos métodos utilizados, visando a proteção da saúde humana em caso de exposição a substâncias tóxicas. Está relacionado à avaliação de efeitos precoces causados por poluentes, como, por exemplo, a predisposição ao aparecimento de aberrações cromossômicas e micronúcleos (Zhang *et al.*, 2016) e efeitos na expressão de citocinas inflamatórias (Stiegel *et al.*, 2016).

O estudo de genotoxicidade através do teste de micronúcleos permite identificar variações na frequência de danos ao DNA das células e, por isso, permite analisar os efeitos tóxicos da poluição (Fenech, 2000). O ensaio de micronúcleo inicialmente descrito em células da medula óssea *in vivo* e *in vitro* é um método acurado muito utilizado no campo da genética toxicológica e já está, atualmente, validado para ser aplicado em outras populações de células como as epiteliais da mucosa oral (Thomas *et al.*, 2009) e linfócitos de sangue periférico (Fenech, 2007).

6

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

epigenética, que consiste na determinação do perfil de metilação e seus efeitos na expressão de genes candidatos, como as citocinas inflamatórias, por exemplo (Byun *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2016; Papavasiliou *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2016; Somineni *et al.*, 2016).

Citocinas são pequenas moléculas proteicas ou glicoproteicas, estimuladas antigenicamente, envolvidas na transdução de sinais autócrinos, parácrinos e endócrinos durante o desencadeamento das respostas imunes. Podem ser expressas por diversas células, como monócitos, macrófagos e linfócitos e são classificadas em citocinas pró-inflamatórias, supressoras, citocinas de doenças alérgicas e fatores estimuladores de crescimento de colônias (Abbas, 2007).

Os estudos que avaliam a relação entre a poluição atmosférica e a epigenética têm mostrado resultados importantes sobre o mecanismo de metilação dos genes. Jiang e col. (2014) mostraram que, em apenas duas horas de exposição aos poluentes derivados da queima do diesel, 400 genes foram diferencialmente metilados no genoma dos participantes de sua pesquisa.

A expressão gênica e o perfil de metilação do Fator de Necrose Tumoral (TNF), citocina pró-inflamatória e da Interleucina-10 (IL-10), citocina imunossupressora, tem sido investigado em diversos estudos toxicológicos a fim de se verificar se suas atividades ou inatividade estão relacionadas com alguma doença inflamatória conhecida (Hedrich *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010; Larsson *et al.*, 2012; Falvo *et al.*, 2013; Hermsdorff *et al.*, 2013; Gómez-Uriz *et*

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

al., 2014) e, por esta razão, a análise dessas moléculas também foram incluídas em nosso estudo.

Em função do apresentado, é de vital importância a compreensão da intimidade dos mecanismos subjacentes aos efeitos tóxicos do PM sobre a saúde, pois permitiria que fossem desenhadas estratégias de redução de risco baseados não apenas no controle de emissão de PM, mas também atuando sobre a saúde humana e a consequente melhoria da qualidade de vida. Esse é o objetivo da ciência voltar-se à saúde pública: intervenção e prevenção.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

2

Objetivos

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliação genotóxica e epigenética em trabalhadores da área urbana e periurbana da cidade de São Paulo expostos à poluição atmosférica.

2.2. Objetivos Específicos

- Obtenção de medidas de exposição à poluição atmosférica (PM_{2,5} e NO₂) através de amostradores individuais;
- Avaliação da genotoxicidade da poluição atmosférica através do teste de micronúcleos em células da mucosa oral e em linfócitos do sangue periférico;
- Avaliação epigenética através da determinação do perfil de metilação das regiões promotoras dos genes TNF-alfa e IL-10;
- Correlacionar os dados de genotoxicidade e perfil de metilação com as medidas de exposição à poluição atmosférica.

Revisão da Literatura

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Poluição do Ar

A atmosfera terrestre é uma camada extremamente fina em relação ao raio do planeta, estratificada em camadas e caracterizada pelas variações de temperatura e pressão em função da altura. A baixa atmosfera é em geral dividida em troposfera e estratosfera. A maior parte dos poluentes atmosféricos fica contida na troposfera, camada que se estende da superfície terrestre até uma altitude média de 10 a 15km, onde sofrem transporte e reações químicas (Seinfeld e Pandis, 2006).

Em termos de composição, a atmosfera terrestre possui inúmeras substâncias, sendo as majoritárias, cerca de 78,09% de nitrogênio, 20,95% de oxigênio, 0,93% de argônio, 0,039% de gás carbônico e pequenas quantidades de outros compostos que não conseguem se acumular na atmosfera da mesma forma que os componentes principais e se apresentam apenas em concentração traço. Outra espécie majoritária é o vapor d'água, extremamente variável nas diversas regiões do planeta e presente de forma predominante na baixa atmosfera.

Os constituintes atmosféricos desempenham papel fundamental no controle da temperatura terrestre, regulando as propriedades termodinâmicas da atmosfera, o clima e a precipitação e tem papel importante nos ciclos biogeoquímicos, transportando nutrientes e outras substâncias essenciais para

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

o funcionamento e equilíbrio da vida no planeta (Castanho, 1999; Baird, 2002; Monks *et al.*, 2009).

A história relata eventos eventuais de mortes relacionadas à poluição desde a Antiguidade. Poluentes de fontes naturais como os de erupções vulcânicas, há muito foram associados às fatalidades (Pénard-Morand e Annesi-Maesano, 2004).

As mais antigas obras que descrevem a poluição são os Tratados Médicos Árabes escritos no século XIII. Essas obras abordam diversos temas relacionados à poluição, tais como a contaminação do ar, da água, do solo, bem como a má gestão de resíduos sólidos (Gari, 2002).

Foi o século XX, no entanto, um divisor de águas, ao concentrar eventos poluidores que chamaram a atenção da população, dos cientistas e do governo para os efeitos deletérios da poluição sobre a saúde (Pope, 2004).

A geração de poluentes tem aumentado de forma exponencial, principalmente nos centros urbanos, tornando a poluição do ar um dos maiores fatores de risco à saúde (Miraglia *et al.*, 2005). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou no final de 2015 que aproximadamente 7 milhões de pessoas morrem ao ano em função da poluição do ar.

Nas últimas décadas, a literatura colecionou uma série bastante sólida de evidências epidemiológicas associando a poluição do ar com efeitos nocivos sobre a saúde e o aumento da mortalidade (Pope *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 2001; Pope *et al.*, 2002; Dominici *et al.*, 2003; Samet *et al.*, 2003; Brook, 2007; Brook, 2008; Krewski *et al.*, 2009; Velická *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2016).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Esses efeitos nocivos ocorrem mesmo sob concentrações habituais de poluentes de vários centros urbanos (Kampa e Castanas, 2008).

Sabe-se que as partículas ambientais são constituídas por materiais naturais, como pólen e materiais antrópicos, como os aerossóis. Essas partículas podem ser emitidas por fontes diretas (aerossol primário) ou formadas por reações na atmosfera (aerossol secundário). Dessa maneira, muitos experimentos têm sido realizados para investigar os efeitos agudos da poluição, porém com limitações inerentes aos modelos experimentais utilizados (Sioutas *et al.*, 1995).

Os relatos científicos sobre o uso de partículas artificiais mostram que elas não representam a complexidade do meio atmosférico, assim como os ensaios utilizando a recuperação de partículas ambientais, a partir da sua coleta em filtros, indicam alterações nas propriedades químicas e físicas dessas partículas, como o diâmetro, por exemplo (Sioutas *et al.*, 1995).

Com o propósito de minimizar as limitações metodológicas impactantes sobre os estudos referentes à poluição ambiental e saúde humana, o Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP) iniciou a utilização de modelos de inalação que simulam condições reais da atmosfera local por meio do uso do Concentrador de Partículas Finas Ambientais de Harvard (CPFAH) e também de amostradores de material particulado individuais.

A poluição, de um modo geral, pode ser definida como a introdução de contaminantes no ambiente, causando instabilidade, desordem, perigo ou desconforto ao ecossistema. Considera-se o ar poluído quando as

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

características naturais da atmosfera são alteradas por agentes químicos, físicos ou biológicos em decorrência da atividade antrópica ou de fenômenos naturais. Segundo o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), entende-se como poluente atmosférico qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis seguros estabelecidos e que torne ou possa tornar o ar: impróprio; nocivo ou ofensivo à saúde; inconveniente ao bem-estar público; danoso aos materiais, fauna e flora; prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade.

No Brasil, a Resolução Nº 3 do CONAMA de 28 de Junho de 1990 estabelece limites para os seguintes poluentes: dióxido de enxofre (SO₂), dióxido de nitrogênio (NO₂), material particulado, monóxido de carbono (CO) e ozônio (O₃).

Dentre os diferentes compartimentos do meio ambiente, a atmosfera é a mais agredida pelo homem com a introdução de diversos contaminantes e cujas consequências não têm recebido a devida atenção. O rápido desenvolvimento tecnológico do mundo moderno tem ocasionado um aumento na quantidade e na variedade de poluentes emitidos para a atmosfera, prejudicando de maneira muito séria a qualidade de vida em nosso planeta (Castro *et al.*, 2003).

Até meados do século XVIII, os prejuízos com a poluição aconteciam em nível local ou regional. Com o maior desenvolvimento tecnológico, o aumento da população e a revolução industrial a situação agravou-se. Nas décadas de 60 e 70, os principais problemas associados ao meio ambiente foram a

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

poluição do ar, dos rios e lagos. Nessa época, a poluição do ar era um problema somente nas grandes cidades. Mais tarde foram criadas leis de controle do nível de poluição e o problema começou a ser estudado.

Nos últimos anos, o conhecimento sobre impacto social da degradação do meio ambiente e as tecnologias para estudos sobre agressões aos ecossistemas tem crescido bastante. Os grandes temas que chamaram a atenção foram o efeito estufa, a chuva ácida e o buraco na camada de ozônio (Kemp, 1994).

3.1.1. O Aerossol Atmosférico

Aerossóis são particulados sólidos ou líquidos em suspensão num gás, com dimensões que variam de alguns nanômetros (nm) a dezenas de micra. São classificados, em geral, pelas suas propriedades aerodinâmicas, uma vez que essas propriedades são determinantes nos processos de remoção e transporte atmosférico, bem como penetração e deposição no trato respiratório (Seinfeld e Pandis, 2006).

Nos grandes centros urbanos, a poluição do ar é mais aparente com o crescente aumento populacional, veicular e de áreas industriais ao seu redor, gerando problemas relacionados à dispersão de poluentes. Esses poluentes atmosféricos podem ser divididos em duas categorias: gases e partículas, que apresentam características físicas, químicas e dispersivas diferentes.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTGCGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

A fração gasosa é formada por diversos compostos químicos, tais como os óxidos de enxofre (SO_x), óxidos de carbono (CO_x), óxidos de nitrogênio (NO_x), O₃, compostos orgânicos voláteis (COVs) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).

Atualmente, os HPAs são os mais estudados em decorrência da sua relação com o efeito estufa, o aquecimento global e a saúde humana. São definidos como compostos orgânicos com dois ou mais anéis aromáticos condensados e que estão presentes tanto no material particulado em suspensão quanto em outras matrizes ambientais.

No ambiente, os HPAs sofrem reações químicas, originando produtos que podem ser prejudiciais à saúde humana. As fontes naturais de emissão de HPAs são as erupções vulcânicas e queimadas florestais espontâneas, mas as principais fontes de HPAs são as de origem antrópica, principalmente aquelas advindas da exaustão de motores a diesel e a gasolina dos processos industriais e da fumaça de cigarros (Cordeiro, 2006).

Os COVs são poluentes que contém carbono, facilmente vaporizados em condições de temperatura e pressão ambientes que, por meio de reações químicas, atuam como precursores do "smog" fotoquímico, levando à formação do ozônio troposférico. Os COVs têm um grande impacto sobre a saúde humana em função da sua alta toxicidade e efeito cancerígeno (Martins *et al.*, 2006).

As partículas sólidas ou líquidas encontradas na atmosfera são denominadas de material particulado cuja composição pode incluir vários

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTTCGATTTCGGCATTATAGTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

elementos químicos, especialmente metais e compostos de carbono (Bergamaschi *et al.*, 2007).

As Partículas Totais em Suspensão (PTS) são caracterizadas por partículas iguais e/ou inferiores a $100\mu\text{m}$ de diâmetro aerodinâmico. As partículas com diâmetro aerodinâmico menor ou igual a $10\mu\text{m}$ são denominadas de partículas inaláveis e são classificadas em grossas (PM_{10} ; $2,5\mu\text{m}$ a $10\mu\text{m}$), finas ($\text{PM}_{2,5}$; $0,1\mu\text{m}$ a $2,5\mu\text{m}$) e ultrafinas ($\text{PM}_{0,1}$; $\leq 0,1\mu\text{m}$) (Baird, 2002). A figura 1 representa classicamente os principais processos que influenciam o tamanho dessas partículas.

As partículas na moda de nucleação são formadas em geral por condensação de vapores em processos de combustão e por nucleação de outras espécies atmosféricas. A moda de acumulação origina-se da coagulação de partículas na moda de nucleação e da condensação de vapores em partículas pré-existentes, causando o seu crescimento.

Os mecanismos de remoção das partículas na moda de acumulação são menos eficientes do que na moda grossa, o que faz com que as partículas se acumulem neste regime e possuam tempos de residência maiores na atmosfera em relação às modas de nucleação, Aitken e à moda grossa. Em termos de concentração em número de partículas, existe predomínio de partículas nas modas Aitken e de nucleação, que, por outro lado não contribuem significativamente para a massa total do material particulado devido ao seu pequeno tamanho (Seinfeld e Pandis, 2006).

Figura 1 – Esquema da distribuição da área de superfície de aerossóis atmosféricos indicando as modas principais de tamanho das partículas, fontes e mecanismos de formação e remoção do material particulado. As modas ilustradas são: nucleação, Aitken, acumulação e a grossa com partículas com tamanhos médios de 20nm, 75nm, 160nm e 10 μm , respectivamente. Adaptado de Seinfeld e Pandis (2006).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTGCGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Em termos de área de superfície de aerossóis, a contribuição majoritária se deve à moda de acumulação. A moda grossa e a moda de acumulação representam a maior parte da concentração em massa do aerossol.

Os particulados atmosféricos originam-se tanto de processos naturais como de processos antrópicos e podem ser classificados como primários (emitidos diretamente da fonte na forma de sólidos e/ou líquidos) ou secundários (formados por processos conversão gás-partícula na atmosfera e/ou condensação de compostos gasosos). Uma vez em suspensão na atmosfera experimentam diversas interações e transformações físicas e químicas acarretando mudanças em sua composição, no seu tamanho e na sua estrutura (Seinfeld e Pandis, 2006).

Essas partículas podem absorver e espalhar radiação solar, modificando assim o balanço radioativo da atmosfera. Podem também atuar como núcleos de condensação de nuvens e como núcleos de gelo, afetando, dessa forma, a microfísica de nuvens, desempenhando importante papel no ciclo hidrológico (Artaxo *et al.*, 1994).

A concentração, composição química e distribuição de tamanho do PM na atmosfera são bastante variáveis espacial e temporalmente. A concentração em massa das partículas na atmosfera varia tipicamente na faixa de 1-100 $\mu\text{g.m}^{-3}$ (Monks *et al.*, 2009).

O PM₁₀ pode estar presente naturalmente na atmosfera ou ser gerado a partir do solo e outros materiais da crosta terrestre. Nas cidades com alta densidade de tráfego, uma fração significativa da fração grossa é produzida

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

pela fricção dos pneus dos veículos com o asfalto das ruas e contém elementos do pavimento e da borracha pneumática.

O $PM_{2,5}$ são derivados dos processos de combustão de automotores, indústrias e usinas termoeleétricas. Ele contém partículas primárias, produzidas diretamente pelas fontes emissoras, bem como partículas secundárias, principalmente sulfatos e nitratos, geradas por processos de conversão de óxidos de enxofre e de nitrogênio. Também fazem parte dessa fração, as partículas de carvão, produzido pela queima de combustíveis fósseis que apresentam na sua superfície diferentes elementos e compostos, tais como metais pesados e hidrocarbonetos adsorvidos.

O $PM_{0,1}$ tem um tempo de residência na atmosfera relativamente curto, pois se agregam progressivamente para formar partículas finas. Muitos estudos já demonstraram que as partículas finas e ultrafinas são as mais perigosas para o ser humano, pois podem penetrar nos alvéolos pulmonares ocasionando doenças cardiovasculares e respiratórias (Kampa e Castanas, 2008).

A rápida urbanização tem resultado numa aceleração dos níveis de emissão de poluentes atmosféricos devido ao transporte, à produção de energia e às atividades industriais. A região metropolitana de São Paulo já é classificada como a quinta maior megacidade do mundo, com cerca de 20 milhões de habitantes, o que representa um décimo da população brasileira (censo demográfico IBGE, 2010).

A cidade de São Paulo experimentou, especialmente no final da década de 70, acentuada descentralização das moradias que irradiaram para vários pontos de cidades que vieram a compor a região metropolitana, originando um

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

padrão periférico de ocupação do solo urbano correspondendo a 3% do território do estado.

Atualmente mais de 3000 poluentes de origem antrópica foram identificados na atmosfera. Apenas os processos de combustão, como em motores veiculares, podem ser responsáveis pela emissão de cerca de 500 compostos diferentes para a atmosfera. No entanto, apenas uma fração destes tem o seu impacto investigado e um número ainda menor tem suas concentrações ambientais determinadas (Austin *et al.*, 2002).

Portanto, medidas reguladoras aplicadas a este setor podem implicar em reduções significativas nas concentrações desses poluentes e em seus efeitos (Carvalho *et al.*, 2015).

3.1.2. Efeitos Sobre a Saúde

Um dos primeiros estudos sobre a correlação existente entre os efeitos da poluição atmosférica à saúde foi estabelecido a partir de episódios agudos de contaminação do ar com a ocorrência de milhares de mortes registradas em Londres, em 1948. No Brasil, jornais das décadas de 60 e 70, notificaram registros de episódios agudos de poluição do ar, decorrentes do excesso de poluentes lançados pelas indústrias na atmosfera, causando mal-estar e lotando os serviços médicos de emergência (CETESB, 2004).

A extensão da ação dos poluentes e os seus mecanismos de atuação no organismo humano são alguns dos principais temas que ainda exigem da

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

comunidade científica um grande esforço para elucidação. Sabe-se que pessoas que passam longos períodos nas ruas, muitas vezes presas nos congestionamentos, são submetidas a doses maiores de poluentes e ficam mais tempo expostas aos mesmos, tornando-se mais vulneráveis aos seus efeitos adversos (Cançado *et al.*, 2006).

Os diferentes componentes da poluição atmosférica podem levar a diversos impactos na saúde humana. Os efeitos à saúde dependem do tipo de poluente, sua concentração, tempo de exposição e suscetibilidade individual (Kampa e Castanas, 2008).

Nos últimos anos, acumularam-se evidências de que o PM aumenta a morbimortalidade cardiovascular e respiratória. O aumento da mortalidade ocorre ou concomitantemente ao aumento dos níveis de PM ou 1 a 5 dias após sua emissão/exposição (Pope, 2000).

Apesar das limitações dos diferentes métodos estatísticos utilizados nos estudos epidemiológicos, a variação na mortalidade diária associada ao PM é estimada em 0,5-1,5%/10 $\mu\text{g.m}^{-3}$ de aumento de PM₁₀ ou em 5-6 $\mu\text{g.m}^{-3}$ de aumento de PM_{2,5} (Abrahamowicz *et al.*, 2003; Levy *et al.*, 2010; Paciorek *et al.*, 2012).

A mortalidade por todas as causas aumenta, mas a taxa de mortalidade eleva-se principalmente às custas de doenças cardiovasculares e respiratórias. Segundo a OMS, o PM causa em torno de 2% da mortalidade cardiorrespiratória no mundo.

O sistema respiratório é particularmente vulnerável à poluição do ar. Asmáticos, portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica, crianças

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

menores de 5 anos e idosos são os que mais sofrem os efeitos da exposição aos poluentes (Schwartz, 1996; Kan *et al.*, 2010; Le *et al.*, 2012).

Além da descompensação da doença de base, há também aumento das taxas de infecções do trato respiratório superior e inferior com aumento dos níveis de PM. Cinco por cento dos cânceres de traqueia, brônquios e pulmão e aproximadamente 1% da mortalidade por infecção respiratória mundialmente são atribuídos ao PM. A procura de salas de emergência e de admissões hospitalares eleva-se nitidamente a partir de horas até alguns dias após o aumento dos níveis de poluição do ar (Brunekreef e Holgate, 2002; Wong *et al.*, 2010; Milojevic *et al.*, 2014).

Ao serem inaladas, as partículas são depositadas em diferentes regiões do trato respiratório (figura 2). A profundidade dessa deposição é maior quanto menor o diâmetro das partículas. Uma fração das partículas grossas é retida já nas narinas, de onde são eliminadas por espirros ou pelo muco. Partículas um pouco menores se depositam na região torácica, podendo, inclusive, ser depositadas ao longo da traqueia e dos brônquios. O aparelho mucociliar, a fagocitose e a tosse são mecanismos responsáveis pela remoção das partículas que atingem este nível do trato respiratório. Finalmente, partículas finas e ultrafinas podem atingir a região dos alvéolos e a corrente sanguínea (Oberdörster *et al.*, 2005).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Deposição de PM no trato respiratório humano. Adaptado de Oberdörster e col. (2005).

Em relação às doenças cardiovasculares, elas representam uma das mais importantes causas de mortalidade em centros urbanos (Dominici *et al.*, 2003; Atkinson *et al.*, 2015). O aumento de PM pode desencadear infarto do miocárdio (Peters *et al.*, 2001), arritmias cardíacas (Peters *et al.*, 2000) e provocar alteração do controle autonômico cardíaco (Pope, 2000). Atualmente, há evidências epidemiológicas suficientes para considerar a poluição do ar, especificamente pelo PM, um outro fator de risco para aterosclerose (Glantz, 2002) e para morte prematura por doença cardiopulmonar (Izzotti *et al.*, 2000; Le *et al.*, 2012).

A análise dos dados publicados permite que algumas características da relação entre doença cardiovascular e PM sejam identificadas: a) dose-dependência: quanto maior a concentração do PM no ar, maior a frequência de eventos cardiovasculares; b) curto período de latência: o tempo que decorre entre o incremento dos níveis de PM e o efeito sobre o sistema cardiovascular é de horas a 5 dias e c) inexistência de um limiar mínimo de concentração de PM abaixo do qual não haja nenhum risco à saúde (Brook *et al.*, 2004).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Além disso, a literatura também relata que alterações reprodutivas, como baixo peso ao nascimento, abortos e relação macho-fêmea (ao nascimento) também foram incorporadas ao conjunto de indicadores de efeitos nocivos da poluição do ar (Mohallem, *et al.*, 2005; Cançado *et al.*, 2006; Pembrey *et al.*, 2006; Somers, 2006; Lichtenfels *et al.*, 2007).

Diversas investigações sobre a toxicologia dos poluentes atmosféricos vêm sendo realizadas mundialmente, em especial sobre o PM_{2,5} (Roper *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016; Maynard, 2016; Wang *et al.*, 2016).

Nestes estudos, a contagem de formação de micronúcleos é uma metodologia amplamente aplicada, por caracterizar as mutações ocorridas nas células expostas aos poluentes (Rossnerova *et al.*, 2011; Demircigil *et al.*, 2014; Chu *et al.*, 2015; O'Callaghan-Gordo *et al.*, 2015).

Os processos inflamatórios sistêmicos desencadeados pela ativação da expressão de citocinas pró-inflamatórias e inativação das imunossupressoras, também estão largamente descritas na literatura (Thomson *et al.*, 2015; Bind *et al.*, 2016; Cliff *et al.*, 2016; Dai *et al.*, 2016; Westberg *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016).

Convém ainda salientar que a definição de efeito adverso à saúde deve ser necessariamente acompanhada da caracterização dos grupos populacionais mais suscetíveis. O aumento da suscetibilidade aos poluentes é dependente de fatores individuais, de moradia e nível socioeconômico. Entre os fatores de natureza individual, os mais importantes são a idade, morbidades associadas e características genéticas. Os extremos da pirâmide etária, abaixo de cinco e acima de 65 anos de idade, têm sido consistentemente apontados

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

como alvos preferenciais das ações adversas dos poluentes atmosféricos (Saldiva *et al.*, 1994, 1995; Cançado *et al.*, 2006).

3.2. Genotoxicidade

3.2.1. Bioindicadores e Biomonitoramento

A utilização de bioindicadores como método de detecção de mudanças no ambiente é uma ferramenta eficaz e relativamente rápida, pois apresenta menores custos e não requer instalações prévias e pode ser distribuída em diversos pontos em uma área de estudo. O uso de bioindicadores é uma metodologia adequada para a detecção de efeitos de poluentes atmosféricos sobre os indivíduos (que podem ser utilizados como biomonitores) e quando associados aos sistemas de monitoramento mecânicos podem fornecer informações de grande valor (Massadeh *et al.*, 2016).

Qualquer ser vivo pode ser utilizado como bioindicador, no entanto, espécies menos sensíveis respondem mais lentamente e com menor eficácia em comparação às espécies mais susceptíveis aos poluentes. Assim, o biomonitoramento pode ser definido, de maneira geral, como o uso de organismos ou materiais biológicos para obter informações qualitativas ou quantitativas sobre certas características da biosfera, como por exemplo, a presença de certos poluentes atmosféricos, ou ainda, como o uso sistemático das respostas de organismos vivos para avaliar mudanças ocorridas no ambiente (Pawlowski *et al.*, 2016).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

As informações mais relevantes no monitoramento ambiental são obtidas pela mudança no comportamento do indivíduo exposto (impactos sobre a saúde, desempenho fisiológico e/ou morfológico) ou através da dosagem de substâncias específicas em seus tecidos.

A coleta sistemática de dados relativos aos efeitos observados sobre a saúde dos indivíduos expostos nos permite a criação de um inventário de respostas à poluição, o que representa o terceiro sistema de informação no controle da qualidade do ar adicionalmente aos inventários de emissões e de concentrações ambientais de poluentes.

A determinação de substâncias químicas em fluidos corporais humanos foi utilizada inicialmente em Toxicologia Ocupacional visando à proteção de trabalhadores expostos a toxicantes. A partir da década de 60, surgiram novas técnicas analíticas capazes de determinar concentrações muito baixas de compostos químicos em matrizes biológicas, possibilitando a determinação de toxicantes em indivíduos expostos apenas em níveis ambientais de contaminação (Zhang *et al.*, 2016).

O biomonitoramento humano é um dos métodos utilizados, visando a proteção da saúde humana em caso de exposição a substâncias químicas e deve ser uma atividade sistemática, contínua ou repetitiva, de coleta de amostras biológicas para análises das concentrações dos poluentes ou de seus produtos de biotransformação ou ainda a avaliação de seus efeitos específicos e não adversos. Esse monitoramento tem como objetivo avaliar a exposição ou o risco à saúde de indivíduos expostos, comparando os dados obtidos com

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTCGATTTCGGCATTATAGTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

valores de referência e, se necessário, aplicando ações corretivas (De Craemer *et al.*, 2016; Fierens *et al.*, 2016).

Atualmente o biomonitoramento humano pode ser dividido em: a) monitoramento de dose interna, com a determinação do próprio poluente ou dos seus produtos de biotransformação em amostras biológicas; b) monitoramento de efeito bioquímico, com a quantificação dos produtos de reação de substâncias ativas com biomoléculas como o DNA ou proteínas e c) monitoramento de efeito biológico, que está relacionado à avaliação de efeitos precoces causados por poluentes, como, por exemplo, efeitos na expressão de citocinas inflamatórias e predisposição ao aparecimento de aberrações cromossômicas e micronúcleos (Stiegel *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

O biomonitoramento humano de dose e de efeitos bioquímicos atualmente tem grande importância na avaliação da exposição humana a poluentes, pois considera todas as rotas de ingresso e todas as fontes relevantes de introdução do agente tóxico tomando-se um instrumento muito importante para avaliação e gerenciamento de risco, além de identificar exposição a novos poluentes, tendências e mudanças na exposição, estabelecer a distribuição da exposição em uma população, auxiliar a identificação de grupos mais vulneráveis e populações expostas à altos níveis de exposição e ainda identificar riscos ambientais específicos em áreas contaminadas (Chang *et al.*, 2016; Liang *et al.*, 2016).

3.2.2. Micronúcleos

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

No decorrer da vida, o DNA sofre mutações, que podem ser causadas por erros durante a duplicação do DNA, na divisão celular ou através de indução por fatores extrínsecos (Somers *et al.*, 2002; Somers *et al.*, 2004; Somers e Cooper, 2009). O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies (Johnson *et al.*, 2016).

Os chamados agentes mutagênicos que vão alterar a sequência das bases no DNA, podem acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de doenças. Após passar por vários ciclos, uma célula poderá acumular mutações que, se em número elevado, poderão determinar a perda do controle de sua divisão, determinando, assim, o aparecimento de neoplasias (Zhu e Tsao, 2014).

De todos os casos de câncer, cerca de 90% estão associados a fatores ambientais. Alguns deles são bem conhecidos, como é o caso do cigarro e o câncer de pulmão, a exposição excessiva ao sol e o câncer de pele e alguns vírus e leucemia; outros estão sendo avaliados como alguns componentes alimentares; outros, ainda, são completamente desconhecidos (Bonassi *et al.*, 2007).

Um dos métodos mais utilizados para se estudar a ocorrência de mutações é o teste de micronúcleos, que consiste em se verificar a frequência de danos cromossômicos *in vivo* em células nucleadas (Soares *et al.*, 2001; Bonassi *et al.*, 2011).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

No LPAE da FM-USP, a planta *Tradescantia pallida* que já estava sendo usada com muito sucesso para o monitoramento da genotoxicidade de vários agentes através do estudo de MN, foi utilizada para demonstrar a mutagenicidade secundária à exposição crônica à poluição atmosférica *in vivo* (Guimarães *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2006). Quando exposta à poluição, altos níveis de MN são encontrados e também altas concentrações de agentes poluentes e metais pesados puderam ser detectadas através de análise química de suas estruturas (Sumita *et al.*, 2003).

Bolognesi e col. (1997a) correlacionaram os efeitos da poluição atmosférica em policiais de trânsito tendo como grupo controle indivíduos fumantes que não estavam em contato direto com a poluição urbana. Nesse estudo, utilizou-se o teste de micronúcleos em linfócitos como ferramenta de detecção dos efeitos mutagênicos da poluição, observando-se um maior nível de ocorrência de micronúcleos nos fumantes e não havendo relação com a exposição direta à poluição.

Il'inskikh e col. (1998), após o acidente da estação atômica, na Sibéria, mostraram a relação entre os altos níveis de MN em eritrócitos e a radiação atmosférica na população local. Nas crianças nascidas próximas à data do acidente, também foram detectados eritrócitos com alta incidência de MN, permanecendo no sangue por um longo período.

Lahiri e col., em Calcutá, (2000) investigaram a resposta inflamatória pulmonar (sintomas respiratórios, citologia de escarro) em 153 crianças expostas cronicamente a ambientes com poluição e em 116 moradores de uma cidade rural com idade entre 6 e 17 anos. Foram feitos também os testes de

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTGATTGCGCATTATAGTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

MN em células epiteliais bucais. Todas as avaliações demonstraram que as crianças de Calcutá sofreram várias reações e anomalias genéticas nos tecidos estudados expostos à poluição.

O micronúcleo se constitui em uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal. São formados durante a telófase da mitose ou meiose, quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. São resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal.

Assim sendo, o micronúcleo representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou dano no aparelho mitótico. É importante ressaltar que os micronúcleos são formados durante a mitose, independentemente do tipo de dano ocorrido durante o ciclo. Por isso, os danos no DNA causados, por exemplo, pela exposição a agentes mutagênicos, somente são expressos em micronúcleos após um ciclo de divisão celular, sendo dependentes da proporção de células que estão se dividindo. Consequentemente, a comparação da frequência de micronúcleos entre populações de células em divisão só seria segura quando a cinética de divisão nuclear após o dano ao DNA fosse idêntica (Fenech, 1997).

A citocalasina B (CtB) é um inibidor da polimerização da actina requerida para a formação do anel de microfilamentos que induzem a contração do citoplasma e clivagem da célula em duas células filhas durante a citocinese (Carter, 1967).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTCGATTTCGGCATTATAGTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

No teste do micronúcleo *in vitro*, o uso da CtB, conforme proposto por Fenech e Morley (1985a), leva ao bloqueio da citocinese, mas não da divisão nuclear, resultando em um acúmulo de células binucleadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão, independentemente do grau de sincronia e da proporção de células em divisão (Fenech, 2000).

A análise de micronúcleos em células binucleadas, além de permitir a comparação da frequência de danos cromossômicos entre populações celulares que podem diferir em sua cinética de divisão, permite uma medida mais precisa da frequência de células micronucleadas, considerando que seria necessário analisar o dobro de células mononucleadas para observar o mesmo nível de danos observados em células binucleadas (Fenech, 1997).

O teste do micronúcleo com citocalasina B pode ser usado para o monitoramento genotóxico de populações, para a avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos e físicos e para estudos específicos como variação interindividual para radiosensibilidade e predição da radiosensibilidade de tumores (Shibamoto *et al.*, 1991; Burrill *et al.*, 2000).

Embora o teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese tenha sido inicialmente desenvolvido para ser aplicado em cultura de linfócitos humanos (Fenech e Morley, 1985a, b), após adaptações, vem sendo também empregado com outros tipos celulares e para a identificação de parâmetros que refletem instabilidade genômica.

Para Fenech (2007) trata-se de um ensaio abrangente para medir danos ao DNA, citostase e citotoxicidade. Eventos de danos ao DNA são analisados especificamente nas células binucleadas (CB) e incluem: a) micronúcleos, um

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTG CATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

biomarcador de quebras cromossômicas e/ou perda de cromossomo inteiro, b) pontes nucleoplasmáticas (PNP), um biomarcador de erros de reparo do DNA e/ou fusões teloméricas e c) brotos nucleares (NBUD), um biomarcador da eliminação de DNA amplificado e/ou complexos de reparo do DNA. Os efeitos citostáticos são medidos através da proporção de células mono, bi e multinucleadas. A citotoxicidade é medida através da proporção de células necróticas e/ou apoptóticas (figura 3).

Assim, o teste é hoje um ensaio bastante utilizado em estudos *in vivo* (monitoramento genotóxico de populações), *in vitro* (avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos e físicos e seus possíveis mecanismos de ação) e *ex vivo* (radiosensibilidade individual).

Thomas e col. publicaram em 2009 um protocolo para o ensaio de micronúcleo em células da mucosa oral. Trata-se de um método minimamente invasivo para o estudo de danos no DNA, da instabilidade cromossômica, da morte das células e do potencial de regeneração do tecido da mucosa bucal humana. Este método é cada vez mais utilizado em estudos epidemiológicos moleculares para investigar o impacto da nutrição, dos fatores de estilo de vida, da exposição à genotoxinas, não-disjunções cromossômicas e morte celular.

Os biomarcadores medidos neste ensaio têm sido associados ao aumento do risco de envelhecimento acelerado, câncer e as doenças neurodegenerativas.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

Figura 3 – Diagrama de ciclos celulares em vários cenários. A) Ciclo celular normal com produção de células mononucleadas; B) Ciclo celular normal com bloqueio por CtB com produção de células binucleadas e C) Ciclo celular sob efeito genotóxico com potenciais de produção de células apoptóticas, necróticas, micronucleadas, com pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares. Modificado de Fenech (2007).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

O protocolo descreve o método estabelecido atualmente para coleta de células bucal usando uma escova de dentes de cabeça pequena, geração de uma suspensão de célula única, preparação das lâminas por citocentrifugação, fixação e coloração com Feulgen e *Light Green* tanto para análise de microscopia de campo claro quanto para fluorescência. Os critérios de avaliação de micronúcleos e outras anomalias nucleares são também são descritas em detalhe.

A figura 4 mostra um diagrama de um corte longitudinal de mucosa oral ilustrando as diferentes camadas de células e suas relações espaciais.

3.3. Epigenética

Epigenética é o termo usado para se referir às características de organismos, como as modificações de cromatina e de DNA, que são estáveis ao longo de diversas divisões celulares mas que não envolvem mudanças na sequência de bases do DNA do organismo (Vaissière *et al.*, 2008; Cheung e Lau, 2010).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 4 – Diagrama de um corte longitudinal de mucosa oral normal, com a representação dos vários tipos celulares analisados no ensaio de micronúcleo: célula diferenciada normal, célula diferenciada com MN, célula binucleada, célula diferenciada com broto nuclear, célula kariorrética (núcleo fragmentado), célula com cromatina condensada, célula picnótica (núcleo extremamente condensado) e célula kariolítica.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

A herança epigenética permite a transmissão de experiências ocorridas com os pais para os filhos (*imprinting* genômico). De acordo com os conceitos tradicionais, quando um embrião é formado, seu epigenoma é completamente apagado e reescrito a partir das informações que estão no seu DNA (Jablonka e Lamb, 2008). A exceção é que, para alguns genes, marcas epigenéticas são mantidas e passadas de uma geração para a geração seguinte (Horsthemke e Ludwig, 2005). Estas modificações epigenéticas desempenham um importante papel no processo de diferenciação celular, permitindo que as células mantenham características estáveis diferentes apesar de conterem o mesmo material genômico (Hendrich e Bickmore, 2001; Carrel e Willard, 2005).

O *imprinting* genômico é um processo cíclico que normalmente dura apenas uma geração. Ambos os *imprints* da geração anterior são apagados nas células primordiais e substituídos por um imprint paterno ou materno durante a espermatogênese e a ovocitogênese, respectivamente. O *imprint* de cada alelo em um *locus* é geralmente mantido durante todas as divisões de células somáticas após a fertilização. A especificidade do efeito genitor de origem permanece a mesma de geração a geração (Jaenisch e Bird, 2003).

Os mecanismos de apagar, estabelecer, manter e ler os *imprints* são objetos de estudo atualmente. Entretanto, estudos de diferenças moleculares entre pares de alelos opostamente imprintados identificaram alguns processos específicos de gametas que contribuem para a regulação de alelos individuais. Em particular, a atenção enfocou a metilação do DNA como o meio principal de silenciamento do alelo por genitor de origem e, menos frequentemente, sua ativação (Reik *et al.*, 2003).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

3.3.1. Metilação do DNA

Especificamente, a metilação do DNA envolve a adição de um grupo metil ($-\text{CH}_3$) na posição 5 de uma citosina no DNA imediatamente a 5' de uma guanina, isto é, a citosina de um dinucleotídeo CpG. A metilação do DNA é estabelecida e mantida pelas DNA metiltransferases (figura 5).

Geralmente, a extensão da metilação do DNA está inversamente correlacionada com a atividade gênica.

As regiões de repetições CpG (ilhas de CpG) que precedem genes comumente expressos (genes de manutenção ou *housekeeping*) não são ou são pouco metiladas (hipometiladas). Por outro lado, os genes que são transcricionalmente inativos em geral são muito metilados (hipermetilados) (Skinner *et al.*, 2010).

A despeito da correlação bem documentada entre a metilação do DNA e a repressão, alguns genes requerem metilação para serem ativos.

A metilação do DNA pode afetar a transcrição, seja direta ou indiretamente. Uma região promotora metilada pode bloquear a expressão gênica, impedindo a ligação de fatores de transcrição ou, o radical metil, pode se ligar em proteínas que mudam a conformação do cromossomo, tornando a região promotora inacessível. Por outro lado, a metilação do DNA pode permitir a expressão do gene se os radicais metil forem necessários para a ligação de fatores específicos de transcrição ou se a metilação impedir que moléculas repressoras se liguem a uma região promotora (Franklin e Mansuy, 2010).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTCGATTTCGGCATTATAGTCGATCGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

Figura 5 – A metilação do DNA é estabelecida e mantida pelas DNA metiltransferases que adicionam um radical metil ($-CH_3$) na posição 5 de uma citosina de um dinucleotídeo CpG do DNA (5-mC = 5-Metilcitosina, C = Citosina, T = Timina e U = Uracila).

Vários mecanismos epigenéticos, incluindo a metilação e a acetilação, podem alterar a função do genoma sob influência exógena. Bollati e Baccarelli (2010) revisaram evidências indicando que as alterações epigenéticas podem mediar os efeitos causados pela exposição a tóxicos ambientais. Os resultados obtidos a partir de modelos animais indicam que no útero ou no início da vida exposições ambientais produzem efeitos que podem ser herdados

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGCTAGAGTCGATCG

transgeracionalmente e são frequentemente acompanhados por modificações epigenéticas.

A busca por equivalentes humanos dos mecanismos epigenéticos identificados em modelos animais está sob estudo. Investigações recentes identificaram um conjunto de tóxicos ambientais que causam alteração de metilação em elementos repetitivos ou genes humanos (Tarantini *et al.*, 2008).

Algumas exposições podem alterar estados epigenéticos e as mesmas alterações epigenéticas podem ser encontradas em pacientes com doenças de interesse. Na figura 6 está proposta uma categorização de como a exposição ambiental a poluentes pode interagir com os mecanismos genéticos e epigenéticos.

Figura 6 – Interação entre gene-ambiente versus epigene-ambiente: modelo de possíveis rotas genéticas e epigenéticas associando exposição ambiental aos efeitos na saúde. Modificado de Bollati e Baccarelli (2010).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

A interação entre o ambiente e o genoma humano tem sido tradicionalmente referida de acordo com o modelo Rota A de interações gene-ambiente (figura 6) (Ishibe e Kelsey, 1997; Kraft e Hunter, 2005; Dempfle *et al.*, 2008; Baccarelli, 2009; London e Romieu, 2009).

Sob este modelo, as doenças resultam de interações entre a composição genética do indivíduo e os fatores ambientais. Geneticistas sempre sustentam que a expressão de uma característica genética no fenótipo é altamente variável e em grande parte, dependente do ambiente no qual o indivíduo está submetido. O mesmo conceito pode ser abordado a partir do domínio da saúde ambiental: alguns indivíduos têm baixo risco de desenvolver de uma doença, como resultado de uma exposição ambiental, enquanto outros são muito mais suscetíveis.

Por exemplo, indivíduos com polimorfismos genéticos que diminuem a capacidade de suas células responderem ao stress oxidativo, têm sido referidos em várias investigações como sendo mais suscetíveis à efeitos cardiovasculares e respiratórios na presença de poluição do ar (Park *et al.*, 2006; Chahine *et al.*, 2007).

Uma abordagem puramente baseada em sequência de DNA (*naked DNA snapshot*) não é suficiente para explicar completamente os riscos de doenças comuns, que são modulados por outros mecanismos não genéticos. Na verdade, crescem as evidências que mostram que as influências moleculares do ambiente se estendem muito além da interação com a sequência de DNA. Várias investigações, têm mostrado que tóxicos ambientais podem modificar estados epigenéticos.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Nas interações gene-ambiente (figura 6, rota A), os polimorfismos genéticos que modificam os efeitos de exposições ambientais são transmitidos transgeracionalmente de acordo com a genética mendeliana. Uma segunda forma de interação (figura 6, rota B) inclui os efeitos diretos das exposições ambientais no genoma, através de danos e/ou mutações no DNA induzidas pela exposição ambiental. Consequentemente, agentes genotóxicos estão sendo classificados de acordo com sua capacidade de alterar a sequência de DNA e, assim, aumentar os riscos de doenças (Siemiatycki *et al.*, 2004).

Mutações no DNA ambientalmente induzidas podem ter um efeito transgeracional único se tiverem ocorrido em uma linhagem de células germinativas (Cropley *et al.*, 2006). Por exemplo, foi demonstrado que a exposição parental à radiação ionizante aumenta a frequência de mutações germinativas detectáveis na geração seguinte (Charles, 2001) e que conferem uma predisposição para o câncer (Dubrova *et al.*, 2000).

Semelhante aos efeitos dos polimorfismos genéticos, as diferenças epigenéticas que determinam os riscos de doenças, podem tornar os indivíduos menos ou mais vulneráveis às agressões ambientais (figura 6, rota C). Em estudos ambientais, a flexibilidade de estados epigenéticos tem gerado um crescente interesse na avaliação das alterações epigenéticas diretas que a exposição ambiental produz (figura 6, rota D), incluindo mudanças na metilação do DNA e modificações de histonas (Baccarelli e Bollati, 2009), bem como a transmissão transgeracional dessas alterações (Anway e Skinner, 2006; Skinner, 2007).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

As alterações epigenéticas induzidas por fatores ambientais, como as mudanças nos perfis de metilação do DNA e modificações proteicas, principalmente em histonas, têm sido investigadas em diversos marcadores inflamatórios com o objetivo de se estabelecer uma relação entre a genotoxicidade desses fatores e as alterações de expressão gênica desses marcadores encontradas em indivíduos expostos (Mostafavi *et al.*, 2015).

3.3.2. Marcadores Inflamatórios

Dentre os principais painéis de marcadores inflamatórios investigados nas pesquisas, de uma forma geral, destacam-se, as citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-16, IL-18, IL-20, TNF-alfa e IFN), as citocinas de doenças alérgicas (IL-4, IL-5, e IL-6) e as citocinas imunossupressoras (IL-10, IL-13 e IL-19) (Brucker *et al.*, 2013; Johannesson *et al.*, 2014; Rückerl *et al.*, 2014; Klümper *et al.*, 2015; Mostafavi *et al.*, 2015). A figura 7 ilustra as interconexões das principais vias de sinalização dessas citocinas.

O sistema imunitário reconhece a presença de organismos patogênicos por diversas proteínas que se ligam às moléculas segregadas pelo organismo ou fixadas em sua superfície. As células responsáveis por estas respostas imunes incluem as células B, as células T, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e células endoteliais (Stanley e Lacy, 2010).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGTCGATCGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 7 – Vias de sinalização dos principais marcadores inflamatórios. Destaques para o TNF-alfa, citocina pró-inflamatória e para a IL-10, citocina imunossupressora. Traduzido e modificado de Qiagen® (2009).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Estas células têm papéis distintos no sistema imunitário e se comunicam com outras células do sistema imunológico por citocinas, que controlam a proliferação, diferenciação e função de células do sistema imunitário. Além disso, elas estão envolvidas em processos de inflamação e no desenvolvimento neuronal, hematopoiético e embrionário do organismo. Ao contrário de hormônios, citocinas não são armazenadas em glândulas como moléculas pré-formadas, mas são rapidamente sintetizadas e segregadas por células diferentes principalmente após a estimulação. As citocinas são pleiotrópicas nas suas atividades biológicas e frequentemente afetam a ação de outras citocinas de forma aditiva, sinérgica ou antagônica (Townsend e McKenzie, 2000).

3.3.2.1. Fator de Necrose Tumoral

O TNF-alfa é expresso principalmente por macrófagos e monócitos, seguido de neutrófilos, células T e NK, sob estímulo de lipoglicanos, vírus, bactérias, células neoplásicas, IFN, IL-1, IL-2, fatores estimuladores de colônias, bradicinina, imunocomplexos, inibidores da cicloxigenase e agentes genotóxicos. É inibido por ciclosporina, dexametasona, IL-10 e antagonistas do Fator Ativador de Plaquetas (PAF) (de Carvalho *et al.*, 2016).

Nedwin e col. (1985) determinaram que o gene TNF-alfa abrange cerca de 3kb e contém 4 exons. Os últimos exons deste gene codificam mais de 80% da proteína segregada. Por análise dos híbridos de células somáticas humano-

rato, constataram que TNF-alfa e TNF-beta estão intimamente ligados no cromossomo 6, no segmento 6p23 (figura 8).

A principal atividade biológica do TNF é a acentuada citólise e citoestase em diferentes linhagens neoplásicas, tendo ação antitumoral muito significativa. É o principal mediador na caquexia das neoplasias malignas, com suas demais ações semelhantes às da IL-1: ação na hematopoiese, na ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos T e B. É também um pirógeno endógeno, aumenta a reabsorção óssea, promove a lipólise, aumenta a proliferação de fibroblastos e eleva as concentrações das proteínas da fase aguda da inflamação (Forte, 2004).

Figura 8 – Mapeamento genômico (A) e citogenético (B) do gene TNF no cromossomo 6 humano. Fonte: NCBI, ISCN, 2009.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

O TNF foi originalmente identificado em soro de rato após a injeção de *Mycobacterium bovis* e de *Bacillus Calmette-Guerin* em uma linhagem celular de monócitos humanos, cujos clones de cDNA foram isolados, sequenciados e traduzidos em *E. coli* (Shirai *et al.*, 1985;. Pennica *et al.*, 1984).

O TNF é sintetizado como uma proteína de 26kD ligada à membrana que é clivada por enzimas de processamento para libertar uma molécula solúvel de 17kD de TNF solúvel que pode, em seguida, se ligar aos seus principais receptores: TNFR1 e TNFR2 (Skoog *et al.*, 1999).

Aggarwal e col. (1985) apresentaram provas de que o TNF-alfa e o TNF-beta são partes de um receptor comum em células tumorais e que os receptores são regulados positivamente por IFN. Vários interferons têm sido conhecidos por serem sinérgicos com TNF, em efeitos anti-tumorais *in vitro*.

Brenner e col. (1989) demonstraram que TNF-alfa estimula a ativação prolongada da expressão do oncogene JUN, que codifica o fator de transcrição AP-1, o qual estimula a transcrição do gene da collagenase. Assim, a ativação de JUN e a expressão do gene da collagenase podem ser um mecanismo para mediar alguns dos efeitos biológicos de TNF-alfa.

Nas células da glia, Beattie e col. (2002) demonstraram que o TNF-alfa produzido, aumenta a eficácia sináptica. Impedir as ações do TNF-alfa endógeno tem os efeitos opostos. Assim, concluíram que é necessária a presença contínua de TNF-alfa para a preservação de força sináptica nas sinapses excitatórias podendo desempenhar um papel na plasticidade sináptica e nas respostas que modulam a uma lesão neural.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Usando uma abordagem integrada que compreende a purificação de afinidade em tandem, espectrometria de massa em tandem por cromatografia líquida, análise de rede e os estudos de perturbação funcional dirigidos usando interferência de RNA ou análise de perda de função, Bouwmeester e col. (2004) identificaram 221 associações moleculares e 80 interagentes anteriormente desconhecidos, incluindo 10 novos moduladores funcionais, da via de transdução de sinal TNF-alfa/NFKB (*Nuclear Factor Kappa B*).

O tráfego de membrana em macrófagos ativados é necessário para dois eventos críticos na imunidade inata: a secreção de citocinas pró-inflamatórias e fagocitose de patógenos. Murray e col. (2005) encontraram uma via que liga ambas as ações, o que pode economizar transporte de membrana e aumentar a resposta imune. O TNF-alfa é veiculado a partir do Golgi, para a reciclagem do endossoma, onde a proteína-3 de membrana vesicular media sua entrega à superfície celular no local da formação fagocitária. A fusão do endossomo de reciclagem no sítio de fagocitose simultaneamente permite rápida liberação de TNF-alfa e expande a membrana para o processo.

3.3.2.2. Interleucina-10

A IL-10 é produzida principalmente por células CD8+, sobretudo células Th2, Th3 ativadas. Linfócitos B, Th1 e mastócitos ativados igualmente podem produzir IL-10, constituindo-se em fontes menos importantes.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCGTATTTTCGATTTCGGCATTATAGTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Kim e col. (1992) mostraram que o gene IL-10 de rato compreende 5 exons e abrange cerca de 5,2kb de DNA genômico. Em sequência, mapearam o gene IL-10 no cromossomo 1 por análise de retrocruzamento interespecífico e no cromossomo humano 1 por análise de PCR a partir de um painel de híbridos de células somáticas de hamster-humano. Mais tarde, Eskdale e col. (1997) mapearam o gene IL-10 na junção entre 1q31 e 1q32 (figura 9).

A principal atividade biológica da IL-10 é inibir a síntese de outras citocinas, como o IFN, IL-2, IL-12 e TNF. Diminui ainda, a proliferação e a função citolítica e secretora de citocinas por Th1 e facilita o desenvolvimento de respostas Th2. Diminui a ação de monócitos e macrófagos e é um co-estimulador para a proliferação de mastócitos e de suas células progenitoras.

Franchimont e col. (1999) examinaram a capacidade do TNF-alfa e da IL-10 de regular diferencialmente a sensibilidade de monócitos e macrófagos humanos aos glicocorticóides. A dexametasona teve efeito diferente sobre a secreção de TNF-alfa e de IL-10 induzida por lipopolissacarídeo. Enquanto suprimiu TNF-alfa de uma forma dependente da dose o seu efeito sobre a secreção de IL-10 foi bifásica, produzindo estimulação em doses mais baixas e a inibição em doses mais elevadas em culturas de células do sangue total. Os autores concluíram que os glicocorticóides modulam diferencialmente o TNF-alfa e a IL-10 por monócitos humanos e que a sensibilidade destas células aos glicocorticóides é alterada pelo pré-tratamento com o TNF-alfa e com a IL-10.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTCGATTTCGGCATTATAGTCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

Figura 9 – Mapeamento genômico (A) e citogenético (B) do gene IL-10 no cromossomo 1 humano. Fonte: NCBI, ISCN, 2009.

Esposito e col. (2003) testaram a hipótese de que concentrações séricas baixas de IL-10 estão associadas à síndrome metabólica em mulheres obesas. As mulheres obesas apresentam níveis circulantes mais elevados de IL-6, proteína C-reativa e de IL-10 do que as mulheres não obesas. Estes resultados demonstram que os níveis circulantes de IL-10 são elevados em mulheres obesas e que baixos níveis de IL-10 estão associados com a síndrome metabólica.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

A estimulação de culturas de células de sangue humano com o lipopolissacarídeo bacteriano mostrou grande variação interindividual na secreção de IL-10, que foi mostrado ter um componente genético de mais de 70% (Westendorp *et al.*, 1997). Eskdale e col. (1998) levaram o estudo a cabo para determinar a extensão em que a estrutura do promotor de IL-10 contribui para a variabilidade genética na secreção induzida por LPS de IL-10. Turner e col. (1997) demonstraram uma diferença na secreção de IL-10, em associação com a presença ou ausência de uma base adenina na posição -1082 do promotor de IL-10 humana.

Grove e col. (2000) examinaram o papel potencial de polimorfismo no gene IL-10 na patogênese da doença hepática alcoólica. As frequências alélicas para 2 substituições de pares de bases únicos em posição -627 (C para A) e -1117 (A para G) na região promotora IL-10 foram determinados em 287 etilistas com doença hepática avançada comprovada por biópsia, 107 etilistas sem evidência de doença hepática e 227 participantes saudáveis.

Elevada produção de IL-10 está associada com doenças auto-imunes tais como artrite reumatóide e o lúpus eritematoso sistêmico. Além disso, os níveis de produção IL-10 são concordantes em gêmeos monozigóticos (Westendorp *et al.*, 1997). O promotor de IL-10 é polimórfico e pode ser responsável por diferentes níveis de produção de citocinas. Gibson e col. (2001) identificaram 7 novos SNPs na região distal do promotor IL-10 e descobriram que certos haplótipos estão significativamente associados com a expressão de IL-10 e com lúpus em afro-americanos.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

O papel da IL-10 no desenvolvimento de diversas outras doenças já está bem estabelecida na literatura, como no caso da psoríase (Asadullah *et al.*, 2001); do carcinoma hepatocelular (Shin *et al.*, 2003); na Síndrome da Morte Súbita Infantil (Summers *et al.*, 2000); na Morte Súbita do Lactente Inesperada devido a uma Infecção (Opdal *et al.*, 2003); no infarto agudo do miocárdio (Lio *et al.*, 2004); na doença Crohn (Fowler *et al.*, 2005); na susceptibilidade à hanseníase (Moraes *et al.*, 2004; Malhotra *et al.*, 2005); na tuberculose (Stein *et al.*, 2007); na proteção contra anemia grave da malária (Ouma *et al.*, 2008) e no tracoma (Natividad *et al.*, 2008).

Lio e col. (2004) concluíram que uma vez que o sistema imunológico humano evoluiu para controlar agentes patogênicos, as respostas pró-inflamatórias eram susceptíveis de serem programadas pela evolução para resistir às infecções fatais. Eles também observaram que a baixa produção de IL-10 está associada com um aumento da resistência aos agentes patogênicos. O aumento da concentração de IL-10, no entanto, pode controlar melhor as respostas inflamatórias induzidas por danos crônicos nos vasos e reduzir o risco de complicações aterogênicas. Concluem também que estas condições podem resultar em um aumento da possibilidade de vida longa em um ambiente com uma carga reduzida de antígenos.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

4

Métodos

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

4. MÉTODOS

4.1. Desenho do Estudo

Ensaio clínico observacional, longitudinal, não randomizado, controlado, aberto, de medidas repetidas, em ambiente real de exposição, para análise dos efeitos da poluição atmosférica em profissionais em atividade externa na cidade de São Paulo, SP.

4.2. Casuística

Participaram deste estudo 57 indivíduos do gênero masculino, com idades variando entre 28 e 66 anos (mediana = 48,70 anos) (figura 10).

Todos os participantes trabalhavam em turnos diários de atividades externas na cidade de São Paulo e, portanto, eram ocupacionalmente expostos à poluição atmosférica. Foram recrutadas 3 categorias de profissionais: 1) controladores de tráfego da Companhia de Engenharia de Tráfego (CET) do centro da cidade (n=18), 2) taxistas dos pontos de Pinheiros e Cerqueira Cesar (n=21) e 3) profissionais do Instituto Florestal em atividade na Serra da Cantareira (n=18).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 10 – Descrição da casuística do estudo: variação do número de participantes do recrutamento ao encerramento da pesquisa.

4.3. Grupos de Estudo

Para a implementação de uma política de não deterioração significativa da qualidade do ar em todo o território nacional, o CONAMA através da Resolução Nº 5 de 15 de Junho de 1989, definiu suas áreas de acordo com a seguinte classificação de usos pretendidos:

Classe I: Áreas de preservação, lazer e turismo, tais como Parques Nacionais e Estaduais, Reservas e Estações Ecológicas, Estâncias

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTGCGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Hidrominerais e Hidrotermais. Nestas áreas deverá ser mantida a qualidade do ar em nível o mais próximo possível do verificado sem a intervenção antropogênica.

Classe II: Áreas onde o nível de deterioração da qualidade do ar seja limitado pelo padrão secundário de qualidade (concentrações de poluentes atmosféricos abaixo das quais se prevê o mínimo efeito adverso sobre o bem-estar da população).

Classe III: Áreas de desenvolvimento onde o nível de deterioração da qualidade do ar seja limitado pelo padrão primário de qualidade (concentrações de poluentes que, ultrapassadas, poderão afetar a saúde da população).

Baseado nessa classificação do CONAMA, nossa casuística foi dividida em dois grupos de estudo a saber (figuras 10, 11 e 12):

- a) Grupo Área Urbana (AU), correspondente à Classe III do CONAMA, formado pelos controladores de tráfego e taxistas (n = 38) – trabalhadores expostos ocupacionalmente no centro da cidade, e
- b) Grupo Área Periurbana (APU), correspondente à Classe I do CONAMA, formado pelos trabalhadores do Instituto Florestal (n = 18) – trabalhadores expostos ocupacionalmente na periferia da cidade.

4.4. Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo, profissionais de tráfego da CET, taxistas e funcionários do Instituto Florestal, ativos de São Paulo, capital, em atividades

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCGTATTTTCGATTTCGGCATTATAGTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

de turnos diários externos há no mínimo 1 ano; saudáveis (ausência de doenças descompensadas), do gênero masculino, com idades entre 20 e 70 anos, não tabagistas ou ex-tabagistas há mais de um ano e residentes, no máximo, a 4km do local de trabalho.

Figura 11 – Foto aérea da Cidade de São Paulo obtida em 20/04/16, mostrando a Área Urbana correspondente à área de classe III do CONAMA e a Área Periurbana, correspondente à área de classe I. Note a neblina de poluição sobre a área urbana. Imagem do autor.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 12 – Imagem de satélite da cidade de São Paulo com a identificação dos locais de exposição ocupacional à poluição atmosférica dos participantes dos grupos de estudo. Grupo AU, área urbana da cidade e grupo APU, área periurbana da cidade. Fonte: Google maps.

4.5. Aspectos Éticos

Este projeto de pesquisa e o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1) foram submetidos à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo de pesquisa nº 0565/07, anexo 2) e somente foi iniciado após ter sido aprovado pela instituição.

Este protocolo foi conduzido de acordo com os princípios enunciados na Declaração de Helsinque - ratificada em Edimburgo (2000), expressos na

Foi declarado pelo pesquisador responsável que as informações contidas neste estudo serão consideradas confidenciais e usadas pelo próprio ou por seus colaboradores, sob sua autorização. Essas informações poderão ser reveladas se, a critério do pesquisador responsável, tal fato se tornar necessário.

Todos os participantes foram incluídos no estudo após palestras explicativas e triagens para adequação nos critérios de inclusão/exclusão. O pesquisador responsável informou aos participantes sobre os objetivos do estudo, os procedimentos adotados, os riscos do protocolo, além das coletas de células e sangue para análise. Os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes de serem aceitos para participar do estudo.

Ao consentirem em participar do estudo, os participantes foram encaminhados para o Hospital das Clínicas (HC) da FMUSP para triagem, coordenada pelo Prof. Dr. Ubiratan de Paula Santos e pela Prof^a Dr^a Maria Lúcia Bueno Garcia.

Durante a triagem, foi feita uma avaliação clínica (anamnese e exame físico completo) dos participantes da pesquisa e aplicado um questionário

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCGTATTTGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

sobre dados sociodemográficos, antecedentes profissionais, sintomas cardiorrespiratórios, oftálmicos e riscos cardiovasculares. Aqueles que se enquadraram dentro dos critérios de inclusão do estudo, tiveram suas visitas agendadas no HC para que fosse dado início à fase de coleta de dados da poluição e de material biológico.

As amostras de poluição do ar foram coletadas 4 vezes para cada participante (4 visitas), durante um período de 24h, com intervalos de 1 semana entre cada coleta. As amostras biológicas (sangue e células da mucosa oral) foram coletadas na segunda e na quarta visita.

4.7. Poluição do Ar

Dados de medição da poluição fornecidos pela CETESB mostram a exposição de uma população em dada área da cidade. Levando-se em consideração o fato de que os indivíduos podem responder diferentemente devido a polimorfismos genéticos e/ou por sofrerem diferentes graus de exposição aos poluentes dependendo de sua moradia, trabalho, deslocamento pela cidade e tipo de meio de transporte, o Eng. Dr. Paulo Afonso de André, pesquisador do LPAE, passou a adaptar equipamentos desenvolvidos pela Escola de Saúde Pública da Universidade de Harvard (Demokritou *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2004) para medidas individuais da exposição dos sujeitos estudados, de forma que estes portassem um amostrador individual de poluição (figura 13).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTCGATTGCGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

O impactador do tipo Harvard possui acoplado ao sistema uma cabeça separadora que determina o ponto de corte para partículas com diâmetro aerodinâmico $\leq 2,5\mu\text{m}$.

Figura 13 – Componentes principais do amostrador de material particulado fino com vazão de $4\text{L}\cdot\text{m}^{-1}$, com impactador desenvolvido pela Escola de Saúde Pública de Harvard, adaptado para uso individual pelo LPAE da FMUSP.

Para a coleta do PM as amostragens foram feitas sobre filtros de polycarbonato (Isopore™ Membrane Filters Polycarbonate, Millipore®, USA) (figura 14), com $0,8\mu\text{m} \times 47\text{mm}$ e vazão de $4\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. A concentração do material particulado ($\text{PM}_{2,5}$), ou seja, a massa total do material retida no filtro por volume de ar succionado foi obtida pelo método gravimétrico.

Para isso, foram realizadas pesagens dos filtros antes e depois da exposição utilizando uma balança analítica de alta sensibilidade (modelo MX5, precisão de $1\mu\text{g}$, Mettler Toledo, Suíça).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Os filtros foram acondicionados individualmente em Placas de Petri e deixados para equalização em uma sala com temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa ($40\pm 3\%$) controladas por um período de 24h antes de cada pesagem. Foram realizadas três pesagens, não sucessivas, para cada filtro e utilizada a média aritmética dessas pesagens.

As massas dos filtros foram pesadas antes e depois das amostragens, sendo a diferença entre as duas pesagens considerada a massa do PM depositado. Conhecendo a vazão da bomba e o tempo de exposição, obteve-se o volume de ar succionado. Dividindo-se a massa do PM obtida pelo volume total de ar succionado, foi obtida a concentração de $\text{PM}_{2,5}$ do ar em $\mu\text{g.m}^{-3}$.

Figura 14 – Filtros de policarbonato antes (claro) e após (escuros) a concentração de PM.

Para estudar o efeito na saúde do gás NO_2 típico de regiões urbanas o utilizamos amostradores passivos como mostrado na figura 15. As vantagens desses amostradores são seu baixo custo, simplicidade de análise laboratorial e grande portabilidade, permitindo que os participantes carreguem esses filtros durante suas atividades normais ou mesmo que sejam acomodados nas

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTGCGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGGCTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

residências, em veículos ou qualquer local de interesse aos estudos, sem causar qualquer problema ou interferência.

Figura 15 – Tubos passivos para amostragem de gases. (A) Frasco para suporte (1) e filtro (2) tratado para absorção de NO₂. (B) Suporte utilizado para acomodar os tubos de amostragem.

Para a validação dessas amostragens foram feitas medidas simultâneas dos filtros passivos junto à estação de monitoramento da CETESB para esses gases, de maneira a se obter uma curva de calibração dos processos. A concentração de NO₂ foi obtida por espectrometria (Lodge, 1988).

O ar é considerado de boa qualidade pela CETESB (qualidade N1, cor verde), quando o Índice de Qualidade do Ar (IQAr) estiver entre 0 e 40. Para tal, a concentração máxima do PM_{2,5} deverá ser de 25µg.m⁻³ e a concentração máxima de NO₂ deverá ser 200µg.m⁻³. Por esse motivo, esses valores foram adotados como referências no nosso estudo.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

4.8. Genotoxicidade

Teste de Micronúcleos

A análise da genotoxicidade foi realizada pelo teste de micronúcleos nas células epiteliais da mucosa oral e em linfócitos do sangue periférico dos sujeitos de pesquisa.

Duas lâminas de cada tipo de células de cada um dos sujeitos foram preparadas e coradas. As leituras das lâminas foram realizadas, às cegas, por dois pesquisadores.

Para a preparação das lâminas de células da mucosa oral, foi utilizado o *Buccal Micronucleus Cytome Assay*, método descrito por Philip Thomas e colaboradores (2009) e para a preparação das lâminas de cultura de linfócitos do sangue periférico, foi utilizado o *Cytokinesis-block Micronucleus Cytome Assay*, método descrito por Michael Fenech (2007).

Ambos os métodos foram adaptados para a visualização das lâminas em microscopia de luz (Olympus, CX41). Para tanto, as colorações foram modificadas: para as lâminas de células da mucosa oral, ela foi realizada com azul de metileno (Merk, 159270) e para as lâminas de linfócitos, ela foi realizada com Azur-eosina-azul de metileno em solução segundo Giemsa (Merk, 109204).

Os critérios do *The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells* (HUMNXL) (Bonassi *et al.*, 2011) foram adotados nesse estudo para o *score* dos micronúcleos encontrados nas células da mucosa oral e os critérios

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTCGTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

do *The HUMN Project* (Fenech *et al.*, 2003) foram adotados para os encontrados em linfócitos do sangue periférico.

O Índice de Divisão Nuclear considerando a Citotoxicidade (IDNC) foi calculado através da fórmula: $IDNC = [A + N + M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]/n$, onde: A = número de células apoptóticas, N = número de células necróticas, M1-M4 = número de células viáveis com 1 a 4 micronúcleos, n = número total de células analisadas.

4.9. Epigenética

Perfil de Metilação do DNA

O perfil de metilação das regiões promotoras dos genes TNF-alfa e IL-10 foi determinado por sequenciamento de nova geração a partir de DNA genômico extraído do sangue periférico dos participantes da pesquisa.

Inicialmente as hemácias das amostras coletadas foram lisadas para a obtenção do *buffy coat*. Os tubos de sangue EDTA foram centrifugados durante 10 minutos, a 1000rpm e em temperatura ambiente; em seguida, o plasma foi descartado e o restante do sangue, transferido para um tubo Falcon de 50mL, que foi completado com TE 1X (pH 8,0) até 40ml; a mistura foi vortexada por 2 minutos e centrifugada a 3.500rpm por 7 minutos (essa lavagem foi repetida 2x); finalmente o sobrenadante foi descartado e o volume final do tubo (aproximadamente 200µL) foi homogeneizado, transferido para um tubo de 1,5ml e armazenado em freezer -80°C.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

Em sequência, foi realizada uma pré-digestão das amostras, antes da extração de DNA, com o uso do kit Qiaamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Cat. 51104). A extração do DNA foi realizada com o uso do kit QIAamp 96 DNA QIAcube HT (Qiagen, Cat. 51331) através do sistema automatizado Qiacube®. Ambos os procedimentos foram realizados segundo as instruções do fabricante.

O DNA extraído foi quantificado e avaliado quanto à pureza no Qubit (*Qubit Fluorometric Quantitation*, Thermo Scientific, EUA) e avaliado quanto à integridade em gel de agarose 0,8%.

Após a extração, o DNA foi tratado com bissulfito de sódio para a conversão das bases não-metiladas. Para esse experimento, foi usado o kit EZ DNA Methylation-Gold™ (Zymo Research, Cat. D5005), segundo as instruções do fabricante.

O DNA convertido foi utilizado para a construção da biblioteca de sequenciamento. O protocolo para a construção desta biblioteca, que consiste em duas etapas, reparo das extremidades do DNA e ligação dos adaptadores de sequenciamento, foi desenvolvido (e não publicado) pela equipe da Dra. Dirce Maria Carraro do Centro Internacional de Pesquisa do Hospital A.C. Camargo Cancer Center.

Para o reparo das extremidades, o DNA foi incubado em termociclador, por 30 minutos, a 37°C com o seguinte mix: T4 DNA Ligase Buffer 5X (10,0 µL), dATP 10mM (10,0 µL), Klenow (0,5 µL), T4 Polynucleotide Kinase (2,5 µL) e DNA pool (27µL).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Para a ligação dos adaptadores, o DNA foi incubado em termociclador por 16 horas, a 16°C com o seguinte mix: T4 DNA Ligase Buffer 10X (5µL), Adaptadores 10µM (5µL), T4 DNA Ligase 1U/µL (5µL), H₂O (5µL), DNA pool (30µL).

Após a preparação da biblioteca, a amostra foi submetida à uma PCR pré-sequenciamento com o seguinte mix: Buffer 10X (5µL), MgSO₄ 50mM (2µL), dNTP 10mM (1µL), Primer 454A-PCR 10µM (1µL), Primer 454B-PCR 10µM (1µL), Taq Platinum High-Fidelity (0,4µL), H₂O (9,6µL), DNA pool (30µL) e o seguinte programa: 94°C (5 min), [94°C (40 seg), 58°C (60 seg), 68°C (60 seg)] x 15, 68°C (5 min) e 4°C (∞).

Os pares *primers* convertidos utilizados na PCR foram:

TNF-alfa:

F: GGGGTATCCTTGATGCTTGTGTG

R: GGAAAGGACACCATGAGCACTGAAAGCA

IL-10

F: ATTGTATTCTGGAATGGGCAATTTG

R: GTGGCTTTTTAATGAATGAAGAGG

O sequenciamento das amostras de DNA convertido foi realizado através de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) com a plataforma GS Junior 454 Sequencing System (Roche).

Foram considerados hipermetilados, os genes TNF-alfa com metilação superior a 7% e os genes IL-10 com metilação superior a 26% (mediana das medidas).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

4.10. Análise dos Resultados

Para a comparação dos resultados entre os grupos experimentais, foi utilizado a análise de variância (ANOVA) e o teste U-Mann Whitney. Para o estabelecimento da correlação entre a poluição e os micronúcleos e o perfil de metilação, foi utilizado o Coeficiente de Correlação de Spearman. Para a análise de frequências, foi utilizado o teste do Qui-quadrado.

Os dados de poluição estão apresentados em média $\pm$ erro padrão. Os dados de micronúcleos e metilação estão apresentados em porcentagem. Diferenças significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$.

Os testes estatísticos e os gráficos foram realizados nos programas IBM® SPSS® Statistics Software, versão 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e Microsoft Office Excel (2007).

Resultados

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

5. RESULTADOS

5.1. Descrição da Casuística

A tabela 1 sumariza os dados antropométricos dos participantes do estudo. Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos em relação aos parâmetros idade (anos), peso (kg), altura (m) e Índice de Massa Corpórea (IMC).

Tabela 1 – Estatística descritiva dos dados antropométricos dos participantes do estudo.

Parâmetro	Grupos	Média	DP	n	EP	med	IC 95%		ANOVA
							Inf	Sup	
Idade	AU	50,29	8,63	39	1,87	48,55	44,33	51,65	ns
	APU	47,72	10,00	18	2,58	49,00	42,81	52,93	
Peso	AU	81,40	13,04	39	2,83	79,43	75,85	86,94	ns
	APU	82,13	17,71	18	4,57	79,20	73,16	91,09	
Altura	AU	1,73	0,04	39	0,01	1,72	1,71	1,74	ns
	APU	1,70	0,07	18	0,02	1,69	1,67	1,73	
IMC	AU	27,39	3,75	39	0,82	26,89	25,79	28,99	ns
	APU	28,36	5,71	18	1,48	27,01	25,46	31,25	

DP = Desvio Padrão, EP = Erro Padrão, med = mediana, IC = Intervalo de Confiança, ns = não significativo.

Os dados vitais dos participantes do estudo (tabela 2) são semelhantes e comparáveis em relação a circunferência abdominal, pressão arterial sistólica e diastólica e frequência respiratória. Entretanto diferem com relação frequência cardíaca ($p=0,0240$) e ao monóxido de carbono exalado ($p=0,0010$).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Tabela 2 – Dados vitais dos participantes do estudo.

Dados	Grupo AU		Grupo APU		p	Teste
	Média	DP	Média	DP		
CA	100,8	11,82	100,4	15,2	0,8900	<i>t</i>
PAS	124,2	11,44	124,1	15,3	0,8900	MW
PAD	76,0	8,99	77,1	12,8	0,6500	<i>t</i>
FR	11,9	3,89	14,2	2,6	0,1050	MW
FC	67,6	9,59	73,6	13,5	0,0240	<i>t</i>
CO	3,3	3,24	0,7	0,7	0,0010	MW

CA = Circunferência Abdominal, PAS = Pressão Arterial Sistólica, PAD = Pressão Arterial Diastólica, FR = Frequência Respiratória, FC = Frequência Cardíaca, CO = Monóxido de Carbono.
DP = Desvio Padrão, *t* = Teste *t* de Student, MN = Teste U-Mann Whitney

5.2. Poluição do ar

A tabela 3 apresenta a estatística descritiva dos valores de poluição (PM_{2,5} e NO₂) amostrados neste trabalho, para os grupos de estudo urbano e periurbano. Nota-se diferença de exposição ao PM_{2,5} (p=0,031) entre os grupos, sendo o grupo AU, aquele exposto às maiores concentrações do poluente. Não foi observada diferença entre os grupos em relação ao NO₂ (p=0,130) (figura 16).

Tabela 3 - Estatística descritiva dos valores de poluição amostrados no estudo.

Poluentes	PM _{2,5}		NO ₂	
Grupos	AU	APU	AU	APU
Média	32,92	25,77	206,80	190,12
EP	1,90	2,39	7,10	4,00
Mediana	31,83	23,74	198,50	189,39
DP	11,85	10,12	44,34	16,97
Variância	140,32	102,44	1966,06	288,13
Mínimo	8,50	14,20	116,81	153,84
Máximo	72,30	54,60	329,82	232,62
n	39	18	39	18
IC 95%	3,84	5,03	14,37	8,44
ANOVA	p=0,031		p=0,130	

DP = Desvio Padrão, EP = Erro Padrão, IC = Intervalo de Confiança.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 16 - Valores médios dos poluentes PM_{2,5} (A) e NO₂ (B) amostrados nos grupos urbano (AU) e periurbano (APU).

Os valores individuais das concentrações de PM_{2,5} e NO₂ medidos nos participantes do estudo estão ilustrados na figura 17.

Observa-se na figura 17A que, no grupo AU, 24% dos indivíduos foram expostos a concentrações de PM_{2,5} inferiores a 25µg.m⁻³, enquanto 76% foram expostos a concentrações superiores. Os dados mostraram que dois participantes deste grupo foram expostos a concentrações superiores a 50µg.m⁻³, o que, pela CETESB, qualifica o ar como ruim e expõe a saúde do indivíduo. Já no grupo APU, 56% dos indivíduos foram expostos a concentrações inferiores a 25µg.m⁻³ e 44% a concentrações superiores. Nos dois casos, as diferenças encontradas foram significativas (p=0,0001 e p=0,0002, respectivamente).

Dos indivíduos expostos a concentrações inferiores a 25µg.m⁻³, 53% encontravam-se na área periurbana de São Paulo. Já dos expostos a concentrações superiores, 78% encontravam-se na área urbana.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Observa-se na figura 17B que, no grupo AU, 53% dos indivíduos foram expostos a concentrações de NO_2 inferiores a $200\mu\text{g.m}^{-3}$, enquanto 47% foram expostos a concentrações superiores. Os dados mostraram que oito participantes deste grupo foram expostos a concentrações superiores a $240\mu\text{g.m}^{-3}$, o que, pela CETESB, qualifica o ar como ruim e, em um caso, exposto a concentração de $320\mu\text{g.m}^{-3}$ (qualidade do ar muito ruim). Já no grupo APU, 78% dos indivíduos foram expostos a concentrações inferiores a $200\mu\text{g.m}^{-3}$ e 22% a concentrações superiores. Nos dois casos, as diferenças encontradas foram significativas ($p < 0,0001$ e $p = 0,0003$, respectivamente).

Dos indivíduos expostos a concentrações inferiores a $200\mu\text{g.m}^{-3}$, 41% encontravam-se na área periurbana de São Paulo. Já dos expostos a concentrações superiores, 82% encontravam-se na área urbana.

Figura 17 - Valores individuais dos poluentes PM_{2.5} (A) e NO₂ (B) amostrados na pesquisa.

5.3. Genotoxicidade

A tabela 4 apresenta a estatística descritiva das frequências de células micronucleadas e micronúcleos na mucosa oral. A tabela 5 apresenta os dados em culturas de linfócitos do sangue periférico e o Índice de Divisão Nuclear considerando a Citotoxicidade amostrados neste trabalho, para os grupos de

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGTCGATCGCTAGCTGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGGCGCTAGAGTCGATCG

estudo urbano e periurbano. Notam-se diferenças de frequências de micronúcleos na mucosa oral ($p < 0,0001$) e em linfócitos ($p < 0,0001$) entre os grupos, sendo o grupo AU, aquele que apresenta as maiores frequências de micronúcleos (figura 18).

Tabela 4 - Estatística descritiva das frequências de células micronucleadas e micronúcleos na mucosa oral dos participantes da pesquisa.

Grupos	CMN-MO%		MN-MO%	
	AU	APU	AU	APU
Média	1,61	0,68	2,78	1,16
EP	0,07	0,04	0,10	0,07
Mediana	1,50	0,70	2,40	1,10
DP	0,42	0,16	0,62	0,30
Variância	0,17	0,03	0,38	0,09
Mínimo	1,00	0,30	2,00	0,40
Máximo	2,70	0,90	4,40	1,60
n	39	18	39	18
IC 95%	0,14	0,08	0,20	0,15
ANOVA	$p < 0,0001$		$p < 0,0001$	

CMN-MO = Células Micronucleadas-mucosa oral, MN-MO = Micronúcleos-mucosa oral,
DP = Desvio Padrão, EP = Erro Padrão, IC = Intervalo de Confiança.

Tabela 5 - Estatística descritiva das frequências de células micronucleadas, micronúcleos e do índice de divisão nuclear em cultura de linfócitos dos participantes da pesquisa.

Grupos	CMN-CL%		MN-CL%		IDNC%	
	AU	APU	AU	APU	AU	APU
Média	0,78	0,47	1,51	0,73	1,92	1,07
EP	0,04	0,04	0,08	0,06	0,07	0,09
Mediana	0,70	0,50	1,40	0,70	1,90	1,05
DP	0,29	0,16	0,50	0,25	0,48	0,37
Variância	0,09	0,03	0,25	0,06	0,23	0,14
Mínimo	0,40	0,10	0,80	0,20	1,10	0,50
Máximo	1,40	0,70	2,60	1,20	3,10	1,70
n	39	18	39	18	39	18
IC 95%	0,09	0,08	0,16	0,13	0,15	0,18
ANOVA	$p = 0,0001$		$p < 0,0001$		$p < 0,0001$	

CMN-CL = Células Micronucleadas-cultura de linfócitos, MN-CL = Micronúcleos-cultura de linfócitos,
IDNC = Índice de Divisão Nuclear considerando a Citotoxicidade,
DP = Desvio Padrão, EP = Erro Padrão, IC = Intervalo de Confiança.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

Figura 18 - Valores médios das frequências de células micronucleadas (CMN) e de micronúcleos (MN) na mucosa oral (MO) (A) e CMN, MN e Índice de Divisão Nuclear considerando a Citotoxicidade (IDNC) em cultura de linfócitos (CL) (B) identificados nos grupos urbano (AU) e periurbano (APU).

Os valores individuais das frequências de células micronucleadas e de micronúcleos na mucosa oral e em cultura de linfócitos identificados nos participantes do estudo estão ilustrados na figura 19.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 19 - Valores individuais das frequências de células micronucleadas (CMN) (A) e de micronúcleos (MN) (B) na mucosa oral (MO) e CMN (C), MN (D) e do Índice de Divisão Nuclear considerando a Citotoxicidade (IDNC) (E) em cultura de linfócitos (CL) identificados nos grupos urbano (AU) e periurbano (APU).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

A análise de correlação entre as frequências de micronúcleos encontradas nas células da mucosa oral e em cultura de linfócitos está mostrada na figura 20. Nota-se uma correlação positiva ($r=0,8106$; $p<0,0001$) entre essas frequências.

A figura 21 mostra as análises de correlação entre as frequências de micronúcleos e as concentrações de poluentes ($PM_{2,5}$ e NO_2) identificadas na casuística. Nota-se uma correlação positiva baixa ($r=0,4033$; $p=0,0021$) entre a frequência de micronúcleos da mucosa oral e o $PM_{2,5}$. Nenhuma correlação foi verificada entre os demais parâmetros.

A figura 22 mostra imagens obtidas por microscopia de luz de células da mucosa oral e linfócitos normais e micronucleados.

Figura 20 - Correlação de Spearman entre as frequências de micronúcleos encontradas nas células da mucosa oral e em cultura de linfócitos ($r = 0,8106$; $p<0,0001$).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGTCGATCGCTAGCTGCTACGGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 21 - Correlação de Spearman entre as frequências de micronúcleos de mucosa oral e o $PM_{2,5}$ (A), entre micronúcleos de mucosa oral e NO_2 (B), entre micronúcleos de cultura de linfócitos e $PM_{2,5}$ (C), entre micronúcleos de cultura de linfócitos e NO_2 (D).

Figura 22 – Fotomicrografias obtidas por microscopia de luz de linfócito binucleado (A), linfócitos binucleados micronucleados (B-E), linfócito necrótico (F), células da mucosa oral normal (G), células da mucosa oral micronucleadas (H-L). Imagens de A a F obtidas com aumento de 1000x e imagens de G a L obtidas com aumento de 400x.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

5.4. Epigenética

O estudo epigenético de nossa casuística consistiu na determinação do perfil de metilação de dinucleotídeos CpG das regiões promotoras dos genes IL-10 e TNF-alfa. Seis nucleotídeos do gene IL-10 e 11 do TNF-alfa foram analisados (figura 23).

A tabela 6 apresenta a estatística descritiva do perfil médio de metilação das regiões promotoras do gene IL-10 e TNF-alfa nos grupos experimentais. Nota-se diferença apenas no perfil de metilação do gene IL-10 entre os grupos ($p=0,0120$).

A figura 24 apresenta os dados do perfil de metilação de cada dinucleotídeo CpG analisado em cada gene e em cada grupo experimental. Nota-se que no gene IL-10, os dinucleotídeos 1, 2, 3 e 4 encontram-se hipometilados enquanto que o 5 e o 6 encontram-se hipermetilados. Já para o gene TNF-alfa, os dinucleotídeos 1 e 5 encontram-se hipermetilados e os demais dinucleotídeos encontram-se hipometilados.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTGCGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGACATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 23 – Sequências de bases nitrogenadas das regiões promotoras dos genes IL-10 (A) e TNF-alfa (B) com a indicação das posições dos dinucleotídeos CpG testados para a metilação em cada caso.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTTCGATCG

Tabela 6 - Estatística descritiva do perfil de metilação das regiões promotoras dos genes IL-10 e TNF-alfa nos grupos experimentais.

Ilhas CpG	IL-10		TNF-alfa	
Grupos	AU	APU	AU	APU
Média	0,25	0,30	0,07	0,06
EP	0,01	0,02	0,00	0,00
Mediana	0,25	0,29	0,07	0,06
DP	0,05	0,09	0,01	0,02
Variância	0,00	0,01	0,00	0,00
Mínimo	0,16	0,21	0,04	0,03
Máximo	0,37	0,51	0,10	0,09
n	39	18	39	18
IC 95%	0,02	0,05	0,00	0,01
ANOVA	p=0,0120		P=0,2136

Figura 24 – Perfil de metilação dos dinucleotídeo CpG analisados no gene IL-10 (A) e TNF-alfa (B), em cada um dos grupos experimentais.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

O perfil médio de metilação dos genes IL-10 e TNF-alfa nos grupos experimentais deste estudo estão ilustrados na figura 25. A análise dos dados nos permite observar que no grupo AU, 61% dos indivíduos apresentam IL-10 hipometilada e 77% apresentam TNF-alfa hipometilado. No grupo APU, observou-se que 56% dos indivíduos apresentaram IL-10 hipermetilada e 83%, TNF-alfa hipometilado.

Dos indivíduos com IL-10 hipometilada, 75% pertencem ao grupo AU. Entre aqueles com IL-10 hipermetilada, 60% pertencem ao grupo AU. De forma semelhante, dos indivíduos com TNF-alfa hipometilado, 66% pertencem ao grupo AU e entre aqueles com TNF-alfa hipermetilado, 75% pertencem ao grupo AU.

As figuras 26 e 27 mostram as análises de correlação entre o perfil de metilação dos genes IL-10 e TNF-alfa e as concentrações de poluentes ($PM_{2,5}$ e NO_2) identificadas na casuística. Uma correlação positiva foi encontrada entre o CpG11 do gene TNF-alfa com o $PM_{2,5}$ ($p=0,0193$). Nenhuma correlação foi verificada entre os demais parâmetros.

A figura 28 mostra as análises de regressão entre os resíduos das frequências de micronúcleos encontrados nas células da mucosa oral e em linfócitos periféricos e os perfis de metilação dos genes IL-10 e TNF-alfa. Observa-se em todos os casos que os indivíduos (100% grupo AU) que estão acima da reta de referência têm uma frequência de micronúcleos maior do que o previsto para o nível de poluição que receberam, enquanto o inverso ocorre para aqueles que estão abaixo da reta de referência (44% grupo AU e 56% grupo APU).

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

Figura 25 - Perfil médio de metilação dos genes IL-10 (A) e TNF-alfa (B) identificados nos grupos urbano (AU) e periurbano (APU) deste estudo.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 26 - Correlação de Spearman entre o perfil médio de metilação do gene IL-10 e o PM_{2,5} (A), entre o perfil médio de metilação do gene IL-10 e o NO₂ (B), entre o perfil médio de metilação do gene TNF-alfa e o PM_{2,5} (C) e entre o perfil médio de metilação do gene TNF-alfa e o NO₂ (D).

Figura 27 – Representação das regiões promotoras dos genes IL-10 (A) e TNF-alfa (C), com as indicações dos dinucleotídeos CpG estudados. Os círculos pretos indicam sítios hipermetilados e os brancos, hipometilados, em relação à metilação média considerada para cada amplicon. As tabelas (B) e (D) indicam as análises de correlação entre a metilação dos sítios CpGs dos genes IL-10 e TNF-alfa, respectivamente, com os poluentes PM_{2,5} e NO₂ amostrados no estudo.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTGCGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGAGTCGATCG

Figura 28 – Análise de Regressão entre os resíduos das frequências de micronúcleos em mucosa oral e o perfil de metilação da IL-10 (A), entre os resíduos das frequências de micronúcleos em linfócitos e o perfil de metilação da IL-10 (B), entre os resíduos das frequências de micronúcleos em mucosa oral e o perfil de metilação do TNF-alfa (C) e entre os resíduos das frequências de micronúcleos em linfócitos e o perfil de metilação do TNF-alfa (D).

Discussão

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

6. DISCUSSÃO

Atualmente as grandes metrópoles sofrem com os efeitos da poluição atmosférica devido ao intenso desenvolvimento tecnológico, que leva ao aumento na quantidade e qualidade de poluentes, principalmente quando derivados de emissões veiculares.

Muitos trabalhos na literatura referem estudos de genotoxicidade relacionados com a poluição atmosférica aferida diretamente no meio através das estações das instituições de controle ambiental. Em nosso estudo, a concentração dos poluentes foi dosada individualmente por meio de amostradores desenvolvidos para este fim, caracterizando um método original e inovador e acentuando a relevância dos nossos resultados.

A utilização do amostrador individual teve como vantagem estimar a real exposição do indivíduo à poluição ambiental, permitindo com isso obter dados específicos para analisar a relação entre exposição e efeito à saúde. Esse método permite obter além da concentração média do material particulado fino, a concentração do carbono elementar e dos principais elementos químicos presentes na atmosfera, podendo levar à identificação das fontes de emissão desses poluentes.

Do ponto de vista operacional, o equipamento agrega leveza, autonomia de energia e confiabilidade de amostragem, necessários para que o indivíduo possa carregá-lo ininterruptamente por um período de 24h, gerando uma amostragem de qualidade suficiente para a realização das análises laboratoriais.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTGGCATTATAGTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Nossa casuística foi formada por trabalhadores de três categorias profissionais com exposição ocupacional à poluição atmosférica: controladores de tráfego e taxistas, expostos na área urbana da cidade de São Paulo e profissionais do Instituto Florestal, expostos na área periurbana da cidade.

Nosso objetivo com essa casuística foi comparar indivíduos expostos a diferentes concentrações de poluentes do ponto de vista genotóxico e epigenético. Uma vez que não há na cidade de São Paulo indivíduos que não estejam expostos aos poluentes atmosféricos, não adotamos um grupo controle nesse estudo. Ao invés disso, cada participante da pesquisa foi considerado controle dele mesmo, em razão do acompanhamento da exposição realizada pelo período de um mês para cada participante.

A análise dos dados antropométricos dos participantes do estudo não mostra diferenças entre os grupos. Entretanto, os grupos diferem com relação frequência cardíaca (sem significação clínica) e ao monóxido de carbono exalado.

Em nosso estudo observamos que há diferença na exposição ao PM_{2,5} entre os grupos, sendo o grupo AU, aquele exposto às maiores concentrações do poluente. Dos participantes expostos as concentrações de material particulado acima de 25µg.m⁻³, 78% encontravam-se na área urbana. Esse dado está de acordo com grande parte dos trabalhos publicados, que identificam nos grandes centros urbanos as maiores concentrações de poluentes atmosféricos (Martins, 2010; Brucker *et al.*, 2013).

Estimativas indicam que cada habitante de São Paulo gasta em média 2,5 horas diariamente para se locomover pela cidade. A média do

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

congestionamento em São Paulo nos picos das tardes de 2015 foi de 109km (CET, 2015). A redução da velocidade de tráfego e aumento dos congestionamentos impõe maiores níveis de exposição à população que permanece mais tempo em corredores de tráfego, onde os níveis de poluição são mais elevados. Do ponto de vista econômico, um aumento no tempo gasto no trânsito envolve diversos custos adicionais com combustível e manutenção dos veículos, aumento no número de internações hospitalares e queda de produtividade.

Apesar do grupo AU ter sido o mais exposto ao material particulado, observamos que 9 indivíduos (24%) foram expostos a concentrações inferiores a $25\mu\text{g.m}^{-3}$, o que caracteriza um ar de boa qualidade, de acordo com a CETESB. Nesse pequeno grupo, os 3 indivíduos que foram expostos às menores concentrações de material particulado, foram aqueles que apresentaram as maiores frequências de micronúcleos em suas células. No grupo APU, 8 indivíduos (44%) foram expostos a concentrações superiores a $25\mu\text{g.m}^{-3}$. Desses indivíduos, os 2 que foram expostos às maiores concentrações de material particulado, foram aqueles que apresentaram as menores frequências de micronúcleos em suas células. O *background* genético e modificações no DNA, entre outros fatores, podem explicar as diferenças de respostas aparentemente paradoxais encontradas nesses indivíduos, como será discutido mais adiante.

Essas diferenças também podem estar associadas à toxicocinética e à toxicodinâmica, isto é, absorção, distribuição, metabolismo e eliminação do $\text{PM}_{2.5}$. Embora mais precisa que a amostragem realizada em estações

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCGTATTTTCGATTGGCATTATAGTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

regionais, a coleta pelos amostradores individuais é realizada com velocidade constante, igual para todos os indivíduos, não refletindo, necessariamente, a quantidade de material particulado depositada nos pulmões.

O DNA é uma molécula extremamente estável que pode ter sua sequência de pares de bases alterada após um único ciclo de replicação com incorporação errônea de um nucleotídeo não reparado ou sofrer mecanismo semelhante induzido por agentes físico-químicos. Essas alterações, definidas como mutações, se não sofrerem reparo antes do próximo ciclo celular, poderão ser fixadas e constituir mudanças herdáveis. Além das mutações pontuais, os rearranjos cromossômicos, por gerarem pareamentos desiguais, podem alterar de forma drástica a sequência original do DNA.

Não é difícil associarmos o acúmulo de mutações no DNA como quebras, rearranjos e aneuploidias com o risco aumentado de câncer uma vez, que a maior parte dos agentes, com comprovada ação carcinogênica, são indutores dessas mutações. Por outro lado, as quebras e os rearranjos cromossômicos, observados em linfócitos de sangue periférico de populações expostas, são frequentemente detectados em células cancerosas.

O teste que vem sendo utilizado no monitoramento biológico de populações humanas, expostas aos agentes mutagênicos e carcinogênicos é o teste do micronúcleo. Essa técnica oferece algumas vantagens podendo ser utilizada diretamente na espécie humana, permitindo a análise de um grande número de células, gerando indicações indiretas de mutações. Em nosso

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

estudo, o teste do micronúcleo foi utilizado para avaliar a ação genotóxica dos poluentes atmosféricos na saúde dos participantes ocupacionalmente expostos.

Atualmente, a Saúde do Trabalhador é um campo em desenvolvimento no espaço da saúde pública. Assim, seu estudo constitui, antes, uma prática, com vistas a contribuir para sua consolidação enquanto área. Estudos de biomonitoramento, com exposição ambiental e/ou ocupacional a altos níveis de misturas complexas de poluentes aéreos urbanos demonstram um risco genotóxico em humanos em função das alterações do DNA e da consequente incidência aumentada de danos cromossômicos.

Na análise de nossa casuística, diferenças de frequências de micronúcleos tanto na mucosa oral quanto em linfócitos entre os grupos foram nitidamente observadas, sendo o grupo AU, aquele que apresenta as maiores frequências de micronúcleos.

Em 100% dos integrantes do grupo AU, a frequência de células micronucleadas de mucosa oral foi superior a 1% enquanto no grupo APU essa frequência foi inferior a 0,9%. Da mesma forma, a frequência de micronúcleos em células da mucosa oral em 100% dos integrantes do grupo AU foi superior a 2% enquanto que no grupo APU ela foi inferior a 1,6%.

Resultados semelhantes foram encontrados nas frequências de células micronucleadas, dos micronúcleos e do Índice de Divisão Nuclear considerando a Citotoxicidade em linfócitos. Nesses casos, as maiores frequências (acima das médias) desses parâmetros foram encontradas apenas nos integrantes do grupo AU.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

A análise de correlação entre as frequências de micronúcleos encontradas nas células da mucosa oral e em cultura de linfócitos nos grupos estudados, revelou uma correlação positiva entre elas ($r=0,8106$; $p<0,0001$). Ceppi e col. (2010) revisaram 19 estudos que compararam por correlação linear as frequências de micronúcleos de mucosa oral e de linfócitos e concluíram que a correlação média nesses estudos foi de 74%, semelhante a encontrada em nosso estudo (81%).

Isso demonstra que o ensaio nas células da mucosa oral é tão eficiente quanto ao ensaio em linfócitos. Destacamos a importância deste resultado uma vez que a coleta das células de mucosa oral é um método não invasivo de preparação simples, higiênico, totalmente indolor o que permite pesquisa em nível epidemiológico confiável e com baixo custo.

A análises de correlação entre as frequências de micronúcleos e as concentrações de poluentes em nossa casuística revelou uma correlação positiva baixa, apesar de significativa ($r=0,4033$; $p=0,0021$), entre a frequência de micronúcleos da mucosa oral e o $PM_{2,5}$. Nenhuma correlação foi verificada entre os demais parâmetros (NO_2 e micronúcleos de linfócitos).

A ausência de correlação entre os micronúcleos e os poluentes atmosféricos também foi observada em vários outros trabalhos envolvendo controladores de tráfego (Bolognesi *et al.*, 1997b; Parry *et al.*, 1997) e indivíduos normais (Karahalil *et al.*, 1999; Kohatsu *et al.*, 2007). Essa ausência de correlação pode estar associada ao fato de que a poluição contribui parcialmente para a ocorrência de quebras cromossômicas e portanto, outros fatores precisam ser levados em consideração nessa análise, como jornada

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGGCGCTAGAGTTCGATCG

diária de trabalho (tempo de exposição), tempo em que o indivíduo permanece em locais fechados durante o dia, atividade física, alimentação, hábitos, hereditariedade, entre outros.

O estudo epigenético da nossa casuística consistiu na determinação do perfil de metilação de dinucleotídeos CpG das regiões promotoras dos genes IL-10 e TNF-alfa. Seis nucleotídeos do gene IL-10 e 11 do TNF-alfa foram analisados. Os grupos estudados diferiram apenas em relação ao perfil médio de metilação da região promotora do gene IL-10.

A metilação média do promotor do gene IL-10 no grupo AU foi de 25% enquanto no grupo APU, de 30%. Sendo a IL-10 uma citocina imunossupressora, assumimos que esse perfil de hipometilação encontrado no grupo AU, pode desempenhar um papel protetor nos processos inflamatórios desses indivíduos. Já a hipermetilação encontrada no grupo APU pode ser responsável pela promoção da inflamação nesses indivíduos, na medida em que o imunossupressor torna-se silenciado epigeneticamente.

As comparações entre os perfis de metilação dos genes IL-10 e TNF-alfa e as concentrações de poluentes ($PM_{2,5}$ e NO_2) identificadas na casuística não revelaram correlação elas. Esse achado também foi relatado em outros trabalhos onde foram estudados indivíduos adultos saudáveis (Johannesson *et al.*, 2014; Mostafavi *et al.*, 2015) e crianças asmáticas (Klümper *et al.*, 2015).

Nossas análises sobre exposição versus micronúcleos, como já discutido, revelaram uma correlação entre os dados, em média. A análise individual, dose-dependente, entretanto, revelou um grande resíduo. Ao regredirmos esses resíduos das frequências de micronúcleos e os perfis de

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

metilação dos genes IL-10 e TNF-alfa, observamos uma correlação significativa, onde os indivíduos que se desviaram positivamente da reta de identidade apresentaram maior vulnerabilidade à exposição aos poluentes a que foram expostos, na medida em que apresentaram maiores frequências (e tendência) de danos cromossômicos. Essa informação sustenta a hipótese de que alterações no perfil de metilação, pela poluição atmosférica, de genes controladores da inflamação, desempenham papel importante na carcinogênese.

É importante considerarmos que os fenômenos biológicos *in vivo* envolvem inúmeros mecanismos de sinalizações e retroações que ainda necessitam ser investigados. As células estão expostas às diversas citocinas e fatores de crescimento de maneira combinada e em eventos sequenciais (Donia *et al.*, 2015). Também se acredita que cada gene tenha seu tempo característico de indução a partir da exposição da célula aos seus estimulantes biológicos e, sob esse raciocínio, toda a exposição do organismo poderia ser vista dentro de uma análise fragmentária de um determinado momento do fenômeno ou ainda um momento da indução de resposta.

Nosso trabalho, assim como a maioria das investigações analisadas, teve como objeto de estudo, seres humanos expostos a poluição atmosférica com possível comprometimento da qualidade de vida. A intenção da pesquisa básica é trabalhar em prol da melhoria dessas condições, porém dentro dos limites clínicos. É importante ressaltar que toda investigação tem sua credibilidade testada por parâmetros que quase sempre relacionam o tamanho da amostra e os limites de execução.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGTCGATCGCTAGCTGCTACGGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

A obtenção de amostras de células e sangue destes indivíduos nem sempre garante material biológico suficiente para análises tão extensivas quanto as idealizadas mediante diferentes metodologias. Essa dicotomia certamente é uma das justificativas para o fato da maioria da literatura revisada, assim como nosso estudo, possuir casuística reduzida. Seus resultados, no entanto, subsidiam o paradigma atualmente proposto da toxicidade da poluição.

Infelizmente, ainda não estamos no tempo de discutir formas alternativas ao tratamento convencional dos processos inflamatórios e neoplásicos com propriedade, entretanto, algumas perspectivas diagnósticas e terapêuticas para esse fim estão surgindo com base nos estudos mais recentes de epigenética.

Nossos achados associados com a literatura atual levam-nos a acreditar que a modulação terapêutica efetiva dos efeitos na saúde ocasionados pela poluição esteja vinculada ao controle da ação das citocinas pró-inflamatórias, alérgicas e imunossupressoras. O estudo desse controle *in loco* pode representar possibilidades terapêuticas importantes.

Qualquer modalidade de tratamento das doenças inflamatórias crônicas representa um desafio à pesquisa, não só de sua eficácia clínica, mas principalmente no que antecede sua aplicação, em ensaios *in vitro*, estudos experimentais e finalmente nos aspectos farmacodinâmicos. Na medida em que essas vias venham a ser elucidadas, poderemos estabelecer melhor o diagnóstico de suscetibilidade à poluição e aprimorar técnicas terapêuticas. A evolução biotecnológica e o crescente acesso ao genoma humano certamente melhoram as perspectivas de aquisição desses conhecimentos.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Os avanços da biologia celular e molecular têm permitido analisar a expressão gênica em diversos eventos biológicos. Isto vem promovendo um grande impacto no estudo da patogênese de importantes doenças e alterações de desenvolvimento, auxiliando o diagnóstico, prognóstico e tratamento. A prática de sequenciamento de DNA vem permitindo a identificação de genes associados à suscetibilidade genética a determinadas doenças, bem como a detecção de mutações e polimorfismos, propiciando o desenvolvimento de terapias gênicas.

O nosso estudo nos proporcionou armazenar uma biblioteca de RNAm das amostras dos indivíduos analisados. Isso nos permitirá dar seguimento à pesquisa, através da análise das expressões de genes marcadores o que poderá contribuir para novas descobertas.

O estudo da interação do material particulado no metabolismo intracelular em nível da expressão gênica dos marcadores inflamatórios é a nossa proposta para investigações futuras. Este estudo poderá contribuir para uma melhor compreensão da resposta inflamatória às diferentes estimulações e suas repercussões nos complexos supramoleculares que constituem as células.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

7

Conclusões

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

7. CONCLUSÕES

Os nossos resultados nos permitem concluir que:

- Os amostradores individuais de medidas de exposição à poluição atmosférica (PM_{2,5} e NO₂) são instrumentos validados pelas medidas das estações regionais, que permitem realizar experimentos com humanos *in loco*;
- As frequências de células micronucleadas e micronúcleos em células da mucosa oral, bem como, células binucleadas micronucleadas, micronúcleos e índice de divisão nuclear em linfócitos, estão significativamente aumentadas no grupo de trabalhadores expostos na área urbana da cidade;
- A região promotora analisada do gene IL-10 apresenta-se hipometilada no grupo de trabalhadores da área urbana da cidade e hipermetilada no grupo de trabalhadores da área periurbana. Não foi encontrada diferença no perfil de metilação do gene TNF-alfa entre os grupos;
- Os resíduos das frequências de micronúcleos estão correlacionados com os perfis de metilação dos genes estudados.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

8
Anexos

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGTCGATCGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

8. ANEXOS

Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Prezado Senhor:

O senhor está sendo convidado a participar de uma pesquisa para avaliar o efeito da poluição do ar de São Paulo na saúde das pessoas. Leia cuidadosamente este documento e faça todas as perguntas que quiser antes de decidir se quer participar do estudo. Sua decisão de concordar em participar deste estudo é voluntária.

I - IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M () F ()
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº: APTO: BAIRRO:
CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor ou curador, etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M () F ()
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº: APTO: BAIRRO:
CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE: Avaliação dos efeitos da exposição aguda ao material particulado em controladores de tráfego da cidade de São Paulo".
2. Coordenador: Paulo Hilário Nascimento Saldiva
CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular do Departamento de Patologia da FMUSP
UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Patologia.
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
SEM RISCO () RISCO MÍNIMO (X) RISCO MÉDIO () RISCO BAIXO () RISCO MAIOR ()
(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
4. DURAÇÃO DA PESQUISA: Dois anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa: Pesquisas científicas demonstram que a poluição do ar pode provocar inflamação em muitos órgãos como olhos, nariz, boca, coração, vasos sanguíneos e pulmão. A poluição pode também alterar coagulação e hormônios do sangue, provocar alterações do DNA que é o componente genético das células. Essas inflamações produzidas pelos poluentes do ar podem facilitar o aparecimento de infarto do coração, pressão alta, alergias dos olhos, nariz, boca e pulmões e as alterações de DNA podem facilitar o aparecimento de câncer no futuro. Dessa forma, são necessárias novas pesquisas para tentar entender como e por que essas alterações ocorrem. Esta pesquisa vai avaliar os efeitos da poluição do ar na pressão arterial, regularidade e ritmo de batimentos do coração, capacidade de respiração, produção da lágrima, alterações das células que recobrem os olhos, boca e nariz e em substâncias presentes no sangue relacionadas à inflamação.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que serão aplicados:

A- Consulta Médica: será feita uma consulta por um médico para avaliar seu estado de saúde.

B- A sua pressão arterial, frequência de batidas do coração e o eletrocardiograma - serão medidos em períodos que podem chegar a 24 horas seguidas através de um aparelho portátil que será fixado na sua cintura. Para medida da pressão arterial um manguito será colocado em volta do braço, enchendo e esvaziando com ar a cada hora, para medir a pressão, como é feito durante as consultas médicas normais.

C- Teste de reatividade vascular: Entre os participantes deste estudo, o senhor poderá ser escolhido para que seja avaliada a reatividade de seus vasos sanguíneos, isto é, como eles respondem frente a estímulos específicos. O exame inclui a análise de diâmetro e fluxo de uma artéria no braço (artéria braquial) em três momentos: 1) nas condições normais; 2) pós-insuflação do manguito no braço, da mesma maneira de quando é medida a pressão arterial; e 3) após você usar um comprimido de um medicamento chamado nitrato sublingual. Estas avaliações serão feitas com aparelho de ultrassom em seu braço.

D- Teste de exercício: O senhor fará um pequeno teste de exercício que será realizado no hospital. Será solicitado ao senhor que suba e desça num pequeno banco com um degrau durante 5 minutos. Antes, durante e após o teste, a sua frequência cardíaca será registrada por uma pequena cinta que será colocada no seu peito.

E- Sangue: serão coletadas amostras de sangue, cinco vezes em dias diferentes, para análises laboratoriais para avaliar substâncias que podem se alterar pelo efeito da poluição. Em cada dia serão retirados 30 mililitros de sangue (pouco mais de 30 gramas), totalizando 150 mililitros nas cinco vezes. Esta quantidade é muito pequena, não causando nenhum problema para sua saúde, e o seu organismo repõe esta quantidade rapidamente. Uma das amostras de sangue coletada será para análise de alterações genéticas (danos no seu DNA) durante este estudo. Uma outra parte do sangue será guardada para análises futuras do DNA, mas antes que sejam realizadas, serão submetidas à aprovação do Comitê de Ética e a você novamente.

F- Boca: serão coletadas células da sua boca por um raspado superficial e delicado com uma espátula de madeira, também para análises de danos no seu DNA.

G- Nariz: será feita uma lavagem nos orifícios nasais alternadamente com 10ml de soro para coleta de células. Além disso, será colocado grãos de açúcar no início da cavidade nasal, espera-se alguns minutos até o senhor sentir o gosto doce na boca. Faremos isto para avaliar a integridade das células que cobrem a cavidade nasal.

H- Olhos: seus olhos serão examinados por um especialista com microscópio especial e será colocado um pequeno papel de filtro por 5 minutos na borda dos olhos para medir sua lágrima. Além disso, será pingado um colírio e encostado um pequeno pedacinho de papel na parte branca dos olhos (conjuntiva) por alguns segundos para colher algumas células;

I- Função pulmonar: você será solicitado a realizar sopros em um bocal de um aparelho em 4 ocasiões durante o estudo para medir sua função pulmonar e inflamação nos brônquios.

J- Exames de imagem vascular: a quantidade e tipo de placa gordura de seus vasos poderá ser avaliada através de 2 exames: ultrassom das artérias carótidas (do pescoço) e tomografia computadorizada de tórax para avaliação de suas artérias coronárias (do coração). Você terá que ficar deitado por 15 minutos para a execução de cada exame. O ultrassom será feito após a passagem de um gel na região do pescoço, e a avaliação será feita através de um transdutor de ultrassom. Para a tomografia computadorizada, você ficará deitado dentro de um tipo de túnel para serem feitas imagens de seu tórax.

K- Coleta de condensado do ar exalado: Você ficará respirando pela boca em um aparelho, cuja parte inferior fica dentro de um recipiente com gelo. O ar que você solta dos pulmões é congelado e a umidade que estava na forma de vapor se condensa e vira líquido. Neste líquido será analisado mediadores inflamatórios que podem estar alterados pela poluição

Todos esses exames serão feitos em um período do dia, com frequência de uma vez por semana, por 4 semanas, em setor ambulatorial (consultório) e não necessitarão de internação no hospital.

Essas avaliações serão realizados para detectar possíveis alterações provocadas pela poluição do ar.

3. Desconfortos e riscos esperados: a colocação de aparelhos para medição de pressão arterial, frequência cardíaca, eletrocardiograma e função pulmonar (prova do sopro) não trazem riscos à saúde. Podem trazer um desconforto momentâneo, quando o manguito do aparelho de tempo em tempo comprime o braço para medir a pressão arterial. Para o teste de reatividade vascular não é previsto nenhum dano e o exame deve demorar aproximadamente 2 horas. O teste de exercício poderá causar no senhor um cansaço físico típico de quem realiza atividade física, mas que acabará após o teste. A coleta de sangue será feita por profissionais experientes e com materiais estéreis e descartáveis, dessa forma não representa risco à saúde. Pode haver desconforto pela dor mínima provocada pela punção da veia para retirada de sangue. A coleta do raspado bucal não oferece desconforto e não traz risco à saúde. A coleta das células da parte branca dos olhos pode oferecer um pequeno desconforto com sensação de irritação ou areia nos olhos, vermelhidão e lacrimejamento passageiro. A lavagem nasal pode induzir um pouco de tosse passageira. A prova do açúcar e da atenção não trazem riscos à saúde. Para todos estes procedimentos serão utilizados apenas materiais descartáveis. Para os exames de imagem de seus vasos, o desconforto é pequeno: para o ultrassom, a passagem do gel pode produzir uma sensação de gelado no local e o transdutor pode produzir uma discreta pressão na região lateral do pescoço; para a tomografia computadorizada você deverá entrar em um túnel e ficar imóvel quando as chapas forem feitas. Este exame, feito uma única vez, expõe a uma dose de radiação que não é suficiente para causar nenhum dano à sua saúde.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGTCGATCGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

4. Benefícios que poderão ser obtidos: Em caso de detecção de alguma doença no aparelho cardiovascular, o senhor será avisado, receberá os exames em mãos e poderá ser encaminhado(a) para acompanhamento médico em serviços referenciados da rede SUS. Os dados coletados ajudarão a compreensão dos efeitos da poluição do ar sobre a saúde, o que poderá contribuir na tentativa de controle da poluição do ar da cidade de São Paulo.
5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para você: não haverá procedimento alternativo ou compensação financeira aos participantes do estudo.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Em qualquer momento o senhor poderá ter acesso às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer dúvidas.
2. O senhor poderá a qualquer momento abandonar a participação na pesquisa sem que haja por parte dos profissionais médicos abandono de seu tratamento.
3. Será mantida total privacidade quanto a todas as informações relacionadas ao senhor e a suas consultas.
4. O senhor terá total disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Pesquisadores:

Ubiratan de Paula Santos	INCOR – HCFMUSP	8384-9932
Chin An Lin	HCFMUSP	3069-7692
Maria Lúcia Bueno Garcia.....	HCFMUSP.....	8122-6480
Ana Luisa Godoy Fernandes.....	UNIFESP.....	9291-8154
Sílvia Lage.....	INCOR-HCFMUSP.....	3069-5697
Leila Antonangelo.....	HCFMUSP.....	3069-5695

Coordenador:

Paulo Hilário Saldiva Nascimento

VI - CONSENTIMENTO LIVRE-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 2007

assinatura do sujeito da pesquisa
ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Anexo 2: Parecer do Comitê de Ética (fl. 1/4)

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 03/10/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0565/07**, intitulado: **"AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA AO MATERIAL PARTICULADO EM CONTROLADORES DE TRÁFEGO DA CIDADE DE SÃO PAULO."** apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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').

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. PAULO HILÁRIO NASCIMENTO SALDIVA**

Pesquisador (a) Executante: **UBIRATAN DE PAULA SANTOS, MARIA LUCIA BUENO GARCIA, ALFESIO LUIS FERREIRA BRAGA, ANA LUIZA GODOY FERNANDES, SILVIA LAGE, LEILA ANTONANGELO, NEWTON KARA JOSÉ**

CAPPesq, 05 de Outubro de 2007

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

Anexo 2: Parecer do Comitê de Ética (fl. 2/4)

APROVAÇÃO

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 28/04/2011, **APROVOU *ad-referendum* as informações** abaixo mencionadas referente ao Protocolo de Pesquisa nº **0565/07**, intitulado: **"AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA AO MATERIAL PARTICULADO EM CONTROLADORES DE TRAFEGO DA CIDADE SÃO PAULO"**, apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

- Comunicado que o projeto faz parte do sub-projeto intitulado "Avaliação da toxicidade da poluição por material particulado gerado por diferentes fontes emissoras: proposição de estudos clínicos e experimentais"
- Solicitação de adendo para incorporação de voluntários: CET, Taxistas e Cinturão Verde da Cidade de São Paulo.
- Relatório enviado ao NCPq relativo as atividades - 2010

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. PAULO HILÁRIO NASCIMENTO SALDIVA**

CAPPesq, 28 de Abril de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcfnet.usp.br

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTGCGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

Anexo 2: Parecer do Comitê de Ética (fl. 3/4)

São Paulo, 01 de fevereiro de 2011.

Ref.: Projeto aprovado sob o Protocolo de Pesquisa nº 0888/07, "Avaliação dos efeitos da exposição aguda ao material particulado em controladores de tráfego da cidade de São Paulo".

Senhor Presidente

Conforme segue abaixo, vimos informar que:

Em 13 de outubro de 2009, envio à CAPESQ do documento (doc.1) informando que o projeto aprovado, acima citado, é um dos subprojetos do Edital MCT- CNPq / CT-SAÚDE - Nº 18/2006, aprovado pelo CNPq "Avaliação da toxicidade da poluição por material particulado gerado por diferentes fontes emissores: proposição de estudos clínicos e experimentais".

Em 23 de fevereiro de 2010 envio à CAPESQ do documento (doc.2) onde solicitamos: 1) a correção do título do estudo, 2) esclarecimento quanto aos voluntários que farão parte do estudo e 3) emenda ao termo de consentimento livre-esclarecido anteriormente aprovado.

Em 15 de março de 2010 esta comissão nos informou (doc.3) que a solicitação referente ao anexo2 estava em desacordo com a resolução do CNS 196/96, a qual versa a encaminhamento de relatórios de andamento/final do estudo.

Estamos encaminhando o relatório parcial enviado para o CNPq (doc.4) referente ao subprojeto.

Confirmamos a esta comissão que o projeto aprovado permaneça com o mesmo título, porém solicitamos que fique apensado no projeto que o mesmo faz parte do subprojeto do Edital MCT- CNPq / CT-SAÚDE - Nº 18/2006, aprovado

Av. Dr. Arnaldo, 455 - 9º andar - sala 1193 - Cerqueira César - CEP 01346-900 - São Paulo - SP
Fone / Fax: 3061.7264

Anexo 2: Parecer do Comitê de Ética (fl. 4/4)

pelo CNPq "Avaliação da toxicidade da poluição por material particulado gerado por diferentes fontes emissoras: proposição de estudos clínicos e experimentais", pois de acordo com o desenvolvimento do projeto vimos a necessidade de incorporar ao mesmo estudo outros profissionais que trabalham nas vias públicas bem como profissionais que trabalham nas áreas do cinturão verde de SP para serem controles deste estudo (doc.5).

O Projeto do Edital 18 inclui 14 subprojetos, onde os mesmos foram aprovados por comissões de ética de acordo com o projeto em questão. Nesta solicitação esta incluída o desenvolvimento do subprojeto sobre estudos epigenéticos do material de DNA já obtido e aprovado por essa Comissão. Este trabalho dará origem a tese de doutorado do aluno Daniel Siquieroli Vilas Boas que será orientado pela Dra. Mônica Valéria Marquizzini Coordenadora Experimental do Edital 18.

Estamos solicitando junto ao mesmo protocolo de pesquisa um adendo para incorporarmos os voluntários relacionados acima. Todos voluntários, CET, Taxistas e Cinturão Verde da cidade de São Paulo, que participaram deste projeto serão submetidos aos mesmos procedimentos descritos e aprovados no protocolo 0565/07.

Atenciosamente,

Dra. Mônica Marquizzini
Pesquisadora Científica

Prof. Paulo H. N. Saldiva
Coordenador Geral do Projeto

Prof. Dr. Euclides Ayres de Castilho
Presidente da CAPPesq do
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Recebido por
Data 02/02/11
Assinatura Científica do HCFMUSP

Referências

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

9. REFERÊNCIAS

Abbas, AK. Basic Immunology: Functions and disorders of the immune system. Elsevier, 2nd edition. 2007; 354p.

Abrahamowicz M, Schopflocher T, Leffondré K, du Berger R, Krewski D. Flexible modeling of exposure-response relationship between long-term average levels of particulate air pollution and mortality in the American Cancer Society study. J Toxicol Environ Health A. 2003 Aug 22-Oct 10;66(16-19):1625-54.

Aggarwal, B. B., Eessalu, T. E., Hass, P. E. Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. Nature 318: 665-667, 1985.

Anway MD, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. Endocrinology. 2006 Jun;147(6 Suppl):S43-9.

Artaxo P, Gerab F, Yamasoe MA, Martins JV. Fine mode aerosol composition at three long-term atmospheric monitoring sites in the Amazon Basin. Journal of Geophysical Research: Atmospheres. 1994 Nov;99(D11):22857–22868.

Asadullah, K., Eskdale, J., Wiese, A., Gallagher, G., Friedrich, M., Sterry, W. Interleukin-10 promoter polymorphism in psoriasis. J. Invest. Derm. 116: 975-978, 2001.

Atkinson RW, Mills IC, Walton HA, Anderson HR. Fine particle components and health--a systematic review and meta-analysis of epidemiological time series studies of daily mortality and hospital admissions. J Expo Sci Environ Epidemiol. 2015 Mar-Apr;25(2):208-14.

Austin J, Brimblecombe P, Sturges WT. Air Pollution Science for the 21st Century. Elsevier, 1st Edition. 2002, 686p.

Baccarelli A, Wright RO, Bollati V, Tarantini L, Litonjua AA, Suh HH, Zanobetti A, Sparrow D, Vokonas PS, Schwartz J. Rapid DNA methylation changes after exposure to traffic particles. Am J Respir Crit Care Med. 2009 Apr 1;179(7):572-8.

Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and environmental chemicals. Curr Opin Pediatr. 2009 Apr;21(2):243-51.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

Baird C. A química e a poluição do ar na troposfera. In: Química Ambiental. Bookman: Porto Alegre/RS, 2ª edição. Cap.3, 2002.

Beattie, E. C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J. C., Ha, B. K., Von Zastrow, M., Beattie, M. S., Malenka, R. C. Control of synaptic strength by glial TNF-alpha. Science 295: 2282-2285, 2002.

Bergamaschi L, Rizzio E, Giaveri G, Loppi S, Gallorini M. Comparison between the accumulation capacity of four lichen species transplanted to a urban site. Environ Pollut. 2007 Jul;148(2):468-76.

Bind MA, Peters A, Koutrakis P, Coull B, Vokonas P, Schwartz J. Quantile Regression Analysis of the Distributional Effects of Air Pollution on Blood Pressure, Heart Rate Variability, Blood Lipids, and Biomarkers of Inflammation in Elderly American Men: The Normative Aging Study. Environ Health Perspect. 2016 Mar 11. [Epub ahead of print].

Bollati V, Baccarelli A. Environmental epigenetics. Heredity (Edinb). 2010 Jul;105(1):105-12.

Bolognesi C, Gallerani E, Bonatti S, De Ferrari M, Fontana V, Valerio F, Merlo F, Abbondandolo A. Sister chromatid exchange induction in peripheral blood lymphocytes of traffic police workers. Mutat Res. 1997a Nov 27;394(1-3):37-44.

Bolognesi C, Merlo F, Rabboni R, Valerio F, Abbondandolo A. Cytogenetic biomonitoring in traffic police workers: micronucleus test in peripheral blood lymphocytes. Environ Mol Mutagen. 1997b;30(4):396-402.

Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Cebulski-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Joksic G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi MR, Zijno A, Norppa H, Fenech M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. Carcinogenesis. 2007 Mar;28(3):625-31.

Bonassi S1, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, Burgaz S, Holland N, Kirsh-Volders M, Knasmueller S, Zeiger E, Carnesoltas D, Cavallo D, da Silva J, de Andrade VM, Demircigil GC, Domínguez Odio A, Donmez-Altuntas H, Gattas G, Giri A, Giri S, Gómez-Meda B, Gómez-Arroyo S, Hadjidekova V, Haveric A, Kamboj M, Kurtishi K, Martino-Roth MG, Montero Montoya R, Nersesyan A, Pastor-Benito S, Favero Salvadori DM, Shaposhnikova A, Stopper H, Thomas P, Torres-Bugarín O, Yadav AS, Zúñiga González G, Fenech M. The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. Mutat Res. 2011 Nov-Dec;728(3):88-97.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGTCGATCGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P.-O., Bergamini, G., Croughton, K., Cruciat, C., Eberhard, D., Gagneur, J., Ghidelli, S., Hopf, C., Huhse, B., and 16 others. A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa-B signal transduction pathway. *Nature Cell Biol.* 6: 97-105, 2004.

Brenner, D. A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M., Karin, M. Prolonged activation of JUN and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* 337: 661-663, 1989.

Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, Mittleman M, Samet J, Smith SC Jr, Tager I; Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. 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 Jun 1;109(21):2655-71.

Brook RD. Cardiovascular effects of air pollution. *Clin Sci (Lond).* 2008 Sep;115(6):175-87.

Brook RD. Why physicians who treat hypertension should know more about air pollution. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2007 Aug;9(8):629-35.

Brucker N, Moro AM, Charão MF, Durgante J, Freitas F, Baierle M, Nascimento S, Gauer B, Bulcão RP, Bubols GB, Ferrari PD, Thiesen FV, Gioda A, Duarte MM, de Castro I, Saldiva PH, Garcia SC. Biomarkers of occupational exposure to air pollution, inflammation and oxidative damage in taxi drivers. *Sci Total Environ.* 2013 Oct 1;463-464:884-93.

Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet.* 2002 Oct 19;360(9341):1233-42.

Burrill W, Levine EL, Hindocha P, Roberts SA, Scott D. The use of cryopreserved lymphocytes in assessing inter-individual radiosensitivity with the micronucleus assay. *Int J Radiat Biol.* 2000 Mar;76(3):375-82.

Byun HM, Colicino E, Trevisi L, Fan T, Christiani DC, Baccarelli AA. Effects of Air Pollution and Blood Mitochondrial DNA Methylation on Markers of Heart Rate Variability. *J Am Heart Assoc.* 2016 Apr 22;5(4). pii: e003218.

Cançado JE, Braga A, Pereira LA, Arbex MA, Saldiva PH, Santos Ude P. Clinical repercussions of exposure to atmospheric pollution. *J Bras Pneumol.* 2006;32 Suppl 2:S5-11.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*. 2005 Mar 17;434(7031):400-4.

Carter SB. Effects of Cytochalasins on Mammalian Cells. *Nature*. 1967 Jan; 213:261-264.

Carvalho VSB, Freitas ED, Martins LD, Martins JA, Mazzoli CR, de Andrade MF. Air quality status and trends over the Metropolitan Area of São Paulo, Brazil as a result of emission control policies. *Environmental Science & Policy*. 2015;47:68-79.

Castanho ADA. A determinação quantitativa de fontes de material particulado na atmosfera da cidade de São Paulo. [dissertação]. Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

Castro HA, Gouveia N, Escamilla-Cejudo JA. Questões metodológicas para a investigação dos efeitos da poluição do ar na saúde. *Rev Bras Epidemiol*. 2003;6(2):135-149.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento ambiental – Relatório Anual de Qualidade do Ar no Estado de São Paulo, Dezembro de 2004.

Chahine T, Baccarelli A, Litonjua A, Wright RO, Suh H, Gold DR, Sparrow D, Vokonas P, Schwartz J. Particulate air pollution, oxidative stress genes, and heart rate variability in an elderly cohort. *Environ Health Perspect*. 2007 Nov;115(11):1617-22.

Chang PL, Hsieh MM, Chiu TC. Recent Advances in the Determination of Pesticides in Environmental Samples by Capillary Electrophoresis. *Int J Environ Res Public Health*. 2016 Apr 8;13(4). pii: E409.

Charles M. UNSCEAR report 2000: sources and effects of ionizing radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. *J Radiol Prot*. 2001 Mar;21(1):83-6.

Chen R, Hu B, Liu Y, Xu J, Yang G, Xu D, Chen C. Beyond PM_{2.5}: The role of ultrafine particles on adverse health effects of air pollution. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Mar 16. pii: S0304-4165(16)30074-5. [Epub ahead of print].

Cheung P, Lau P. Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Mol Endocrinol*. 2005 Mar;19(3):563-73.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTGCATCG

Chu M, Sun C, Chen W, Jin G, Gong J, Zhu M, Yuan J, Dai J, Wang M, Pan Y, Song Y, Ding X, Guo X, Du M, Xia Y, Kan H, Zhang Z, Hu Z, Wu T, Shen H. Personal exposure to PM_{2.5}, genetic variants and DNA damage: a multi-center population-based study in Chinese. *Toxicol Lett*. 2015 Jun 15;235(3):172-8.

Cliff R, Curran J, Hirota JA, Brauer M, Feldman H, Carlsten C. Effect of diesel exhaust inhalation on blood markers of inflammation and neurotoxicity: a controlled, blinded crossover study. *Inhal Toxicol*. 2016 Feb;28(3):145-53.

Cordeiro DS. Estudo de aspectos do comportamento fotoquímico e eletroquímico de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos [dissertação]. São Paulo, Universidade de São Paulo – Instituto de Química; 2006.

Cropley JE¹, Suter CM, Beckman KB, Martin DI. Germ-line epigenetic modification of the murine A_{vy} allele by nutritional supplementation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Nov 14;103(46):17308-12.

Dai L, Bind MA, Koutrakis P, Coull BA, Sparrow D, Vokonas PS, Schwartz JD. Fine particles, genetic pathways, and markers of inflammation and endothelial dysfunction: Analysis on particulate species and sources. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2016 Jan 6. [Epub ahead of print].

de Carvalho FO, Felipe FA, de Melo Costa AC, Teixeira LG, Silva ÉR, Nunes PS, Shanmugam S, de Lucca Junior W, Quintans JS, de Souza Araújo AA. Inflammatory Mediators and Oxidative Stress in Animals Subjected to Smoke Inhalation: A Systematic Review. *Lung*. 2016 Apr 25. [Epub ahead of print].

De Craemer S, Croes K, van Larebeke N, Sioen I, Schoeters G, Loots I, Nawrot T, Nelen V, Campo L, Fustinoni S, Baeyens W. Investigating unmetabolized polycyclic aromatic hydrocarbons in adolescents' urine as biomarkers of environmental exposure. *Chemosphere*. 2016 Apr 19;155:48-56.

Demircigil GÇ, Erdem O, Gaga EO, Altuğ H, Demirel G, Özden Ö, Arı A, Örnektekin S, Döğeroğlu T, van Doorn W, Burgaz S. Cytogenetic biomonitoring of primary school children exposed to air pollutants: micronuclei analysis of buccal epithelial cells. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2014 Jan;21(2):1197-207.

Demokritou P, Gupta T, Ferguson S, Koutrakis P. Development of a high-volume concentrated ambient particles system (CAPS) for human and animal inhalation toxicological studies. *Inhal Toxicol*. 2003 Feb;15(2):111-29.

Dempfle A, Scherag A, Hein R, Beckmann L, Chang-Claude J, Schäfer H. Gene-environment interactions for complex traits: definitions, methodological requirements and challenges. *Eur J Hum Genet*. 2008 Oct;16(10):1164-72.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Ding R, Jin Y, Liu X, Zhu Z, Zhang Y, Wang T, Xu Y. Characteristics of DNA methylation changes induced by traffic-related air pollution. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2016 Jan 15;796:46-53.

Dominici F, McDermott A, Zeger SL, Samet JM. Airborne particulate matter and mortality: timescale effects in four US cities. *Am J Epidemiol*. 2003 Jun 15;157(12):1055-65.

Dominici F, McDermott A, Zeger SL, Samet JM. National maps of the effects of particulate matter on mortality: exploring geographical variation. *Environ Health Perspect*. 2003 Jan;111(1):39-44.

Donia M, Kjeldsen JW, Svane IM. The controversial role of TNF in melanoma. *Oncoimmunology*. 2015 Oct29;5(4):e1107699.

Dubrova YE, Plumb M, Gutierrez B, Boulton E, Jeffreys AJ. Transgenerational mutation by radiation. *Nature*. 2000 May 4;405(6782):37.

Eskdale, J., Gallagher, G., Verweij, C. L., Keijsers, V., Westendorp, R. G. J., Huizinga, T. W. J. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 95: 9465-9470, 1998.

Eskdale, J., Kube, D., Tesch, H., Gallagher, G. Mapping of the human IL-10 gene and further characterization of the 5-prime flanking sequence. *Immunogenetics* 46: 120-128, 1997.

Esposito, K., Pontillo, A., Giugliano, F., Giugliano, G., Marfella, R., Nicoletti, G., Giugliano, D. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *J. Clin. Endocr. Metab*. 88: 1055-1058, 2003.

Falvo JV, Jasenosky LD, Kruidenier L, Goldfeld AE. Epigenetic control of cytokine gene expression: regulation of the TNF/LT locus and T helper cell differentiation. *Adv Immunol*. 2013;118:37-128.

Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2007;2(5):1084-104.

Fenech M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res*. 1997 Aug 1;392(1-2):11-8.

Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res*. 1985b Feb-Apr;147(1-2):29-36.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Fenech M, Morley AA. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*. 1985a;43(172-173):233-46.

Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*. 2000 Nov 20;455(1-2):81-95.

Ferreira MI, Domingos M, Gomes Hde A, Saldiva PH, de Assunção JV. Evaluation of mutagenic potential of contaminated atmosphere at Ibirapuera Park, São Paulo - SP, Brazil, using the Tradescantia stamen-hair assay. *Environ Pollut*. 2007 Jan;145(1):219-24.

Fierens T, Van Holderbeke M, Standaert A, Cornelis C, Brochot C, Ciffroy P, Johansson E, Bierkens J. Multimedia & PBPK modelling with MERLIN-Expo versus biomonitoring for assessing Pb exposure of pre-school children in a residential setting. *Sci Total Environ*. 2016 Apr 18. [Epub ahead of print].

Forte, WN. *Imunologia básica e aplicada*. Artmed: São Paulo, SP. 2004, 359p.

Fowler, E. V., Eri, R., Hume, G., Johnstone, S., Pandeya, N., Lincoln, D., Templeton, D., Radford-Smith, G. L. TNF-alpha and IL-10 SNPs act together to predict disease behaviour in Crohn's disease. (Letter) *J. Med. Genet*. 42: 523-528, 2005.

Franchimont, D., Martens, H., Hagelstein, M.-T., Louis, E., Dewe, W., Chrousos, G. P., Belaiche, J., Geenen, V. Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. *J. Clin. Endocr. Metab*. 84: 2834-2839, 1999.

Franklin TB, Mansuy IM. Epigenetic inheritance in mammals: evidence for the impact of adverse environmental effects. *Neurobiol Dis*. 2010 Jul;39(1):61-5.

Gari, L. Arabic Treatises on Environmental Pollution up to the End of the Thirteenth Century. *Environment and History*. 2002 Nov;8(4):475-488(14).

Gibson, A. W., Edberg, J. C., Wu, J., Westendorp, R. G. J., Huizinga, T. W. J., Kimberly, R. P. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J. Immun*. 166: 3915-3922, 2001.

Glantz SA. Air pollution as a cause of heart disease. Time for action. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Mar 20;39(6):943-5.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Gómez-Uriz AM, Goyenechea E, Campión J, de Arce A, Martínez MT, Puchau B, Milagro FI, Abete I, Martínez JA, Lopez de Munain A. Epigenetic patterns of two gene promoters (TNF- α and PON) in stroke considering obesity condition and dietary intake. *J Physiol Biochem*. 2014 Jun;70(2):603-14.

Grove, J., Daly, A. K., Bassendine, M. F., Gilvarry, E., Day, C. P. Interleukin 10 promoter region polymorphisms and susceptibility to advanced alcoholic liver disease. *Gut* 46: 540-545, 2000.

Guimarães ET1, Macchione M, Lobo DJ, Domingos M, Saldiva PH. Evaluation of the mutagenic potential of urban air pollution in São Paulo, Southeastern Brazil, using the *Tradescantia* stamen-hair assay. *Environ Toxicol*. 2004 Dec;19(6):578-84.

Gupta T, Demokritou P, Koutrakis P. Development and performance evaluation of a high-volume ultrafine particle concentrator for inhalation toxicological studies. *Inhal Toxicol*. 2004 Dec 1;16(13):851-62.

Hedrich CM, Ramakrishnan A, Dabito D, Wang F, Ranatunga D, Bream JH. Dynamic DNA methylation patterns across the mouse and human IL10 genes during CD4⁺ T cell activation; influence of IL-27. *Mol Immunol*. 2010 Nov-Dec;48(1-3):73-81.

Hendrich B, Bickmore W. Human diseases with underlying defects in chromatin structure and modification. *Hum Mol Genet*. 2001 Oct 1;10(20):2233-42.

Hermsdorff HH, Mansego ML, Campión J, Milagro FI, Zulet MA, Martínez JA. TNF- α promoter methylation in peripheral white blood cells: relationship with circulating TNF α , truncal fat and n-6 PUFA intake in young women. *Cytokine*. 2013 Oct;64(1):265-71.

Horsthemke B, Ludwig M. Assisted reproduction: the epigenetic perspective. *Hum Reprod Update*. 2005 Sep-Oct;11(5):473-82.

Il'inskikh NN, Il'inskikh EN, Il'inskikh IN. A decrease in the level of erythrocytes with micronuclei under the influence of pyrimidine and thiazolidine derivatives in the blood of persons who came under radiation exposure as a result of the accident at the Siberian Chemical Combine. *Tsitol Genet*. 1998 Apr-May;32(3):26-9.

ISCN (2009): <http://atlasgeneticsoncology.org/ISCN09/ISCN09.html>, International System for Chromosome Nomenclature. Acesso em 01/05/2016.

Ishibe N, Kelsey KT. Genetic susceptibility to environmental and occupational cancers. *Cancer Causes Control*. 1997 May;8(3):504-13.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Izzotti A, Parodi S, Quaglia A, Farè C, Vercelli M. The relationship between urban airborne pollution and short-term mortality: quantitative and qualitative aspects. *Eur J Epidemiol.* 2000;16(11):1027-34.

Jablonka E, Lamb MJ. Soft inheritance: challenging the modern synthesis. *Genetics and Molecular Biology.* 2008;31(2):389-395.

Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003 Mar;33 Suppl:245-54.

Jiang R1, Jones MJ2, Sava F3, Kobor MS4,5, Carlsten C6. Short-term diesel exhaust inhalation in a controlled human crossover study is associated with changes in DNAmethylation of circulating mononuclear cells in asthmatics. *Part Fibre Toxicol.* 2014 Dec 9;11:71.

Jiang XQ, Mei XD, Feng D. Air pollution and chronic airway diseases: what should people know and do? *J Thorac Dis.* 2016 Jan;8(1):E31-40.

Johannesson S, Andersson EM, Stockfelt L, Barregard L, Sallsten G. Urban air pollution and effects on biomarkers of systemic inflammation and coagulation: a panel study in healthy adults. *Inhal Toxicol.* 2014 Feb;26(2):84-94.

Johnson DH, Taylor WR, Aboelsoud MM, Foote PH, Yab TC, Cao X, Smyrk TC, Loftus EV Jr, Mahoney DW, Ahlquist DA, Kisiel JB. DNA Methylation and Mutation of Small Colonic Neoplasms in Ulcerative Colitis and Crohn's Colitis: Implications for Surveillance. *Inflamm Bowel Dis.* 2016 Apr 21. [Epub ahead of print].

Kampa M, Castanas E. Human health effects of air pollution. *Environ Pollut.* 2008 Jan;151(2):362-7.

Kan H, Chen B, Zhao N, London SJ, Song G, Chen G, Zhang Y, Jiang L; HEI Health Review Committee. Part 1. A time-series study of ambient air pollution and daily mortality in Shanghai, China. *Res Rep Health Eff Inst.* 2010 Nov;(154):17-78.

Karahalil B, Karakaya AE, Burgaz S. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res.* 1999;442:29-35.

Kemp DD. *Global Environmental Issues: A Climatological Approach.* Routledge, 2th edition. 1994; 224p.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTCGATTGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Kim, J. M., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Khan, T. A., Moore, K. W. Structure of the mouse Il-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J. Immun.* 148: 3618-3623, 1992.

Klümper C, Krämer U, Lehmann I, von Berg A, Berdel D, Herberth G, Beckmann C, Link E, Heinrich J, Hoffmann B, Schins RP; GINIplus and LISApplus study groups. Air pollution and cytokine responsiveness in asthmatic and non-asthmatic children. *Environ Res.* 2015 Apr;138:381-90.

Kohatsu AGS, Shimabukuro F, Gattás GJF. Use of mutagenicity tests to assess occupational exposure. *Saúde, Ética & Justiça.* 2007;12(1/2):15-21.

Kraft P, Hunter D. Integrating epidemiology and genetic association: the challenge of gene-environment interaction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005 Aug 29;360(1460):1609-16.

Krewski D, Jerrett M, Burnett RT, Ma R, Hughes E, Shi Y, Turner MC, Pope CA 3rd, Thurston G, Calle EE, Thun MJ, Beckerman B, DeLuca P, Finkelstein N, Ito K, Moore DK, Newbold KB, Ramsay T, Ross Z, Shin H, Tempalski B. Extended follow-up and spatial analysis of the American Cancer Society study linking particulate air pollution and mortality. *Res Rep Health Eff Inst.* 2009 May;(140):5-114; discussion 115-36.

Lahiri T, Roy S, Basu C, Ganguly S, Ray MR, Lahiri P. Air pollution in Calcutta elicits adverse pulmonary reaction in children. *Indian J Med Res.* 2000 Jul;112:21-6.

Larsson L, Thorbert-Mros S, Rymo L, Berglundh T. Influence of epigenetic modifications of the interleukin-10 promoter on IL10 gene expression. *Eur J Oral Sci.* 2012 Feb;120(1):14-20.

Le TG, Ngo L, Mehta S, Do VD, Thach TQ, Vu XD, Nguyen DT, Cohen A. Effects of short-term exposure to air pollution on hospital admissions of young children for acute lower respiratory infections in Ho Chi Minh City, Vietnam. HEI Collaborative Working Group on Air Pollution, Poverty, and Health in Ho Chi Minh City. *Res Rep Health Eff Inst.* 2012 Jun;(169):5-72; discussion 73-83.

Levy JI, Clougherty JE, Baxter LK, Houseman EA, Paciorek CJ; HEI Health Review Committee. Evaluating heterogeneity in indoor and outdoor air pollution using land-use regression and constrained factor analysis. *Res Rep Health Eff Inst.* 2010 Dec;(152):5-80; discussion 81-91.

Liang S, Xu F, Tang W, Zhang Z, Zhang W, Liu L, Wang J, Lin K. Brominated flame retardants in the hair and serum samples from an e-waste recycling area

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

in southeastern China: the possibility of using hair for biomonitoring. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016 Apr 13. [Epub ahead of print].

Lichtenfels AJ, Gomes JB, Pieri PC, El Khouri Miraglia SG, Hallak J, Saldiva PH. Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in São Paulo, Brazil. *Fertil Steril.* 2007 Jan;87(1):230-2.

Lio, D., Candore, G., Crivello, A., Scola, L., Colonna-Romano, G., Cavallone, L., Hoffmann, E., Caruso, M., Licastro, F., Caldarera, C. M., Branzi, A., Franceschi, C., Caruso, C. Opposite effects of interleukin 10 common gene polymorphisms in cardiovascular diseases and in successful ageing: genetic background of male centenarians is protective against coronary heart disease. *J. Med. Genet.* 41: 790-794, 2004.

Lodge Jr JP. Analysis for Atmospheric Nitrogen Dioxide (24-H Average). Method of Air Sampling And Analysis, Third Edition, Lewis Publishers, 1988; 399:402.

London SJ, Romieu I. Gene by environment interaction in asthma. *Annu Rev Public Health.* 2009;30:55-80.

Luo Y, Feng J, Xu Q, Wang W, Wang X. NSun2 Deficiency Protects Endothelium From Inflammation via mRNA Methylation of ICAM-1. *Circ Res.* 2016 Mar 18;118(6):944-56.

Malhotra, D., Darvishi, K., Sood, S., Sharma, S., Grover, C., Relhan, V., Reddy, B. S. N., Bamezai, R. N. K. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Hum. Genet.* 118: 295-300, 2005.

Martins LD, Andrade MF, Freitas ED, Pretto A, Gatti LV, Albuquerque EL, Tomaz E, Guardani ML, Martins MH, Junior OM. Emission factors for gas-powered vehicles traveling through road tunnels in São Paulo, Brazil. *Environ Sci Technol.* 2006 Nov 1;40(21):6722-9.

Martins MAG. Variação da composição e toxicidade do material particulado ao longo do dia na cidade de São Paulo. [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Brasil; 2010.

Massadeh AM, Alomary AA, Mir S, Momani FA, Haddad HI, Hadad YA. Analysis of Zn, Cd, As, Cu, Pb, and Fe in snails as bioindicators and soil samples near traffic road by ICP-OES. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016 Mar 30. [Epub ahead of print].

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCGTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Maynard RL. Air pollution: The last 35 years. *Hum Exp Toxicol*. 2015 Dec;34(12):1253-7.

Milojevic A, Wilkinson P, Armstrong B, Bhaskaran K, Smeeth L, Hajat S. Short-term effects of air pollution on a range of cardiovascular events in England and Wales: case-crossover analysis of the MINAP database, hospital admissions and mortality. *Heart*. 2014 Jul;100(14):1093-8.

Miraglia SG, Saldiva PH, Böhm GM. An evaluation of air pollution health impacts and costs in São Paulo, Brazil. *Environ Manage*. 2005 May;35(5):667-76.

Mohallem SV, de Araújo Lobo DJ, Pesquero CR, Assunção JV, de Andre PA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of Sao Paulo. *Environ Res*. 2005 Jun;98(2):196-202.

Monks PS, Granierb C, Fuzzie S, Stohlf A, Williams ML, Akimoto H, Amanni M, Baklanovj A, Baltenspergerk U, Beyl I, Blakem N, Blakea RS, Carslaw K, Cooper OR, Dentenero F, et al. Atmospheric composition change – global and regional air quality *Atmospheric Environment*. 2009 Oct;43(33):5268–5350.

Moraes, M. O., Pacheco, A. G., Schonkeren, J. J. M., Vanderborght, P. R., Nery, J. A. C., Santos, A. R., Moraes, M. E., Moraes, J. R., Ottenhoff, T. H. M., Sampaio, E. P., Huizinga, T. W. J., Sarno, E. N. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun*. 5: 592-595, 2004.

Mostafavi N, Vlaanderen J, Chadeau-Hyam M, Beelen R, Modig L, Palli D, Bergdahl IA, Vineis P, Hoek G, Kyrtopoulos SA, Vermeulen R. Inflammatory markers in relation to long-term air pollution. *Environ Int*. 2015 Aug;81:1-7.

Murray, R. Z., Kay, J. G., Sangermani, D. G., Stow, J. L. A role for the phagosome in cytokine secretion. *Science* 310: 1492-1495, 2005.

Natividad, A., Holland, M. J., Rockett, K. A., Forton, J., Faal, N., Joof, H. M., Mabey, D. C. W., Bailey, R. L., Kwiatkowski, D. P. Susceptibility to sequelae of human ocular chlamydial infection associated with allelic variation in IL-10 cis-regulation. *Hum. Molec. Genet*. 17: 323-329, 2008.

Nedwin, G. E., Naylor, S. L., Sakaguchi, A. Y., Smith, D., Jarrett-Nedwin, J., Pennica, D., Goeddel, D. V., Gray, P. W. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res*. 13: 6361-6373, 1985.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTCGATTGCGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTAGCTGCTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005 Jul;113(7):823-39.

O'Callaghan-Gordo C, Fthenou E, Pedersen M, Espinosa A, Chatzi L, Beelen R, Chalkiadaki G, Decordier I, Hoek G, Merlo DF, Nieuwenhuijsen M, Roumeliotaki T, Vafeiadi M, Vande Loock K, Kleinjans J, Stephanou E, Kirsch-Volders M, Kogevinas M. Outdoor air pollution exposures and micronuclei frequencies in lymphocytes from pregnant women and newborns in Crete, Greece (Rhea cohort). *Environ Res.* 2015 Nov;143(Pt A):170-6.

OMS. <http://www.un.org/apps/news/story.asp?NewsID=52343#.VxqM2fkrLVT>. Acesso em 22/04/2016.

Opdal, S. H., Opstad, A., Vege, A., Rognum, T. O. IL-10 gene polymorphisms are associated with infectious cause of sudden infant death. *Hum. Immun.* 64: 1183-1189, 2003.

Ouma, C., Davenport, G. C., Were, T., Otieno, M. F., Hittner, J. B., Vulule, J. M., Martinson, J., Ong'echa, J. M., Ferrell, R. E., Perkins, D. J. Haplotypes of IL-10 promoter variants are associated with susceptibility to severe malarial anemia and functional changes in IL-10 production. *Hum. Genet.* 124: 515-524, 2008.

Paciorek CJ, Liu Y; HEI Health Review Committee. Assessment and statistical modeling of the relationship between remotely sensed aerosol optical depth and PM2.5 in the eastern United States. *Res Rep Health Eff Inst.* 2012 May;(167):5-83; discussion 85-91.

Papavasiliou FN, Chung YC, Gagnidze K, Hajdarovic KH, Cole DC, Bulloch K. Epigenetic Modulators of Monocytic Function: Implication for Steady State and Disease in the CNS. *Front Immunol.* 2016 Jan 15;6:661.

Parry EM, Ballantine JA, Ellard S, Evans WE, Jones C, Kilic N, et al. Biomonitoring Study of workers potentially exposed to traffic fumes. *Environ Mol Mutagen.* 1997;30:119-30.

Park SK, O'Neill MS, Wright RO, Hu H, Vokonas PS, Sparrow D, Suh H, Schwartz J. HFE genotype, particulate air pollution, and heart rate variability: a gene-environment interaction. *Circulation.* 2006 Dec 19;114(25):2798-805.

Pawlowski J, Lejzerowicz F, Apotheloz-Perret-Gentil L, Visco J, Esling P. Protist metabarcoding and environmental biomonitoring: Time for change. *Eur J Protistol.* 2016 Feb 22. [Epub ahead of print].

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Pembrey ME, Bygren LO, Kaati G, Edvinsson S, Northstone K, Sjöström M, Golding J; ALSPAC Study Team. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur J Hum Genet*. 2006 Feb;14(2):159-66.

Pénard-Morand C, Annesi-Maesano I. Air pollution: from sources of emissions to health effects. *Breathe*. 2004; 1(2):10.

Pennica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H., Derynck, R., Palladino, M. A., Kohr, W. J., Aggarwal, B. B., Goeddel, D. V. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312: 724-729, 1984.

Peters A, Dockery DW, Muller JE, Mittleman MA. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation*. 2001 Jun 12;103(23):2810-5.

Peters A, Liu E, Verrier RL, Schwartz J, Gold DR, Mittleman M, Baliff J, Oh JA, Allen G, Monahan K, Dockery DW. Air pollution and incidence of cardiac arrhythmia. *Epidemiology*. 2000 Jan;11(1):11-7.

Pope CA 3rd. Air pollution and health - good news and bad. *N Engl J Med*. 2004 Sep 9;351(11):1132-4

Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*. 2002 Mar 6;287(9):1132-41.

Pope CA 3rd, Thun MJ, Namboodiri MM, Dockery DW, Evans JS, Speizer FE, Heath CW Jr. Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Mar;151(3 Pt 1):669-74.

Pope CA 3rd. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk? *Environ Health Perspect*. 2000 Aug;108 Suppl 4:713-23.

Qiagen, 2009. www.qiagen.com/nl/shop/genes-and-pathways/pathway-details/?pwid=130. Acesso em 01/05/2016.

Reik W, Santos F, Dean W. Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. *Theriogenology*. 2003 Jan 1;59(1):21-32.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Roper C, Chubb LG, Cambal L, Tunno B, Clougherty JE, Mischler SE. Characterization of ambient and extracted PM_{2.5} collected on filters for toxicology applications. *Inhal Toxicol*. 2015;27(13):673-81.

Rossnerova A, Spatova M, Pastorkova A, Tabashidze N, Veleminsky M Jr, Balascak I, Solansky I, Sram RJ. Micronuclei levels in mothers and their newborns from regions with different types of air pollution. *Mutat Res*. 2011 Oct 1;715(1-2):72-8.

Rückerl R, Hampel R, Breitner S, Cyrys J, Kraus U, Carter J, Dailey L, Devlin RB, Diaz-Sanchez D, Koenig W, Phipps R, Silbajoris R, Soentgen J, Soukup J, Peters A, Schneider A. Associations between ambient air pollution and blood markers of inflammation and coagulation/fibrinolysis in susceptible populations. *Environ Int*. 2014 Sep;70:32-49.

Saldiva PH, King M, Delmonte VL, Macchione M, Parada MA, Daliberto ML, Sakae RS, Criado PM, Silveira PL, Zin WA, et al. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. *Environ Res*. 1992 Feb;57(1):19-33.

Saldiva PH, Lichtenfels AJ, Paiva PS, Barone IA, Martins MA, Massad E, Pereira JC, 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 May;65(2):218-25.

Saldiva PH, Pope CA 3rd, Schwartz J, Dockery DW, Lichtenfels AJ, Salge JM, Barone I, Bohm GM. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. *Arch Environ Health*. 1995 Mar-Apr;50(2):159-63.

Samet JM, Dominici F, McDermott A, Zeger SL. New problems for an old design: time series analyses of air pollution and health. *Epidemiology*. 2003 Jan;14(1):11-2.

Schwartz J. Air pollution and hospital admissions for respiratory disease. *Epidemiology*. 1996 Jan;7(1):20-8.

Seinfeld JH, Pandis SN. Atmospheric chemistry and physics: from air pollution to climate changes. 2th edition, Wiley: New York, USA. 2006, 1232p.

Shen J, Liu Y, Ren X, Gao K, Li Y, Li S, Yao J, Yang X. Changes in DNA Methylation and Chromatin Structure of Pro-inflammatory Cytokines Stimulated by LPS in Broiler Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Poult Sci*. 2016 Mar 18. pii: pew086. [Epub ahead of print]

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTTCGATTGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Shibamoto Y, Streffer C, Fuhrmann C, Budach V. Tumor radiosensitivity prediction by the cytokinesis-block micronucleus assay. *Radiat Res.* 1991 Dec;128(3):293-300.

Shin, H. D., Park, B. L., Kim, L. H., Jung, J. H., Kim, J. Y., Yoon, J. H., Kim, Y. J., Lee, H.-S. Interleukin 10 haplotype associated with increased risk of hepatocellular carcinoma. *Hum. Molec. Genet.* 12: 901-906, 2003.

Shirai, T., Yamaguchi, H., Ito, H., Todd, C. W., Wallace, R. B. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumour necrosis factor. *Nature* 313: 803-806, 1985.

Siemiatycki J, Richardson L, Straif K, Latreille B, Lakhani R, Campbell S, Rousseau MC, Boffetta P. Listing occupational carcinogens. *Environ Health Perspect.* 2004 Nov;112(15):1447-59.

Sioutas C, Koutrakis P, Burton RM. A technique to expose animals to concentrated fine ambient aerosols. *Environ Health Perspect.* 1995 Feb;103(2):172-7.

Skinner MK, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol Metab.* 2010 Apr;21(4):214-22.

Skinner MK. Endocrine disruptors and epigenetic transgenerational disease etiology. *Pediatr Res.* 2007 May;61(5 Pt 2):48R-50R.

Skoog, T., van't Hooft, F. M., Kallin, B., Jovinge, S., Boquist, S., Nilsson, J., Eriksson, P., Hamsten, A. A common functional polymorphism (C-A substitution at position -863) in the promoter region of the tumour necrosis factor- α (TNF- α) gene associated with reduced circulating levels of TNF- α . *Hum. Molec. Genet.* 8: 1443-1449, 1999.

Soares SR, Bueno-Guimarães HM, Ferreira CM, Rivero DH, De Castro I, Garcia ML, Saldiva PH. Urban air pollution induces micronuclei in peripheral erythrocytes of mice in vivo. *Environ Res.* 2003 Jul;92(3):191-6.

Somers CM, Cooper DN. Air pollution and mutations in the germline: are humans at risk? *Hum Genet.* 2009 Mar;125(2):119-30.

Somers CM, McCarry BE, Malek F, Quinn JS. Reduction of particulate air pollution lowers the risk of heritable mutations in mice. *Science.* 2004 May 14;304(5673):1008-10.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Somers CM, Yauk CL, White PA, Parfett CL, Quinn JS. Air pollution induces heritable DNA mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 10;99(25):15904-7.

Somers CM. Expanded simple tandem repeat (ESTR) mutation induction in the male germline: lessons learned from lab mice. *Mutat Res*. 2006 Jun 25;598(1-2):35-49.

Somineni HK, Zhang X, Biagini Myers JM, Kovacic MB, Ulm A, Jurcak N, Ryan PH, Khurana Hershey GK, Ji H. Ten-eleven translocation 1 (TET1) methylation is associated with childhood asthma and traffic-related air pollution. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Mar;137(3):797-805.e5.

Stanley AC, Lacy P. Comparison of serum and cell-specific cytokines in humans. *Physiology (Bethesda)*. 2010 Aug;25(4):218-29.

Stein, C. M., Zalwango, S., Chiunda, A. B., Millard, C., Leontiev, D. V., Horvath, A. L., Cartier, K. C., Chervenak, K., Boom, W. H., Elston, R. C., Mugerwa, R. D., Whalen, C. C., Iyengar, S. K. Linkage and association analysis of candidate genes for TB and TNF-alpha cytokine expression: evidence for association with IFNGR1, IL-10, and TNF receptor 1 genes. *Hum. Genet*. 121: 663-673, 2007.

Stiegel MA, Pleil JD, Sobus JR, Madden MC. Inflammatory Cytokines and White Blood Cell Counts Response to Environmental Levels of Diesel Exhaust and Ozone Inhalation Exposures. *PLoS One*. 2016 Apr 8;11(4):e0152458.

Sumita NM, Mendes ME, Macchione M, Guimarães ET, de Lichtenfels AJ, de Lobo DJ, Saldiva PH, Saiki M. *Tradescantia pallida* cv. *purpurea boom* in the characterization of air pollution by accumulation of trace elements. *J Air Waste Manag Assoc*. 2003 May;53(5):574-9.

Summers, A. M., Summers, C. W., Drucker, D. B., Barson, A., Hajeer, A. H., Hutchinson, I. V. Association of IL-10 genotype with sudden infant death syndrome. *Hum. Immun*. 61: 1270-1273, 2000.

Tarantini L, Bonzini M, Apostoli P, Pegoraro V, Bollati V, Marinelli B, Cantone L, Rizzo G, Hou L, Schwartz J, Bertazzi PA, Baccarelli A. Effects of particulate matter on genomic DNA methylation content and iNOS promoter methylation. *Environ Health Perspect*. 2009 Feb;117(2):217-22.

Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2009;4(6):825-37.

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Thomas P1, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2009;4(6):825-37.

Thomson EM, Breznan D, Karthikeyan S, MacKinnon-Roy C, Charland JP, Dabek-Zlotorzynska E, Celo V, Kumarathasan P, Brook JR, Vincent R. Cytotoxic and inflammatory potential of size-fractionated particulate matter collected repeatedly within a small urban area. *Part Fibre Toxicol.* 2015 Jul 16;12:24.

Townsend MJ, McKenzie AN. Unravelling the net? Cytokines and diseases. *J Cell Sci.* 2000 Oct; 113 (Pt 20): 3549-50.

Turner, D. M., Williams, D. M., Sankaran, D., Lazarus, M., Sinnott, P. J., Hutchinson, I. V. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Europ. J. Immunogenet.* 24: 1-8, 1997.

Vaissière T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res.* 2008 Jul-Aug;659(1-2):40-8.

Velická H, Puklová V, Keder J, Brabec M, Malý M, Bobák M, Kotlík B, Jiřík V, Janout V, Kazmarová H. Asthma Exacerbations and Symptom Variability in Children Due to Short-term Ambient Air Pollution Changes in Ostrava, Czech Republic. *Cent Eur J Public Health.* 2015 Dec;23(4):292-8.

Wang FF, Geng CM, Hao WD, Zhao YD, Li Q, Wang HM, Qian Y. The Cellular Toxicity of PM_{2.5} Emitted from Coal Combustion in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Biomed Environ Sci.* 2016 Feb;29(2):107-16.

Westberg H, Elihn K, Andersson E, Persson B, Andersson L, Bryngelsson IL, Karlsson C, Sjögren B. Inflammatory markers and exposure to airborne particles among workers in a Swedish pulp and paper mill. *Int Arch Occup Environ Health.* 2016 Feb 13. [Epub ahead of print]

Westendorp, R. G. J., Langermans, J. A. M., Huizinga, T. W. G., Elouali, A. H., Boomsma, D. I., Verweij, C. L., Vandenbroucke, J. P. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 349: 170-173, 1997. Note: Erratum: *Lancet* 349: 656 only, 1997.

Wong CM, Vichit-Vadakan N, Vajanapoom N, Ostro B, Thach TQ, Chau PY, Chan EK, Chung RY, Ou CQ, Yang L, Peiris JS, Thomas GN, Lam TH, Wong TW, Hedley AJ, Kan H, Chen B, Zhao N, London SJ, Song G, Chen G, Zhang Y, Jiang L, Qian Z, He Q, Lin HM, Kong L, Zhou D, Liang S, Zhu Z, Liao D, Liu W, Bentley CM, Dan J, Wang B, Yang N, Xu S, Gong J, Wei H, Sun H, Qin Z;

ATCGGATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTTCGGCATTATAGTCGATCGCTAGCTGCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

HEI Health Review Committee. Part 5. Public health and air pollution in Asia (PAPA): a combined analysis of four studies of air pollution and mortality. *Res Rep Health Eff Inst.* 2010 Nov;(154):377-418.

Yuan X, Wang Y, Li L, Zhou W, Tian D, Lu C, Yu S, Zhao J, Peng S. PM2.5 induces embryonic growth retardation: Potential involvement of ROS-MAPKs-apoptosis and G0/G1 arrest pathways. *Environ Toxicol.* 2015 Oct 15. [Epub ahead of print].

Zhang X, Xiao X, Duan H, Gao F, Li Y, Niu Y, Gao W, Wang H, Yu S, Zheng Y. Cytotoxicity of diesel engine exhaust among the Chinese occupational population: a complement of cytokinesis-block micronucleus cytome. *Inhal Toxicol.* 2016 May;28(6):274-80.

Zhao M, Tang J, Gao F, Wu X, Liang Y, Yin H, Lu Q. Hypomethylation of IL10 and IL13 promoters in CD4+ T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:931018.

Zhou W, Tian D, He J, Wang Y, Zhang L, Cui L, Jia L, Zhang L, Li L, Shu Y, Yu S, Zhao J, Yuan X, Peng S. Repeated PM2.5 exposure inhibits BEAS-2B cell P53 expression through ROS-Akt-DNMT3B pathway-mediated promoter hypermethylation. *Oncotarget.* 2016 Mar 2. [Epub ahead of print]

Zhu CQ, Tsao MS. Prognostic markers in lung cancer: is it ready for prime time? *Transl Lung Cancer Res.* 2014 Jun;3(3):149-58.