

Dolores Helena Rodriguez Ferreira Rivero

Alterações eletrocardiográficas, hematológicas e
histológicas induzidas pelo material particulado
fino da cidade de São Paulo

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

Área de Concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva

São Paulo

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rivero, Dolores Helena Rodriguez Ferreira

Alterações eletrocardiográficas, hematológicas e histológicas induzidas pelo material particulado fino da cidade de São Paulo / Dolores Helena Rodriguez Ferreira Rivero. -- São Paulo, 2005.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Paulo Hilário Nascimento Saldiva.

Descritores: 1.POLUIÇÃO AMBIENTAL 2.PARTÍCULAS 3.FREQÜÊNCIA CARDÍACA 4.VASOCONSTRIÇÃO 5.PULMÃO/anatomia & histologia 6.VASOS CORONÁRIOS/anatomia & histologia 7.CÉLULAS SANGÜÍNEAS . 8.RATOS WISTAR

USP/FM/SBD-163/05

"Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão e ousadia, pois o triunfo pertence a quem mais se atreve. E a vida é muito para ser insignificante"

Charles Chaplin

Agradecimentos

Primeiramente agradeço ao meu chefe, amigo e professor Paulo Saldiva, meu orientador, pela importância e significado que possui na minha vida. A minha admiração cresce a cada dia na medida que torna-se impossível enxergar minha trajetória como pesquisadora sem o convívio e ensinamentos desta pessoa ímpar. A confiança e estímulo que ele deposita em mim supera os meus desafios e me faz acreditar que com ele tudo é possível; e na verdade é. Agradeço pela concretização desta tese e pela oportunidade de poder estudar a linha de pesquisa cardiovascular, que foi extremamente gratificante.

Aos meus pais Antonio e Celsa, pelo amor, dedicação, carinho e atenção, que parecem inesgotáveis. A realização desta tese foi possível graças aos esforços e estímulos que recebi durante toda a vida e, principalmente, nesta jornada. Divido com você pai, mais este degrau alcançado e agradeço muito pelo apoio e incentivo que sempre recebi! Digo também que tenho um porto seguro que me fortalece e faz de mim o que sou. Este porto é minha mãe, amiga querida de todas as horas. O que seria de mim, sem você? Agradeço por tudo...tenho um amor imenso por vocês. Deixo também aqui registrado o meu carinho pela Débora, sempre tão importante na minha vida.

Agradeço ao José Odilo, meu marido, acima de tudo uma pessoa de qualidades admiráveis. Durante a trajetória desta tese percebi o quanto a paciência e amor de um companheiro são fundamentais para a concretização de um sonho. Aprendi com você que não podemos desistir daquilo que desejamos e que a força de vontade supera qualquer barreira. Tenho certeza que este esforço, muitas vezes acompanhado de ausências, trará ótimos resultados. À você, querido, todo meu carinho e agradecimento especial.

Não posso deixar de agradecer algumas pessoas que são especiais e me apoiaram neste caminho. Agradeço a solicitude sempre tão gentil da Eliane Gazzeto, que além de seus afazeres, me auxiliou com a ilustração

fotográfica da tese. Sua amizade e apoio foram muito importantes para mim. Da mesma forma deixo aqui meus agradecimentos à Ana Luíza Silveira, exímia profissional e fotógrafa da documentação científica do Museu da Patologia pelo apoio constante e auxílio com as fotomicrografias histológicas.

À Prof. Dra. Marisa Dolhnikoff, pelo auxílio na revisão da avaliação morfométrica deste estudo.

À Profa. Leila Antonangelo e Dr. Nelson Medeiros Júnior pela condução das análises hematológicas deste estudo, executadas no Laboratório Central do Hospital das Clínicas.

À aluna Carolina Sasaki, excelente bolsista de iniciação científica, que participou da padronização e condução de vários experimentos com registros eletrocardiográficos em ratos.

Aos amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental agradeço o apoio em todas as fases deste trabalho. Vocês colaboram para fazer o meu dia-a-dia mais feliz: Regiani, Ana Júlia, Fernando, Eliane Tigre, Débora, Rosa, Heloísa, Emília, Ana Lúcia, Eliane Gazzeto, Márcia, Dalva, Nildo, Severina, Prof. Alfésio, Prof. Luís, Paulo André, Ana Luíza e Profa. Thaís Mauad. Agradeço também a Sandra Soares, que não está mais entre nós, pelo auxílio na segunda fase experimental deste trabalho. Agradeço especialmente ao Carlos e Davi, sempre tão gentis e solícitos, pela manutenção e cuidado com os animais utilizados neste experimento, além dos auxílios laboratoriais.

Aos amigos do Laboratório de Terapêutica Experimental I (LIM 20) pelo apoio e amizade.

À Deus, por mais uma etapa cumprida.

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	2
1.2. AR – RECURSO VITAL POLUÍDO?.....	5
1.3. POLUIÇÃO DO AR E SAÚDE	12
1.4. MATERIAL PARTICULADO FINO (PM _{2,5}) E O SISTEMA CARDIO- PULMONAR.....	15
2. OBJETIVOS	23
3. MÉTODOS.....	25
3.1. Animais	26
3.2. Desenho Experimental	26
3.3. Coleta e Análise das Partículas	28
3.4. Extração dos Filtros para Instilação Traqueal.....	29
3.5. Instilação Traqueal.....	29
3.6. Aquisição de Dados Eletrocardiográficos e Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca	30
3.7. Análise Hematológica.....	32
3.8. Histologia e Morfometria	32
3.9. Razão Peso Seco/Úmido	34
3.10. Análise Estatística	35
4. RESULTADOS	37
4.1. FASE I 38	
4.1.1. Análise das Partículas.....	38
4.1.2. Eletrocardiograma	39
4.2. FASE II 42	
4.2.1. Análise Hematológica	42
4.2.2. Histopatologia e Morfometria.....	44
4.2.3. Razão Peso Seco/Úmido	49

5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	64
7. ANEXOS	66
7.1. Valores individuais de todos os parâmetros avaliados	67
7.2. Separatas dos artigos publicados.....	81
8. REFERÊNCIAS	94

RESUMO

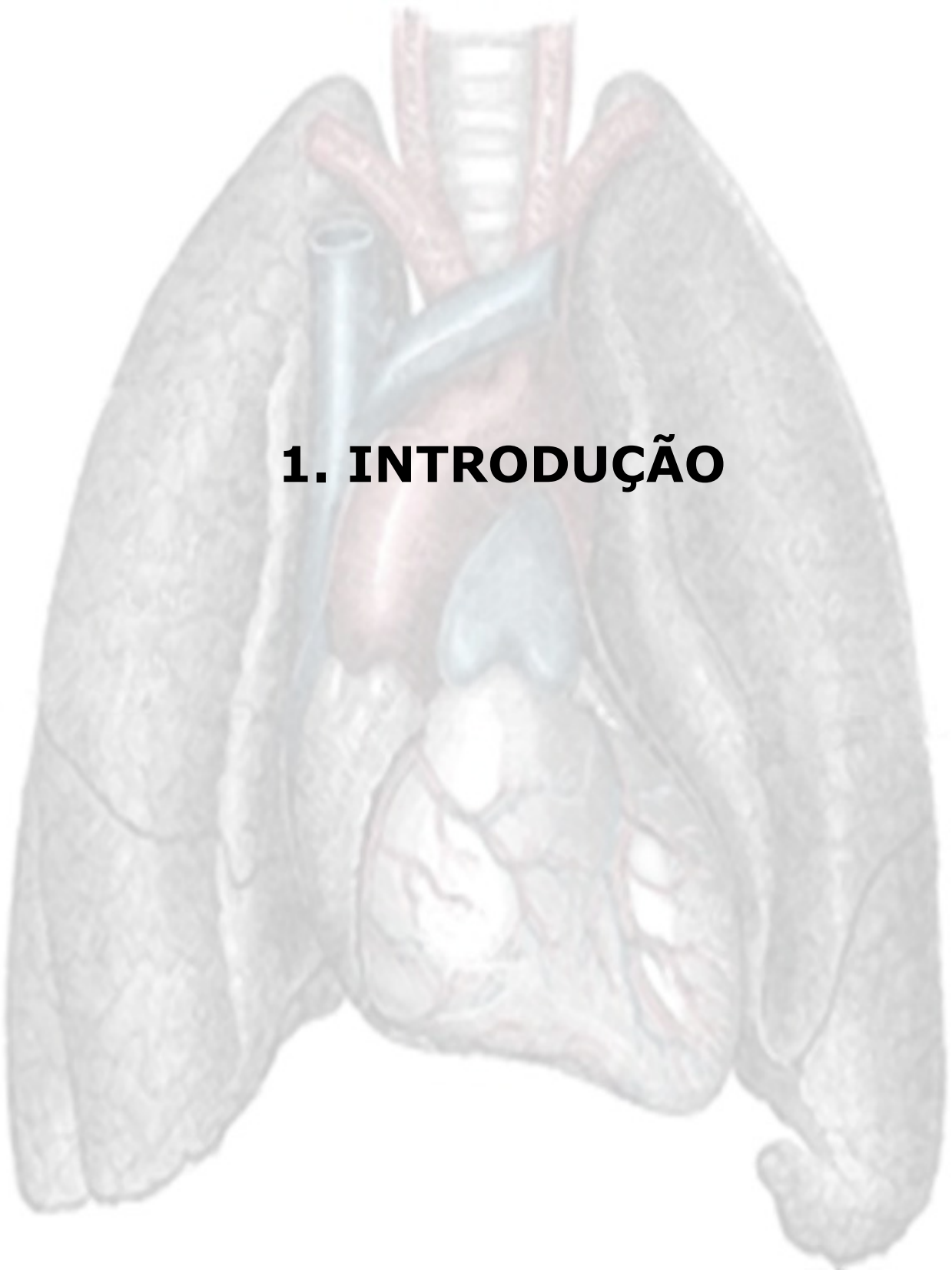
Rivero DHRF. *Alterações eletrocardiográficas, hematológicas e histológicas induzidas pelo material particulado fino da cidade de São Paulo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005, 112p.

Os mecanismos envolvidos na associação entre poluição do ar e aumento da mortalidade cardiovascular não estão ao todo esclarecidos. O objetivo deste estudo foi testar os efeitos agudos do PM_{2.5} da cidade de São Paulo sobre a frequência cardíaca (FC), variabilidade da frequência cardíaca (VFC), inflamação sistêmica e vasoconstrição de arteríolas de ratos Wistar saudáveis. O PM_{2.5} foi coletado em filtros de fibra de vidro utilizando um amostrador de grandes volumes. Para o ECG foram utilizados 47 ratos que foram submetidos a instilação traqueal de: salina, filtro branco, 50 µg e 100 µg de PM_{2.5}. A frequência cardíaca (FC) e o desvio-padrão dos intervalos NN (SDNN) foram avaliados na fase pré, 30 e 60 minutos após a instilação. Outro grupo de 38 ratos foram submetidos a instilação traqueal de: filtro branco, 100 µg e 500 µg de PM_{2.5} para análises hematológicas e histopatológicas. Estes animais foram sacrificados 24 horas após a instilação traqueal para a coleta de sangue e amostras de pulmão e coração para a morfometria e análise da razão peso seco/úmido. A FC diminuiu significativamente ($p < 0.001$) com o tempo, mas não houve efeito de tratamento ou interação entre tempo e tratamento. O SDNN diminuiu 60 minutos após a instilação nos grupos de 50 µg e 100 µg de PM_{2.5} ($p = 0.025$). O número de reticulócitos aumentou significativamente em ambas as doses de PM_{2.5} ($p < 0.05$), enquanto que o hematócrito aumentou somente no grupo de 500 µg ($p < 0.05$). Segmentados, neutrófilos e fibrinogênio diminuíram significativamente, enquanto que os linfócitos aumentaram com 100 µg de PM_{2.5} ($p < 0.05$). Houve uma diminuição dose-dependente da razão luz/parede (L/P) das arteríolas pulmonares intra-acinares em ambos grupos de PM ($p < 0.001$). A razão L/P das arteríolas peri-bronquiolares diminuiu no grupo que recebeu 500 µg de PM_{2.5} ($p < 0.001$). Houve um aumento significativo da razão peso seco/úmido no coração para o grupo que recebeu 500 µg ($p < 0.001$). Concluindo, as partículas finas da cidade de São Paulo induzem a uma redução do SDNN e promovem alterações histológicas pulmonares e cardíacas, resultando em significativa vasoconstrição. A medula óssea também participou na resposta aguda promovida pelas partículas que alcançam os pulmões.

SUMMARY

Rivero DHRF. *Electrocardiographic, hematological and histological alterations induced by fine particulate matter of Sao Paulo city* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2005. 112p.

The mechanisms involved in the association between air pollution and increased cardiovascular mortality are not fully understood. The objective of this study was to test the acute effects of Sao Paulo PM_{2.5} on heart rate, heart rate variability, systemic inflammation and vasoconstriction of arterioles of healthy Wistar rats. PM_{2.5} was collected in glass fiber filters using a high volume sampler. Forty-seven rats were submitted to tracheal instillation with: saline, blank filter, 50 µg and 100 µg of PM_{2.5} to ECG analysis. Heart rate (HR) and standard deviation of the intervals between normal beats (SDNN) were assessed immediately before, 30 and 60 minutes after instillation. Another thirty-eight rats were submitted to tracheal instillation with: blank filter, 100 µg and 500 µg of PM_{2.5} to hematological and histopathological analysis. These animals were sacrificed 24 hours after instillation when blood, heart and lung samples were collected for morphological and wet-to-dry weight ratio analysis. HR decreased significantly ($p < 0.001$) with time, but no significant effect of treatment or interaction between time and treatment was observed. SDNN decreased 60 minutes after instillation in groups PM_{2.5} 50 µg and 100 µg ($p = 0.025$). Reticulocytes significantly increased at both PM_{2.5} doses ($p < 0.05$) while hematocrit levels increased in the 500 µg group ($p < 0.05$). Segmented, neutrophils and fibrinogen levels significantly decreased, while lymphocytes increased with 100 µg of PM_{2.5} ($p < 0.05$). A significant dose-dependent decrease of intra-acinar pulmonary arterioles Lumen/Wall ratio (L/W) was observed in PM groups ($p < 0.001$). Peribronchiolar arterioles L/W showed a significant decrease in the 500µg group ($p < 0.001$). A significant increase in heart wet-to-dry weight ratio was observed in the 500 µg group ($p < 0.001$). In conclusion, fine particles in the city of Sao Paulo induces a reduction of SDNN and promote pulmonary and cardiac histological alterations, resulting in significant vasoconstriction. In addition, we observed that the bone marrow also participated in the acute response to particles reaching the lungs.



1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A partir da segunda metade do século XX, os homens, em todas as nações e grupos étnicos, foram afetados pelas transformações progressivas no meio ambiente. Os impactos negativos mais rápidos foram percebidos através da degradação dos recursos naturais não-renováveis e nos acúmulos de rejeitos e resíduos das grandes concentrações urbanas e parques industriais. A percepção da degradação ambiental só é possível com a compreensão de que o planeta Terra, que até 150 anos atrás parecia praticamente infinito e inesgotável, tinha um limite crítico.

O modelo atual globalizado de desenvolvimento capitalista está sustentado por uma grande produção de conhecimentos científicos e tecnológicos que o impulsionam em um processo de produção de mercadorias em quantidades nunca antes vistas e em velocidade muito acelerada. A fase atual do capitalismo caracteriza-se não somente pela centralidade do lucro e do processo de acumulação, mas do crescimento da escala de ações das grandes empresas. A reorganização dos espaços territoriais em larga escala objetivou uma lógica de acumulação para manter a competitividade mundial.

É impossível à natureza acompanhar o ritmo desse modelo sem se aproximar de uma catástrofe ambiental que, em certo sentido, já se manifesta em diversos locais em escala global. Nos últimos anos, observou-se um crescimento da preocupação social com relação aos danos que o processo de desenvolvimento capitalista vem causando ao nosso meio ambiente. A cada dia, diversos grupos se organizam para lutar por problemas relacionados à degradação ambiental. Os vários encontros realizados pelos órgãos internacionais (ONU, Banco Mundial, etc.) enfrentam crises lideradas pelos grupos de oposição ao modelo vigente, entre eles, ambientalistas.

Na raiz de quase todos os problemas ambientais da atualidade está o crescimento descontrolado e exagerado da população humana, como consequência direta do conhecimento científico e tecnológico ao desvendar as causas das principais doenças que afligiram a humanidade no início do século passado. Atualmente, a população da Terra é de mais de 6×10^9 habitantes, aumentando em um bilhão de pessoas a cada 12 anos (Population Reference Bureau, 2002). Esse crescimento desenfreado foi acompanhado pelo aumento exponencial do consumo de energia com a intensificação do processo de industrialização e urbanização.

O consumo anual médio de energia *per capita* no mundo, em 1998, era aproximadamente 1,6 tonelada de óleo equivalente (TEP – *ton of equivalent petroleum*) ou 18.000 Kcal. Somente os EUA, com 6% da população mundial, consomem 35% da energia mundial. Nos países industrializados, o consumo *per capita* é de 5,5 TEP, sendo 1,39 TEP o

consumo no Brasil. Com a explosão populacional dos últimos dois séculos e com o aumento do consumo de energia per capita, o consumo total de energia no mundo aumentou cerca de 100 vezes em relação ao consumo do passado distante (World Resources Institute, 2003).

Os impactos do uso de energia no meio ambiente não são novidade. Durante séculos, a queima de madeira contribuiu para o desmatamento de muitas áreas. O que é relativamente novo é a relação entre problemas ambientais regionais e globais, e suas implicações. É inquestionável a importância do potencial de energia para melhorar a qualidade de vida e a produção de serviços à sociedade. Porém, a produção de energia convencional e o seu consumo estão intimamente relacionados com a degradação do meio ambiente através da queima de combustíveis fósseis. O impacto ambiental conseqüente desta prática nas grandes cidades é o problema da poluição do ar, a qual ameaça a saúde humana e a qualidade de vida, além de afetar o equilíbrio ecológico e a diversidade biológica.

A queima de combustíveis fósseis é problemática em vários níveis (embora a utilização de gás natural gere menores emissões prejudiciais do que petróleo e carvão). Os principais poluentes emitidos na combustão de combustíveis fósseis (petróleo ou carvão) são óxidos de enxofre e nitrogênio, monóxido de carbono e suspensão de particulados.

A história do crescimento urbano de São Paulo foi marcada pela facilidade de uso e aquisição do automóvel em detrimento ao transporte

público. Neste cenário, as emissões provenientes de veículos automotores são as grandes responsáveis pela poluição urbana da cidade de São Paulo, contribuindo pelo aumento de internações hospitalares, problemas respiratórios e cardiovasculares, além da piora da qualidade de vida de seus moradores. No entanto, ainda existem lacunas e questões a serem resolvidas afim de desvender os efeitos de cada componente, o seu potencial tóxico e mecanismos de ação.

Essa temática tem sido objeto de estudo do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental do Departamento de Patologia da USP ao longo das últimas décadas. Esta tese de doutorado representa a continuação dos estudos do laboratório e tem por objetivo avaliar o comprometimento cardiopulmonar promovido pelas partículas finas do ar da cidade de São Paulo.

1.2. AR – RECURSO VITAL POLUÍDO?

O uso primordial do ar é manter a vida na Terra. No entanto, é utilizado pelas comunidades de uma maneira não parcimoniosa, seja pela característica insípida e incolor ou pelo fato de estar disponível livremente sem que seu uso exija qualquer ônus ou esforço. Além da utilização dos metabólicos naturais do ar pelo homem, animais e vegetação, outros usos importantes devem ser acrescentados: transporte, combustão, processos

industriais e, principalmente, a utilização do ar como receptor e transportador de resíduos da atividade humana.

Os seres vivos, incluindo o homem, vivem na camada de ar denominada Troposfera. Esta camada está localizada acima da crosta terrestre (cerca de 12 Km), e constitui-se de Nitrogênio diatômico (N_2 , 78%), Oxigênio diatômico (O_2 , 21%), Argônio (Ar, 1%), Dióxido de Carbono (CO_2 , 0,04%) e por vários outros gases em pequenas concentrações. Se tivermos em mente o significado real de meio ambiente e de todos os fatores interligados a este para gerar o bem-estar da sociedade, torna-se fácil deduzir que a atmosfera necessita estar “limpa” e livre de poluentes.

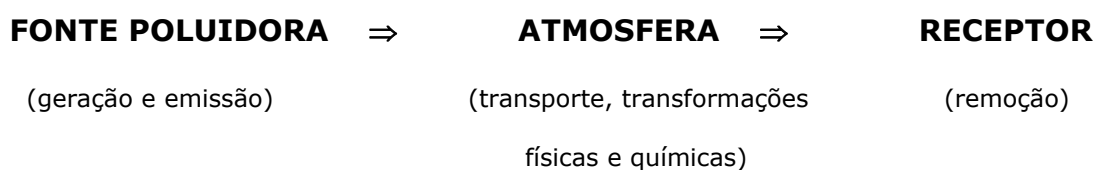
A forma de tratar o meio ambiente como algo externo sempre esteve associada a essa atmosfera fundamental ao nosso meio, ou seja, é algo que se joga para fora e não no “próprio quintal” (Mol e Spaargaren, 2000). A cidade de São Paulo é um exemplo veemente do impacto das externalidades ambientais como resultado do uso indiscriminado ou abusivo de seus recursos: rios poluídos, ar contaminado, etc.

A poluição do ar pode ser definida como a presença de substâncias que alterem as propriedades físicas, químicas ou biológicas da atmosfera, em concentrações suficientes para interferir direta ou indiretamente na saúde, segurança e bem-estar dos seres vivos e ecossistemas em geral.

Existem vários poluentes presentes no ar atmosférico que podem ou não reagir entre si. Como forma de simplificação, são comumente divididos em duas categorias:

- Poluentes Primários: emitidos diretamente pelas fontes de emissão como resultado de processos industriais (fontes estacionárias), gases de exaustão de motores de combustão interna (fontes móveis, no caso de automóveis, por exemplo).
- Poluentes Secundários: formados na atmosfera através da reação química entre poluentes primários e constituintes naturais da atmosfera.

O nível de poluição do ar ou a qualidade do ar é medida pela quantificação de substâncias poluentes presentes neste ar. Para determinar a concentração de determinado poluente deve-se aferir o grau de exposição dos receptores (ser humano, animais, plantas e materiais), como resultado final do processo de lançamento deste poluente por suas fontes de emissão e suas interações na atmosfera (Derisio, 2000). O ciclo do "nascimento, vida e morte do poluente" é visualizado, esquematicamente, da seguinte forma:



A interação entre as fontes de poluição e a atmosfera vai definir o nível de qualidade do ar, que determina por sua vez o surgimento de efeitos adversos sobre os receptores.

A variedade de poluentes que podem estar presentes na atmosfera é muito grande. Estas substâncias podem ser classificadas da seguinte forma:

- Compostos sulfurosos (SO_2 , SO_3 , H_2S , sulfatos);
- Compostos de nitrogenados (NO , NO_2 , NH_3 , HNO_3 , nitratos);
- Compostos orgânicos de carbono (hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos);
- Monóxido de carbono e dióxido de carbono;
- Compostos halogenados (HCl , HF , cloretos, fluoretos);
- Material Particulado

Com o propósito de controlar as emissões de poluentes originários de fontes móveis e estacionárias, os EUA, na década de 60, estabeleceram padrões de qualidade do ar através da Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana (EPA). Os padrões já estabelecidos baseiam-se em estudos sobre o efeito dos diferentes poluentes e prevêm uma margem de segurança. Os poluentes controlados pela EPA são: SO_2 , Ozônio, NO_2 , CO , particulados totais em suspensão (PTS), PM_{10} , $\text{PM}_{2,5}$ e Chumbo. No Brasil, o Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA, pela resolução Nº 3 de 28/6/90, estabeleceu os padrões nacionais de qualidade do ar, com base na Portaria Normativa Nº 348 de

14/3/90 do IBAMA, com a padronização dos mesmos poluentes da EPA com exceção do chumbo e $PM_{2,5}$ (Tabela 1).

Neste sentido, o monitoramento é uma das formas de avaliar a qualidade do ar de uma determinada região e de estabelecer medidas de controle e prevenção para que os níveis estejam aceitáveis. No estado de São Paulo, a agência responsável pelo monitoramento do ar é a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). No ano de 1981, passou a vigorar uma rede automática de monitoramento do ar, com estações medidoras distribuídas pela Região Metropolitana de São Paulo - RMSP e Cubatão. Essa rede foi renovada em 1996 e hoje, totaliza 29 estações.

A fumaça negra emitida pelo escapamento de automóveis a diesel é a forma mais evidente de poluição do ar que encontramos nas grandes metrópoles. Esta fumaça é composta de material particulado. Adota-se o índice MP para a concentração de material particulado em nossa cidade. No entanto, adotarei para este trabalho a terminologia internacional (PM) – *particulate matter*, haja vista a ampla aceitação e utilização desta terminologia pela comunidade científica nacional.

Os particulados são partículas sólidas (poeiras, fumos) ou líquidas (fumaça e névoas), suspensas no ar e invisíveis a olho nu. Estas partículas suspensas em uma determinada massa de ar não apresentam o mesmo tamanho aerodinâmico e tampouco apresentam a mesma composição.

Tabela 1 – Padrões nacionais de qualidade do ar, segundo resolução Conama nº 3, de 28 de junho de 1990

Poluente	Tempo de Amostragem	Padrão Primário ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Padrão Secundário ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Partículas Totais em	24 horas ⁽¹⁾	240	150
Suspensão (PTS)	MGA ⁽²⁾	80	60
Dióxido de Enxofre	24 horas ⁽¹⁾	365	100
(SO ₂)	MAA ⁽³⁾	80	40
Monóxido de Carbono	1 hora ⁽¹⁾	40.000 (35 ppm)	40.000 (35 ppm)
(CO)	8 horas ⁽³⁾	10.000 (9 ppm)	10.000 (9 ppm)
Ozônio (O ₃)	1 hora ⁽¹⁾	160	160
Fumaça	24 horas ⁽¹⁾	150	100
	MAA ⁽³⁾	60	40
Partículas Inaláveis	24 horas ⁽¹⁾	150	150
(PI)	MAA ⁽³⁾	50	50
Dióxido de Nitrogênio	1 hora ⁽¹⁾	320	190
(NO ₂)	MAA ⁽³⁾	100	100

FONTE: CETESB, 2002 (1) não deve ser excedido mais que uma vez ao ano, (2) média geométrica anual, (3) média aritmética anual

Quanto ao tamanho possuem uma distribuição trimodal, ou seja, partículas de diâmetro $\leq 10 \mu\text{m}$ (PM₁₀), o que corresponde a toda faixa de partículas finas e os menores membros da faixa de partículas grossas, sendo chamadas de partículas inaláveis; partículas de diâmetro $\leq 2,5 \mu\text{m}$ (PM_{2,5}), o que inclui somente as partículas finas; e partículas com diâmetros muito pequenos $\leq 0,1 \mu\text{m}$, chamadas partículas ultrafinas. Enquanto as partículas grossas são originadas de maneira natural (dispersão do solo, materiais da crosta), partículas pequenas de fuligem são geralmente produzidas pela queima incompleta de combustíveis a base de carbono, como, carvão, gasolina e óleo diesel (Baird, 2002).

Na cidade de São Paulo, a grande responsável pelo aumento na concentração de PM é a frota de veículos que continua crescendo em um ritmo assustador a cada ano (Figura 1). O crescimento da indústria automobilística está associada a marca de modernidade e progresso das cidades. No Brasil, esse modelo de “progresso” deixou de priorizar o transporte público para criar e atender um apelo da nova era consumista. Possuir o modelo do “ano” é visto como *status* e afirmação social de jovens, que veem na aquisição do automóvel, um passo para a maioria.

Na década de 80, a CETESB desenvolveu as bases técnicas para controlar os poluentes veiculares através do PROCONVE - Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores, definindo os limites máximos de emissão para todos os veículos novos, leves e pesados, nacionais e importados.



Figura 1. Vias congestionadas da Cidade de São Paulo. Notar a redução da visibilidade em dia típico de poluição

Fonte: Cetesb (www.cetesb.sp.gov.br)

Atualmente, a frota de veículos no Brasil é de $18,7 \times 10^6$ unidades, das quais 6,96 milhões circulam a cada dia no Estado de São Paulo (Anfavea, 2000). Além das emissões de material particulado, os moradores da cidade de São Paulo enfrentam congestionamentos em quase todos os períodos do dia. No entanto, nossos governantes continuam apostando seus orçamentos escassos em obras viárias como o recém construído Tunel Rebouças, por exemplo, que além de não solucionar o problema, desvia o mesmo fluxo de carros para outros pontos mais críticos.

1.3. POLUIÇÃO DO AR E SAÚDE

Cinqüenta e dois anos se passaram desde o grande episódio Londrino de poluição do ar ocorrido em 1952, que culminou com a morte de mais de 4.000 pessoas. Outros episódios marcantes que também provocaram aumento de mortalidade precederam o smog de Londres, como o Vale do Meuse na Bélgica (1930) e Donora nos EUA (1948). Estas cidades foram tomadas por uma névoa densa, com duração de 5 dias ou mais, pelo excesso de particulados presentes no ar. No Brasil, em 1985, aconteceu o maior acidente da nossa história. O rompimento de um duto de gasolina da Petrobrás na região de Cubatão, a qual chegou a ser considerada a mais poluída do mundo, ocasionou 99 mortes e centenas de desaparecidos.

As condições climáticas e a composição de elementos na atmosfera mudaram; a legislação vigente em vários países eliminou as concentrações elevadas de vários poluentes; Ainda assim, os seres vivos do nosso planeta continuam sofrendo os efeitos da poluição do ar. Esta exposição causa problemas respiratórios, cardiovasculares e morte, seja em adultos, crianças, idosos, doentes ou não.

O episódio clássico acontecido em Londres despertou profundo interesse na comunidade científica em desvendar os efeitos deletérios da poluição do ar na saúde humana. A partir da década de 80, centenas de trabalhos foram publicados com a avaliação dos efeitos de poluentes sobre a saúde, principalmente efeitos do material particulado. Estes achados estão detalhados e discutidos em revisões recentes (Pope III, 2000 a; Pope III, 2000b; Harrison e Yin, 2000; Brunekreef e Holgate, 2002; Oberdörster, 2001; Englert, 2004).

Com o intuito de estudar os efeitos da poluição existente na cidade de São Paulo, surgiu ao final da década de 80, o Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE) do Departamento de Patologia da FMUSP. O LPAE é reconhecido pela comunidade científica internacional como o grupo que introduziu e consolidou o conceito de exposição de animais a condições reais de poluição atmosférica como um instrumento fundamental para compreensão da toxicidade da poluição urbana. Os estudos experimentais deste laboratório foram os pioneiros na utilização de ratos expostos à poluição urbana, demonstrando os efeitos maléficos à saúde, principalmente alterações respiratórias (Böhm e cols., 1989;

Saldiva e cols., 1992; Lemos e cols., 1994; Pereira e cols., 1996. Nas últimas duas décadas, os estudos experimentais do LPAE avançaram no sentido de investigar os efeitos do material particulado na mutagênese, na embriogênese, no sistema reprodutivo e mais recentemente, no sistema cardiovascular.

Além dos estudos experimentais, o LPAE iniciou linhas de pesquisa em estudos epidemiológicos observacionais para investigar os efeitos deletérios da poluição do ar sobre as doenças respiratórias de crianças e idosos (Saldiva e cols., 1994; Saldiva e cols., 1995, Conceição e cols., 2001). Observou-se também uma associação significativa entre os poluentes do ar e atendimentos no pronto-socorro (Lin e cols., 1999; Martins e cols., 2001; Braga e cols., 1999; Braga e cols., 2001a). Além disso, demonstrou-se também que os efeitos adversos dos poluentes influenciam tanto a mortalidade neonatal (Lin e cols., 2004) como a mortalidade fetal (Pereira e cols., 1998).

É importante ressaltar que a maioria dos estudos epidemiológicos e experimentais avaliam o PM focando somente sua fração de tamanho (PM_{10} , $PM_{2,5}$ ou CP – *coarse particles*). O que se observa nesses trabalhos é que as evidências associadas ao PM_{10} ou $PM_{2,5}$ estão relacionadas à origem das emissões inerentes a cada área de estudo.

1.4. MATERIAL PARTICULADO FINO (PM_{2,5}) E O SISTEMA CARDIO-PULMONAR

Quando observa-se a taxa de mortalidade nos EUA, o maior índice é devido a problemas cardiovasculares (18%) quando comparado a óbitos por outras causas (WHO, 2002). Este cenário não é diferente no Brasil, onde os óbitos por doenças cardiovasculares no Estado de São Paulo correspondem a 32,65% do total de mortes das regiões metropolitanas das capitais dos estados da região sudeste, totalizando 69.104 mil mortes no ano de 2000 (Datusus, 2000).

A influência da poluição do ar nas doenças cardiovasculares está em grande evidência. Ao longo dos últimos anos, não foi intuitivamente óbvio imaginar que partículas presentes no pulmão poderiam contribuir para um aumento de risco de morte por problemas cardíacos. Porém, estudos recentes demonstram que indivíduos com comprometimento cardíaco, expostos ao PM, possuem maior associação ao risco de morte (Dockery, 2001; Liao e cols., 1999; Goldberg e cols., 2001; Lin e cols., 2003; Mann e cols., 2002).

Um estudo importante realizado por Dockery e seus colaboradores no ano de 1993, teve como objetivo investigar a mortalidade ocorrida em seis cidades americanas que foram escolhidas por apresentar altos níveis de particulados. Este estudo selecionou 8.111 adultos durante 1974 a 1977 e o estado de saúde de cada pessoa foi monitorado até o final de 1989. Simultaneamente, uma estação de monitoramento do ar foi

implantado na região central de cada comunidade para registrar os níveis de poluição durante o mesmo período. A data e causa da morte foi computada e correlacionada com diferentes frações de PM. O coeficiente de correlação (0,986) entre $PM_{2,5}$ e a taxa relativa de mortalidade entre indivíduos masculinos e femininos foi altamente positiva. Além disso, a correlação positiva com a mortalidade foi atribuída a câncer de pulmão e doenças cardiopulmonares, mas não a outras causas. Os estudos epidemiológicos de (Pope III e cols., 1995; Laden e cols., 2000 e Schwartz e cols., 2002), também associaram a mortalidade com aumento de concentrações diárias de PM, particularmente partículas finas.

Existem evidências sugestivas de que a mortalidade cardiovascular associada à poluição do ar ocorre durante as primeiras 24 horas após um aumento da mesma. Braga e cols., 2001b, mostraram recentemente que um aumento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM_{10} está associado com morte cardiovascular no mesmo dia do evento da poluição. Pacientes com evidências de arritmias cardíacas, possuidores de desfibriladores implantados na pele, apresentaram aumento de arritmias, em curto espaço de tempo, na medida em que houve aumento de $18 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $PM_{2,5}$ (Peters e cols., 2000).

A Organização Mundial de Saúde declarou recentemente a seguinte afirmação: "Existe uma forte evidência para se concluir que as são mais prejudiciais que partículas grossas em termos de mortalidade e casos respiratórios e cardiovasculares em estudos epidemiológicos tipo painel. Isto não implica que as partículas grossas sejam inócuas" (WHO, Working

Group, 2003). A justificativa destas afirmações estão comprovadas na literatura e serão abordadas a seguir.

Partindo do princípio que o $PM_{2.5}$ pode atingir o território alveolar, componentes liberados pelas partículas respiráveis podem entrar na circulação e influenciar parâmetros circulatórios considerados como fatores de risco para os eventos cardiovasculares (Schwartz, 2001). Stone e Godleski (1999) sugeriram que as partículas finas podem entrar na corrente sanguínea e afetar o coração através de arritmias e morte súbita em indivíduos susceptíveis. Mais recentemente, foi demonstrado que partículas ultrafinas podem ser detectadas na circulação sistêmica, após 1 minuto de exposição, promovendo uma rota de entrada em todos os órgãos (Nemmar e cols., 2002).

Revisões recentes relatam vários fatores de risco relacionados às partículas finas que interagem na resposta de fase aguda e na doença cardiovascular (Seaton e cols., 1995; Utell e Frampton, 2000; Frampton, 2001; Donaldson e cols., 2001; Kang, 2001; Brook e cols., 2003; Verrier e cols., 2002). Neste contexto, a inalação de partículas induz aumento de viscosidade do plasma, alterações de parâmetros sanguíneos tais como níveis de fibrinogênio ou contagem de eritrócitos e leucócitos, vasoconstrição e alterações de coagulabilidade (Kodavanti e cols., 2002; Seaton e cols., 1999; Gardner e cols., 2000; Baskurt e cols., 1990; Peters e cols., 1997; Bouthillier e cols., 1998; Nemmar e cols., 2004). Um estudo prévio do nosso laboratório demonstrou que a composição de partículas residuais de óleo combustível, instiladas em camundongos, foi

decisiva na resposta sanguínea (Medeiros e cols., 2004). Adicionalmente, outros trabalhos experimentais recentes relatam alterações sistêmicas e inflamatórias após exposição a partículas (Kodavanti e cols., 1998; Schins e cols., 2004; Saldiva e cols., 2002).

Os efeitos cardiovasculares das partículas não são necessariamente mediados somente pela inflamação sistêmica. É plausível que o início da inflamação pulmonar, desencadeada pelas partículas, dispare reflexos (Widdicombe e Lee, 2001) que podem afetar a função cardiovascular. No tocante aos efeitos cardiovasculares documentados em resposta a exposição ao PM estão incluídos: rompimento da atividade do sistema nervoso autônomo (SNA) pelo aumento (Tarkiainen e cols., 2003; Magari e cols., 2002) e diminuição da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) (Gold e cols., 2000; Pope III e cols., 2004; Magari e cols., 2001); vasoconstrição pulmonar (Batalha e cols., 2002; Brook e cols., 2002); arritmias cardíacas (Peters e cols., 2000; Watkinson e cols., 1998); infarto agudo do miocárdio (IAM) (Peters e cols., 2001); hospitalização (Lin e cols., 2003; Schwartz, 1999), depressão do segmento ST em pacientes com doença coronariana durante o exercício (Juha e cols., 2002).

Apesar da influência das partículas sobre o sistema cardiovascular, os mecanismos fisiopatológicos desta associação não foram esclarecidos ainda. A poluição do ar talvez seja um fator que “engatilhe” um canal de eventos, especialmente em indivíduos vulneráveis, como os idosos, pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (ICC) ou doença pulmonar obstrutiva crônica.

A atividade mecânica cardíaca é comandada por um estímulo elétrico que tem origem no nó sinoatrial localizado posteriormente ao ângulo de união da veia cava superior com o átrio direito. O estímulo elétrico induz uma despolarização que se propaga até englobar os átrios, como ondas de excitação de forma radiada. Após a ativação atrial, o impulso alcança a área juncional (nó atrioventricular), se propaga pelos ventrículos através do fascículo atrioventricular, ramos direito e esquerdo e pelos miócitos condutores cardíacos (Figura 2). É importante constatar que o coração, durante sua atividade, age como um gerador de correntes elétricas e que estas correntes, espalhando-se no meio condutor que é o coração, geram potenciais elétricos cuja evolução no tempo e no espaço podem ser aproximadamente previstas. Assim funciona o eletrocardiograma (ECG) que nada mais é do que o registro das variações do potencial elétrico do meio extracelular decorrentes da atividade cardíaca (Tranchesi, 2001).

O coração humano varia a sua frequência batimento a batimento, como consequência dos ajustes imediatos promovidos pelo SNA para manter a homeostase do sistema cardiovascular. O controle autonômico da frequência cardíaca (FC) é exercido sobre o nó sinoatrial batimento a batimento, determinando flutuações que apresentam dois componentes distintos: um de alta frequência, identificado como arritmia sinusal respiratória, mediado pelo sistema nervoso parassimpático; e um de baixa frequência mediado tanto pelo vago como pelo sistema simpático. Análise da VFC, batimento a batimento, é um dos métodos não-invasivos para avaliar quantitativamente a atividade autonômica cardíaca.

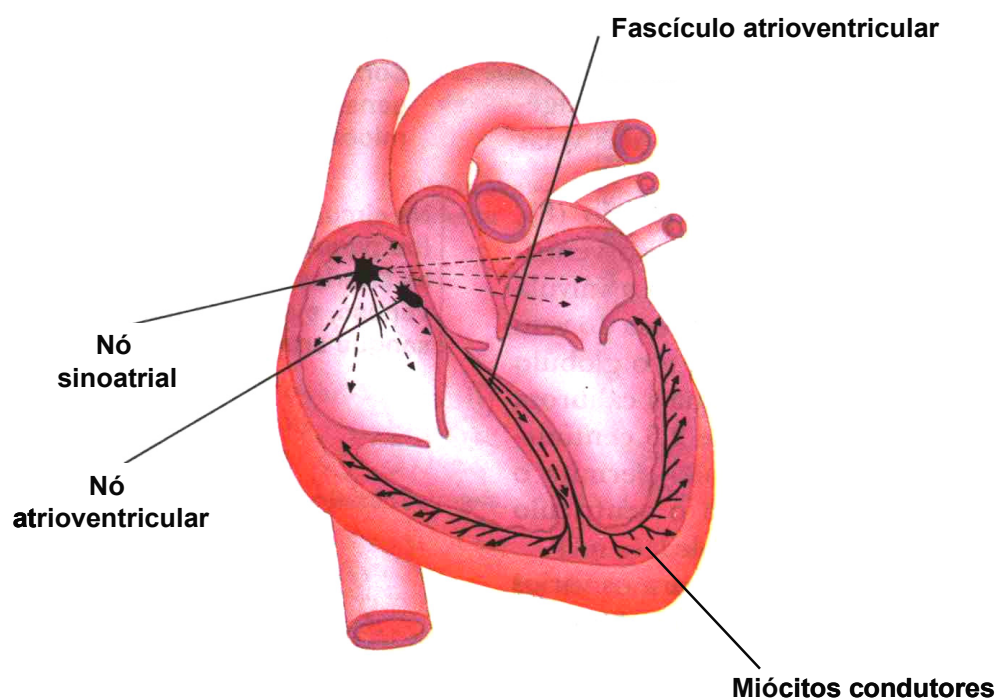


Figura 2. Sistema de condução elétrica cardíaca. Conjuntos formados pelo nó sinoatrial, nó atrioventricular, fascículo atrioventricular e miócitos condutores. *Imagem adaptada de Avancini & Favaretto, 1997.*

A VFC pode ser analisada tanto em curtos períodos de tempo 2, 5, 15 minutos ou longos períodos como 24h, sendo o último o mais utilizado na prática clínica. Após medir-se cada intervalo RR de batimentos sinusais sucessivos, em um determinado intervalo de tempo, excluindo-se as ectopias e os artefatos, obtem-se a média e seu respectivo desvio padrão, que através de técnicas matemáticas desdobram-se em alguns índices estatísticos. Esses índices constituem a análise da VFC no domínio do tempo e estão reunidos na Tabela 2.

Outra forma de se avaliar a VFC é a análise no domínio da frequência. Refere-se ao estudo dos componentes de frequência que

compõem uma série temporal de intervalos RR em um período definido. A análise espectral permite identificação e separação de grupos de ondas, construindo um gráfico onde frequências de ondas semelhantes são agrupadas.

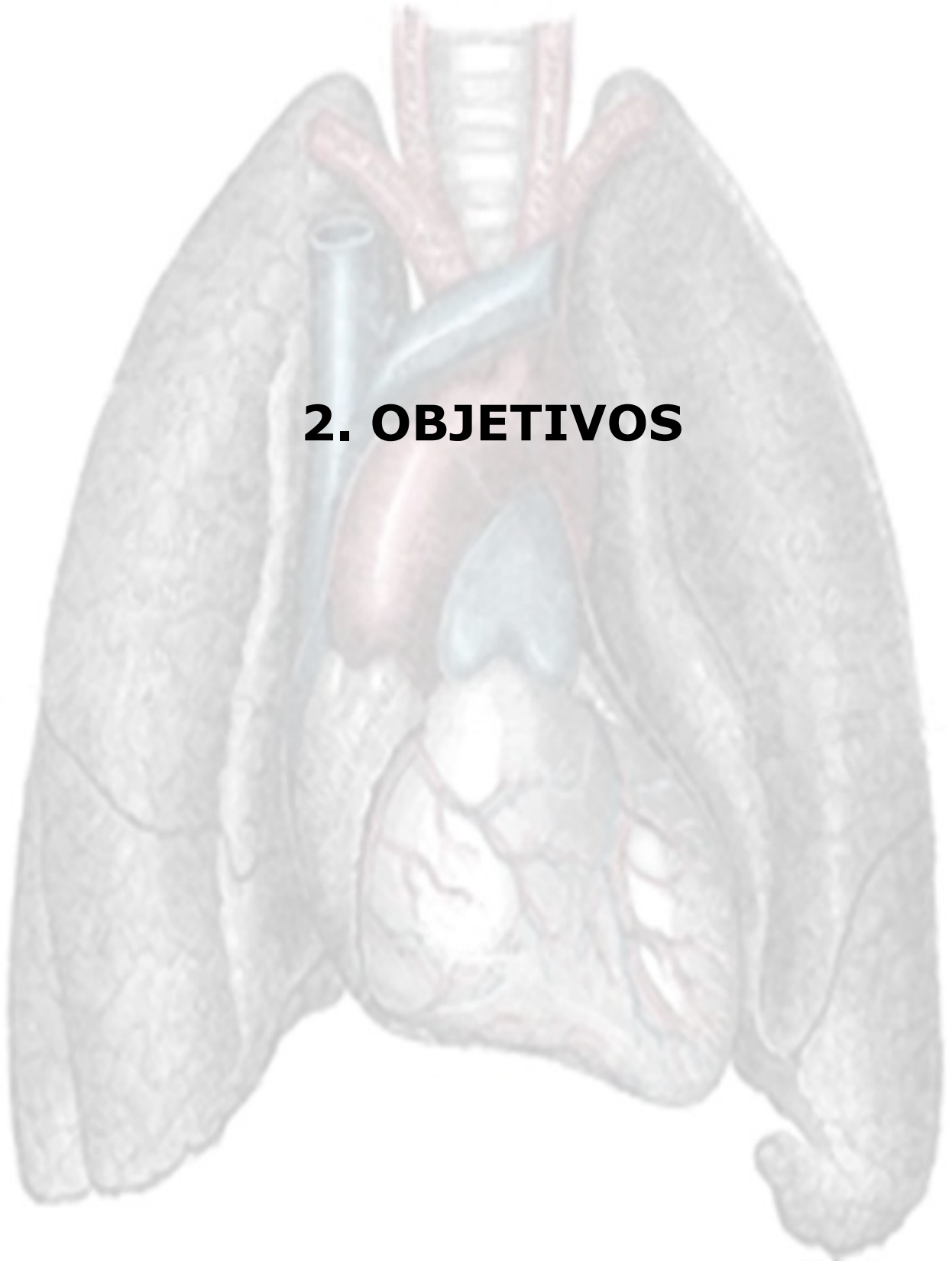
Tabela 2 – Variabilidade da frequência cardíaca no domínio de tempo

Índice	Unidade	Definição
RRMED	ms	Média de todos os intervalos NN
SDNN	ms	Desvio-padrão de todos os intervalos NN
SDANN	ms	Desvio-padrão da média dos intervalos NN, medida em segmentos de 5 min.
SDNNi	ms	Média dos desvios-padrão dos intervalos NN, medidos em segmentos de 5 min.
RMSSD	ms	Raiz quadrada da média das diferenças sucessivas ao quadrado, entre NN adjacentes
PNN50	%	Porcentagem das diferenças sucessivas entre os intervalos NN que são > 50ms
Índice triangular		Número total de intervalos NN, dividido pela altura do histograma de todos estes. São medidos em uma escala discretizada de 1/128 segundos (8ms)

Alterações do controle autonômico do coração estão entre os mecanismos potenciais responsáveis pela mortalidade cardíaca associada a poluição (Pope e cols., 1999; Godleski e cols., 2000). O estudo da VFC tem sido usado em pacientes com uma variedade de doenças cardíacas e não-cardíacas (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996; Lombardi, 2002).

Por outro lado, existem evidências recentes de que a inalação de partículas aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) nos pulmões e coração (Goldsmith e cols., 1998; Dye e cols., 1997; Tao e cols., 2003; Gurgueira e cols., 2002; González-Flecha, 2004). A produção de ERO no território cardiovascular pode ser induzida por vários eventos, incluindo inflamação (Kodavanti e cols., 2000; Ichimura e cols., 2003; Touyz and Schiffrin, 2004), alterações de controle autonômico (Campese e cols., 2004) ou aumento de carga mecânica (McDonough, 1999). De fato, todos estes caminhos estão interconectados e, na maioria dos casos, torna-se difícil isolar a participação de cada um na avaliação toxicológica do PM.

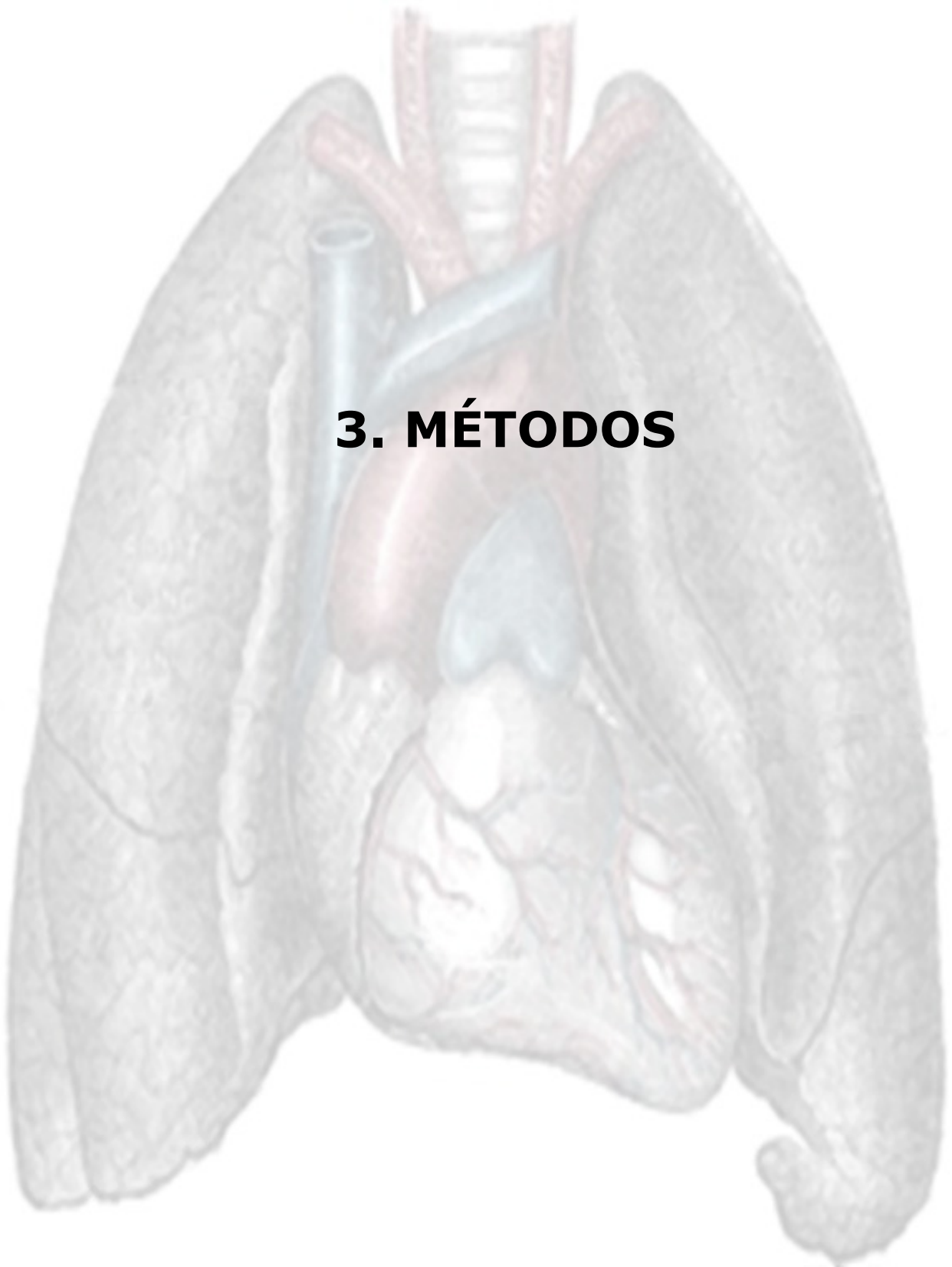
A partir dos fundamentos expostos acima, os objetivos do estudo foram avaliar se a administração de PM_{2.5} da cidade de São Paulo promove em ratos Wistar saudáveis, alterações detectáveis de ECG em parâmetros como FC, desvio-padrão dos intervalos RR normais (SDNN) ou distúrbios de ritmo cardíaco; inflamação pulmonar, cardíaca e sistêmica; além de alterações morfológicas em vasos pulmonares e cardíacos. O conhecimento de tais informações poderá contribuir para a compreensão dos mecanismos relacionados com a inalação de partículas e mortalidade aguda em humanos.



2. OBJETIVOS

Avaliar os possíveis efeitos da instilação do material particulado fino (PM_{2,5}) da cidade de São Paulo, em ratos saudáveis, sobre os seguintes parâmetros:

- ❖ **Eletrocardiográficos:** análise da FC e VFC durante 1 hora após a instilação traqueal;
- ❖ **Hematológicos:** análise do hemograma (hematócrito, leucócitos, eritrócitos, plaquetas e reticulócitos) e fatores de coagulação (tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcialmente ativada) após 24 horas de instilação traqueal;
- ❖ **Histológicos:** avaliação do perfil inflamatório do parênquima pulmonar e miocárdio; determinação da razão Luz/Parede de arteríolas pulmonares e ramos coronarianos; avaliação da razão peso seco/úmido do tecido pulmonar e cardíaco após 24 horas de instilação traqueal;



3. MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 85 ratos machos da raça Wistar, adultos (três meses de idade), pesando aproximadamente 250 gramas, provenientes do biotério central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos entre 22 e 23° C, com umidade controlada e ciclos de noite/dia de 12 em 12 horas. Comida e água foram fornecidos *ad libitum*.

3.2. Desenho Experimental

Este trabalho foi subdividido em duas fases experimentais. A primeira fase objetivou a avaliação dos parâmetros eletrocardiográficos (FC e VFC) de 47 ratos que receberam randomicamente as seguintes soluções:

- a) SAL (n=12), solução salina estéril;
- b) FB - Filtro Branco (n=12), solução obtida pela ultra-sonicação de um filtro branco submerso em água destilada;

- c) PM 50 (n=12), solução obtida pela ultra-sonicação do filtro contendo PM submerso em água destilada, contendo 50µg de PM_{2.5};
- d) PM 100 (n=11), solução obtida pela ultra-sonicação do filtro contendo PM submerso em água destilada, contendo 100µg de PM_{2.5}.

A segunda fase deste trabalho objetivou a avaliação dos efeitos cardiopulmonares agudos do PM_{2.5}, sobre parâmetros hematológicos e histológicos de 38 ratos que receberam randomicamente as seguintes soluções:

- e) FB - Filtro Branco (n=12), solução obtida pela ultra-sonicação de um filtro branco submerso em água destilada;
- f) PM 100 (n=13), solução obtida pela ultra-sonicação do filtro contendo PM submerso em água destilada, contendo 100µg de PM_{2.5};
- g) PM 500 (n=13), solução obtida pela ultra-sonicação do filtro contendo PM submerso em água destilada, contendo 500µg de PM_{2.5}.

3.3. Coleta e Análise das Partículas

Foi empregado um amostrador de grandes volumes (Hi-vol, Energética, Brasil) acoplado a um inlet (Tisch Environmental Inc., EUA) que permite a separação de partículas menores que 2,5 μm de diâmetro com um fluxo de 1,1 metros cúbicos por minuto, durante 24 horas. Nosso amostrador de partículas localiza-se no topo do telhado de nossa Faculdade de Medicina (aproximadamente a 15 metros acima do nível do solo), a qual situa-se circundada por avenidas de tráfego intenso. O $\text{PM}_{2,5}$ foi coletado em filtros de fibra de vidro, que foram secos durante 24 horas, a 50° C, antes e após a coleta das partículas para pesagem. As partículas foram coletadas no mês de Setembro de 2003.

A determinação dos elementos traço do material coletado foi realizado nos filtros através de análise por ativação de nêutrons. Amostras do filtro, bem como elementos padrão, foram realizados sob fluxo térmico de nêutrons através de um reator nuclear (IEA-R1) durante 0,5 minuto por 16 horas. Após o tempo adequado de decaimento, as amostras irradiadas e os padrões foram medidos usando um detector hiper-puro Ge acoplado a um analisador multicanal. As concentrações elementares foram calculadas através de método comparativo. Os filtros brancos foram analisados usando as mesmas condições experimentais adotadas para as análises das amostras dos filtros de PM. A concentração dos elementos medidos nos filtros brancos foi subtraída dos valores obtidos nos filtros de PM, para obter sua concentração líquida. A contribuição do filtro branco também foi

subtraída dos resultados que foram expressos como função do volume de ar coletado. A determinação do conteúdo de Enxofre foi realizada através da análise de Fluorescência de Raios-X, usando também a parte não-exposta dos filtros como "branco".

3.4. Extração dos Filtros para Instilação Traqueal

Após 24 horas da coleta das partículas, preparou-se uma suspensão aquosa dos filtros. Devido a dificuldades inerentes de remoção das partículas diretamente dos filtros de fibra de vidro, sub-componentes do PM foram extraídos em água destilada, via agitação em ultrasonicador, durante 8 horas. Obteve-se uma eficiência de extração de 79%, sendo determinada através do peso inicial (antes da extração) e final (após a extração) dos filtros, após secá-los em estufa a 50° Celsius durante 24 horas.

3.5. Instilação Traqueal

Os ratos foram anestesiados com 3% de pentobarbital sódico na concentração de 50mg/Kg de peso corpóreo, via intra-peritoneal. Após este procedimento, foram submetidos a intubação traqueal através de

um laringoscópio pediátrico adaptado e um tubo de polietileno 16G, funcionando como um tubo endotraqueal. 1 mL de cada solução teste foi injetada vagarosamente, em três fases inspiratórias separadas, através de uma seringa acoplada ao tubo endotraqueal. Os animais tiveram um período de recuperação entre as instilações, desde que foi induzido um reflexo de apnéia em cada tempo.

3.6. Aquisição de Dados Eletrocardiográficos e Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca

Após a intubação traqueal, realizou-se o ECG através da conexão de eletrodos em agulhas previamente inseridas no espaço subcutâneo do animal, nas seguintes posições: uma derivação retrocordial (dorso do animal) e quatro derivações periféricas (patas dianteiras e traseiras). Este procedimento foi realizado em animais previamente anestesiados com pentobarbital sódico 3% (50mg/kg).

O aparelho de ECG utilizado é da empresa TEB - *Tecnologia de Engenharia Brasileira*®, que foi desenvolvido para a utilização em humanos (Figura 3). O *software* e cabos para aquisição do sinal foram padronizados e adaptados para a utilização em roedores. Os sinais são filtrados, amplificados, digitalizados (500 Hz) e armazenados em um microcomputador.

Para a avaliação da FC e da VFC, realizou-se o registro do ECG durante 5 minutos consecutivos para cada período de análise. Considerando que os nossos animais apresentam FC acima de 200 batimentos por minuto, foram analisados no mínimo, 1000 batimentos. Os intervalos R-R foram determinados manualmente. A FC, calculada como a média do intervalo recíproco batimento a batimento, e o desvio padrão dos intervalos R-R normais (SDNN), foram calculados imediatamente antes (medida pré-instilação), 30 e 60 minutos após a instilação traqueal. Os animais foram levados ao biotério após a recuperação da consciência.

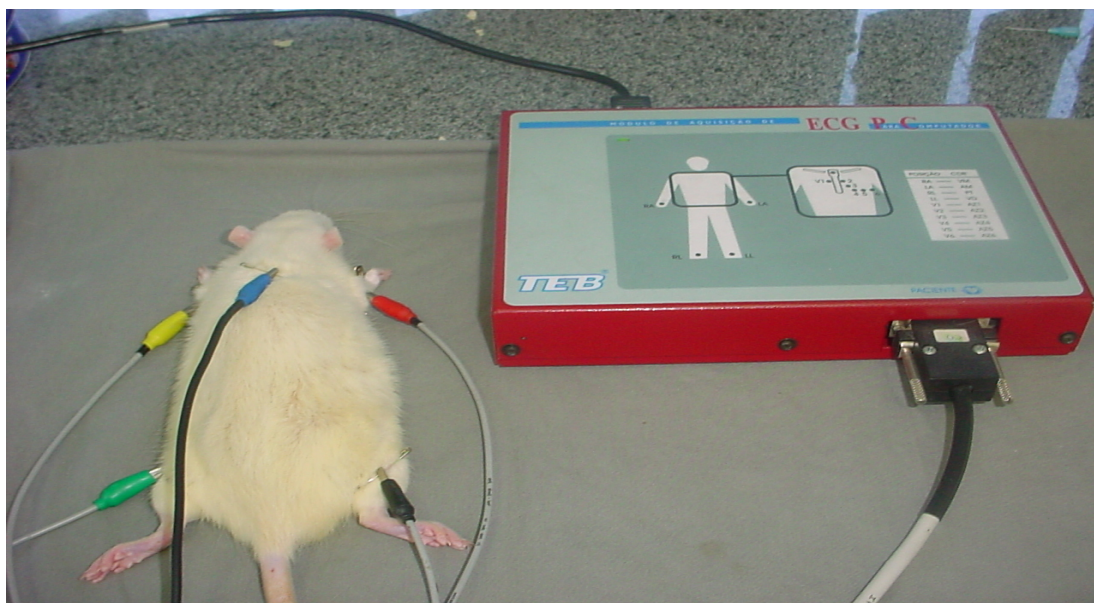


Figura 3. Registro eletrocardiográfico com as 4 derivações periféricas e 1 derivação retro-cordial

3.7. Análise Hematológica

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico 3% (50mg/kg, intra-peritoneal), após 24 horas de instilação traqueal. Amostras de sangue foram coletadas através da punção da aorta abdominal e foram acondicionadas em tubos EDTA K3 para hemograma e contagem de reticulócitos. Contagens completas de células vermelhas, plaquetas e células brancas foram feitas em um Analisador Hematológico. Para a determinação dos reticulócitos, todo o sangue foi diluído com um corante fluorescente (thiazole orange), o qual é específico para ácidos nucléicos (Corberand, 1996). Depois de 25 segundos, a solução foi examinada com um aparelho de *laser* óptico, que fornece a porcentagem total dos reticulócitos contados. Além disso, coletaram-se amostras de sangue em frascos contendo citrato de sódio para a determinação do fibrinogênio, do tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA) e do tempo de protrombina (TP).

3.8. Histologia e Morfometria

Após a coleta de sangue procedeu-se a eutanásia dos animais via secção total da aorta abdominal. O coração foi isolado e fixado por 48 horas em solução de formol tamponado (10%). Antes da fixação em formol tamponado, retirou-se uma secção transversal para a determinação

da razão peso seco/úmido. Após a fixação, o coração foi cortado em três secções paralelas transversais de 2 mm aproximadamente, em ambas as câmaras ventriculares.

O pulmão esquerdo foi isolado e fixado durante 24 horas pela instilação intratraqueal de solução de formol tamponado 10%, através de uma pressão constante de 20 cm de água. Após a fixação, realizou-se uma secção transversal na entrada do brônquio principal esquerdo. Os cortes de coração e pulmão foram embebidos em parafina e foram processados conforme procedimentos histológicos rotineiros. Cortes de aproximadamente 5 μm de espessura foram preparados e corados com Hematoxilina e Eosina.

As lâminas histológicas foram codificadas para estudo mascarado. A histopatologia descritiva foi realizada em todas as secções amostradas. Em secções transversais dos ramos de artérias coronárias, mediu-se quantitativamente a razão entre as áreas de lúmen e parede (L/P). A razão L/P pulmonar foi medida em cortes transversais de arteríolas peribronquiolares (adjacentes ao bronquíolo terminal), localizadas na transição de troca gasosa das vias aéreas e nas arteríolas intra-acinares. O corte transversal dos vasos foram definidos como aqueles que possuem uma variação entre o diâmetro máximo e mínimo $\leq 10\%$. As medidas morfométricas foram realizadas em aumento de 400 vezes, usando um procedimento padrão de contagem de pontos através de um sistema de teste coerente de 100 pontos e 50 linhas contidas em um quadrado de 10.000 μm^2 . A razão L/P foi determinada ajustando a artéria inteira

dentro dos limites do quadrado e quantificando o número de pontos incidentes no lúmen ou na parede do vaso. As áreas do lúmen e parede arteriolares foram então calculadas conforme as equações (1) e (2):

$$(1) \text{ Área luminal} = \text{número de pontos incidentes no lúmen} \times 100$$

$$(2) \text{ Área da parede} = \text{número de pontos incidentes na parede} \times 100$$

Após as medidas, as arteríolas pulmonares e miocárdicas foram categorizadas pelo tamanho, de acordo com a área do lúmen.

3.9. Razão Peso Seco/Úmido

A severidade do edema pulmonar e cardíaco foi avaliada pela razão peso seco/úmido. O lobo pulmonar inferior direito inteiro e um corte transversal do coração, incluindo os dois ventrículos, foram colocados em uma placa de Petri e foram imediatamente pesados em balança analítica para obter o peso úmido. Logo após, cada espécime foi mantido a 50°C por 72 horas para obter o peso seco. A razão peso seco/úmido foi calculada da seguinte forma:

$$(3) \text{ razão peso seco/úmido} = (\text{peso úmido} - \text{peso seco}) / \text{peso úmido}$$

3.10. Análise Estatística

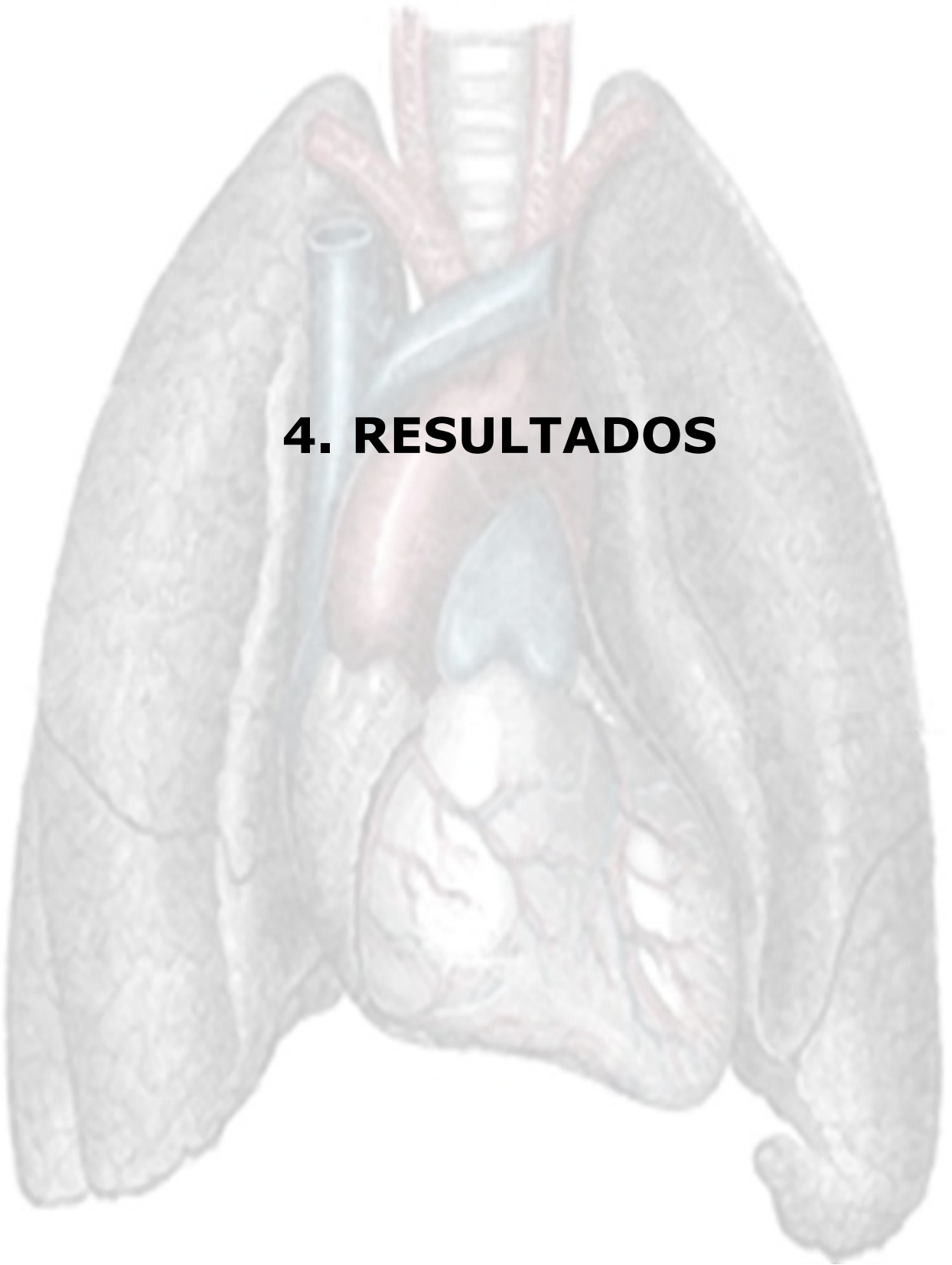
Inicialmente foram feitas medidas descritivas para todos os grupos e variáveis analisadas. A seguir, foi aplicado o teste de homogeneidade das variâncias (heteroscedasticidade) e o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para avaliar se as variáveis seguiam uma distribuição normal e homogênea.

A significância dos resultados eletrocardiográficos foram determinados através de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas. Foi utilizado o método de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls. Foram utilizadas transformações logarítmicas para estabilizar a variância das variáveis dependentes.

Para os dados morfométricos dos vasos pulmonares e coronarianos, testamos a significância dos resultados através de modelos lineares generalizados, usando como variável dependente tanto os valores absolutos como as categorias da razão L/P. Como variáveis preditivas, consideramos termos categóricos para tratamento (filtro branco, 100 e 500 μg do $\text{PM}_{2.5}$) e três indicadores do tamanho dos vasos avaliados, bem como o termo de interação entre tratamento e tamanho. O termo indicador para o tamanho do vaso foi incluído porque é esperado um aumento da razão L/P na medida que a luz do vaso aumenta.

Para os parâmetros hematológicos, a significância dos resultados foi determinada utilizando-se análise de variância (ANOVA) para analisar

as diferenças entre os grupos. Desde que houve um grau significativo de heteroscedasticidade em várias variáveis analisadas, consideramos novamente como variável dependente nos modelos de ANOVA, tanto os valores absolutos como as categorias de cada parâmetro medido. Utilizamos o teste de comparações múltiplas de *Bonferroni* quando as diferenças estatisticamente significativas foram detectadas pela ANOVA. O nível de significância estabelecido foi de 5%. O pacote estatístico empregado foi o SPSS versão 10.0 para Windows.



4. RESULTADOS

4.1. FASE I

4.1.1. Análise das Partículas

Os valores da composição elementar medidos pela análise de ativação de nêutrons e fluorescência de Raio-x (enxofre) estão descritos na Tabela 3. Em geral, as concentrações de enxofre, bromo, cobalto e manganês no ar da cidade de São Paulo, são maiores que os valores relatados em outros locais como Los Angeles, New Jersey, Virginia, Boston and Phoenix, com exceção do ferro (Prahalad e cols., 1999, Harrison e Yin, 2000).

Tabela 3 – Composição elementar da concentração das partículas de PM2.5

<i>Elementos</i>	<i>Valores (%)</i>
Enxofre*	3.05
Arsênio	0.30
Bromo	0.21
Cloro	2.09
Cobalto	2.65
Ferro	2.67
Lantânio	5.42
Manganês	0.64
Antimônio	0.21
Escândio	3.25
Tório	8.14

* Fluorescência de Raio-X

4.1.2. Eletrocardiograma

Pode-se observar na Figura 4 o traçado eletrocardiográfico do rato anestesiado na fase pré-instilação. A Tabela 4 apresenta os valores da estatística descritiva da FC para todos os grupos experimentais e períodos de análise. A FC diminuiu significativamente ($p < 0.001$) com tempo, refletindo provavelmente o relaxamento dos animais após a manipulação. Não foi observado efeito de tratamento ou interação entre tempo e tratamento ($p = 0.836$ e $p = 0.102$, respectivamente). O SDNN diminuiu com o tempo ($p = 0.007$), e esse efeito não foi uniforme para todos os tratamentos, desde que uma interação significativa entre tempo e tratamento foi observada ($p = 0.025$).

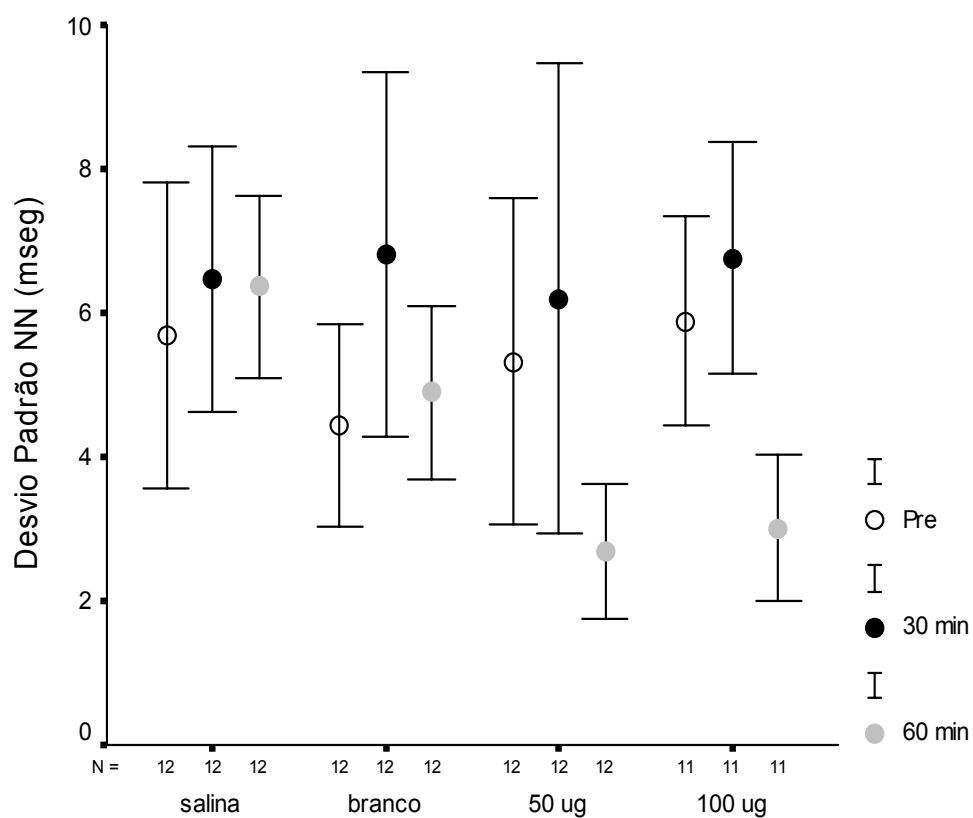
As análises de comparações múltiplas revelaram 2 subconjuntos: salina, filtro branco e 100 μg de $\text{PM}_{2.5}$, e o segundo subconjunto composto por filtro branco, 50 μg e 100 μg de $\text{PM}_{2.5}$. Animais que receberam salina não exibiram alterações substanciais de SDNN ao longo do período de estudo, enquanto aqueles submetidos a instilação de $\text{PM}_{2.5}$ mostraram uma diminuição significativa após 60 minutos. Nenhuma diferença aparente foi observada nos animais que receberam doses diferentes de $\text{PM}_{2.5}$ (Gráfico 1). A suspensão aquosa de filtro branco não parece ser totalmente inerte, desde que a flutuação do SDNN durante o estudo retorna ao estado basal ao final das observações. O efeito do tratamento foi marginalmente significativo ($p = 0.052$). Os valores individuais encontram-se em no item Anexos.

Tabela 4 – Estatística descritiva (média e desvio padrão) da frequência cardíaca para todos os grupos e períodos de análise

		FC Pré	FC 30 min	FC 60 min
Salina	Média	382,16	370,43	364,06
	Desvio Padrão	11,38	16,83	16,84
Filtro Branco	Média	397,08	351,97	325,17
	Desvio Padrão	11,24	11,47	16,28
50 µg	Média	381,06	347,46	360,24
	Desvio Padrão	1,39	11,61	14,07
100 µg	Média	385,45	346,85	354,37
	Desvio Padrão	9,08	12,33	15,26

**Figura 4.** Traçado eletrocardiográfico do rato anestesiado

Gráfico 1. Média e desvio padrão dos valores do SDNN em função do grupo (salina, filtro branco, 50 μ g e 100 μ g), nos tempos (Pré), 30 e 60 minutos após a instilação. SDNN diminuiu com o tempo ($p=0.007$) e houve uma interação significativa entre tempo e tratamento ($p=0.025$)



4.2. FASE II

4.2.1. Análise Hematológica

Os parâmetros hematológicos quantificados foram: eritrócitos, hematócrito, segmentados, bastonetes, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, reticulócitos, plaquetas, fibrinogênio, TP e TTPA. Os valores descritivos estão discriminados na Tabela 5. Houve um aumento significativo de reticulócitos em ambas as doses de PM_{2.5} ($p < 0.05$). Os níveis percentuais do hematócrito aumentaram significativamente para o grupo PM 500 em relação ao grupo FB ($p = 0.04$). Os níveis de segmentados e neutrófilos diminuíram significativamente no grupo PM 100 em relação ao grupo PM 500 ($p = 0.03$), enquanto que o nível de linfócitos aumentou para o grupo PM 100 em relação ao PM 500 ($p = 0.02$).

Os parâmetros remanescentes não exibiram alterações significativas. Da mesma forma, não houveram diferenças nas quantificações de plaquetas, TP e TTPA. Houve uma diminuição significativa dos níveis de fibrinogênio nos animais que receberam 100 µg em relação ao FB ($p = 0.01$). Os valores individuais encontram-se em no item Anexos.

Tabela 5 – Estatística descritiva (média e desvio padrão) das células sanguíneas e fatores de coagulação em animais expostos ao filtro branco, 100 µg e 500 µg de PM_{2.5}.

	Grupos					
	Filtro Branco		PM100		PM500	
	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
Eritrócitos (milhões/mm ³)	7,88	,50	8,01	,41	8,10	,50
Hematócrito (%) ^a	40,69	2,00	42,76	2,64	43,62	1,77
Segmentados(%) ^b	19,17	14,81	14,15	10,94	27,00	14,97
Bastonetes (%)	1,54	,99	1,62	1,66	1,08	,28
Linfócitos (%) ^b	72,75	14,11	79,62	11,89	67,31	14,21
Monócitos (%)	3,25	1,96	3,23	2,45	3,77	3,11
Eosinófilos (%)	,67	,78	,69	,63	,85	1,14
Basófilos (%)	,00	,00	,00	,00	,00	,00
Neutrófilos (%) ^b	23,33	14,30	16,46	9,82	28,08	15,16
Reticulócitos (%) ^c	3,25	,46	3,73	,71	3,93	,93
Plaquetas (mil/mm ³)	833,9	132,2	799,0	98,96	878,7	216,0
Fibrinogênio ^d (mg/dl)	397,5	9,40	353,8	48,94	386,2	36,76
Tempo de Protrombina (s)	23,55	1,99	24,40	1,41	24,58	1,35
Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (s)	30,50	10,76	27,35	8,19	34,16	11,58

(a) FB diferente do PM500 (p=0.04)

(b) PM100 diferente do PM500 (p<0.05)

(c) FB diferente de ambas as doses de PM (p<0.05)

(d) PM100 diferente do FB (p=0.01)

4.2.2. Histopatologia e Morfometria

As alterações pulmonares observadas nos três grupos podem ser visualizadas na Figura 5. Animais submetidos a concentrações de PM 100 e PM 500 desenvolveram inflamação pulmonar aguda no tecido alveolar, caracterizado pelo recrutamento de neutrófilos e macrófagos na transição entre o bronquíolo terminal e o território de troca gasosa com o envolvimento do parênquima alveolar periférico. Embora não tendo quantificado as alterações inflamatórias pulmonares, as análises histológicas mostraram um padrão dose-dependente de inflamação alveolar, sendo mais pronunciada no grupo PM 500. Observou-se também um aumento do número de células inflamatórias nos tecidos conectivos peri-brônquicos e peri-vasculares nos dois grupos. Não houve evidência de inflamação miocárdica nos grupos estudados.

O gráfico 2 representa os resultados da razão L/P mensurados nas arteríolas pulmonares intra-acinares, agregadas pelo tamanho do vaso e exposição. Observou-se uma diminuição significativa da razão (L/P) de animais expostos a ambas concentrações de partículas ($p < 0.001$). Adicionalmente, a diminuição da razão (L/P) foi diferente entre os animais que receberam a maior dose (500 μ g) em comparação com aqueles que receberam a menor dose (100 μ g) ($p = 0.002$).

O gráfico 3 representa a razão (L/P) mensurada nas arteríolas adjacentes ao bronquíolo terminal (peri-bronquiolares). O grupo PM 500 apresentou uma diminuição significativa da razão (L/P), para todos os tamanhos arteriolares, em relação ao grupo FB e PM 100 ($p < 0.001$). As alterações arteriolares estão ilustradas na Figura 5.

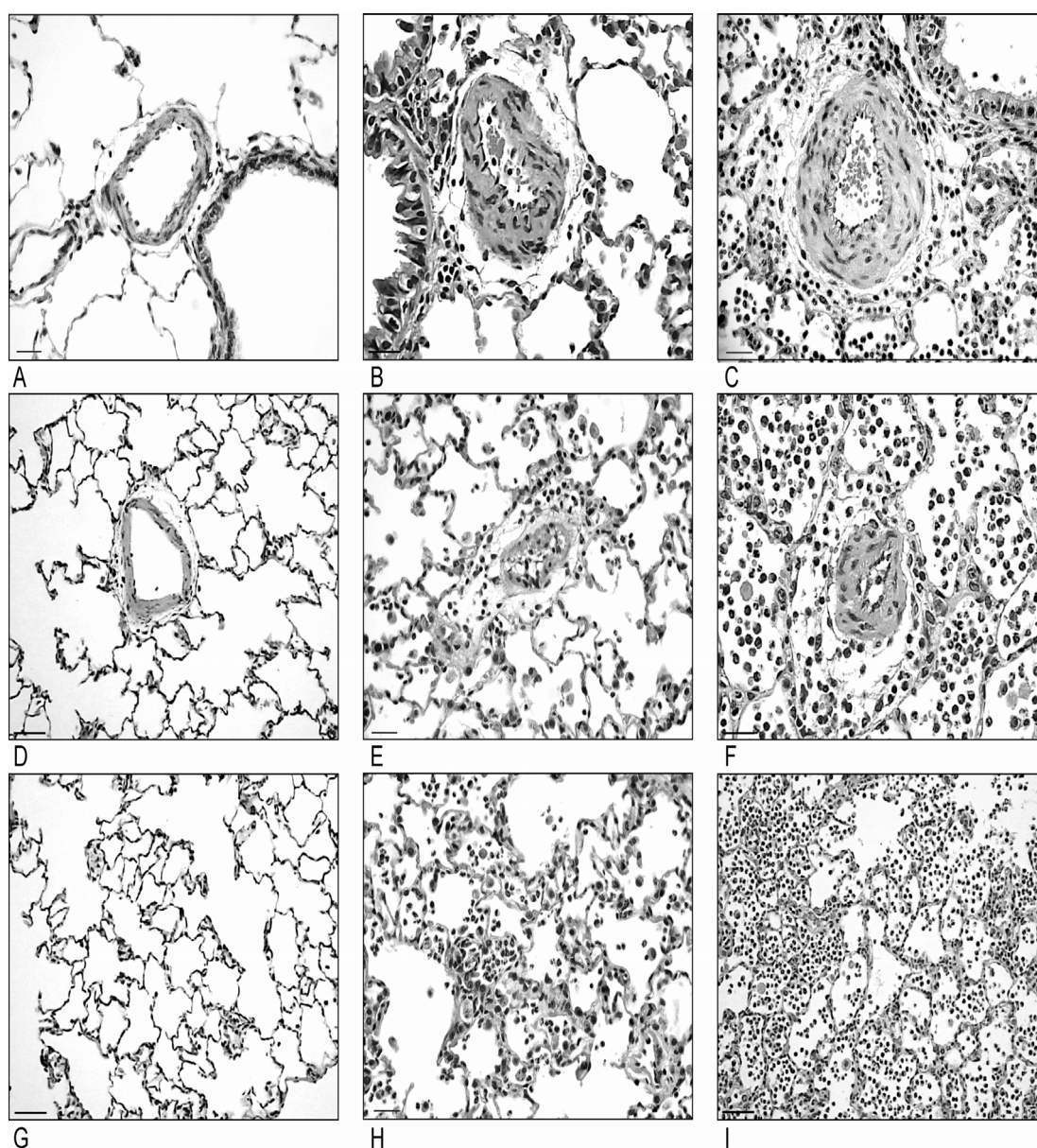


Figura 5. Fotomicrografias do tecido pulmonar dos grupos Filtro Branco (A, D e G), PM100 (B, E e H) e PM500 (C, F e I). A a C: Arteríolas peri-bronquiolares com diminuição da razão L/P no grupo PM500 (C), secundário a vasoconstrição. D a F: Arteríolas intra-acinares com vasoconstrição e diminuição da razão (L/P) em ambos grupos PM100 (E) e PM500 (F) comparado ao Filtro Branco (D). Note a inflamação periarteriolar nos grupos expostos ao PM. G a I: Inflamação alveolar aguda em ambos grupos expostos ao PM (H and I), sendo mais pronunciada nos animais expostos a maior dose (I). Escala em A, D, G e I = 50 μ m. Escala em B, C, E, F e H = 25 μ m.

Gráfico 2. Média e desvio padrão dos valores da razão lúmen/parede das arteríolas pulmonares intra-acinares nos três grupos (Filtro Branco, 100 μg e 500 μg de $\text{PM}_{2.5}$). A razão L/P diminuiu significativamente nos grupos que receberam PM (100 e 500 μg) em relação ao filtro branco ($p < 0.001$). Adicionalmente, a razão L/P foi diferente entre PM500 e PM100 ($p = 0.002$).

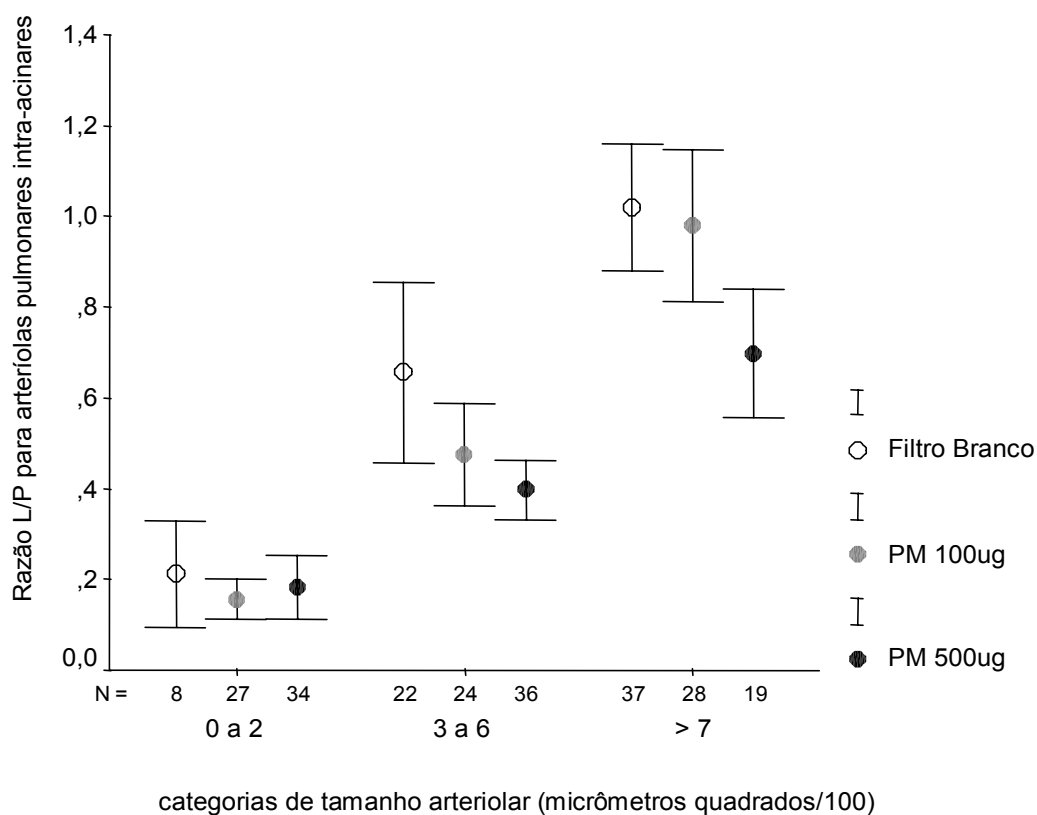
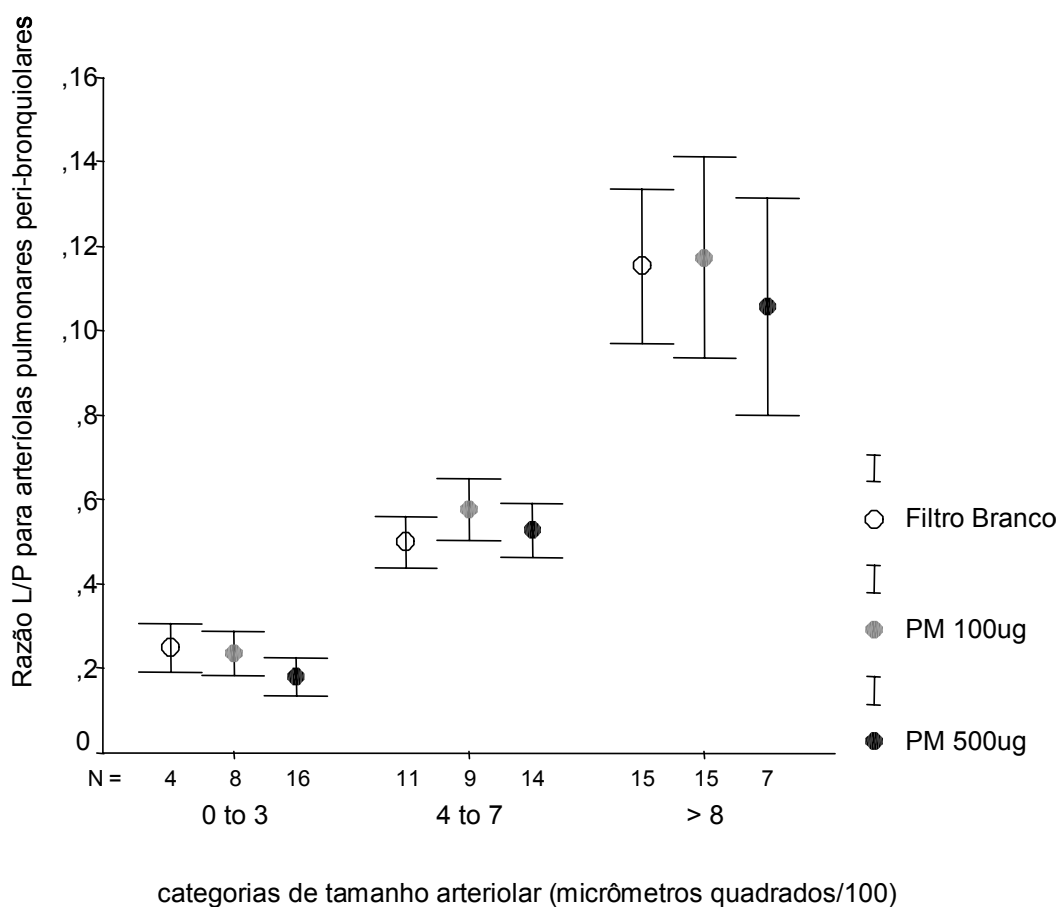
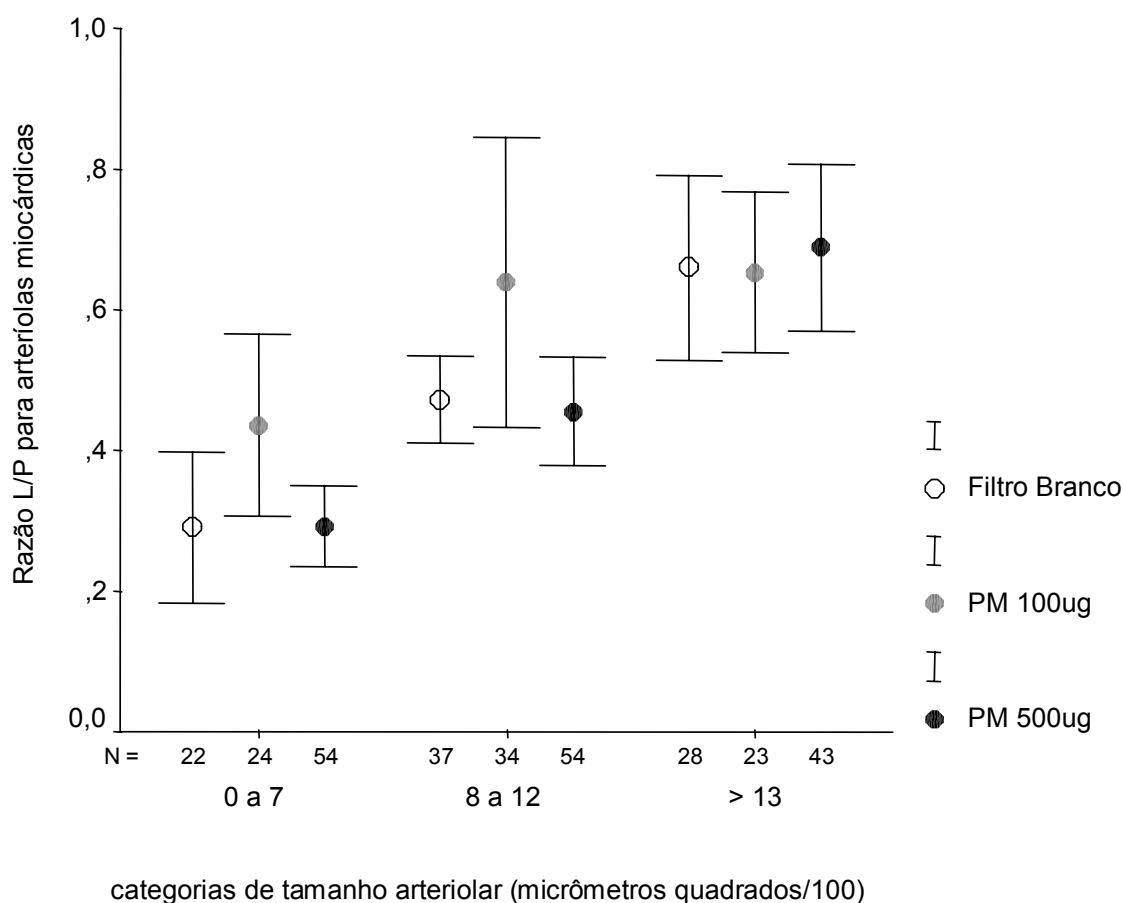


Gráfico 3. Média e desvio padrão dos valores da razão lúmen/parede das arteríolas pulmonares peri-bronquiolares nos três grupos (Filtro Branco, 100 µg e 500 µg de PM_{2.5}). A razão L/P diminuiu significativamente no grupo PM500 quando comparado ao Filtro Branco e PM100 ($p < 0.001$).



O gráfico 4 apresenta os resultados da razão (L/P) mensurada nas arteríolas miocárdicas. Não foi observada diferença entre os três tratamentos empregados.

Gráfico 4. Média e desvio padrão dos valores da razão lúmen/parede das arteríolas miocárdicas nos três grupos (Filtro Branco, 100 µg e 500 µg de PM_{2.5}). Não foi observada diferença entre os grupos.



Os valores individuais encontram-se em no item Anexos.

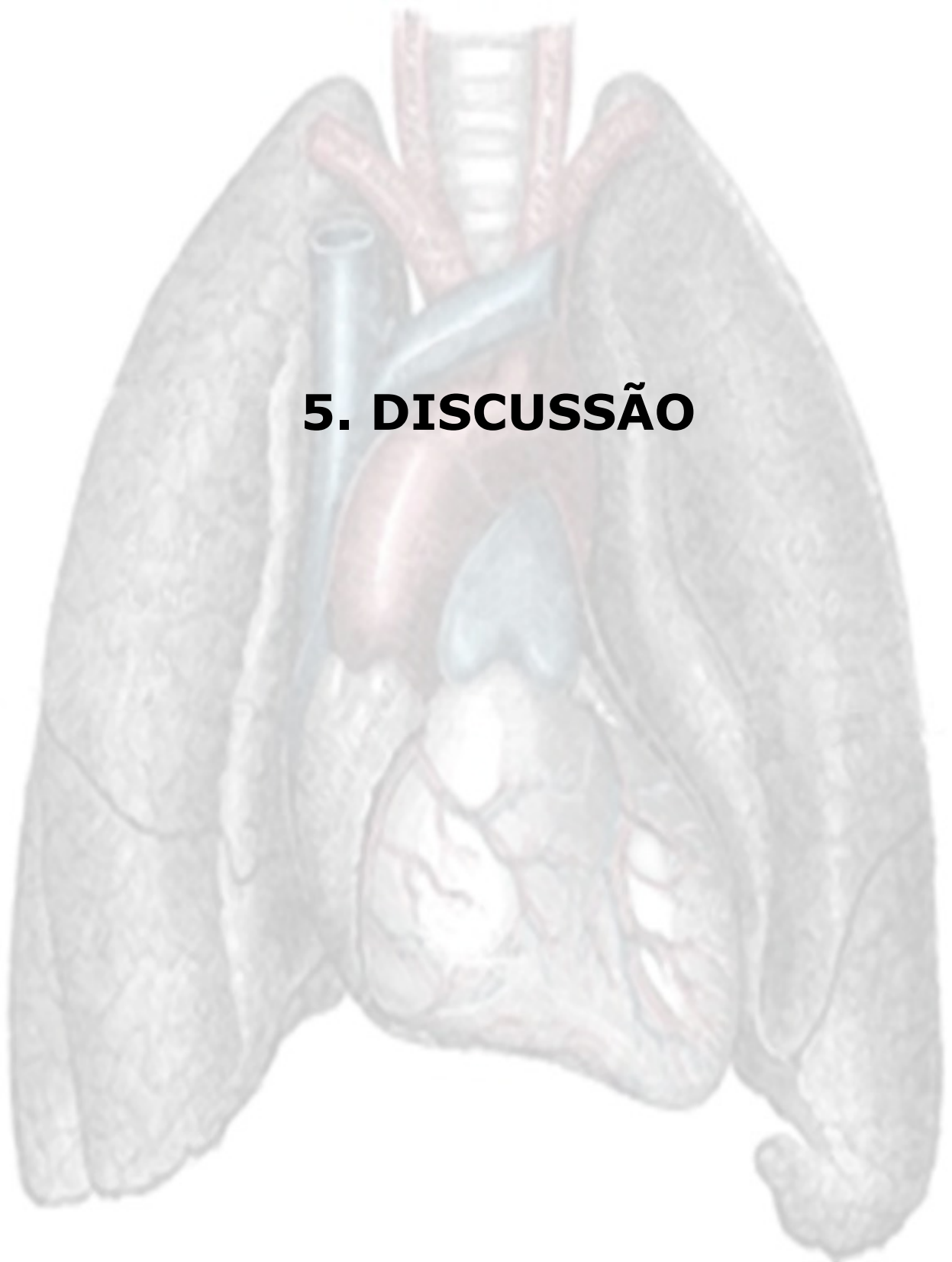
4.2.3. Razão Peso Seco/Úmido

A tabela 6 mostra os resultados da razão peso seco/úmido pulmonar e cardíaco. Houve um aumento significativo desta relação somente no coração, em animais que receberam a maior dose de PM (500 µg) quando comparado aos outros tratamentos ($p < 0.001$). Os valores individuais encontram-se em no item Anexos.

Tabela 6 – Média e desvio padrão da razão peso seco/úmido no pulmão e coração de animais expostos ao filtro branco, 100 µg e 500 µg de PM_{2.5}.

Grupos	Razão Peso seco/úmido	
	Pulmão	Coração
Filtro Branco	0.81 ± 0.02	0.86 ± 0.03
PM100	0.81 ± 0.02	0.84 ± 0.05
PM500	0.81 ± 0.06	0.87 ± 0.04 *

* $p < 0.001$ comparado ao Filtro Branco e PM100 µg



5. DISCUSSÃO

O modelo de desenvolvimento focado na industrialização, com sua forma de produção e organização do trabalho, a concentração populacional nas cidades, as interações sociedade/natureza, a exploração intensa dos recursos naturais trazendo à tona a questão dos seus limites de renovação, causou, ao longo dos anos, impactos sociais e ambientais responsáveis por desequilíbrios perceptíveis a todos os habitantes do planeta.

A maior parte da energia consumida no planeta vem das chamadas fontes sujas, principalmente petróleo e carvão mineral. Além da contribuição pela emissão de material particulado e outros compostos, também favorecem a elevação dos níveis de CO₂ na atmosfera, responsável pelo efeito estufa e outros riscos ambientais. Na lista de grandes geradores de energia e de problemas ambientais também estão as hidrelétricas. Elas são, teoricamente, uma fonte limpa. Mas, além de alargarem e desestruturarem complexos ambientais, são emissoras de metano, um gás com poder de retenção de calor 21 vezes maior que o do dióxido de carbono.

Pode-se concluir que o declínio ambiental não é produto de pobreza ou de riqueza, mas sim do tipo de atividade humana. De qualquer forma, estamos caminhando para avanços significativos quanto a tomada de

consciência de que as decisões individuais, sejam elas referentes a alimentação, transporte público, hábitos e etc. refletem o modo “saudável ou não” de vida em escala global.

O hábito de fumar é o exemplo recente de uma política de limitação que venceu o apelo consumista da indústria do cigarro. Neste aspecto, a Organização Mundial de Saúde restringiu drasticamente a publicidade, marketing, patrocínio de eventos e advertiu sobre seus malefícios. O mesmo não acontece com a indústria do automóvel como comentado por Feldmann recentemente: *“No caso dos automóveis, dada a relevância da indústria automobilística na economia mundial e o seu significado para as pessoas individualmente, torna-se muito difícil operar soluções no âmbito das instituições globais ora existentes”* (Fábio Feldmann – *Meio Ambiente no Século 21*).

Dentre as características da cidade de São Paulo, está o alto congestionamento de suas vias e a poluição do ar, principalmente nos meses de inverno com o fenômeno da inversão térmica. Cabe aqui um questionamento: Como introduzir uma mentalidade voltada a preservação e qualidade do ar em uma sociedade que depende de uma economia consumista para continuar existindo? Como podemos deixar de almejar o carro do ano com seus inúmeros itens que de tão desnecessários induzem ao vício do conforto? Ao meu ver, deveria haver um esforço no sentido de informar o consumidor sobre o impacto de suas escolhas, seja positivo ou negativo.

Atualmente, uma das metas do LPAE é estudar os fatores que favorecem a morbidade e mortalidade cardiovascular pela exposição ao ar poluído das grandes cidades. Neste contexto, a cidade de São Paulo ofereceu a vantagem de dar subsídios em forma de matéria-prima aos nossos estudos: as partículas que poluem sua atmosfera.

O mecanismo fisiopatológico da associação entre mortalidade cardíaca e poluição do ar não é conhecido ainda. Segundo Zareba e cols. 2001, a morte cardíaca é consequência de uma atuação recíproca complexa entre o sistema nervoso autônomo, mediando o controle do sistema cardiovascular, um substrato miocárdico (que pode ser alterado no processo patológico das doenças) e a vulnerabilidade miocárdica levando a uma resposta arritmogênica ou isquêmica (Figura 6).

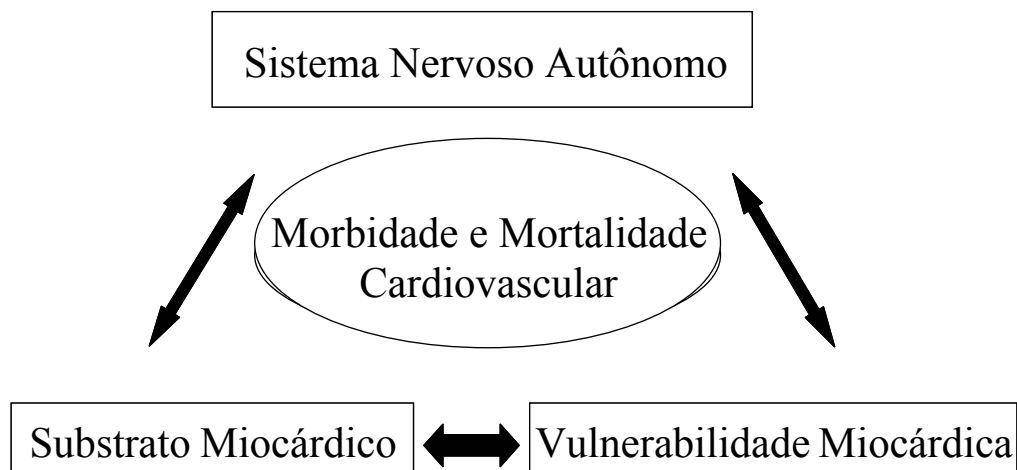


Figura 6. Representação esquemática de Zareba e cols., 2001

Segundo este autor, a presença de um único fator não é suficiente para desencadear a morte. Neste caso, a poluição do ar pode induzir uma cascata de eventos pelo aumento da ativação simpática, que pode alterar o substrato miocárdico ou aumentar a sua vulnerabilidade, ocasionando taquiarritmias ventriculares, agravamento da isquemia, aumento de viscosidade sanguínea, ICC e morte. Neste contexto, o monitoramento de parâmetros eletrocardiográficos e marcadores sanguíneos pode refletir os componentes “chave” da mortalidade cardíaca.

A diminuição da VFC é um marcador de risco de mortalidade em pacientes com problemas cardíacos, principalmente IAM (Kleiger e cols., 1987; Vaishnav e cols., 1994; Carney e cols., 2001; Sosnowski e cols., 2002) e ICC (Boveda e cols., 2001), além do risco aumentado de morte súbita (La Rovere e cols., 2003; Galinier e cols., 2000). A importância fisiológica das alterações da VFC não está totalmente compreendida, porém, é reconhecido o papel da disfunção autonômica na mortalidade cardiovascular, onde as medidas da VFC fornecem indicadores quantitativos e bem definidos da função autonômica cardíaca (Task Force, 1996). Estas informações foram importantes para alavancar estudos epidemiológicos e experimentais com a proposta de elucidar os mecanismos responsáveis pela associação da poluição do ar com a morbi-mortalidade cardiovascular.

Nossos resultados indicam que a medida da VFC total (SDNN) foi mais sensível para detectar as alterações cardíacas causadas pela instilação do PM_{2.5}. Como demonstrado no Gráfico 1, o SDNN começou a

diminuir rapidamente 30 minutos após a instilação traqueal. De fato, devido as limitações do estabelecimento de nosso experimento – gravações de ECG utilizando eletrodos ao invés de telemetria – não foi possível acompanhar as alterações no SDNN por longos períodos de tempo. Esta informação poderia ser valiosa quanto a magnitude e duração das alterações no SDNN. O mesmo resultado (uma diminuição rápida e aguda no SDNN) foi previamente observado em ratos com IAM expostos a rofa (residual oil fly ash) (Wellenius e cols., 2002). No presente estudo, avançamos no sentido de demonstrar que a diminuição no SDNN pode acontecer com as partículas finas em “mundo real” e com animais saudáveis.

Alguns estudos epidemiológicos também demonstraram que níveis elevados de $PM_{2.5}$ alteram o balanço do sistema nervoso autônomo e favorecem a diminuição da VFC na exposição ocupacional (Magari e cols., 2001) e, em idosos (Gold e cols., 2000) principalmente aqueles com desordens cardíacas prévias (Liao e cols., 1999).

O estudo de Pope e colaboradores, conduzido no Vale de Utah (E.U.A) em 1999, utilizou o monitoramento eletrocardiográfico de sete indivíduos durante 29 dias, durante e após episódios de poluição elevada, somente avaliando material particulado menor que $10\ \mu m$ (PM_{10}). Neste estudo, um aumento de $100\ \mu g/m^3$ foi associado a uma diminuição de 18 ms no SDNN após 24 horas. Gold e colaboradores em 2000, na cidade de Boston, demonstraram que um aumento de $PM_{2.5}$ nas quatro horas prévias à prática de exercícios físicos foi associado a um declínio em 24

ms em ambos SDNN e r-MSSD de indivíduos com idade entre 53 a 87 anos. Os dados na literatura ainda são limitados a respeito da associação da VFC e material particulado fino, no entanto, eles indicam que em algumas populações ou condições patológicas específicas, essa poluição particulada pode influenciar o ajuste da VFC e ocasionar a morte.

Em nosso estudo, a FC não mostrou-se um parâmetro sensível para caracterização dos efeitos do PM_{2.5} no período de tempo avaliado. Os estudos de instilação em roedores com rofa mostraram que, excluindo o período de bradicardia que ocorre imediatamente após a instilação, alterações na FC ocorrem somente após longos períodos e com doses bem maiores que as doses empregadas neste estudo (Watkinson e cols., 2001; Campen, 2002). Em humanos, a elevação da FC durante a hospitalização tem sido preditivo de morte em pacientes com IAM (Hjalmarson e cols., 1990) e pode aumentar em episódios de poluição (Peters e cols., 1999).

Alterações inflamatórias pulmonares são relativamente evidentes em animais expostos ao PM_{2.5}, a ponto que foi possível distinguir as lâminas histológicas que pertenciam aos animais expostos e aos animais controles. Com o intuito de evitar uma interpretação tendenciosa, o patologista que conduziu os estudos histopatológicos descritivos não relatou seus achados e as lâminas codificadas foram entregues para avaliação morfométrica. Nossos achados estão de acordo com vários estudos prévios e confirmam totalmente o potencial inflamatório das partículas urbanas finas.

Observamos um estreitamento significativo da vasculatura pulmonar nos animais expostos ao $PM_{2.5}$, sendo este efeito mais proeminente nas arteríolas intra-acinares. Este resultado confirma um estudo prévio do nosso grupo de que a vasculatura pulmonar é alvo de partículas urbanas (Batalha e cols., 2002). Devido ao curto período de tempo entre a instilação e a avaliação (24 horas), é mais provável que o estreitamento da vasculatura pulmonar seja devido a constrição do que sendo dependente de um significativo remodelamento arteriolar. Nossos resultados sugerem que a exposição a partículas ambientais modifica o balanço entre vasoconstrição e vasodilatação a nível pulmonar. O endotélio é ativado por citocinas circulantes que induzem a produção de óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio e endotelinas nas paredes dos vasos, os quais são potentes constritores do músculo liso. Bouthillier e cols., 1998 mostraram aumento dos níveis de endotelina-1 no plasma de ratos após inalação de partículas urbanas, sugerindo a ativação dos mecanismos de vasoconstrição.

O conceito de que as partículas induzem constrição das arteríolas pulmonares é nova e abre novas possibilidades para o estudo do prejuízo cardíaco, pelo fato da constrição da vasculatura pulmonar levar a um aumento de sobrecarga cardíaca. O ventrículo com sobrecarga de pressão pode desenvolver hipertrofia em razão do aumento da resistência dentro da circulação pulmonar.

Dados epidemiológicos recentes indicam que pacientes com ICC estão entre aqueles com alta susceptibilidade aos efeitos da exposição à

poluição (Mann e cols., 2002). Em face aos nossos achados, a possibilidade de um aumento de carga ao ventrículo direito induzida pelas partículas poderá posteriormente deteriorar a performance cardíaca de indivíduos com ICC, explicando possivelmente um dos mecanismos relacionados à poluição e doenças cardíacas.

Torna-se importante enfatizar que um incremento de carga mecânica ao coração induz a um aumento de consumo de oxigênio pelas células cardíacas, predispondo ao desenvolvimento de hipóxia cardíaca em situações aonde a oferta de oxigênio aos cardiomiócitos é insuficiente. Hipóxia miocárdica é um evento que predispõe tanto ao IAM (Peters e cols., 2001) quanto arritmias (Peters e cols., 2000; Watkinson e cols., 1998), eventos relacionados à poluição relatados na literatura.

A inspeção da Figura 5 mostra que, embora haja pequena expansão do tecido conectivo perivascular e peribrônquico pelo edema intersticial, não observa-se edema intra-alveolar nos animais que receberam PM, mesmo com a maior dose. Este achado está em concordância com a observação de um aumento leve e insignificante da razão peso seco/úmido pulmonar, demonstrado na tabela 6. De fato, a magnitude do recrutamento celular inflamatório claramente pressupõe exudação de fluido para o espaço alveolar. Este achado é interessante e talvez esteja relacionado à composição peculiar de nossas partículas.

Infelizmente, não temos uma caracterização compreensiva da composição química das partículas empregadas neste estudo. Foram

medidos somente 11 elementos e não temos a informação sobre o material orgânico aderido ao PM. Assumindo que o conteúdo de enxofre está principalmente na forma de sulfato, os níveis deste componente em nossas amostras não estão muito altos. Considerando que nossa frota de veículos leves utiliza uma mistura de gasolina com 22% de etanol, é relativamente provável que o PM na nossa cidade contenha uma proporção significativa de compostos orgânicos voláteis (incluindo aldeídos) e nitratos. De fato, a composição das partículas mostrou influenciar a toxicidade *in vivo* (Costa e Dreher, 1997; Dreher e cols., 1997; Kodavanti e cols., 1998; Dye e cols., 2001; Campen e cols., 2001; Ghio e cols., 2002; Saldiva e cols., 2002; Schins e cols., 2004) e *in vitro* (Carter e cols., 1997; Prahalad e cols., 1999; Osornio-Vargas e cols., 2003; González-Flecha, 2004). É tentador especular que as características do cenário da nossa poluição determina a predominância de acúmulo celular nos pulmões de nossos animais. No entanto, a informação limitada sobre a composição de nossas partículas nos previne de delinear hipóteses mecanísticas e indica a necessidade de estudos futuros, provavelmente comparando nosso PM com amostras de locais com fontes diferentes de poluição.

Apesar da significativa inflamação pulmonar observada em nosso estudo, encontramos alterações de baixa intensidade em marcadores sanguíneos. Detectamos uma diminuição nos níveis de fibrinogênio, segmentados e neutrófilos nos ratos expostos a menor dose de PM_{2.5}. Uma explicação possível seria de que a baixa dose de partícula induziu

uma aderência transitória de neutrófilos na microvasculatura. No sangue que flui normalmente através das vênulas, os eritrócitos ficam confinados a uma coluna axial central, deslocando os leucócitos na direção da parede vascular. Acontece que no início do processo inflamatório ocorre a diminuição da velocidade de fluxo sanguíneo após a vasodilatação induzida pelos mediadores, e isto favorece a marginação dos leucócitos. Como o sistema da coagulação e a inflamação são processos intimamente relacionados, a baixa dose de PM_{2,5} também favoreceu o consumo de fibrinogênio, possivelmente pela ativação da trombina que é responsável pela clivagem do fibrinogênio solúvel circulante para gerar um coágulo insolúvel de fibrina. Estas alterações foram revertidas em altas doses, com a liberação de neutrófilos e fibrinogênio pela medula óssea e fígado, respectivamente.

Com respeito a esses achados, as alterações hematológicas observadas em nosso estudo são menos intensas que outros achados relatados em estudos prévios que demonstram aumentam dos níveis de fibrinogênio (Gardner e cols., 2000; Ghio e cols., 2000; Schwartz 2001). Encontramos resultados semelhantes em estudos prévios de nosso grupo. Medeiros e cols. em 2004, encontraram aumento nos níveis de fibrinogênio em animais submetidos a instilação de partículas residuais de óleo combustível (Medeiros e cols., 2004). Santos e cols. 2004, estudaram trabalhadores da CET-PMSP durante agosto de 2000 e agosto de 2001, com a monitorização de ECG, espirometria, marcadores sanguíneos inflamatórios e de coagulação. Os resultados relevaram que

concentrações elevadas de CO, SO₂ e PM₁₀ promovem a elevação do hematócrito, fibrinogênio, proteína C-reativa, velocidade de hemossedimentação, no tempo e na atividade de protrombina.

É possível que nosso PM_{2.5} contenha substâncias com baixa solubilidade e capacidade de alcançar a circulação sistêmica. No entanto, é notável que os reticulócitos aumentam após instilação de partículas. Estudos prévios (Tan e cols., 2000; Van Eeden e Hogg, 2002; Goto e cols., 2004; Medeiros e cols., 2004) também observaram que a medula óssea é responsiva a partículas inaladas. O número aumentado de reticulócitos talvez altere a viscosidade sanguínea, a qual pode contribuir com o aumento de carga ao coração, bem como favorecer a formação de coágulos sanguíneos. Resumindo, os resultados hematológicos sugerem que alterações de parâmetros sanguíneos induzidas pela inalação de partículas, participam na patogênese da gravidade de ICC e doenças isquêmicas do miocárdio associadas à poluição do ar.

Edema cardíaco foi observado nos animais que receberam a maior dose de PM_{2.5}. Os pulmões não exibiram tais alterações, sugerindo que a drenagem linfática pulmonar foi um mecanismo bastante eficiente. O edema cardíaco pode ocorrer como consequência de condições patológicas e fisiológicas severas (Geissler e Allen, 1998), porém, o desenho do nosso estudo não permite o esclarecimento desta patogênese. De qualquer maneira, a presença de edema cardíaco, avaliado 24 horas após a instilação de partículas, está coerente com a hipótese de que as partículas afetam o funcionamento cardíaco.

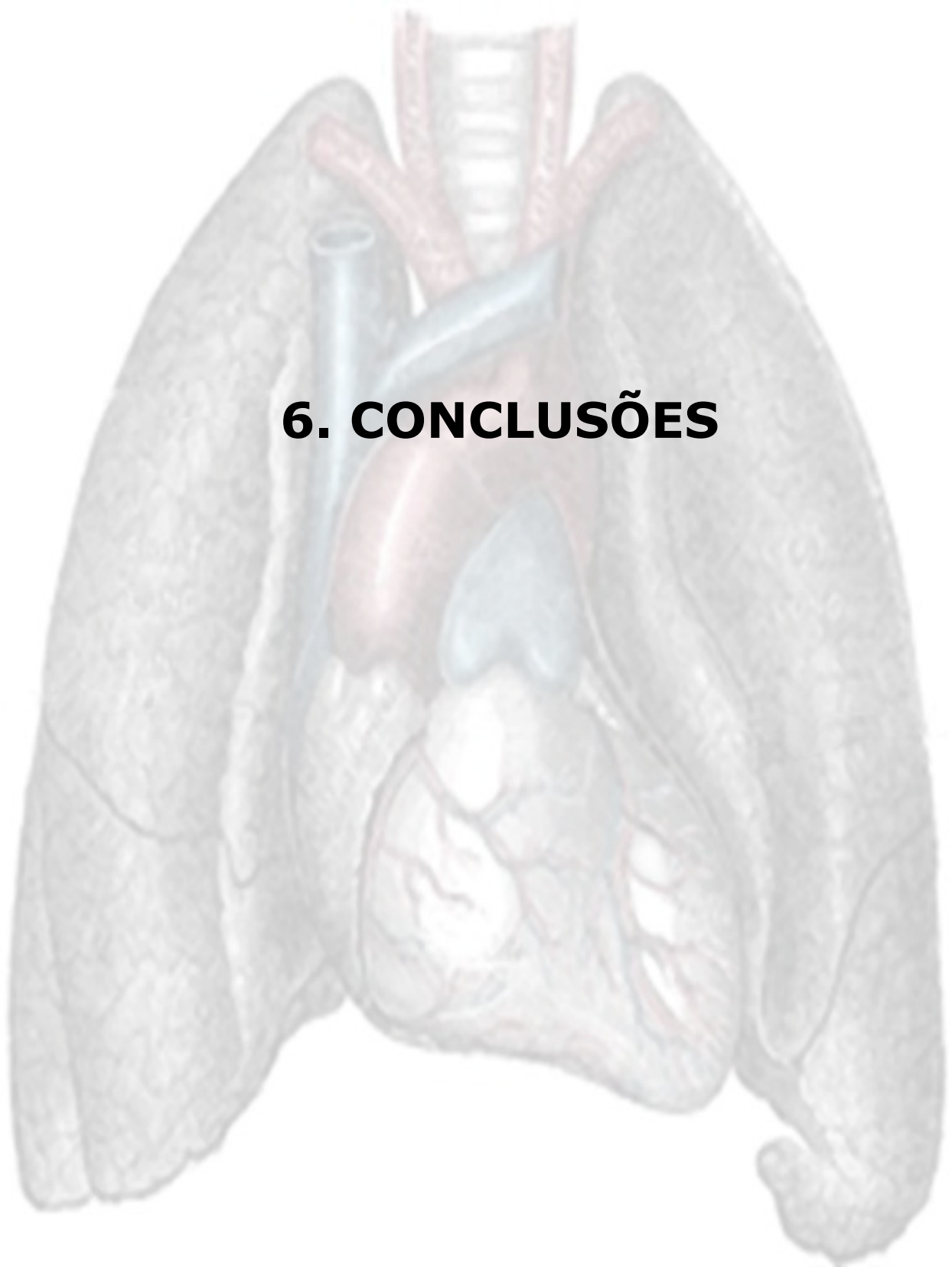
É importante caracterizar as limitações de nosso estudo com o objetivo de melhor avaliar sua real contribuição. Primeiro, a exposição ao PM_{2.5} foi através da instilação traqueal de uma suspensão aquosa ao invés de inalação, e, com uma dose superior da que seria esperada depositar nos pulmões em condições reais. Segundo, devido as partículas terem sido extraídas por sonicação em meio aquoso, nosso procedimento provavelmente favoreça a presença de componentes solúveis do PM_{2.5}, tais como metais de transição. Os estudos em humanos diferem dos estudos experimentais por avaliarem os efeitos da exposição crônica aos poluentes e os resultados estão sujeitos a presença de outras variáveis climáticas (temperatura, umidade, pluviosidade) e características inerentes a cada localidade como tráfego, fonte de partículas, geografia, dispersão dos ventos e etc..

Concluindo, a instilação da suspensão aquosa de PM_{2.5} induz a redução do SDNN e promove alterações pulmonares e cardíacas em ratos saudáveis, mesmo quando marcadores de inflamação sistêmica não são evidentemente alterados. A vasculatura pulmonar foi marcadamente afetada resultando em importante vasoconstrição. Observamos também que a medula óssea também participa da resposta aguda das partículas que atingem os pulmões. Os efeitos de VFC foram observados após 1 hora e em concentrações abaixo de 100 microgramas. Apesar das diferenças entre os procedimentos experimentais e o ambiente no qual os humanos vivem, nossos resultados fornecem argumentos a favor de

plausibilidade biológica de eventos cardíacos súbitos, associados com a exposição de partículas, relatados na literatura epidemiológica.

A totalidade dos resultados confirmam as conclusões de que as partículas finas da cidade de São Paulo afetam não somente os pulmões, mas também o coração. As evidências de que somente componentes específicos do material particulado fino ou interações entre as partículas estão envolvidos com as disordens cardiovasculares relacionados com a depressão do sistema nervoso autônomo, devem ser exploradas em estudos experimentais futuros.

Apesar do crescimento da consciência ambiental, vale considerar que a preocupação com o futuro ainda tem sido insuficiente para mudar o presente. Os novos valores de educação ambiental têm sido incapazes de alterar o modo de produção das tecnologias sujas em prol da qualidade de vida e saúde dos habitantes deste planeta. Cabe a nós, cientistas, principalmente aqueles que estudam os efeitos da poluição ambiental na saúde humana, continuar lutando para solucionar os mecanismos pelo qual a degradação ambiental atinge a saúde e bem-estar dos seres vivos e buscar alternativas para combatê-la.

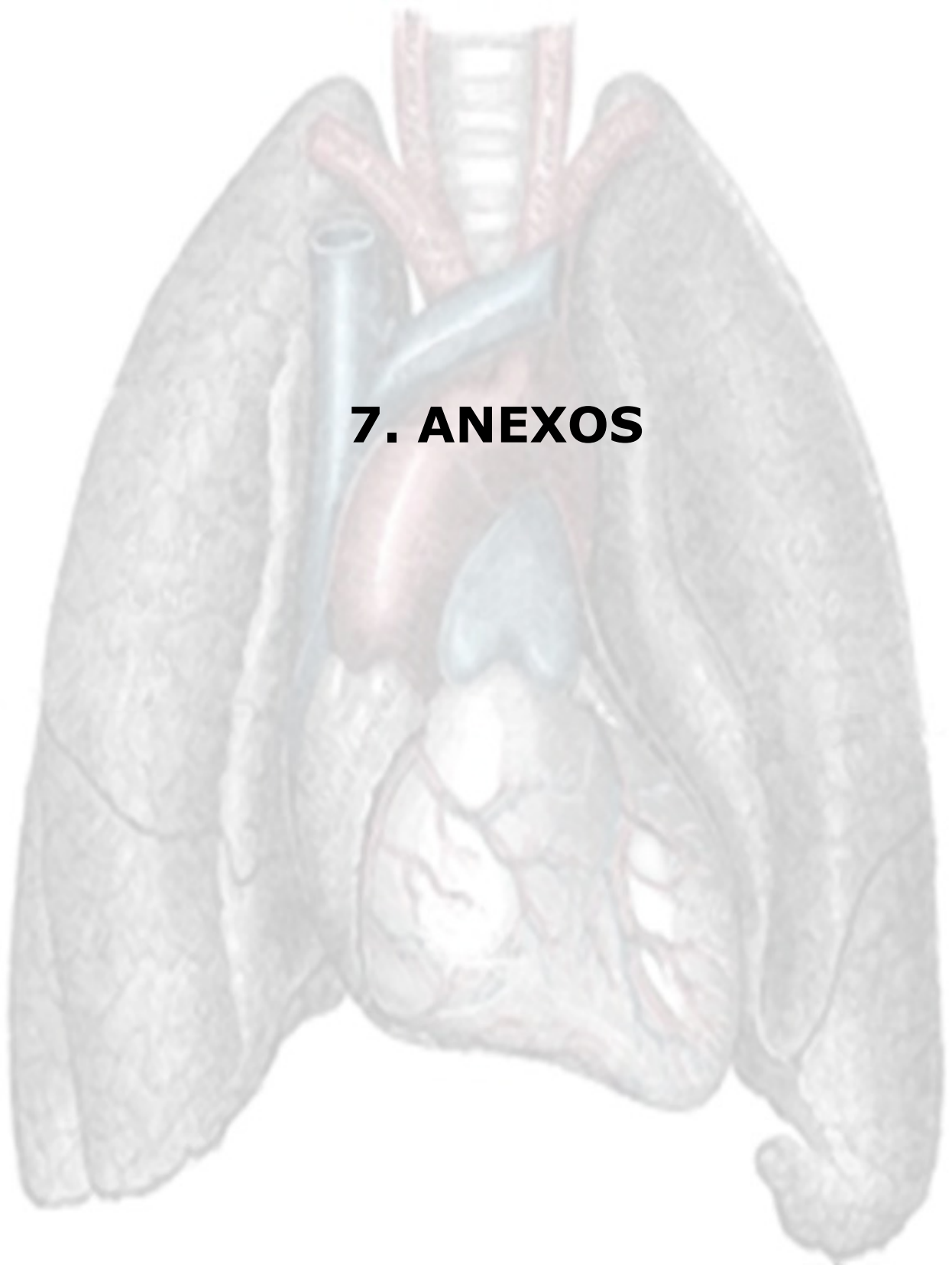


6. CONCLUSÕES

O presente trabalho permite concluir que o PM_{2,5} da cidade de São Paulo promove os seguintes efeitos em ratos saudáveis:

- ❖ **Eletrocardiográficos:** alteração do balanço do sistema nervoso autônomo através da diminuição da variabilidade da frequência cardíaca, nos animais que receberam ambas as doses de material particulado, após 60 minutos. A frequência cardíaca teve um comportamento similar nos animais controles e expostos;
- ❖ **Hematológicos:** diminuição nos níveis de fibrinogênio, segmentados e neutrófilos nos ratos expostos a menor dose de PM_{2,5} sugerindo alterações de coagulabilidade. A medula óssea é reativa ao PM_{2,5} pelo aumento significativo na percentagem de reticulócitos;

Histológicos: inflamação pulmonar significativa e dose-dependente com estreitamento significativo da vasculatura pulmonar, sendo este efeito mais proeminente nas arteríolas intra-acinares. Não constatamos a presença de edema pulmonar, porém a presença de edema cardíaco sugere que o funcionamento do coração foi prejudicado.



7. ANEXOS

7.1. Valores individuais de todos os parâmetros avaliados

Tabela 7 – Valores individuais e desvio-padrão da FC nos tempos pré, 30 e 60 minutos

Animal	Grupo	Fr. Pré	Fr. 30	Fr. 60	DesvioFreq.Pré	DesvioFreq.30	Desvio Freq.60
1	Salina	371,1	419,2	388,4	5,42	25,37	14,99
2	Salina	323,8	292,9	295,5	5,29	8,13	13,05
3	Salina	351,6	370,5	391,6	4,63	5,54	7,82
4	Salina	369,5	404	415,8	7,59	8,98	23,65
5	Salina	376,2	389,9	395,2	19,39	21,84	16,91
6	Salina	445,8	428,9	416,5	3,91	20,27	13,32
7	Salina	330,8	358,4	275,1	18,66	5,5	6,83
8	Salina	408,8	396,2	392,9	27,39	25,37	23,53
9	Salina	394,3	399	381,3	26,99	22,19	13,12
10	Salina	360,9	248,3	251,2	7,58	9,85	7,26
11	Salina	410,6	430,4	418,1	24,69	28,96	24,74
12	Salina	442,5	307,5	347,1	14,31	5,87	7,09
1	Filtro Branco	349,7	295,1	243,7	7,74	15,56	5,84
2	Filtro Branco	397,7	350,5	329,4	19,72	8,78	4,29
3	Filtro Branco	448,1	426,2	322,1	7,77	7,63	10,38
4	Filtro Branco	404,1	339	390,6	7,87	9,91	8,88
5	Filtro Branco	412,7	377,2	442,8	8,68	23,28	9,74
6	Filtro Branco	429	376,9	317,8	28,39	14,81	9,52
7	Filtro Branco	455,3	400,7	371,8	10,21	39,82	9,84
8	Filtro Branco	372,2	312,4	320,2	13,1	9,01	4,16
9	Filtro Branco	319,3	376,9	333,3	6,87	7,81	5,58
10	Filtro Branco	379,8	315,3	296,9	4,88	19,71	9,73
11	Filtro Branco	407,6	328,5	254,9	9,66	6,03	8,96
12	Filtro Branco	389,5	325	278,6	12,88	4,08	9,9
1	50 µg	399,9	369,4	399,3	29,93	5,04	2,96
2	50 µg	404,5	319,1	358,1	5,66	16,16	3,41
3	50 µg	392,3	389,4	433,8	15,77	28,6	6,11
4	50 µg	390,1	413,6	412,1	4,05	4,42	4,67
5	50 µg	281,9	357,6	353,3	10,35	9,38	3,2
6	50 µg	459,1	343,5	378,1	6,12	22,24	25,63
7	50 µg	383,1	361,7	369,8	29,72	41,28	10,71
8	50 µg	380,3	309,8	309,8	3,73	4,2	3,96
9	50 µg	368,1	300,6	284,1	4,64	8,57	12,16
10	50 µg	419,5	417,4	401,9	8,67	3,6	3,47
11	50 µg	358,1	336,3	398,1	13,41	38,98	9,24
12	50 µg	355,3	295,9	297,3	23,46	14,78	8,41
1	100 µg	380,9	392,7	373,4	15,27	21,02	15,96
2	100 µg	398	352,9	336,4	20,28	8,04	10,05
3	100 µg	406,3	377,2	300,7	20,93	8,94	4,66
4	100 µg	384,3	319,5	410,1	15,92	21,16	7
5	100 µg	413,8	264,7	270,8	6,1	7,46	3,39
6	100 µg	400,6	308	342,3	14	11,5	3,62
7	100 µg	344	325,8	385	19,41	16,28	26,34
8	100 µg	414	354,8	286,6	12,59	7,88	3,54
9	100 µg	400,9	356,1	384,3	0,5	13	3,36
10	100 µg	409,8	358,7	386,8	23,97	24,12	4,17
11	100 µg	359,5	428,8	448	8,27	13,19	11,41

Tabela 8 – Valores individuais e desvio-padrão dos intervalos RR nos tempos pré, 30 e 60 minutos.

Animal	Grupo	RR Pré	RR 30	RR 60	Desvio RR Pré	Desvio RR 30	Desvio RR 60
1	Salina	161,7	143,6	154,7	2,36	8,53	6,52
2	Salina	185,3	205	203,5	2,83	5,37	8,78
3	Salina	170,7	162	153,3	2,25	2,45	3,37
4	Salina	162,4	148,6	144,8	3,47	3,47	9,53
5	Salina	159,9	154,4	152,1	8,16	8,77	6,07
6	Salina	134,6	140,2	144,2	1,2	7,01	4,55
7	Salina	182	167,5	218,2	10,26	2,5	5,43
8	Salina	147,4	152,1	153,2	9,72	10,13	9,08
9	Salina	152,9	150,9	157,5	11,07	8,36	4,48
10	Salina	166,3	241,9	239,1	3,45	9,49	6,52
11	Salina	146,7	140,1	144	9,2	9,82	8,58
12	Salina	135,7	195,2	172,9	4,33	1,73	3,51
1	Filtro Branco	171,7	203,9	246,3	3,78	10,71	5,86
2	Filtro Branco	151,2	171,3	182,2	7,57	4,34	2,37
3	Filtro Branco	133,9	140,8	186,5	2,3	2,53	6,04
4	Filtro Branco	148,5	177,1	153,7	2,92	5,19	3,51
5	Filtro Branco	145,5	159,6	135,6	3,06	9,63	2,96
6	Filtro Branco	140,5	154,5	188,9	10,4	6,44	5,76
7	Filtro Branco	131,9	151,3	161,5	2,97	16,15	4,24
8	Filtro Branco	161,4	192,2	187,4	5,65	5,57	2,41
9	Filtro Branco	188	159,2	180,1	4,03	3,32	3,06
10	Filtro Branco	158	191	202,3	2,04	12,08	6,57
11	Filtro Branco	147,3	182,7	235,7	3,53	3,37	8,38
12	Filtro Branco	154,2	184,6	215,6	5,07	2,31	7,6
1	50 µg	164,7	162,5	150,3	7,05	2,22	1,15
2	50 µg	148,4	188,6	167,6	2,09	9,91	1,61
3	50 µg	153,2	137,2	138,3	6,2	0,83	1,96
4	50 µg	153,8	145,1	145,6	1,61	1,55	1,64
5	50 µg	213,1	167,9	169,9	7,7	4,43	1,6
6	50 µg	130,7	175,4	159,4	1,75	11,2	1,66
7	50 µg	157,6	168	162,4	13,13	18,37	4,49
8	50 µg	157,8	193,7	193,7	1,55	2,65	2,47
9	50 µg	163	199,8	211,6	2,1	1,3	5,2
10	50 µg	143,1	143,7	149,3	2,98	1,22	1,28
11	50 µg	167,8	179,4	150,8	6,28	10,19	3,52
12	50 µg	169,6	203,3	202	11,05	10,39	5,66
1	100 µg	192,6	186,4	183,2	7,2	3,7	2,6
2	100 µg	151,2	170,1	178,5	7,61	3,89	5,33
3	100 µg	148,1	159,2	199,6	7,61	3,77	3,1
4	100 µg	156,4	188,6	146,3	7,29	11,18	2,48
5	100 µg	145	226,9	221,6	2,12	6,6	2,78
6	100 µg	150	195,1	175,3	5,36	7,3	1,88
7	100 µg	174,5	184,6	156,6	9,89	8,78	1,73
8	100 µg	145,1	169,2	209,4	4,54	3,73	2,59
9	100 µg	149,7	168,7	156,1	3,19	6,29	1,35
10	100 µg	146,9	168	155,1	8,28	10,41	1,67
11	100 µg	167	140,1	134	3,83	4,35	3,37

Tabela 9 – Valores individuais dos parâmetros sanguíneos nos grupos FB, 100 e 500 µg de PM_{2.5}.

Animal	Grupo	eritrócito	hematócrito	leucócitos	segmentados	bastonetes
1	Filtro Branco	7,77	41,6	3,95	19	1
2	Filtro Branco	7,57	39,5	5,76	54	1
3	Filtro Branco	8,12	41,1	3,45	11	1
4	Filtro Branco	8,91	44,3	2,38	29	3
5	Filtro Branco	8,09	41,7	4,91	39	1
6	Filtro Branco	7,63	40,2	2,29	8	1
7	Filtro Branco	7,55	38,9	4,38	1	3,5
8	Filtro Branco	8,16	42,6	5,14	14	1
9	Filtro Branco	6,82	36,6	4,41	11	1
10	Filtro Branco	7,88	40,7	5,35	10	1
11	Filtro Branco	7,83	39,2	3,84	17	1
12	Filtro Branco	8,25	41,9	4,14	17	3
1	100 µg	8,21	44	2,82	7	1
2	100 µg	8,43	44,1	4,92	32	1
3	100 µg	8,51	46,4	4,12	10	1
4	100 µg	8,64	43,8	2,9	21	2
5	100 µg	8,03	45,6	2,83	17	1
6	100 µg	8,25	46,6	1,84	8	2
7	100 µg	7,61	40,9	1,55	1	7
8	100 µg	7,5	40,3	1,96	36	1
9	100 µg	8,04	43,8	3,83	2	1
10	100 µg	7,24	38,4	2,97	16	1
11	100 µg	7,84	40,4	4,2	10	1
12	100 µg	7,95	40,6	2,99	20	1
13	100 µg	7,92	41	3,8	4	1
1	500 µg	7,89	39,7	2,89	28	1
2	500 µg	8,06	42,2	4,8	13	1
3	500 µg	7,26	41,7	4,25	15	1
4	500 µg	8,47	42,9	5,34	38	1
5	500 µg	7,61	43,9	5,74	15	1
6	500 µg	7,73	44,4	3,52	62	2
7	500 µg	8,47	46,8	5,61	51	1
8	500 µg	7,77	43,9	3,82	20	1
9	500 µg	7,89	44,7	2,61	18	1
10	500 µg	8,54	43,2	6,13	28	1
11	500 µg	8,08	44,7	4,28	25	1
12	500 µg	9,22	45,2	3,76	22	1
13	500 µg	8,32	43,7	3,6	16	1

Tabela 9 – Valores individuais dos parâmetros sanguíneos nos grupos FB, 100 e 500 µg de PM_{2.5}.

Animal	Grupo	linfócitos	monócitos	eosinófilos	basófilos	neutrófilos	reticulócitos
1	Filtro Branco	76	2	2	0	20	4,1
2	Filtro Branco	44	1	0	0	55	3,6
3	Filtro Branco	85	2	1	0	12	3,3
4	Filtro Branco	65	3	0	0	32	3,1
5	Filtro Branco	53	5	2	0	40	2,8
6	Filtro Branco	86	4	1	0	9	3,5
7	Filtro Branco	60	4	0	0	36	3,7
8	Filtro Branco	82	2	1	0	15	3
9	Filtro Branco	80	8	0	0	12	3,2
10	Filtro Branco	88	1	0	0	11	3,1
11	Filtro Branco	79	3	0	0	18	2,4
12	Filtro Branco	75	4	1	0	20	.
1	100 µg	89	3	0	0	8	4,3
2	100 µg	56	10	1	0	33	2,5
3	100 µg	86	2	1	0	11	3,7
4	100 µg	71	5	1	0	23	3,8
5	100 µg	78	3	1	0	18	3,4
6	100 µg	88	2	0	0	10	2,5
7	100 µg	90	2	0	0	8	3,3
8	100 µg	58	4	1	0	37	3,4
9	100 µg	87	1	0	0	12	4,5
10	100 µg	81	1	1	0	17	4,4
11	100 µg	84	3	2	0	11	4,7
12	100 µg	74	5	0	0	21	3,7
13	100 µg	93	1	1	0	5	4,3
1	500 µg	67	4	0	0	29	3
2	500 µg	85	1	0	0	14	3,9
3	500 µg	81	3	0	0	16	5,7
4	500 µg	60	1	0	0	39	3,8
5	500 µg	75	9	0	0	16	3,7
6	500 µg	34	1	1	0	64	4,2
7	500 µg	44	3	1	0	52	4,4
8	500 µg	69	10	0	0	21	3,2
9	500 µg	76	2	3	0	19	3,1
10	500 µg	68	2	1	0	29	3,6
11	500 µg	69	5	0	0	26	5,8
12	500 µg	74	1	2	0	23	2,8
13	500 µg	73	7	3	0	17	3,9

Tabela 9 – Valores individuais dos parâmetros sanguíneos nos grupos FB, 100 e 500 µg de PM_{2.5}.

Animal	Grupo	plaquetas	fibrinogênio	TP	TTPA
1	Filtro Branco	744	370	23,1	24
2	Filtro Branco	831	432	22,6	24
3	Filtro Branco	928	388	23,1	24
4	Filtro Branco	639	403	24,2	24
5	Filtro Branco	828	341	25,8	41,4
6	Filtro Branco	1022	451	27,6	24
7	Filtro Branco	615	377	24,2	51,6
8	Filtro Branco	884	367	22,4	24
9	Filtro Branco	838	383	21,5	44
10	Filtro Branco	790	463	21	24
11	Filtro Branco	831	.	.	.
12	Filtro Branco	1057	.	.	.
1	100 µg	963	328	23,9	24
2	100 µg	560	485	23,5	45,2
3	100 µg	758	370	25,7	24
4	100 µg	746	388	28,1	46,4
5	100 µg	749	362	25,5	24
6	100 µg	758	338	24,4	24
7	100 µg	874	350	24,3	24
8	100 µg	813	352	23,4	24
9	100 µg	805	315	24,7	24
10	100 µg	827	287	24,1	24
11	100 µg	866	341	23,1	24
12	100 µg	909	330	22,7	24
13	100 µg	759	.	23,8	24
1	500 µg	259	409	25	24
2	500 µg	925	422	22,6	24
3	500 µg	835	367	25	44,4
4	500 µg	1137	338	24,7	52,7
5	500 µg	1066	397	22,6	51,8
6	500 µg	934	355	23,4	24
7	500 µg	927	439	23,5	36,1
8	500 µg	866	383	24,7	24
9	500 µg	766	330	24,9	43,1
10	500 µg	807	367	26,7	24
11	500 µg	1020	439	26,6	24
12	500 µg	842	415	25,3	37,8
13	500 µg	1039	360	.	.

Tabela 10 – Valores individuais da razão peso seco/úmido nos grupos FB, 100 e 500 µg de PM_{2.5}.

Animal	Grupo	Pulmão	Coração
1	Fitro Branco	0,8	0,82
2	Fitro Branco	0,78	0,85
3	Fitro Branco	0,79	0,84
4	Fitro Branco	0,79	0,82
5	Fitro Branco	0,88	0,9
6	Fitro Branco	0,83	0,84
7	Fitro Branco	0,83	0,86
8	Fitro Branco	0,82	0,86
9	Fitro Branco	0,82	0,89
10	Fitro Branco	0,82	0,88
11	Fitro Branco	0,82	0,9
12	Fitro Branco	0,81	0,9
1	PM 100µg	0,78	0,81
2	PM 100µg	0,78	0,78
3	PM 100µg	0,78	0,78
4	PM 100µg	0,79	0,78
5	PM 100µg	0,79	0,79
6	PM 100µg	0,85	0,87
7	PM 100µg	0,83	0,85
8	PM 100µg	0,82	0,85
9	PM 100µg	0,86	0,87
10	PM 100µg	0,83	0,85
11	PM 100µg	0,83	0,89
12	PM 100µg	0,82	0,9
13	PM 100µg	0,82	0,91
1	PM 500µg	0,82	0,93
2	PM 500µg	0,82	0,88
3	PM 500µg	0,81	0,91
4	PM 500µg	0,81	0,92
5	PM 500µg	0,81	0,89
6	PM 500µg	0,82	0,9
7	PM 500µg	0,81	0,94
8	PM 500µg	0,83	0,93
9	PM 500µg	0,81	0,94
10	PM 500µg	0,81	0,92
11	PM 500µg	0,82	0,89
12	PM 500µg	0,81	0,92
13	PM 500µg	0,81	0,9

Tabela 11 – Valores individuais dos índices morfométricos das arteríolas intra-acinares, peri-bronquiolares e arteríolas miocárdicas

rato	grupo	luz IA	parede IA	luz PB	parede PB	luz cor	parede cor	L/P IA	L/P PB	L/P cor
1	FB	6	7	3	7	12	12	0,86	0,43	1
1	FB	9	12	4	3	0,4	20	0,75	1,33	0,02
1	FB	3	8	8	20	12	20	0,38	0,4	0,6
1	FB	2	5	.	.	8	20	0,4	.	0,4
1	FB	5	2	.	.	32	44	2,5	.	0,73
1	FB	7	8	.	.	16	32	0,88	.	0,5
1	FB	4	7	.	.	12	16	0,57	.	0,75
1	FB	9	5	1,8	.	.
1	FB	6	7	0,86	.	.
1	FB	7	11	0,64	.	.
2	100ug	7	9	5	6	16	24	0,78	0,83	0,67
2	100ug	9	11	16	11	9	26	0,82	1,45	0,35
2	100ug	21	16	15	11	13	21	1,31	1,36	0,62
2	100ug	6	10	11	16	9	49	0,6	0,69	0,18
2	100ug	15	11	.	.	3	9	1,36	.	0,33
2	100ug	4	13	.	.	10	21	0,31	.	0,48
2	100ug	5	8	.	.	13	45	0,63	.	0,29
2	100ug	5	22	.	.	9	42	0,23	.	0,21
3	500ug	3	7	.	.	16	20	0,43	.	0,8
3	500ug	1	10	.	.	7	27	0,1	.	0,26
3	500ug	11	26	.	.	6	33	0,42	.	0,18
3	500ug	8	16	.	.	0,5
3	500ug	8	24	.	.	0,33
3	500ug	4	24	.	.	0,17
3	500ug	8	16	.	.	0,5
3	500ug	14	38	.	.	0,37
3	500ug	4	12	.	.	0,33
3	500ug	9	32	.	.	0,28
3	500ug	12	24	.	.	0,5
4	FB	4	13	13	19	16	36	0,31	0,68	0,44
4	FB	6	10	2	18	4	24	0,6	0,11	0,17
4	FB	1	5	.	.	11	34	0,2	.	0,32
4	FB	11	28	.	.	0,39
4	FB	10	28	.	.	0,36
4	FB	3	24	.	.	0,13
4	FB	6	30	.	.	0,2
4	FB	16	56	.	.	0,29
5	FB	21	10	16	9	2	4	2,1	1,78	0,5
5	FB	2	5	12	15	15	31	0,4	0,8	0,48
5	FB	10	10	.	.	20	44	1	.	0,45
5	FB	3	5	.	.	17	25	0,6	.	0,68
5	FB	13	7	.	.	10	14	1,86	.	0,71
5	FB	7	10	.	.	17	26	0,7	.	0,65
5	FB	8	11	.	.	6	5	0,73	.	1,2
5	FB	14	14	.	.	18	32	1	.	0,56

continua

continuação

rato	grupo	luz IA	parede IA	luz PB	parede PB	luz cor	parede cor	L/P IA	L/P PB	L/P cor
5	FB	10	40	.	.	0,25
5	FB	15	27	.	.	0,56
5	FB	12	20	.	.	0,6
5	FB	11	23	.	.	0,48
6	100ug	5	10	5	5	8	24	0,5	1	0,33
6	100ug	12	16	7	4	14	104	0,75	1,75	0,13
6	100ug	7	10	11	15	16	28	0,7	0,73	0,57
6	100ug	6	8	11	12	24	20	0,75	0,92	1,2
6	100ug	13	10	.	.	5	21	1,3	.	0,24
6	100ug	9	16	.	.	5	22	0,56	.	0,23
6	100ug	7	8	0,88	.	.
6	100ug	1	11	0,09	.	.
7	100ug	4	4	13	21	4	12	1	0,62	0,33
7	100ug	1	6	2	9	11	30	0,17	0,22	0,37
7	100ug	2	6	3	13	11	20	0,33	0,23	0,55
7	100ug	1	8	7	21	6	9	0,13	0,33	0,67
7	100ug	7	13	11	11	8	28	0,54	1	0,29
7	100ug	1	9	3	36	3	22	0,11	0,08	0,14
7	100ug	6	11	0,55	.	.
7	100ug	7	4	1,75	.	.
7	100ug	1	10	0,1	.	.
7	100ug	3	6	0,5	.	.
8	FB	1	15	6	16	4	9	0,07	0,38	0,44
8	FB	2	13	.	.	20	20	0,15	.	1
8	FB	5	12	.	.	36	20	0,42	.	1,8
8	FB	9	13	.	.	36	40	0,69	.	0,9
8	FB	6	18	.	.	40	24	0,33	.	1,67
9	FB	0	15	6	8	8	8	0	0,75	1
9	FB	5	11	10	17	8	12	0,45	0,59	0,67
9	FB	10	9	.	.	13	26	1,11	.	0,5
9	FB	9	15	.	.	10	27	0,6	.	0,37
9	FB	8	9	.	.	15	22	0,89	.	0,68
9	FB	10	27	.	.	0,37
9	FB	8	26	.	.	0,31
9	FB	8	32	.	.	0,25
9	FB	11	30	.	.	0,37
10	FB	5	9	4	11	10	17	0,56	0,36	0,59
10	FB	8	7	20	12	12	32	1,14	1,67	0,38
10	FB	4	7	5	11	28	44	0,57	0,45	0,64
10	FB	11	10	9	6	15	45	1,1	1,5	0,33
10	FB	15	10	.	.	3	27	1,5	.	0,11
10	FB	12	20	.	.	0,6
11	100ug	21	10	7	6	9	20	2,1	1,17	0,45
11	100ug	9	5	10	11	24	52	1,8	0,91	0,46
11	100ug	11	20	8	3	5	23	0,55	2,67	0,22
11	100ug	6	5	2	5	28	28	1,2	0,4	1
11	100ug	1	14	26	25	16	36	0,07	1,04	0,44

continua

continuação

rato	grupo	luz IA	parede IA	luz PB	parede PB	luz cor	parede cor	L/P IA	L/P PB	L/P cor
11	100ug	12	11	6	32	4	4	1,09	0,19	1
11	100ug	12	12	.	.	9	15	1	.	0,6
11	100ug	21	43	.	.	10	26	0,49	.	0,38
11	100ug	2	5	0,4	.	.
11	100ug	1	6	0,17	.	.
11	100ug	10	7	1,43	.	.
11	100ug	9	13	0,69	.	.
12	500ug	2	6	6	46	7	27	0,33	0,13	0,26
12	500ug	9	9	13	30	4	26	1	0,43	0,15
12	500ug	2	3	.	.	4	9	0,67	.	0,44
12	500ug	5	12	.	.	12	40	0,42	.	0,3
12	500ug	12	13	.	.	9	22	0,92	.	0,41
12	500ug	10	16	.	.	14	35	0,63	.	0,4
12	500ug	2	9	.	.	4	16	0,22	.	0,25
12	500ug	8	8	.	.	8	18	1	.	0,44
12	500ug	16	48	.	.	0,33
12	500ug	15	40	.	.	0,38
12	500ug	17	22	.	.	0,77
12	500ug	8	52	.	.	0,15
13	500ug	7	15	4	4	16	36	0,47	1	0,44
13	500ug	3	7	2	30	2	7	0,43	0,07	0,29
13	500ug	2	10	0	10	11	20	0,2	0	0,55
13	500ug	1	36	2	5	8	28	0,03	0,4	0,29
13	500ug	1	8	3	17	8	30	0,13	0,18	0,27
13	500ug	4	15	2	13	8	50	0,27	0,15	0,16
13	500ug	1	10	.	.	36	44	0,1	.	0,82
13	500ug	1	13	.	.	8	20	0,08	.	0,4
13	500ug	1	12	.	.	4	20	0,08	.	0,2
13	500ug	16	28	.	.	0,57
14	500ug	9	23	5	8	16	22	0,39	0,63	0,73
14	500ug	0	5	7	9	1	6	0	0,78	0,17
14	500ug	5	23	8	18	12	15	0,22	0,44	0,8
14	500ug	6	17	8	11	12	20	0,35	0,73	0,6
14	500ug	6	8	4	12	4	20	0,75	0,33	0,2
14	500ug	3	16	.	.	0,19
14	500ug	4	16	.	.	0,25
15	500ug	1	7	4	10	4	20	0,14	0,4	0,2
15	500ug	10	7	1	7	4	11	1,43	0,14	0,36
15	500ug	7	41	5	8	4	10	0,17	0,63	0,4
15	500ug	5	20	5	15	12	44	0,25	0,33	0,27
15	500ug	4	28	3	12	12	32	0,14	0,25	0,38
15	500ug	4	6	.	.	16	28	0,67	.	0,57
15	500ug	4	6	.	.	7	37	0,67	.	0,19
15	500ug	4	11	.	.	4	33	0,36	.	0,12
15	500ug	13	24	.	.	16	20	0,54	.	0,8
15	500ug	3	10	0,3	.	.
16	500ug	7	20	11	14	4	8	0,35	0,79	0,5

continua

continuação

rato	grupo	luz IA	parede IA	luz PB	parede PB	luz cor	parede cor	L/P IA	L/P PB	L/P cor
16	500ug	5	20	.	.	12	32	0,25	.	0,38
16	500ug	8	12	.	.	16	32	0,67	.	0,5
16	500ug	8	12	.	.	7	8	0,67	.	0,88
16	500ug	12	20	.	.	0,6
16	500ug	8	28	.	.	0,29
16	500ug	4	8	.	.	0,5
16	500ug	8	24	.	.	0,33
16	500ug	8	28	.	.	0,29
16	500ug	12	40	.	.	0,3
16	500ug	8	24	.	.	0,33
16	500ug	16	28	.	.	0,57
16	500ug	8	24	.	.	0,33
17	FB	7	11	5	23	6	20	0,64	0,22	0,3
17	FB	9	9	12	17	12	20	1	0,71	0,6
17	FB	9	10	9	8	8	13	0,9	1,13	0,62
17	FB	10	13	3	7	4	12	0,77	0,43	0,33
17	FB	10	7	.	.	16	24	1,43	.	0,67
17	FB	10	13	.	.	4	24	0,77	.	0,17
17	FB	19	14	.	.	20	28	1,36	.	0,71
17	FB	2	5	.	.	28	36	0,4	.	0,78
17	FB	14	15	.	.	16	36	0,93	.	0,44
17	FB	3	10	0,3	.	.
18	100ug	1	5	3	10	7	20	0,2	0,3	0,35
18	100ug	0	13	.	.	9	19	0	.	0,47
18	100ug	6	19	.	.	4	16	0,32	.	0,25
18	100ug	1	6	.	.	20	24	0,17	.	0,83
18	100ug	7	14	.	.	4	4	0,5	.	1
18	100ug	2	6	.	.	1	8	0,33	.	0,13
18	100ug	2	6	.	.	5	32	0,33	.	0,16
18	100ug	3	22	.	.	4	11	0,14	.	0,36
18	100ug	1	9	.	.	8	12	0,11	.	0,67
18	100ug	2	31	.	.	7	13	0,06	.	0,54
18	100ug	4	19	.	.	6	12	0,21	.	0,5
18	100ug	0	5	0	.	.
18	100ug	6	26	0,23	.	.
18	100ug	1	16	0,06	.	.
18	100ug	0	11	0	.	.
19	500ug	1	13	2	7	4	8	0,08	0,29	0,5
19	500ug	11	14	17	18	0	8	0,79	0,94	0
19	500ug	5	15	2	6	4	4	0,33	0,33	1
19	500ug	1	1	8	18	16	40	1	0,44	0,4
19	500ug	10	11	6	19	7	32	0,91	0,32	0,22
19	500ug	1	2	1	7	8	16	0,5	0,14	0,5
19	500ug	1	6	.	.	8	4	0,17	.	2
19	500ug	3	11	.	.	8	8	0,27	.	1
19	500ug	9	8	.	.	4	12	1,13	.	0,33
19	500ug	8	28	.	.	0,29

continua

continuação

rato	grupo	luz IA	parede IA	luz PB	parede PB	luz cor	parede cor	L/P IA	L/P PB	L/P cor
20	100ug	8	25	8	8	12	40	0,32	1	0,3
20	100ug	.	.	4	28	12	28	.	0,14	0,43
20	100ug	.	.	8	4	8	8	.	2	1
20	100ug	14	29	.	.	0,48
20	100ug	8	44	.	.	0,18
20	100ug	28	24	.	.	1,17
20	100ug	12	16	.	.	0,75
20	100ug	12	4	.	.	3
20	100ug	8	8	.	.	1
20	100ug	12	36	.	.	0,33
21	500ug	2	6	7	9	4	28	0,33	0,78	0,14
21	500ug	5	6	9	24	3	14	0,83	0,38	0,21
21	500ug	3	6	7	13	5	26	0,5	0,54	0,19
21	500ug	5	14	.	.	4	8	0,36	.	0,5
21	500ug	5	11	.	.	4	7	0,45	.	0,57
21	500ug	8	32	.	.	0,25
21	500ug	0	12	.	.	0
21	500ug	1	19	.	.	0,05
21	500ug	0	20	.	.	0
21	500ug	24	60	.	.	0,4
21	500ug	8	30	.	.	0,27
22	FB	10	10	8	10	4	12	1	0,8	0,33
22	FB	12	28	17	20	4	20	0,43	0,85	0,2
22	FB	6	8	4	4	8	24	0,75	1	0,33
22	FB	6	8	.	.	4	16	0,75	.	0,25
22	FB	12	11	.	.	8	16	1,09	.	0,5
22	FB	4	16	.	.	0,25
22	FB	8	20	.	.	0,4
22	FB	4	28	.	.	0,14
22	FB	8	20	.	.	0,4
22	FB	8	16	.	.	0,5
23	100ug	4	9	.	.	12	25	0,44	.	0,48
23	100ug	3	8	.	.	13	18	0,38	.	0,72
23	100ug	5	7	.	.	20	36	0,71	.	0,56
23	100ug	9	8	.	.	4	3	1,13	.	1,33
23	100ug	4	18	.	.	36	32	0,22	.	1,13
23	100ug	7	6	.	.	24	44	1,17	.	0,55
23	100ug	2	12	0,17	.	.
24	100ug	3	19	.	.	4	13	0,16	.	0,31
24	100ug	7	10	.	.	24	40	0,7	.	0,6
24	100ug	3	20	.	.	8	20	0,15	.	0,4
24	100ug	17	14	.	.	12	12	1,21	.	1
24	100ug	16	32	.	.	0,5
25	500ug	0	10	1	8	4	8	0	0,13	0,5
25	500ug	1	23	6	15	20	32	0,04	0,4	0,63
25	500ug	2	8	.	.	16	52	0,25	.	0,31
25	500ug	4	9	.	.	12	20	0,44	.	0,6

continua

continuação

rato	grupo	luz IA	parede IA	luz PB	parede PB	luz cor	parede cor	L/P IA	L/P PB	L/P cor
25	500ug	0	6	.	.	20	72	0	.	0,28
25	500ug	4	9	.	.	8	8	0,44	.	1
25	500ug	1	9	.	.	28	64	0,11	.	0,44
25	500ug	8	28	.	.	0,29
25	500ug	4	12	.	.	0,33
26	100ug	10	13	10	12	28	52	0,77	0,83	0,54
26	100ug	2	10	1	11	8	24	0,2	0,09	0,33
26	100ug	4	5	.	.	8	4	0,8	.	2
26	100ug	0	2	.	.	16	24	0	.	0,67
26	100ug	1	10	.	.	4	8	0,1	.	0,5
26	100ug	4	8	.	.	0,5
26	100ug	12	28	.	.	0,43
26	100ug	8	8	.	.	1
26	100ug	4	24	.	.	0,17
26	100ug	12	52	.	.	0,23
27	100ug	2	6	3	4	12	36	0,33	0,75	0,33
27	100ug	7	13	6	17	32	40	0,54	0,35	0,8
27	100ug	4	6	2	7	12	20	0,67	0,29	0,6
27	100ug	1	7	5	13	16	21	0,14	0,38	0,76
27	100ug	5	12	.	.	12	44	0,42	.	0,27
27	100ug	2	8	.	.	4	16	0,25	.	0,25
27	100ug	4	24	.	.	0,17
28	500ug	5	7	4	12	12	36	0,71	0,33	0,33
28	500ug	6	22	.	.	0,27
28	500ug	16	20	.	.	0,8
28	500ug	16	12	.	.	1,33
28	500ug	4	12	.	.	0,33
28	500ug	16	32	.	.	0,5
28	500ug	16	20	.	.	0,8
29	FB	14	7	2	2	4	8	2	1	0,5
29	FB	9	12	10	10	4	28	0,75	1	0,14
29	FB	11	16	5	8	20	32	0,69	0,63	0,63
29	FB	4	7	.	.	8	16	0,57	.	0,5
29	FB	5	5	.	.	8	25	1	.	0,32
29	FB	3	3	.	.	4	12	1	.	0,33
29	FB	7	15	.	.	4	24	0,47	.	0,17
29	FB	16	24	.	.	0,67
29	FB	16	32	.	.	0,5
30	500ug	2	8	1	23	12	40	0,25	0,04	0,3
30	500ug	1	4	1	13	4	20	0,25	0,08	0,2
30	500ug	3	10	.	.	4	24	0,3	.	0,17
30	500ug	10	14	.	.	8	20	0,71	.	0,4
30	500ug	6	20	.	.	4	12	0,3	.	0,33
30	500ug	6	11	.	.	8	48	0,55	.	0,17
30	500ug	1	6	.	.	20	48	0,17	.	0,42
30	500ug	2	11	.	.	24	32	0,18	.	0,75
30	500ug	2	9	0,22	.	.

continua

continuação

rato	grupo	luz IA	parede IA	luz PB	parede PB	luz cor	parede cor	L/P IA	L/P PB	L/P cor
30	500ug	2	26	0,08	.	.
31	500ug	1	7	3	7	16	8	0,14	0,43	2
31	500ug	9	18	3	5	32	52	0,5	0,6	0,62
31	500ug	6	13	4	19	36	56	0,46	0,21	0,64
31	500ug	14	25	.	.	8	32	0,56	.	0,25
31	500ug	2	15	.	.	8	28	0,13	.	0,29
31	500ug	3	16	.	.	9	20	0,19	.	0,45
31	500ug	0	16	.	.	0
31	500ug	11	22	.	.	0,5
31	500ug	4	20	.	.	0,2
31	500ug	16	48	.	.	0,33
32	FB	6	14	4	11	12	32	0,43	0,36	0,38
32	FB	6	15	.	.	12	20	0,4	.	0,6
32	FB	4	17	.	.	8	24	0,24	.	0,33
32	FB	7	9	.	.	16	56	0,78	.	0,29
32	FB	12	32	.	.	0,38
32	FB	20	56	.	.	0,36
33	500ug	1	9	2	16	16	12	0,11	0,13	1,33
33	500ug	3	25	.	.	8	28	0,12	.	0,29
33	500ug	3	17	.	.	8	32	0,18	.	0,25
33	500ug	2	14	.	.	4	16	0,14	.	0,25
33	500ug	24	28	.	.	0,86
33	500ug	8	12	.	.	0,67
33	500ug	4	36	.	.	0,11
33	500ug	16	8	.	.	2
33	500ug	12	20	.	.	0,6
33	500ug	12	24	.	.	0,5
33	500ug	4	12	.	.	0,33
33	500ug	17	17	.	.	1
33	500ug	4	20	.	.	0,2
33	500ug	4	16	.	.	0,25
33	500ug	8	16	.	.	0,5
34	FB	1	13	10	11	8	24	0,08	0,91	0,33
34	FB	8	17	5	6	4	8	0,47	0,83	0,5
34	FB	10	10	9	7	0	16	1	1,29	0
34	FB	19	15	7	8	8	32	1,27	0,88	0,25
34	FB	9	6	10	13	12	44	1,5	0,77	0,27
34	FB	16	28	.	.	0,57
35	500ug	0	5	.	.	24	28	0	.	0,86
35	500ug	6	15	.	.	4	16	0,4	.	0,25
35	500ug	3	18	.	.	4	4	0,17	.	1
35	500ug	3	9	.	.	12	16	0,33	.	0,75
35	500ug	3	17	.	.	20	24	0,18	.	0,83
35	500ug	6	7	.	.	16	48	0,86	.	0,33
35	500ug	4	12	.	.	0,33
35	500ug	4	13	.	.	0,31
35	500ug	4	24	.	.	0,17

continua

continuação

rato	grupo	luz IA	parede IA	luz PB	parede PB	luz cor	parede cor	L/P IA	L/P PB	L/P cor
35	500ug	20	24	.	.	0,83
36	100ug	3	10	8	9	4	5	0,3	0,89	0,8
36	100ug	12	10	10	8	16	48	1,2	1,25	0,33
36	100ug	1	5	.	.	8	4	0,2	.	2
36	100ug	12	36	.	.	0,33
37	500ug	3	7	.	.	8	16	0,43	.	0,5
37	500ug	0	8	.	.	20	52	0	.	0,38
37	500ug	24	28	.	.	0,86
37	500ug	8	16	.	.	0,5
37	500ug	8	12	.	.	0,67
37	500ug	20	40	.	.	0,5
37	500ug	20	28	.	.	0,71
37	500ug	12	24	.	.	0,5
37	500ug	16	40	.	.	0,4

7.2. Separatas dos artigos publicados

ARTICLE IN PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

 SCIENCE @ DIRECT®

Environmental Research ■■■■■

**Environmental
Research**

www.elsevier.com/locate/envres

PM_{2.5} induces acute electrocardiographic alterations in healthy rats[☆]

Dolores Helena Rodriguez Ferreira Rivero*, Carolina Sasaki, Geraldo Lorenzi-Filho, Paulo Hilário Nascimento Saldiva

Experimental Air Pollution Laboratory, Department of Pathology, School of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Received 18 August 2004; received in revised form 1 December 2004; accepted 6 December 2004

Abstract

There is evidence that changes of the autonomic control of the heart are among the potential mechanisms responsible for pollution-related cardiac mortality. The objective of this work is to assess the acute effects of urban particulate matter of $\leq 2.5 \mu\text{m}$ (PM_{2.5}) particles on heart rate (HR) and HR variability. Forty-seven healthy Wistar rats were anesthetized, submitted to tracheal intubation, and instilled with 1 mL of four different solutions: saline, blank filter, and 50 or 100 μg of PM_{2.5}. PM_{2.5} was collected in glass fiber filters using a high-volume sampler. Electrodes for obtaining electrocardiograms were implanted subcutaneously in a Lead II configuration. HR and the standard deviation of the intervals between normal beats (SDNN) were assessed immediately before and 30 and 60 min after instillation. HR decreased significantly ($P < 0.001$) with time, but no significant effect of treatment or interaction between time and treatment was observed. In contrast, there was a significant SDNN interaction between time and treatment ($P = 0.025$). The SDNN decreased 60 min after instillation with a PM_{2.5} of 50 and 100 μg . In conclusion, the injection of an aqueous suspension of PM_{2.5} induced a reduction of SDNN in healthy rats. The effect was observed 1 h after instillation and in a concentration of $< 100 \mu\text{g}$.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: PM_{2.5}; Electrocardiogram; Heart rate variability; Rats; Air pollution

1. Introduction

A series of recent studies have reported epidemiological associations between daily concentrations of air pollution and mortality (Laden et al., 2000; Pope et al., 1995; Schwartz et al., 2002) due to cardiovascular events (Dockery, 2001; Liao et al., 1999; Goldberg et al., 2001). Epidemiologic studies have shown a stronger association between cardiovascular deaths and air pollution

during the first 24 h after a pollution increase. Braga et al. (2001) recently showed that a $10\text{-}\mu\text{g}/\text{m}^3$ increase in particulate matter of $\leq 10 \mu\text{m}$ (PM₁₀) is associated with cardiovascular death on the same day of the pollution event. Furthermore, cardiac patients with implanted cardioverter defibrillators experience an increased risk of arrhythmias shortly after increases in air pollution (Peters et al., 2000).

Several cardiovascular effects have been documented in response to exposure to PM, including the disruption of autonomic nervous system activity by increased (Tarkiainen et al., 2003; Magari et al., 2002) and decreased heart rate variability (HRV) (Gold et al., 2000; Pope et al., 2004; Magari et al., 2001). Arterial vasoconstriction (Batalha et al., 2002; Brook et al., 2002), cardiac arrhythmias (Peters et al., 2000; Watkinson et al., 1998), and cardiac events including myocardial infarction (Peters et al., 2001), hospitalization

[☆]This work was made possible by the financial support of CNPq (the Brazilian Council of Research) and LIM-HCFMUSP (Institute of the Laboratories of Medical Investigation, Clinical Hospital, School of Medicine, University of São Paulo). The study was approved by the Ethics Committee of the School of Medicine, University of São Paulo.

*Corresponding author. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina USP, Av. Dr. Arnaldo 455, 1 andar sala 1226, Cerqueira César, 01246-903 São Paulo, SP, Brazil. Fax: + 55 11 30680072.

E-mail address: dohelena@usp.br (D.H.R.F. Rivero).

ARTICLE IN PRESS

2

D.H.R.F. Rivero et al. / Environmental Research ■ (■■■■) ■■■-■■■

(Lin et al., 2003; Schwartz, 1999), depression of the ST segment in coronary heart disease patients during exercise (Juha et al., 2002), and systemic and inflammatory changes have also been documented (Kodavanti et al., 1998; Schins et al., 2004; Saldiva et al., 2002).

There is evidence that changes of the autonomic control of the heart are among the potential mechanisms responsible for pollution-related cardiac mortality (Pope et al., 1999). Analysis of beat-to-beat HRV is one of the noninvasive methods to quantitatively assess cardiac autonomic activity and has been used in patients with a variety of cardiac and noncardiac diseases (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996). Low HRV is associated with a higher risk of all-cause mortality in survivors of an acute myocardial infarction (Sosnowski et al., 2002; Carney et al., 2001) and sudden death (La Rovere et al., 2003).

It has been suggested that $PM_{2.5}$, the fine component of particulate matter ($\leq 2.5 \mu m$), may mediate some of the adverse cardiac effects reported by epidemiologic studies (Seaton et al., 1995; Frampton, 2001; Utell and Frampton, 2000). However, the mechanisms of particle-induced cardiovascular damage are not yet defined. Information about the time course and specific constituents of $PM_{2.5}$ responsible for cardiac effects, including dose-response relationships, is still needed, either from human or animal studies. In this context, recent studies in rats have provided evidence that combustion-derived particles induce alterations of heart rhythm in animals with previous cardiovascular disease (Wellenius et al., 2002; Wichers et al., 2004).

We have continued this line of study, assessing whether the administration of urban $PM_{2.5}$ particles promotes alterations of detectable acute electrocardiogram (ECG) parameters such as heart rate (HR), standard deviation of the intervals between normal beats (SDNN), or disturbances of heart rhythm. To address these questions we used a single instillation of two concentrations of $PM_{2.5}$ in healthy adults Wistar rats.

2. Methods

2.1. Animals

Adult male Wistar rats (3 months of age) weighing ~ 250 g were obtained from the vivarium of the School of Medicine at the Universidade of São Paulo. They were maintained at 22–23 °C, controlled humidity, and a 12 h dark to 12 h light cycle. Food and water were available ad libitum.

2.2. Particle sampling and analysis

We employed a high-volume sampler (HIVOL, Energética, Brazil) coupled with an inlet (Tisch Envir-

onmental Inc., USA) that allows the separation of $PM_{2.5}$ at a flow rate of $1.1 m^3/min$. The particle sampler was located on the roof of our Medical School (about 15 m above ground level), which is situated at an intersection with heavy traffic in downtown São Paulo. Particles were collected in glass fiber filters, which were dried for 24 h at 50 °C and weighed before and after particle collection. Particles were sampled in September 2003.

Neutron-activation analysis was used to determine the trace-element content of the filtrate. Filter samples and elemental standards were irradiated under thermal neutron flux of the IEA-R1 nuclear research reactor for 30 s and 16 h. After adequate decay times, the irradiated samples and standards were measured using a hyperpure Ge detector coupled to a multichannel analyzer. Concentrations of elements were calculated by comparative methods. Blank filters were analyzed under the same experimental conditions as for the analysis of filter samples. The contribution from the blank filter was subtracted from the results, and final results were expressed as a function of the volume of air collected. The sulfur content was determined by X-ray fluorescence analysis, using the nonexposed area of filters as a blank filter.

2.3. Filter extracts

Aqueous suspensions of filters were prepared within 24 h of collection. Because of the inherent difficulty of extracting PM from high-volume filters, subcomponents of the filter were submerged in distilled water and the filtrate was removed via agitation by an ultrasound water bath of 8 h. The concentration of PM was determined by the weighing of the filters before and after extraction. The weight of the extracted filter was determined after drying for 24 h at 50 °C.

2.4. Particulate matter instillation

Forty-seven rats were submitted to tracheal instillation of 1 mL of the following solutions:

SAL ($n = 12$), sterile saline solution;
BF ($n = 12$), blank filter solution obtained by ultrasonication of a blank filter in distilled water;
 PM_{50} ($n = 12$) solution obtained by ultrasonication of a filter containing PM submersed in distilled water and containing 50 μg of $PM_{2.5}$; and
 PM_{100} ($n = 11$) solution obtained by ultrasonication of a filter containing PM submersed in distilled water (the same procedure as for PM_{50}) containing 100 μg of $PM_{2.5}$.

The instillation procedure was conducted under anesthesia with 3% sodium pentobarbital (30 mg/kg body wt., ip). The rats were submitted to tracheal intubation using an adapted pediatric laryngoscope, and

ARTICLE IN PRESS

D.H.R.F. Rivero et al. / Environmental Research ■ (■■■■) ■■-■■■

3

a 16-gauge polyethylene tube was inserted to serve as an endotracheal tube. The solution (1 mL of blank or extract suspensions) was instilled in three separate inspirations through the endotracheal tube coupled to a syringe.

2.5. Electrocardiographic data acquisition and analysis

An ECG was recorded through stainless steel needles implanted under the skin during anesthesia after tracheal intubation. Electrodes for obtaining ECGs were implanted subcutaneously in a Lead II configuration (right arm, left leg, and right leg) with one retrocardial derivation. We utilized a device primarily developed for use in human ECG (Tecnologia de Engenharia Brasileira) that was adapted for use in rodents. ECG signals were band-pass filtered, amplified, digitized (500 Hz), and stored in a microcomputer.

To assess HR and HRV, changes were computed by inspecting ECGs recorded during five consecutive minutes for each period of analysis. Considering that HR in our animals was consistently over 200 beats/min, we analyzed at least 1000 beats. The *R-R* intervals were determined manually. HR, calculated as the reciprocal of the mean beat-to-beat interval, and the standard deviation of beat-to-beat intervals, was calculated immediately before (Pre) and 30 and 60 min after instillation. After regaining consciousness, the animals were returned to their cages and taken to the vivarium.

2.6. Statistical analysis

The significance of results was determined by employing ANOVA for repeated-measures models. Student–Newman–Keuls was utilized as a post hoc test. Logarithmic transformations of the dependent variables were needed to stabilize variance. The level of significance was set at 5%. We made the statistical calculations with the aid of the SPSS v.10.0 package.

3. Results

None of the animals studied died during the course of the experiment. One animal died during the night after PM₁₀₀ instillation. An autopsy revealed pulmonary congestion and neutrophilic alveolar infiltrate.

3.1. Particle analysis

Table 1 shows the values of elemental composition measured by neutron-activation analysis and, in the case of sulfur, X-ray fluorescence analysis. In general, the concentrations of sulfur, bromide, cobalt, and manganese were higher than those reported for other locations, with the exception of iron (Prahald et al., 1999).

3.2. ECG analysis

Table 2 depicts the descriptive statistics of HR for all experimental groups and periods of analysis. The HR decreased significantly ($P < 0.001$) with time, probably reflecting the relaxation of the animals after manipulation. No effect of treatment or interaction between time and treatment were observed (P values of 0.836 and 0.102, respectively). The SDNN decreased with time ($P = 0.007$), this effect being not uniform for all treatments, since a significant ($P = 0.025$) interaction between time and treatment was detected. Post hoc analysis disclosed two subsets: (1) saline, blank, and 100 μg of PM_{2.5} and (2) blank and 50 and 100 μg of PM_{2.5}. As shown in Fig. 1, animals that received saline did not exhibit substantial alterations of the SDNN along the period of study, whereas those submitted to instillation with PM_{2.5} showed a decrease of SDNN after 60 min. No apparent differences were observed in the behavior of animals receiving different doses of PM_{2.5} (Fig. 1). Blank filter extracts did not seem to be entirely inert, since the SDNN fluctuated during the study, returning to baseline at the end of observations.

Table 1
Elemental composition and concentration of PM_{2.5} particles

Element	Values (%)
Sulfur ^a	3.05
Arsenic	0.30
Bromine	0.21
Chlorine	2.09
Cobalt	2.65
Iron	2.67
Lanthanum	5.42
Manganese	0.64
Antimony	0.21
Scandium	3.25
Thorium	8.14

^aX-ray fluorescence analysis.

Table 2
Descriptive statistics of heart rate for all experimental groups and periods of analysis

		HR PRE	HR 30	HR 60
Saline	Mean	382.16	370.43	364.06
	Std. error	11.38	16.83	16.84
Blank	Mean	397.08	351.97	325.17
	Std. error	11.24	11.47	16.28
50 μg	Mean	381.06	347.46	360.24
	Std. error	11.39	11.61	14.07
100 μg	Mean	385.45	346.85	354.37
	Std. error	9.08	12.33	15.26

HR expressed as beats per minute.

ARTICLE IN PRESS

4

D.H.R.F. Rivero et al. / Environmental Research ■ (■■■■) ■■■-■■■

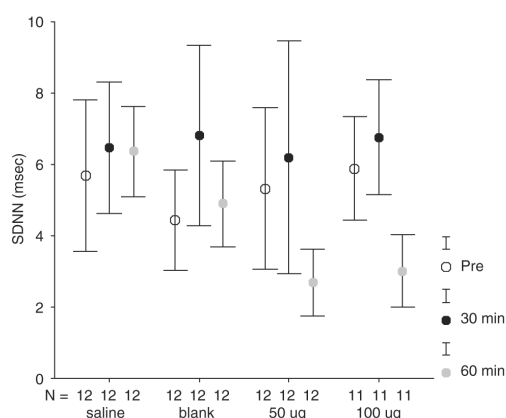


Fig. 1. Means and standard errors of SDNN values as a function of group (saline, blank, and 50 or 100 μg $\text{PM}_{2.5}$) immediately before (Pre) and 30 and 60 min after instillation. The SDNN decreased with time ($P = 0.007$) and there was a significant interaction between time and treatment ($P = 0.025$).

The effect of treatment was marginally significant ($P = 0.052$).

3.3. Discussion

Although the influence of air pollution on the cardiovascular system is being identified in epidemiologic studies, the pathophysiologic mechanism underlying this association is not known. Cardiac death is a consequence of a complex interplay between the autonomic nervous system governing centrally mediated control of the cardiovascular system, a myocardial substrate altered in the course of disease processes, and myocardial vulnerability leading to arrhythmogenic or ischemic response (Zareba et al., 2001). The presence of a single such condition is usually not sufficient to trigger death. Air pollution may be a stressor sufficient to trigger this chain of events, especially in vulnerable subjects such as the elderly, patients with heart failure, or those with chronic obstructive pulmonary disease. In this context, the assessment of electrocardiographic parameters provides an opportunity to measure some of the key components of cardiac death.

In our study, HR was not a sensitive parameter for characterizing the effects of $\text{PM}_{2.5}$ in the time window evaluated. Instillation studies in rodents have shown that, excluding the bradycardic period present immediately after instillation, changes in HR usually occur only after longer periods and at higher doses than those employed in the present investigation (Watkinson et al., 2001). Our results indicate that a measure of overall HRV—SDNN—was more sensitive for detecting heart alterations caused by the instillation of $\text{PM}_{2.5}$. As shown

in Fig. 1, the SDNN began to decrease as quickly as 30 min after instillation. In fact, because of the limitations of our experimental set-up—ECG recordings made with electrodes rather than by telemetry—we could not follow the time course of the SDNN changes for longer periods. Such information would be valuable, providing information about the magnitude and duration of the changes in the SDNN. The same basic finding—and acute, rapid decrease in the SDNN—was previously observed in rats with myocardial infarction exposed to aerosolized residual oil fly ash (Wellenius et al., 2002). In the present study, we moved further by demonstrating that a decrease in the SDNN can be elicited by “real-world” $\text{PM}_{2.5}$ in healthy rats.

It is important to fully characterize the limitations of our study in order to better evaluate its real contribution. First, $\text{PM}_{2.5}$ was delivered by tracheal instillation of an aqueous suspension rather than by inhalation and at a higher dose than would be expected to deposit into the lungs under real-world conditions. Second, because particles were extracted by sonication in aqueous media, our procedure probably favors the presence of soluble components of $\text{PM}_{2.5}$, such as transition metals. Despite the limitations mentioned, our results are coherent with the epidemiological finding that exposure to PM elicits short-term variations in HRV in humans.

In conclusion, instillation of an aqueous suspension of $\text{PM}_{2.5}$ induces a reduction of the SDNN in healthy rats. The effects were observed within a period of 1 h and in concentrations under 100 μg . Despite the differences between our experimental procedure and the environment in which humans live, our results may provide an argument in favor of the biological plausibility of sudden cardiac events in response to exposure to particles reported by the epidemiological literature. The evidence that only specific components of fine particulate matter or interactions among particles are involved with cardiovascular disorders related to depressed autonomic nervous control should be further explored in future experimental studies.

References

- Batalha, J.R.F., Saldiva, P.H.N., Clarke, R.W., Coull, B.A., Stearns, R.C., Lawrence, J., Murthy, G.G.K., Koutrakis, P., Godleski, J.J., 2002. Concentrated ambient air particles induce vasoconstriction of small pulmonary arteries in rats. *Environ. Health Perspect.* 110, 1191–1197.
- Braga, A.L.F., Zanobetti, A., Schwartz, J., 2001. The lag structure between particulate air pollution and respiratory and cardiovascular deaths in 10 US cities. *J. Occup. Environ. Med.* 43, 927–933.
- Brook, R.D., Brook, J.R., Urch, B., Vincent, R., Rajagopalan, S., Silverman, F., 2002. Inhalation of fine particulate air pollution and ozone causes acute arterial vasoconstriction in healthy adults. *Circulation* 105, 1534–1536.
- Carney, R.M., Blumenthal, J.A., Stein, P.K., Watkins, L., Catellier, D., Berkman, L.F., Czajkowski, S.M., O'Connor, C., Stone, P.H.,

ARTICLE IN PRESS

D.H.R.F. Rivero et al. / Environmental Research ■ (■■■■) ■■■-■■■

5

- Freedland, K.E., 2001. Depression, heart rate variability, and acute myocardial infarction. *Circulation* 104 (17), 2024–2028.
- Dockery, D.W., 2001. Epidemiologic evidence of cardiovascular effects of particulate air pollution. *Environ. Health Perspect.* 109 (4), 483–486.
- Frampton, M.W., 2001. Systemic and cardiovascular effects of airway injury and inflammation: ultrafine particle exposure in humans. *Environ. Health Perspect.* 109 (4), 529–532.
- Gold, D.R., Litonjua, A., Schwartz, J., Lovett, E., Larson, A., Nearing, B., Allen, G., Verrier, M., Cherry, R., Verrier, R., 2000. Ambient pollution and heart rate variability. *Circulation* 101 (11), 1267–1273.
- Goldberg, M.S., Burnett, R.T., Bailar 3rd, J.C., Tamblyn, R., Ernst, P., Flegel, K., Brook, J., Bonvalot, Y., Singh, R., Valois, M.F., Vincent, R., 2001. Identification of persons with cardiorespiratory conditions who are at risk of dying from the acute effects of ambient air particles. *Environ. Health Perspect.* 109 (4), 487–494.
- Juha, P., Peters, A., Hoek, G., Tiittanen, P., Brunekreef, B., De Hartog, J., Heinrich, J., Ibalid-Mulli, A., Kreyling, W., Lanki, T., Timonen, K., Vanninen, E., 2002. Particulate air pollution and risk of ST-segment depression during repeated submaximal exercise tests among subjects with coronary heart disease: the exposure and risk assessment for fine and ultrafine particles in ambient air (ULTRA) study. *Circulation* 106 (8), 933–938.
- Kodavanti, U.P., Hauser, R., Christiani, D.C., Zhi, H.M., McGee, J., Ledbetter, A., Richards, J., Costa, D.L., 1998. Pulmonary responses to oil fly ash particles in the rat differ by virtue of their specific soluble metals. *Toxicol. Sci.* 43, 204–212.
- Laden, F., Neas, L.M., Dockery, D.W., Schwartz, J., 2000. Association of fine particulate matter from different sources with daily mortality in six US cities. *Environ. Health Perspect.* 108, 941–947.
- La Rovere, M.T., Pinna, G.D., Maestri, R., Mortara, A., Capomolla, S., Febo, O., Ferrari, R., Franchini, M., Gnemmi, M., Opasich, C., Riccardi, P.G., Traversi, E., Cobelli, F., 2003. Short-term heart rate variability strongly predicts sudden cardiac death in chronic heart failure patients. *Circulation* 107, 565–570.
- Liao, D., Creason, J., Shy, C., Williams, R., Watts, R., Zweidinger, R., 1999. Daily variation of particulate air pollution and poor cardiac autonomic control in the elderly. *Environ. Health Perspect.* 107, 521–525.
- Lin, C.A., Pereira, L.A.A., Conceição, G.M.S., Kishi, H.S., Milani Jr., R., Braga, A.L.F., Saldiva, P.H.N., 2003. Association between air pollution and ischemic cardiovascular emergency room visits. *Environ. Res.* 92, 57–63.
- Magari, S.R., Hauser, R., Schwartz, J., Williams, P.L., Smith, T.J., Christiani, D.C., 2001. Association of heart rate variability with occupational and environmental exposure to particulate air pollution. *Circulation* 104 (9), 986–991.
- Magari, S.R., Schwartz, J., Williams, P.L., Hauser, R., Smith, T.J., Christiani, D.C., 2002. The association of particulate air metal concentrations with heart rate variability. *Environ. Health Perspect.* 110, 875–880.
- Peters, A., Liu, E., Verrier, R.L., Schwartz, J., Gold, D.R., Mittleman, M., Baliff, J., Oh, J.A., Allen, G., Monahan, K., Dockery, D.W., 2000. Air pollution and incidence of cardiac arrhythmia. *Epidemiology* 11, 11–17.
- Peters, A., Dockery, D.W., Muller, J.E., Mittleman, M.A., 2001. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation* 103, 2810–2815.
- Pope 3rd., C.A., Thun, M.J., Namboodiri, M.M., Dockery, D.W., Evans, J.S., Speizer, F.E., Heath Jr., C.W., 1995. Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of US adults. *Am. J. Crit. Care Med.* 151, 669–674.
- Pope 3rd., C.A., Verrier, R.L., Lovett, E.G., Larson, A.C., Raizenne, M.E.B.A., Kanner, R.E., Schwartz, J., Villegas, G.M., Gold, D.R., Dockery, D.W., 1999. Heart rate variability associated with particulate air pollution. *Am. Heart J.* 138, 890–899.
- Pope 3rd., C.A., Hansen, M.L., Long, R.W., Nielsen, K.R., Eatough, N.L., Wilson, W.E., Eatough, D.J., 2004. Ambient particulate air pollution, heart rate variability, and blood markers of inflammation in a panel of elderly subjects. *Environ. Health Perspect.* 112 (3), 339–345.
- Prahalad, A.K., Soukup, J.M., Inmon, J., Willis, R., Ghio, A.J., Becker, S., Gallagher, J.E., 1999. Ambient air particles: effects on cellular oxidant radical generation in relation to particulate elemental chemistry. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 158, 81–91.
- Saldiva, P.H.N., Clarke, R.W., Coull, B.A., Stearns, R.C., Murthy, J.L.G.G., Diaz, E., Koutrakis, P., Suh, H., Tsuda, A., Godleski, J.J., 2002. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 1610–1617.
- Schins, R.P.F., Lightbody, J.H., Borm, P.J.A., Shi, T., Donaldson, K., Stone, V., 2004. Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195, 1–11.
- Schwartz, J., 1999. Air pollution and hospital admissions for heart disease in eight US countries. *Epidemiology* 10, 17–22.
- Schwartz, J., Laden, F., Zanobetti, A., 2002. The concentration–response relation between PM_{2.5} and daily deaths. *Environ. Health Perspect.* 110, 1025–1029.
- Seaton, A., MacNee, W., Donaldson, K., Godden, D., 1995. Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet* 345, 176–178.
- Sosnowski, M., MacFarlane, P.W., Czyz, Z., Skrzypek-Wanha, J., Boczkowska-Gaik, E., Tendera, M., 2002. Age-adjustment of HRV measures and its prognostic value for risk assessment in patients late after myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* 86, 249–258.
- Tarkiainen, T.H., Timonen, K.L., Vanninen, E.J., Alm, S., Hartikainen, J.E.K., Pekkanen, J., 2003. Effect of acute carbon monoxide exposure on heart rate variability in patients with coronary artery disease. *Clin. Physiol. Funct. Immunol.* 23, 98–102.
- Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Eur. Heart J.* 17, 354–381.
- Utell, M.J., Frampton, M.W., 2000. Acute health effects of ambient air pollution: the ultrafine particle hypothesis. *J. Aerosol Med.* 13, 355–359.
- Watkinson, W.P., Campen, M.J., Costa, D.L., 1998. Cardiac arrhythmia induction after exposure to residual oil fly ash particles in a rodent model of pulmonary hypertension. *Toxicol. Sci.* 41, 209–216.
- Watkinson, W.P., Campen, M.J., Nolan, J.P., Costa, D.L., 2001. Cardiovascular and systemic responses to inhaled pollutants in rodents: effects of ozone and particulate matter. *Environ. Health Perspect.* 109 (4), 539–546.
- Wellenius, G.A., Saldiva, P.H.N., Batalha, J.R.F., Murthy, G.G.K., Coull, B.A., Verrier, R.L., Godleski, J.J., 2002. Electrocardiographic changes during exposure to residual oil fly ash (ROFA) particles in a rat model of myocardial infarction. *Toxicol. Sci.* 66, 327–335.
- Wichers, L.B., Nolan, J.P., Winsett, D.W., Ledbetter, A.D., Kodavanti, U.P., Schladweiler, C.J., Costa, D.L., Watkinson, W.P., 2004. Effects of instilled combustion-derived particles in spontaneously hypertensive rats. Part I: cardiovascular responses. *Inhalation Toxicol.* 16, 391–405.
- Zareba, W., Nomura, A., Philippe, J., 2001. Cardiovascular effects of air pollution: what to measure in ECG? *Environ. Health Perspect.* 109 (4), 533–538.

NOT FOR
PUBLIC RELEASE

TOXICOLOGICAL SCIENCES 84, 1–8 (2005)
doi:10.1093/toxsci/kfi137
Advance Access publication Month 00, 2004

Acute Cardiopulmonary Alterations Induced by Fine Particulate Matter of São Paulo, Brazil

Dolores Helena Rodriguez Ferreira Rivero,^{*1} Sandra Regina Castro Soares,^{*} Geraldo Lorenzi-Filho,[†] Mitiko Saiki,[‡] John J. Godleski,[§] Leila Antonangelo,^{*} Marisa Dolhnikoff,^{*} and Paulo Hilário Nascimento Saldiva^{*}

^{*}Department of Pathology, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; [†]Pulmonary Division, School of Medicine, University of São Paulo, Experimental Air Pollution Laboratory, São Paulo, Brazil; [‡]Institute of Research in Nuclear Energy of the State of São Paulo, São Paulo, Brazil; [§]Department of Environmental Health, Physiology Program, Harvard School of Public Health, Boston, Massachusetts

Received October 14, 2004; accepted February 13, 2005

The mechanisms involved in the association between air pollution and increased cardiovascular morbidity are not fully understood. The objective of this study was to test the hypothesis that fine particulate matter (PM_{2.5}) induces systemic inflammation and vasoconstriction of small arteries in the lung and heart of rats. Thirty-eight healthy Wistar rats were anesthetized, intubated, and submitted to the instillation of 1 ml of distilled water diluted in the following solution: blank filter, 100 µg and 500 µg of PM_{2.5}. PM_{2.5} was collected in glass fiber filters with a high-volume sampler. The animals were sacrificed 24 h after instillation when blood, heart, and lung samples were collected for morphological and wet-to-dry weight ratio analysis. PM_{2.5} consisted of the following elements: sulphur, arsenic, bromine, chlorine, cobalt, iron, lanthanum, manganese, antimony, scandium, and thorium. Total reticulocytes significantly increased at both PM_{2.5} doses ($p < 0.05$) while hematocrit levels increased in the 500 µg group ($p < 0.05$). Quantification of segmented neutrophils and fibrinogen levels showed a significant decrease, while lymphocytes counting increased with 100 µg of PM_{2.5} ($p < 0.05$). A significant dose-dependent decrease of intra-acinar pulmonary arteriole lumen/wall ratio (L/W) was observed in PM groups ($p < 0.001$). Peribronchiolar arterioles L/W showed a significant decrease in the 500 µg group ($p < 0.001$). A significant increase in heart wet-to-dry weight ratio was observed in the 500 µg group ($p < 0.001$). In conclusion, fine environment particles in the city of São Paulo promote pulmonary and cardiac histological alterations. Pulmonary vasculature was markedly affected by particle instillation, resulting in significant vasoconstriction in healthy rats.

Key Words: particulate matter; blood; vasoconstriction; lung; heart.

INTRODUCTION

Recent studies have demonstrated the association between air pollution and increased cardiovascular morbidity (Lin *et al.*,

¹ To whom correspondence should be addressed at Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina USP, Av. Dr. Arnaldo 455, 1 andar sala 1226, Cerqueira César – Universidade São Paulo, São Paulo – SP Cep:01246–903 Brasil. Fax: 055 11 30680072. E-mail: dohelena@usp.br

2003; Mann *et al.*, 2002) and mortality (Braga *et al.*, 2001; Dockery, 2001; Goldberg *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2001). Because fine particulate matter (PM_{2.5}) can access alveolar territory, components leached from these respirable particles can enter the circulation and influence important circulatory parameters that are risk factors for adverse cardiovascular events (Schwartz, 2001).

Stone and Godleski (1999) have suggested that fine particles can enter the bloodstream and adversely affect the heart by initiating arrhythmias and sudden death in susceptible subjects. More recently, it has been demonstrated that inhaled ultrafine particles can be detected within 1 min of exposure in the systemic circulation, where they can persist for hours, providing an entrance route into all organ systems (Nemmar *et al.*, 2002). Increased plasma viscosity and changes in blood parameters such as fibrinogen levels or red blood cell counts have been demonstrated after particle inhalation (Baskurt *et al.*, 1990; Gardner *et al.*, 2000; Kodavanti *et al.*, 2002; Seaton *et al.*, 1999). A previous study carried out at our laboratory demonstrated that the composition of fine particles surrogate was critical in determining the blood response to inhaled particles (Medeiros *et al.*, 2004). Recent studies have shown that exposure to particles induces vasoconstriction and changes in blood homeostasis favoring blood coagulation (Bouthillier *et al.*, 1998; Peters *et al.*, 1997). In addition, rats with acute myocardial infarction are more prone to developing ventricular arrhythmias when exposed to inhaled particles (Wellenius *et al.*, 2002).

Cardiovascular effects of particles are not necessarily mediated only by systemic inflammation. For instance, it is plausible that the onset of pulmonary inflammation by particles (Kodavanti *et al.*, 1998, 2002; Saldiva *et al.*, 2002; Schins *et al.*, 2004) may trigger reflexes that may affect cardiovascular function. Several cardiovascular effects have been documented in response to particle exposure, including disruption of the autonomic nervous system activity by increased (Magari *et al.*, 2002; Tarkiainen *et al.*, 2003) and decreased heart rate variability (Gold *et al.*, 2000; Magari *et al.*, 2001; Pope *et al.*, 1999, 2004). Thus different mechanisms, either dependent on

systemic inflammation or regulated by local reflexes, may participate in the pathogenesis of cardiovascular abnormalities associated with particle inhalation.

There is recent evidence that particle inhalation increases the generation of reactive oxidative species (ROS) in the lungs as well as in the heart (Gurgueira *et al.*, 2002; González-Flecha, 2004; Tao *et al.*, 2003). Production of ROS in the cardiovascular territory may be induced by several events, including inflammation (Ichimura *et al.*, 2003; Touyz and Schiffrin, 2004), changes of autonomic control (Campese *et al.*, 2004), or increased mechanical load (McDonough, 1999). In fact, all those pathways are interconnected and, in most of the cases, it is difficult to isolate the participation of each when evaluating particle toxicology.

The present study was designed to evaluate whether the tracheal instillation of environment particles with an aerodynamic diameter equal or lower than 2.5 μm , at two different concentrations, induces pulmonary, cardiac, and systemic inflammation in healthy adult rats. In addition, we investigated the effects on oxidative stress and morphologic parameters of the lung and heart small arteries. We reasoned that such information could contribute to the understanding of the mechanisms relating particle inhalation to acute mortality in humans.

METHODS

Animals. Thirty-eight male adult, Wistar rats (3 months of age) weighing ~250 g were obtained from the vivarium of our School of Medicine at the University of São Paulo. They were kept at 22° to 23°C, with controlled humidity, and a dark–light cycle of 12 to 12 h. Food and water were available *ad libitum*.

Particle sampling and analysis. We employed a high-volume sampler (HIVOL, Energética, Brazil) coupled to an inlet (Tisch Environmental Inc, USA) that allows the separation of particles below 2.5 μm (PM_{2.5}) at a flow rate of 1.1 m³/min. Our particle sampler was located on the roof of our Medical School (about 15 m above the ground), which is located on a street with very heavy traffic in downtown São Paulo. Particles were collected in one glass fiber filter, which was dried for 24 h at 50°C before and after particle collection for weighing. Particles were sampled during the month of September 2003.

Trace element determinations of the material collected were carried out on filters by neutron activation analysis. Filter samples and elemental standards were irradiated under thermal neutron flux of the IEA-R1 nuclear research reactor for 0.5 min and 16 h. After adequate decay times, the irradiated samples and standards were measured using a hyper pure Ge detector coupled with a multichannel analyzer. Element concentrations were calculated by a comparative method. Blank filters were analyzed using the same experimental conditions adopted for the analysis of filter samples, and the concentrations of the measured elements in the blank filter were subtracted to provide their net concentration. Contribution from the blank filter was also subtracted from results, and the final results were then expressed as a function of collected air volume. Sulfur determination was performed by x-ray fluorescence analysis, using the non-exposed part of the filters as a blank filter.

Filter extracts for tracheal instillation. Filter extracts were prepared within 24 h after collection. Because of the inherent difficulties in removing particulate material directly from a high-volume filter, subcomponents of PM were extracted in distilled water via agitation by ultrasonication water bath for 8 h. The efficiency of extraction was determined by weighting the filter before

and after extraction, and it was determined as 79%. The weight of the filters was determined after drying them for 24 h at 50°C.

Tracheal instillation. The rats were anaesthetized with 3% sodium pentobarbital (30 mg/kg body weight, i.p.) and submitted to tracheal intubation with an adapted pediatric laryngoscope; a 16-gauge polyethylene tube was inserted, working as an endotracheal tube. Test solutions (1 ml) were slowly injected in three separate inspirations through the endotracheal tube coupled to a syringe. Animals were allowed to recover between instillations, because a reflex apnea was induced each time. The rats were randomized and received the following solutions:

BF—blank filter ($n = 12$): solution obtained by ultra-sonication of a blank filter in distilled water;
PM100 ($n = 13$): solution obtained by ultrasonication of a filter containing PM submerged in distilled water, corresponding to 100 μg of PM_{2.5};
PM500 ($n = 13$): solution obtained by ultra-sonication of a filter containing PM submerged in distilled water (the same procedure as PM100) corresponding to 500 μg of PM_{2.5}.

The entire group of 38 animals was submitted to the analysis.

Blood analysis. Rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg body weight, i.p.) 24 h after tracheal instillation. Blood samples were collected by abdominal aorta puncture, and blood was stored in ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) K3 tubes for complete blood and reticulocyte count. Complete blood counts of red blood cells, platelets, and white blood cells were performed using a hematological analyzer (Bayer Corporation, NY). For the determination of the reticulocytes, the whole blood was diluted with a fluorescent stain (thiazole orange), which is specific for nucleic acids (Corberand, 1996). After 25 s, solution fluorescence was measured with a laser optical bench. The equipment gives the percentage of total reticulocytes counted. In addition, blood samples were collected in vials with sodium citrate for the determination of fibrinogen, activated partial thromboplastin time, and prothrombin time.

Histopathology and morphometry. The heart was isolated *en bloc* and fixed for 48 h in buffered 10% formalin solution. Before the heart was fixed in formalin, one transverse section was sampled for wet-to-dry weight ratio determination. After fixation, the heart was cut in three parallel transverse sections of both ventricular chambers, 2 mm apart.

The left lung was isolated and fixed for 24 h by intratracheal instillation of 10% formalin solution at a constant pressure of 20 cm of water. A transverse section was performed at the entrance of the main left bronchus. Both heart and lung tissue slices were embedded in paraffin and processed according to routine histological procedures. Five-micrometer thick slides were prepared and stained with hematoxylin and eosin (H&E).

Histological slices were coded for blind analysis. Descriptive histopathology was performed for all sections sampled. Quantitative measurements of the ratio between the lumen and wall (L/W) areas were done for transverse sections of coronary arteries. Lung L/W ratio was measured in transversally cut arterioles adjacent to the terminal bronchioles, located in the transition between those conducting to gas exchange airways and in intra-acinar arterioles. Transversally cut vessels were defined as the ones exhibiting a variation between its maximum and minimum diameter $\leq 10\%$. Morphometric measurements were performed using a standard point-counting procedure, at 400 \times , with the aid of a coherent test system of 100 points and 50 lines contained within a square of 10,000 μm^2 at this magnification. Arterial diameters were assessed using the grid lines. L/W ratio was determined by placing the entire artery within the limits of the square, and determining the number of points hitting the lumen or the wall of the vessel. The areas of arteriolar lumen and wall were then calculated according to equations (1) and (2):

- (1) luminal area = number of points hitting the lumen \times 100
- (2) wall area = number of points hitting the arteriolar wall \times 100

After measurements, pulmonary and myocardial arterioles were categorized by size, according to the luminal area.

TABLE 1
Elemental Composition and Concentration of PM_{2.5} Particles

Element (%)	Values
Sulfur ^a	3.05
Arsenic	0.30
Bromine	0.21
Chorine	2.09
Cobalt	2.65
Iron	2.67
Lanthanum	5.42
Manganese	0.64
Antimony	0.21
Scandium	3.25
Thorium	8.14

^aX-ray fluorescence analysis.

Wet-to-dry weight ratio. The severity of pulmonary and heart edema was assessed by the wet-to-dry weight ratio. The entire inferior right lobe of the lung and one transverse slice of the heart, comprising the right and left ventricles, were gently placed in a pre-weighted Petri dish, and weighted on an analytical balance immediately after excision to obtain the wet weight. Each specimen was then dried at 50°C for 72 h to obtain the dry weight. The wet-to-dry weight ratio was calculated as follows:

$$(3) \text{ wet-to-dry weight ratio} = (\text{wet weight} - \text{dry weight}) / \text{wet weight}.$$

Statistical analysis. For the morphometric data of pulmonary and coronary vessels, we tested the significance of the results by computing general linear models, using as dependent variable either the absolute value or ranks of lumen/wall ratio. As predictive variables, we considered categorical terms for treatment (blank filter, 100 and 500 µg of PM_{2.5}) and three indicators of the size of the vessel evaluated, as well as a term of interaction between treatment and size. The indicator term for vessel size was included because lumen/wall ratio is expected to increase as the lumen of the vessel increases. For hematological parameters, the significance of results was determined using analysis of variance (ANOVA) for independent groups, setting the level of significance at 5%. Since there was a significant degree of heterocedasticity in several variables analyzed, we again considered as dependent variables in the ANOVA models either the absolute value or ranks of each parameter measured. Bonferroni *post-hoc* analysis was used when significant statistical differences were detected by general linear models or ANOVA. The statistical package employed was the SPSS v. 10.0 for Windows.

RESULTS

Particle Analysis

Table 1 shows the values of element composition measured by neutron activation analysis and, in the case of sulfur, x-ray fluorescence analysis. In general, the concentrations of sulfur, bromide, cobalt, and manganese of the air in São Paulo are higher than those reported for other locations such as Los Angeles, New Jersey, Virginia, Boston, and Phoenix, with the exception of iron (Harrison and Yin, 2000; Prahald *et al.*, 1999).

Blood Analysis

Table 2 shows the descriptive statistics of hematological parameters. There was a significant increase in total reticulocytes at both doses of PM_{2.5} ($p < 0.05$) while hematocrit levels increased for the group receiving 500 µg in relation to the blank filter group ($p = 0.04$). Segmented and neutrophils showed a significant decrease in the 100 µg group in relation to the group receiving 500 µg of PM_{2.5} ($p = 0.03$). Lymphocytes showed a significant increase at the 100 µg concentration in relation to 500µg of PM_{2.5} ($p = 0.02$). The remaining parameters did not exhibit significant alterations. No significant differences were observed among the groups regarding platelet counting, prothrombin time, and activated partial thromboplastin time. There was a significant decrease in fibrinogen levels at the dose of 100 µg in relation to the blank filter ($p = 0.01$).

Histopathology and Morphometry

Figure 1 shows the pulmonary changes observed in the three groups. Animals submitted to PM100 and PM500 concentrations developed an acute pulmonary inflammation in the alveolar tissue, characterized by the recruitment of neutrophils and macrophages at the transition between the terminal bronchiole and gas-exchange territory with the involvement of the peripheral alveolar parenchyma. Although we did not quantify the pulmonary inflammatory changes, histological analysis showed a dose-dependent pattern of alveolar inflammation, which was more pronounced in the PM500 group. Increased numbers of inflammatory cells were also detected in the peribronchial and perivascular connective tissue in the two groups. There was no evidence of myocardial inflammation in either group.

Figure 2A depicts the results of L/W ratio measured in intracinar pulmonary arterioles, aggregated by vessel size and exposure. A significant decrease of L/W ratio was observed in the animals exposed to environment particles ($p < 0.001$). In addition, the decrement of L/W ratio was different between animals receiving the higher dose (500 µg) in comparison with those receiving the smaller dose (100 µg) ($p = 0.002$). Figure 2B shows the L/W ratio measured in arterioles located adjacent to terminal bronchioles. The PM500 group showed a significant decrease for all arteriolar sizes in relation to the blank filter and PM100 µg ($p < 0.001$) groups. Pulmonary arteriolar changes are illustrated in Figure 1. Figure 2C presents the results of L/W ratio measured in myocardial arterioles. No difference was observed among the 3 treatments employed ($p = 0.08$).

Wet-to-Dry Weight Ratio

Table 3 shows the results of the lung and heart wet-to-dry weight ratio. A significant increase of this relation was observed only in the heart, with the higher dose of PM (500 µg) being different from the remaining treatments ($p < 0.001$).

TABLE 2
Descriptive Statistics (Mean, Median and Standard Deviation) of Blood Cells and Coagulation Factors in Circulating Blood from Animals Exposed to Blank Filter, 100 µg, and 500 µg of PM_{2.5}

	Group								
	Blank filter			PM100			PM500		
	Mean	Median	S.D.	Mean	Median	S.D.	Mean	Median	S.D.
Erythrocytes (million/mm ³)	7.88	7.86	.50	8.01	8.03	.41	8.10	8.06	.50
Hematocrit (%) ^a	40.69	40.90	2.00	42.76	43.80	2.64	43.62	43.90	1.77
Segmented (%) ^a	19.17	15.50	14.81	14.15	10.00	10.94	27.00	22.00	14.97
Band (%)	1.54	1.00	.99	1.62	1.00	1.66	1.08	1.00	.28
Lymphocytes (%) ^b	72.75	77.50	14.11	79.62	84.00	11.89	67.31	69.00	14.21
Monocytes (%)	3.25	3.00	1.96	3.23	3.00	2.45	3.77	3.00	3.11
Eosinophils (%)	.67	.50	.78	.69	1.00	.63	.85	.00	1.14
Basophils (%)	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00	.00
Neutrophils (%) ^b	23.33	19.00	14.30	16.46	12.00	9.82	28.08	23.00	15.16
Reticulocytes (%) ^c	3.25	3.20	.46	3.73	3.70	.71	3.93	3.80	.93
Platelets (thousand/mm ³)	833.9	831.00	132.29	799.0	805.00	98.96	878.7	925.00	216.08
Fibrinogen ^d (mg/dl)	397.5	385.50	39.40	353.8	345.50	48.94	386.2	383.00	36.76
Prothrombin time (s)	23.55	23.10	1.99	24.40	24.10	1.41	24.58	24.80	1.35
Active partial thromboplastin time (s)	30.50	24.00	10.76	27.35	24.00	8.19	34.16	30.15	11.58

^aBF different from PM500 ($p = 0.04$).

^bPM100 different from PM500 ($p < 0.05$).

^cBF different from both doses of PM ($p < 0.05$).

^dPM100 different from BF ($p = 0.01$).

DISCUSSION

Our results indicated that a single instillation of urban particles elicits significant pulmonary and cardiac alterations, and, to a lesser extent, changes in blood parameters.

Lung inflammatory alterations were quite evident in the animals exposed to PM_{2.5} up to a point that it was possible to distinguish, without error, the histological slices of the exposed animals from controls. To avoid an interpretation bias, the researcher who conducted pulmonary vessel measurements did not perform the descriptive histopathological studies of the lungs. Our findings are in line with several previous studies and fully confirm the inflammatory potential of urban PM_{2.5} aerosol. Interestingly, we observed a significant narrowing of the pulmonary vasculature in the animals that were exposed to PM_{2.5}, with this effect being more prominent in the intra-acinar arterioles. This result confirms our previous finding that the pulmonary vasculature is a target for urban particles (Batalha *et al.*, 2002). Because of the short time lag between instillation and evaluation (24 h) the narrowing of pulmonary vasculature is most probably due to constriction rather than being dependent on significant arteriolar remodeling. Thus, our results suggest that exposure to environment particles modifies the balance between vasoconstriction and vasodilatation at pulmonary level. The endothelium is activated by circulating cytokines that induce the production of nitric oxide, reactive oxygen species and endothelin in vessel walls, which are potent

vascular smooth-muscle constrictors. Bouthillier *et al.* (1998) showed increased plasma levels of endothelin -1 in rats after inhalation of urban particles.

The inspection of Figure 1 shows that, although a small expansion of the perivascular and peribronchial connective tissue by interstitial edema can be noticed, intra-alveolar edema is virtually absent in animals receiving PM, even at the highest dose. This finding is in agreement with the observation of a slight and non-significant increase in wet/dry ratio, as depicted in Table 3. In fact, the magnitude of inflammatory cell recruitment clearly overcomes fluid exudation to alveolar space. This is an interesting finding and, perhaps, it is related to the peculiar composition of our particles. Unfortunately, we did not have a comprehensive characterization of the chemical composition of our test particles, since we only measured 11 elements and we do not have information about the organic material adhered to the PM. Assuming that in study, the sulfur content is mainly in the form of sulfate, the levels of this component in our PM samples are not very high. Considering that our light duty vehicles uses a blend of gasoline with 22% of ethanol, it is quite probable that PM in our town contains a significant proportion of volatile organic compounds (including aldehydes) and nitrates. Indeed, the composition of the particles was shown to influence their toxicity *in vivo* (Kodavanti *et al.*, 1998; Saldiva *et al.*, 2002; Schins *et al.*, 2004) and *in vitro* (Carter *et al.*, 1997; González-Flecha, 2004; Prahalad

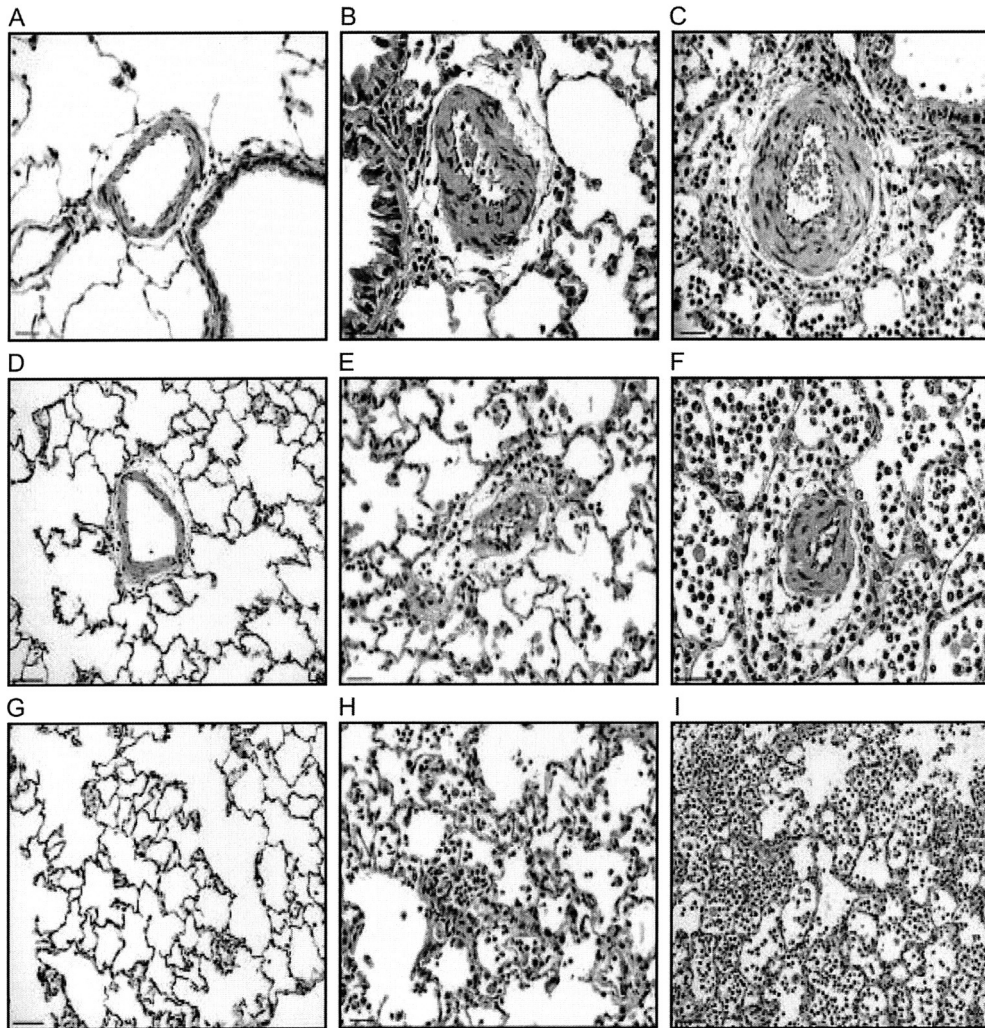


FIG. 1. Photomicrographs of pulmonary tissue in blank filter (A, D, and G), PM100 (B, E, and H) and PM500 (C, F, and I) groups. A to C: The figures show peribronchiolar arterioles with decreased L/W ratio in PM500 group (C), secondary to vasoconstriction. D to F: The intra-acinar arterioles show vasoconstriction and decrease in L/W ratio in both 100PM (E) and 500PM (F) groups as compared with blank filter (D). Note the periarteriolar inflammation in the PM groups. G to I: Acute alveolar inflammation is observed in both PM groups (H and I), which is more pronounced in the animals exposed to higher PM dose (I). Scale bar in A, D, G, and I = 50 μ m. Scale bar in B, C, E, F, and H = 25 μ m.

et al., 1999). It is tempting to speculate that the characteristics of our pollution scenario determine the predominance of cellular accumulation over edema in the lungs of our animals, but the limited information about the composition of our particles prevents us from drawing mechanistic hypothesis, indicating the necessity of further studies, probably

comparing our PM to samples from places with different pollution sources.

The concept that particles induce constriction of pulmonary arterioles is new and opens new possibilities for the study of cardiac impairment induced by particles since, conceivably, constriction of pulmonary vasculature induces an increase of

6

FERREIRA RIVERO ET AL.

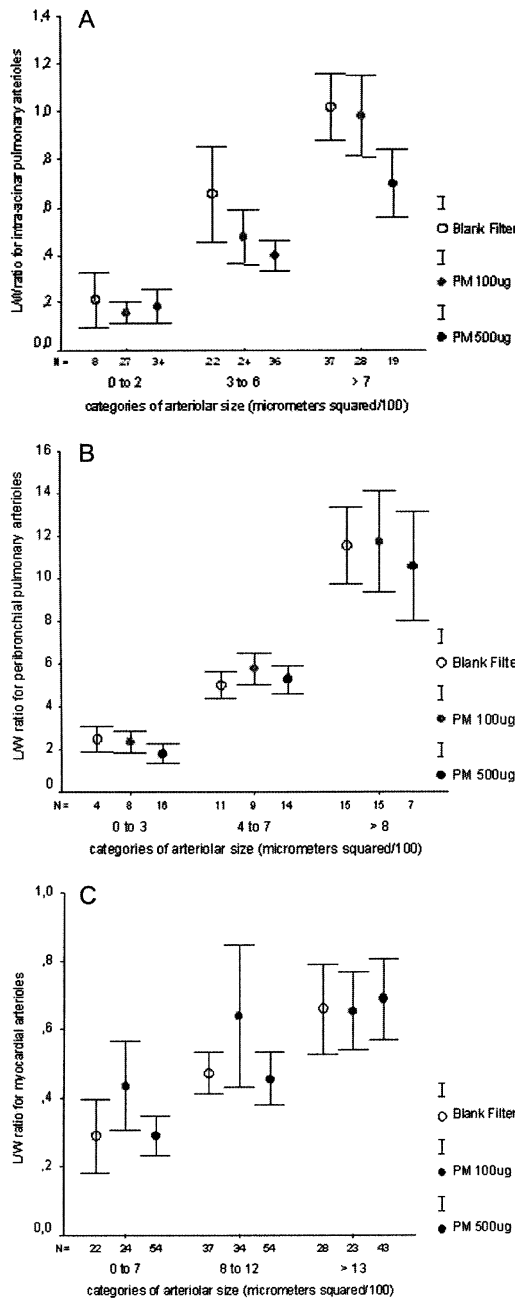


TABLE 3
Mean and Standard Deviation of Wet/Dry Weight Ratio in Lung and Heart from Animals Exposed to Blank Filter, 100 µg, and 500 µg of PM_{2.5}

	Wet/dry weight ratio	
	Lung	heart
Blank filter	0.81 ± 0.02	0.86 ± 0.03
PM100 µg	0.81 ± 0.02	0.84 ± 0.05
PM500 µg	0.81 ± 0.06	0.87 ± 0.04*

*p < 0.001 compared to blank filter and PM100 µg.

the mechanical load to the heart. In this line, recent epidemiological data indicate that patients with congestive heart failure are among those with the highest susceptibility to particle pollution exposure (Mann *et al.*, 2002). In light of our findings, the possibility that an increased afterload to the right ventricle induced by particles may further deteriorate cardiac performance in subjects with congestive heart failure (CHF) must be considered as one of the mechanisms correlating air pollution and cardiac diseases. It is also important to stress that any increment in the mechanical load to the heart induces an increase in oxygen consumption by the cardiac cells, predisposing to the development of cardiac hypoxia in situations where the oxygen available to cardiomyocytes is already insufficient. Myocardial hypoxia is an event that predisposes to both myocardial infarction (Peters *et al.*, 2001) and arrhythmias (Peters *et al.*, 2000; Watkinson *et al.*, 1998), events that have been related to particle pollution by the epidemiology literature.

Despite the significant pulmonary inflammation observed, the changes in blood markers evaluated in our study show a somehow lower intensity. We detected a decrease in fibrinogen and neutrophils in the rats exposed to the low dose of PM_{2.5}. This finding is somewhat puzzling. One explanation could be that our lower dose of particles induced a transient adherence of neutrophils to the microvasculature, as well as a consumption of fibrinogen, changes that were reversed at the higher doses, with release of neutrophils and fibrinogen by the bone marrow and liver, respectively. In this respect, the hematological changes observed in our study are less intense than those

FIG. 2. Mean and standard error of lumen/wall ratio values in lung and heart for the three groups (blank filter, 100 µg and 500 µg of PM_{2.5}). (A) L/W ratio of intra-acinar pulmonary arterioles was significantly decreased in PM groups (100 and 500 µg) as compared with blank filter (p < 0.001). Additionally, the L/W ratio was different between PM500 and PM100 (p = 0.002). (B) Peribronchiolar pulmonary arterioles showed significantly decreased L/W ratio in PM 500 group as compared with blank filter and PM100 (p < 0.001). (C) Lumen/wall ratio measured in myocardial arterioles. No difference was observed among the groups.

reported in a previous study of our group in animals exposed to residual oil fly ash (Medeiros *et al.*, 2004). It is possible that our PM_{2.5} contains substances with a lower solubility and capacity to reach the systemic circulation. It is remarkable that reticulocytes were increased after particle instillation. Previous studies (Goto *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 2004; Van Eeden and Hogg, 2002) have also observed that bone marrow is responsive to inhaled particles. The increased number of reticulocytes may induce changes in blood viscosity, which may contribute to mechanical load to the heart, as well as to blood clotting. Thus, our results suggest that, although modest in our case, changes in blood parameters induced by particle inhalation may participate in the pathogenesis of congestive heart failure aggravation and myocardial ischemic diseases reported as associated with particle inhalation by epidemiological studies.

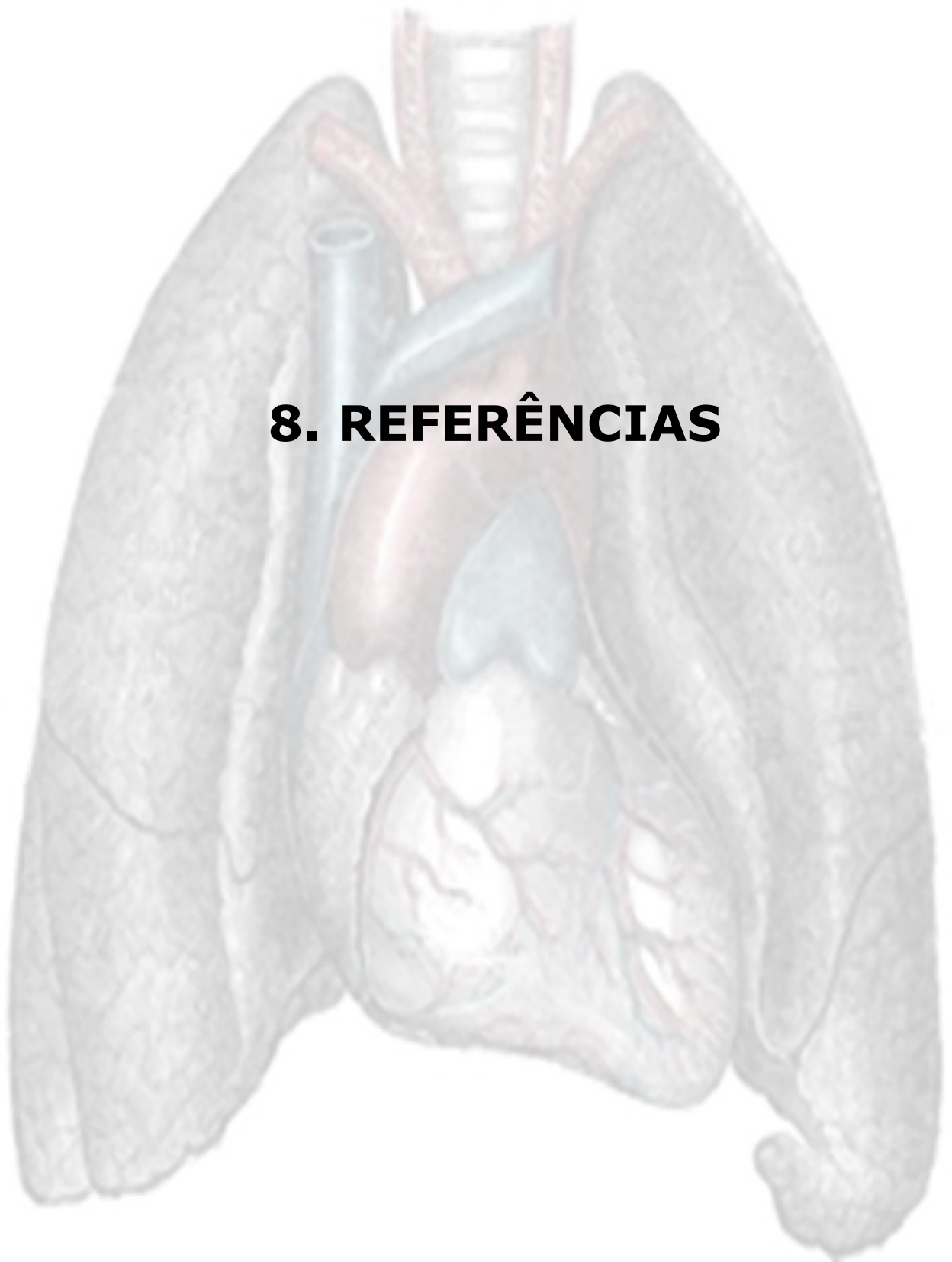
Cardiac edema was also observed in animals receiving PM_{2.5}. The lungs did not exhibit such alteration, suggesting that the lymphatic drainage in the lungs is an efficient mechanism. Cardiac edema may occur as a consequence of several physiological and pathological conditions, and the design of our study did not allow the clarification of its pathogenesis. However, the presence of cardiac edema, measured 24 h after particle instillation, is in line with the hypothesis that environment particles do affect heart functioning.

In conclusion, our results indicate that exposure to environment particles promotes pulmonary and cardiac alterations in healthy rats, even when cellular markers of systemic inflammation are not evidently altered. Pulmonary vasculature was also markedly affected by particle instillation, resulting in significant vasoconstriction. In addition, we observed that the blood marrow also participated in the acute response to particles reaching the lungs. The overall results supportive the conclusion that environmental particles affect not only the lungs but also the heart and suggest that these changes may occur even when modest alterations of blood cell markers of systemic inflammation are observed.

REFERENCES

- Baskurt, O. K., Levi, E., Caglayan, S., and Dikmenoglu, N. (1990). *Arch. Environ. Health* **45**, 224–228.
- Batalha, J. R. F., Saldiva, P. H. N., Clarke, R. W., Coull, B. A., Stearns, R. C., Lawrence, J., Murthy, G. G. K., Koutrakis, P., and Godleski, J. J. (2002). Concentrated ambient air particles induce vasoconstriction of small pulmonary arteries in rats. *Environ. Health Perspect.* **110**, 1191–1197.
- Bouthillier, L., Vincent, R., Goegan, P., Adamson, I. Y. R., Bjarnason, S., Stewart, M., Guénette, J., Potvin, M., and Kumarathasan, P. (1998). Acute effects of inhaled urban particles and ozone. Lung morphology, macrophage activity and plasma endothelin-1. *Am. J. Pathol.* **153**, 1873–1884.
- Braga, A. L. F., Zanobetti, A., and Schwartz, J. (2001). The lag structure between particulate air pollution and respiratory and cardiovascular deaths in 10 US cities. *J. Occup. Environ. Med.* **43**, 927–933.
- Buege, J. A., and Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **52**, 302–309.
- Campese, V. M., Ye, S., Zhong, H., Yanamadala, V., Ye, Z., and Chiu, J. (2004). Reactive oxygen species stimulate central and peripheral sympathetic nervous system activity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**, H695–H703.
- Carter, J. D., Ghio, A. J., Samet, J. M., and Devlin, R. B. (1997). Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **146**, 180–188.
- Corberand, J. X. (1996). Reticulocyte analysis using flow cytometry. *Hematol. Cell. Ther.* **38**, 487–494.
- Dockery, D. W. (2001). Epidemiologic evidence of cardiovascular effects of particulate air pollution. *Environ. Health Perspect.* **109**, 483–486.
- Gardner, S. Y., Lehmann, J. R., and Costa, D. L. (2000). Oil fly ash induced elevation of plasma fibrinogen levels in rats. *Toxicol. Sci.* **56**, 175–180.
- Gold, D. R., Litonjua, A., Schwartz, J., Lovett, E., Larson, A., Nearing, B., Allen, G., Verrier, M., Chery, R., and Verrier, R. (2000). Ambient pollution and heart rate variability. *Circulation* **101**, 1267–1273.
- Goldberg, M. S., Burnett, R. T., Bailar, J. C. 3rd, Tambllyn, R., Ernst, P., Flegel, K., Brook, J., Bonvalot, Y., Singh, R., Valois, M. F., and Vincent, R. (2001). Identification of persons with cardiorespiratory conditions who are at risk of dying from the acute effects of ambient air particles. *Environ. Health Perspect.* **109**, 487–494.
- González-Flecha, B. (2004). Oxidant mechanisms in response to ambient air particles. *Mol. Aspects Med.* **25**, 169–182.
- Goto, Y., Ishii, H., Hogg, J. C., Shih, C. H., Yatera, K., Vincent, R., and Van Eeden, S. F. (2004). Particulate matter air pollution stimulates monocyte release from the bone marrow. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* E pub ahead of print.
- Gurgueira, S. A., Lawrence, J., Coull, B., Murthy, G. G. K. and González-Flecha, B. (2002). Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environ. Health Perspect.* **110**, 749–755.
- Ichimura, H., Parthasarathi, K., Quadri, S., Iseki, A. C., and Bhattacharya, J. (2003). Mechano-oxidative coupling by mitochondria induces proinflammatory responses in lung venular capillaries. *J. Clin. Invest.* **111**, 691–699.
- Kodavanti, U. P., Hauser, R., Christiani, D. C., Zhi, H. M., McGee, J., Ledbetter, A., Richards, J., and Costa, D. L. (1998). Pulmonary responses to oil fly ash particles in the rat differ by virtue of their specific soluble metals. *Toxicol. Sci.* **43**, 204–212.
- Kodavanti, U. P., Schladweiler, M. C., and Ledbetter, A. D. (2002). Temporal association between pulmonary and systemic effects of particulate matter in healthy and cardiovascular compromised rats. *J. Toxicol. and Environ. Health* **65**, 1545–1569.
- Lin, C. A., Pereira, L. A. A., Conceição, G. M. S., Kishi, H. S., Milani, R. Jr., Braga, A. L. F., and Saldiva, P. H. N. (2003). Association between air pollution and ischemic cardiovascular emergency room visits. *Environ. Res.* **92**, 57–63.
- Magari, S. R., Hauser, R., Schwartz, J., Williams, P. L., Smith, T. J., and Christiani, D. C. (2001). Association of heart rate variability with occupational and environmental exposure to particulate air pollution. *Circulation* **104**, 986–991.
- Magari, S. R., Schwartz, J., Williams, P. L., Hauser, R., Smith, T. J., and Christiani, D. C. (2002). The association of particulate air metal concentrations with heart rate variability. *Environ. Health Perspect.* **110**, 875–880.
- McDonough, K. H. (1999). The role of alcohol in the oxidant antioxidant balance in heart. *Front. Biosci.* **4**, D601–D606.
- Mann, J. K., Tager, I. B., Lurmann, F., Segal, M., Quesenberry, C. P., Lugg, M. M., Shan, J., and Van Den Eeden, S. K. (2002). Air pollution and hospital admissions for ischemic heart disease in persons with congestive heart failure or arrhythmia. *Environ. Health Perspect.* **110**, 1247–1252.
- Medeiros, N., Jr., Rivero, D. H. R. F., Kasahara, D. I., Saiki, M., Godleski, J. J., Koutrakis, P., Capelozzi, V. L., Saldiva, P. H. N., and Antonangelo, L. (2004).

- Acute pulmonary and hematological effects of two types of particle surrogates are influenced by their elemental composition. *Environ. Res.* **95**, 62–70.
- Nemmar, A., Hoet, P. H. M., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M. F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L. and Nemery, B. (2002). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* **105**, 411–414.
- Peters, A., Döring, A., Wichmann, H-E., and Koenig, W. (1997). Increased plasma viscosity during an air pollution episode: A link to mortality? *Lancet* **349**, 1582–1587.
- Peters, A., Liu, E., Verrier, R. L., Schwartz, J., Gold, D. R., Mittleman, M., Baliff, J., Oh, J. A., Allen, G., Monahan, K., and Dockery, D. W. (2000). Air pollution and incidence of cardiac arrhythmia. *Epidemiology* **11**, 11–17.
- Peters, A., Dockery, D. W., Muller, J. E., and Mittleman, M. A. (2001). Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation* **103**, 2810–2815.
- Pope, C. A. 3rd, Verrier, R. L., Lovett, E. G., Larson, A. C., Raizenne, M. E. B. A., Kanner, R. E., Schwartz, J., Villegas, G. M., Gold, D. R., and Dockery, D. W. (1999). Heart rate variability associated with particulate air pollution. *Am. Heart J.* **138**, 890–899.
- Pope, C. A. 3rd, Hansen, M. L., Long, R. W., Nielsen, K. R., Eatough, N. L., Wilson, W. E., and Eatough, D. J. (2004). Ambient particulate air pollution, heart rate variability, and blood markers of inflammation in a panel of elderly subjects. *Environ. Health Perspect.* **112**, 339–345.
- Prahalad, A. K., Soukup, J. M., Inmon, J., Willis, R., Ghio, A. J., Becker, S., and Gallagher, J. E. (1999). Ambient air particles: effects on cellular oxidant radical generation in relation to particulate elemental chemistry. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **158**, 81–91.
- Saldiva, P. H. N., Clarke, R. W., Coull, B. A., Stearns, R. C., Murthy, J. L. G. G., Diaz, E., Koutrakis, P., Suh, H., Tsuda, A., and Godleski, J. J. (2002). Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **165**, 1610–1617.
- Schins, R. P. F., Lightbody, J. H., Borm, P. J. A., Shi, T., Donaldson, K., and Stone, V. (2004). Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **195**, 1–11.
- Schwartz, J. (2001). Air pollution and blood markers of cardiovascular risk. *Environ. Health Perspect.* **109**, 405–409.
- Schwartz, J., Ballester, F., Saez, M., Perez-Hoyos, S., Bellido, J., Cambra, K., Arribas, F., Cañada, A., Perez-Boillos, M. J., and Sunyer, J. (2001). The concentration–response relation between air pollution and daily deaths. *Environ. Health Perspect.* **109**, 1001–1006.
- Seaton, A., Soutar, A., Crawford, V., Elton, R., McNerlan, S., Cherie, J., Watt, M., Agius, R., and Stout, R. (1999). Particulate air pollution and the blood. *Thorax* **54**, 1027–1032.
- Stone, P. H., and Godleski, J. J. (1999). First steps toward understanding the pathophysiologic link between air pollution and cardiac mortality. *Am. Heart J.* **138**, 804–807.
- Tao, F., González-Flecha, B. and Kobzik, L. (2003). Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. *Free Rad. Biol. Med.* **35**, 327–340.
- Tarkiainen, T. H., Timonen, K. L., Vanninen, E. J., Alm, S., Hartikainen, J. E. K., and Pekkanen, J. (2003). Effect of acute carbon monoxide exposure on heart rate variability in patients with coronary artery disease. *Clin. Physiol. Func. Im.* **23**, 98–102.
- Touyz, R. M., and Schiffrin, E. L. (2004). Reactive oxygen species in vascular biology: Implications in hypertension. *Histochem. Cell. Biol.* **122**, 339–352.
- Van Eeden, S. F., and Hogg, J. C. (2002). Systemic inflammatory response induced by particulate matter air pollution: The importance of bone-marrow stimulation. *J. Toxicol. Environ. Health* **65**, 1597–1613.
- Watkinson, W. P., Campen, M. J., and Costa, D. L. (1998). Cardiac arrhythmia induction after exposure to residual oil fly ash particles in a rodent model of pulmonary hypertension. *Toxicol. Sci.* **41**, 209–216.
- Wellenius, G. A., Saldiva, P. H. N., Batalha, J. R. F., Murthy, G. G., Krishna Coull, B. A., Verrier, R. L., and Godleski, J. J. (2002). Electrocardiographic changes during exposure to residual oil fly ash (ROFA) particles in a rat model of myocardial infarction. *Toxicol. Sci.* **66**, 327–335.



8. REFERÊNCIAS

Anfavea. 2000. Associação nacional dos fabricantes de veículos automotores. <http://www.anfavea.com.br/Index.html>.

Avancini & Favaretto. *Biologia* – 1997. Uma abordagem evolutiva e ecológica. Ed. Moderna, Vol. 2. São Paulo.

Baird, C. 2002. *Química Ambiental. A química e a poluição do ar na troposfera*. Bookman, 2ª Edição, Capítulo 3, pp. 107 – 191.

Baskurt, O.K., Levi, E., Caglayan, S. and Dikmenoglu, N. 1990. *Arch. Environ. Health* 45, 224-228.

Batalha, J.R.F., Saldiva, P.H.N., Clarke, R.W., Coull, B.A., Stearns, R.C., Lawrence, J., Murthy, G.G. K., Koutrakis, P. and Godleski, J.J. 2002. Concentrated ambient air particles induce vasoconstriction of small pulmonary arteries in rats. *Environ. Health Perspect.* 110, 1191-1197.

Böhm, G.M, Saldiva, P.H.N., Pasqualucci, C.G., Massad, E., Martins, M., Zin, W.A., Cardoso, W.V., Criado, P.M., Komatsuzaki, M., Sakae, R.S., Negri, E.M., Lemos, M., Capelozzi, V.L., Crestana, C., Silva, R. 1989. Biological effects of air pollution in São Paulo and Cubatão. *Environ. Res.* 49, 208-216.

Bouthillier, L., Vincent, R., Goegan, P., Adamson, I.Y.R., Bjarnason, S., Stewart, M., Guénette, J., Potvin, M. and Kumarathasan, P. 1998. Acute effects of inhaled urban particles and ozone. *Lung*

morphology, macrophage activity and plasma endothelin-1. *Am. J. Pathol.* 153, 1873-1884.

Boveda, S., Galinier, M., Pathak, A., Fourcade, J., Dongay, B., Benchendikh, D., Massabuau, P., Fauvel, J.M., Senard, J.M. and Bounhoure, J.P. 2001. Prognostic value of heart rate variability in time domain analysis in congestive heart failure. *J. Interv. Card. Electrophysiol.* 5(2), 181-187.

Braga, A.L.F., Conceição, G.M.S., Pereira, L.A.A., Kishi, H.S., Pereira, J.C.R., Andrade, M.F., Gonçalves, F.L.T., Saldiva, P.H.N., Latorre, M.R.D.O. 1999. Air pollution and pediatric respiratory hospital admissions in São Paulo, Brazil. *J. Environ. Med.* 1, 95-102.

Braga, A.L.F., Saldiva, P.H.N., Pereira, L.A.A., Menezes, J.J.C., Conceição, G.M.S., Lin, C.A., Zanobetti, A., Schwartz, J., Dockery, D.W. 2001a. Health effects of air pollution exposure on children and adolescents in São Paulo, Brazil. *Pediatr. Pulmonol.* 31,106-113.

Braga, A.L.F., Zanobetti, A. and Schwartz, J. 2001b. The lag structure between particulate air pollution and respiratory and cardiovascular deaths in 10 US cities. *J. Occup. Environ. Med.* 43, 927-933.

Brook R.D., Brook, J.R., Urch, B., Vincent, R., Rajagopalan, S. and Silverman, F. 2002. Inhalation of fine particulate air pollution and ozone causes acute arterial vasoconstriction in healthy adults. *Circulation* 105, 1534-1536.

Brook, R.D., Brook, J.R. and Rajagopalan, S. 2003. Air pollution: the "heart" of the problem. *Curr. Hypertens. Rep.* 5(1), 32-39.

Brunekreef, B., Holgate, S.T. 2002. Air pollution and health. *Lancet* 360, 1233-1242.

Campen, M.J., Nolan, J.P., Schladweiler, M.C.J., Kodavanti, U.P., Evansky, P.A., Costa, D.L. and Watkinson, W.P. 2001. Cardiovascular and thermoregulatory effects of inhaled PM-associated transition metals: a potential interaction between nickel and vanadium sulfate. *Toxicol. Sci.* 64(2), 243-252.

Campen, M.J. 2002. Cardiac and thermoregulatory effects of instilled particulate matter-associated transition metals in healthy and cardiopulmonary-compromised rats. *J Toxicol. and Environ. Health* 65, 1615-1631.

Campese, V.M., Ye, S., Zhong, H., Yanamadala, V., Ye, Z and Chiu, J. 2004. Reactive oxygen species stimulate central and peripheral sympathetic nervous system activity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287(2), H695-H703.

Carney, R.M., Blumenthal, J.A., Stein, P.K., Watkins, L., Catellier, D., Berkman, L.F., Czajkowski, S.M., O'Connor, C., Stone, P.H. and Freedland, K.E. 2001. Depression, heart rate variability, and acute myocardial infarction. *Circulation* 104(17), 2024-2028.

Carter, J.D., Ghio, A.J., Samet, J.M. and Devlin, R.B. 1997. Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 146, 180-188.

Conceição, G.M.S., Miraglia, S.G., Kishi, H.S., Saldiva, P.H.N., Singer, J.M. 2001. Air pollution and child mortality: a time series study in São Paulo, Brazil. *Environ. Health. Perspect.* 109(3), 347-350.

Corberand, J.X. Reticulocyte analysis using flow cytometry. 1996. *Hematol. Cell. Ther.* 38, 487-494.

Costa, D.L. and Dreher, K.L. 1997. Bioavailable transition metals in particulate matter mediate cardiopulmonary injury in healthy and compromised animal models. *Environ. Health Perspect.* 105(5), 1053-1060.

Datasus. 2000. <http://www.datasus.gov.br/>.

Derisio, José Carlos. 2000. Introdução ao controle de poluição ambiental. Editora Signus, 2º edição.

Dheher, K.L., Jaskot, R.H., Lehmann, J.R., Richards, J.H. and McGee, J.K. 1997. Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury. *J. Toxicol. Environ. Health.* 50, 285-305.

Dockery, D.W., Pope III, C.A., Xu, X., Spengler, J.D., Ware, J.H., Fay, M.E., Ferris, B.G. Jr., Speizer, F.E. 1993. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N. Engl. J. Med.* 329(24), 1753-1759.

Dockery, D.W. 2001. Epidemiologic evidence of cardiovascular effects of particulate air pollution. *Environ. Health Perspect.* 109(4), 483-486.

Donaldson, K., Stone, V., Seaton, A. and MacNee, W. 2001. Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. *Environ. Health Perspect.* 109(4), 523-527.

Dye, J.A., Adler, K.B., Richards, J.H. and Dreher, K.L. 1997. Epithelial injury induced by exposure to residual oil fly-ash particles: role of reactive oxygen species? *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 17, 625-633.

Dye, J.A., Lehmann, J.R., McGee, J.K., Winsett, D.W., Ledbetter, A.D., Everitt, J.I., Ghio, A.J. and Costa, D.L. 2001. Acute pulmonary toxicity of particulate matter filter extracts in rats: coherence with epidemiological studies in Utah Valley residents. *Environ. Health Perspect.* 109(3), 395-403.

Englert, N. 2004. Fine particles and human health – a review of epidemiological studies. *Toxicology Letters*, 235-242.

Frampton, M.W. 2001. Systemic and cardiovascular effects of airway injury and inflammation: ultrafine particle exposure in humans. *Environ. Health Perspect.* 109(4), 529-532.

Galinier, M., Pathak, A., Fourcade, J., Androdias, C., Curnier, D., Varnous, S., Boveda, S., Massabuau, P., Fauvel, M., Senard, J.M. and Bounhoure, J.P. 2000. Depressed low frequency power of heart rate variability as an independent predictor of sudden death in chronic heart failure. *Eur. Heart J.* 21(6), 475-482.

Gardner, S.Y., Lehmann, J.R. and Costa, D.L. 2000. Oil fly ash induced elevation of plasma fibrinogen levels in rats. *Toxicol. Sci.* 56, 175-180.

Geissler, H.J. and Allen, S.J. 1998. Myocardial fluid balance: pathophysiology and clinical implications. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 46, 242-247.

Ghio, A.J., Kim, C., Devlin, R.B. 2000. Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in health human volunteers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 981-988.

Ghio, A.J., Silbajoris, R., Carson, J.L. and Samet, J.M. 2002. Biologic effects of oil fly ash. *Environ. Health Perspect.* 110(1), 89-102.

Godleski, J.J., Verrier, R.L., Koutrakis, P., Catalano, P., Coull, B., Reinisch, U., Lovett, E.G., Lawrence, J., Murthy, G.G., Wolfson, J.M., Clarke, R.W., Nearing, B.D. and Killingsworth, C. 2000. Mechanisms of morbidity and mortality from exposure to ambient air particles. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 91, 5-88.

Gold, D.R., Litonjua, A., Schwartz, J., Lovett, E., Larson, A., Nearing, B., Allen, G., Verrier, M., Cherry, R. and Verrier, R. 2000. Ambient pollution and heart rate variability. *Circulation* 101(11), 1267-1273.

Goldberg, M.S., Burnett, R.T., Bailar 3rd, J.C., Tamblyn, R., Ernst, P., Flegel, K., Brook, J., Bonvalot, Y., Singh, R., Valois, M.F. and Vincent, R. 2001. Identification of persons with cardiorespiratory conditions who are at risk of dying from the acute effects of ambient air particles. *Environ. Health Perspect.* 109(4), 487-494.

Goldsmith, C.A.W., Imrich, A., Danaee, H., Ning, Y.Y. and Kobzik, L. 1998. Analysis of air pollution particulate mediated oxidant

stress in alveolar macrophages. *J. Toxicol. Environ. Health* 54, 529-545.

González-Flecha, B. 2004. Oxidant mechanisms in response to ambient air particles. *Molecular Aspects of Medicine* 25, 169-182.

Goto, Y., Ishii, H., Hogg, J.C., Shih, C.H., Yatera, K., Vincent, R. and Van Eeden, S.F. 2004. Particulate matter air pollution stimulates monocyte release from the bone marrow. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170(8), 891-897.

Gurgueira, S.A., Lawrence, J., Coull, B., Murthy, G.G.K. and González-Flecha, B. 2002. Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environ. Health Perspect.* 110, 749-755.

Harrison, R.M. and Yin, J. 2000. Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health? *The Science of the Total Environment.* 249, 85-101.

Hjalmarson, A., Gilpin, E.A., Kjekshus, J., Schieman, G., Nicod, P., Henning, H. and Ross, J. 1990. Influence of heart rate on mortality after acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 65, 547-553.

Ichimura, H., Parthasarathi, K., Quadri, S., Issekutz, A.C and Bhattacharya, J. 2003. Mechano-oxidative coupling by mitochondria induces proinflammatory responses in lung venular capillaries. *J. Clin. Invest.* 111(5), 691-9.

Juha, P., Peters, A., Hoek, G., Tiittanen, P., Brunekreef, B., De Hartog, J., Heinrich, J., Ibaldo-Mulli, A., Kreyling, W., Lanki, T.,

Timonen, K., and Vanninen, E. 2002. Particulate air pollution and risk of ST-segment depression during repeated submaximal exercise tests among subjects with coronary heart disease: the exposure and risk assessment for fine and ultrafine particles in ambient air (ULTRA) study. *Circulation* 106(8), 933-938.

Kang, Y.J. 2001. Molecular and cellular mechanisms of cardiotoxicity. *Environ. Health Perspect.* 109(1), 27-39.

Kleiger, R.E., Miller, J.P., Bigger, J.T. Jr. and Moss, A.J. 1987. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 59, 256-262.

Kodavanti, U.P., Hauser, R., Christiani, D.C., Zhi, H.M., McGee, J., Ledbetter, A., Richards, J and Costa, D.L. 1998. Pulmonary responses to oil fly ash particles in the rat differ by virtue of their specific soluble metals. *Toxicol. Sci.* 43, 204-212.

Kodavanti, U.P., Schladweiler, M.C., Ledbetter, A.D., Watkinson, W.P., Campen, M.J., Winsett, D.W., Richards, J.R., Crissman, K.M., Hatch, G.E. and Costa, D.L. 2000. The spontaneously hypertensive rat as a model of human cardiovascular disease:evidence of exacerbated cardiopulmonary injury and oxidative stress from inhaled emission particulate matter. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* 164, 250-263.

Kodavanti, U.P., Schladweiler, M.C. and Ledbetter, A.D. 2002. Temporal association between pulmonary and systemic effects of particulate matter in healthy and cardiovascular compromised rats. *J. Toxicol and Environ. Health* 65, 1545-1569.

La Rovere, M.T., Pinna, G.D., Maestri, R., Mortara, A., Capomolla, S., Febo, O., Ferrari, R., Franchini, M., Gnemmi, M., Opasich, C., Riccardi, P.G., Traversi, E. and Cobelli, F. 2003. Short-term heart rate variability strongly predicts sudden cardiac death in chronic heart failure patients. *Circulation* 107, 565-570.

Laden, F., Neas, L.M., Dockery, D.W. and Schwartz, J. 2000. Association of fine particulate matter from different sources with daily mortality in six U.S. cities. *Environ. Health Perspect.* 108, 941-947.

Lemos, M., Lichtenfels, A.J.F.C., Amaro, Jr. E., Macchione, M., Martins, M., King, M., Böhm, G.M., Saldiva, P.H.N. 1994. Quantitative pathology of nasal passages in rats exposed to urban levels of air pollution. *Environ. Res.* 66, 87-95.

Liao, D., Creason, J., Shy, C., Williams, R., Watts, R. and Zweidinger, R. 1999. Daily variation of particulate air pollution and poor cardiac autonomic control in the elderly. *Environ. Health Perspect.* 107, 521-525.

Lin, C.A., Martins, M.A., Farhat, S.C.L., Pope 3rd, C.A., Conceição, G.M.S., Anastacio, V.M., Hatanaka, M., Andrade, W.C., Hamave, W.R., Böhm, G.M., Saldiva, P.H.N. 1999. Air Pollution and Respiratory Illness of Children in São Paulo, Brazil. *Pediatric Perinatal Epidemiol.* 13, 475-488.

Lin, C.A., Pereira, L.A.A., Conceição, G.M.S., Kishi, H.S., Milani Jr., R., Braga, A.L.F. and Saldiva, P.H.N. 2003. Association between air pollution and ischemic cardiovascular emergency room visits. *Environ. Res.* 92, 57-63.

Lin, C.A., Pereira, L.A.A., Nishioka, D.C., Conceição, G.M.S., Braga, A.L.F. and Saldiva, P.H.N. 2004. Air pollution and neonatal deaths in São Paulo, Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37(5), 765-770.

Lombardi, F. 2002. Clinical implications of present physiological understanding of HRV components. *Cardiac electrophysiology review.* 6, 245-249.

Magari, S.R., Hauser, R., Schwartz, J., Williams, P.L., Smith, T.J. and Christiani, D.C. 2001. Association of heart rate variability with occupational and environmental exposure to particulate air pollution. *Circulation* 104(9), 986-991.

Magari, S.R., Schwartz, J., Williams, P.L., Hauser, R., Smith, T.J. and Christiani, D.C. 2002. The association of particulate air metal concentrations with heart rate variability. *Environ. Health Perspect.* 110, 875-880.

Mann, J.K., Tager, I.B., Lurmann, F., Segal, M., Quesenberry, C.P., Lugg, M.M., Shan, J and Van Den Eeden, S.K. 2002. Air pollution and hospital admissions for ischemic heart disease in persons with congestive heart failure or arrhythmia. *Environ. Health Perspect.* 110, 1247-1252.

Martins, L.C., Latorre, M.R.D.O., Saldiva, P.H.N. and Braga, A.L.F. 2001. Relação entre poluição atmosférica e atendimentos por infecção de vias aéreas superiores no município de São Paulo: avaliação do rodízio de veículos. *Ver. Bras. Epidemiol.* 4(3), 220-229.

McDonough, K.H. 1999. The role of alcohol in the oxidant antioxidant balance in heart. *Front. Biosci.* 4, D601-D606.

Medeiros Jr., N., Rivero, D.H.R.F., Kasahara, D.I., Saiki, M., Godleski, J.J., Koutrakis, P., Capelozzi, V.L., Saldiva, P.H.N. and Antonangelo, L. 2004. Acute pulmonary and hematological effects of two types of particle surrogates are influenced by their elemental composition. *Environmental Research* 95, 62-70.

Mol, A.P.J. e Spaargaren, G. 2000. "Ecological Modernization Theory in Debate: a review." In *Ecological Modernisation Around the World: Perspectives and Critical Debates*, Frank Cass & Co. Ltd. pp. 17-49.

Nemmar, A., Hoet, P.H.M., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M.F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L. and Nemery, B. 2002. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 105, 411-414.

Nemmar, A., Hoylaerts, M.F., Hoet, P.H.M. and Nemery, B. 2004. Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicol. Letters* 149, 243-253.

Oberdörster, G. 2001. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 74, 1-8.

Osornio-Vargas, A.R., Bonner, J.C., Alfaro-Moreno, E., Martínez, L., Garcia-Cuellar, C., Rosales, S.P.L., Miranda, J. and Rosas, I. 2003. Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter in vitro are dependent on particle size and composition. *Environ. Health Perspect.* 111, 1289-1293.

Pereira, L.A., Loomis, D., Conceição, G.M., Braga, A.L.F., Arcas, R.M., Kishi, H.S., Singer, J.M., Böhm, G.M., Saldiva, P.H. 1998.

Association between air pollution and intrauterine mortality in Sao Paulo, Brazil. *Environ. Health Perspect.* 106(6), 325-329.

Pereira, P.M., Saldiva, P.H.N., Sakae, R.S., Böhm, G.M., Martins, M.A. 1996. Urban levels of air pollution increase lung responsiveness in rats. *Environ. Res.* 69, 96-101.

Peters, A., Döring, A., Wichmann, H-E. and Koenig, W. 1997. Increased plasma viscosity during an air pollution episode: a link to mortality? *Lancet* 349, 1582-1587.

Peters, A., Perz, S., Döring, A., Stieber, J., Koenig, W. and Wichmann, H.E. 1999. Increases in heart rate during an air pollution episode. *Am. J. Epidemiol.* 150, 1094-1098.

Peters, A., Liu, E., Verrier, R.L., Schwartz, J., Gold, D.R., Mittleman, M., Baliff, J., Oh, J.A., Allen, G., Monahan, K., Dockery, D.W. 2000. Air pollution and incidence of cardiac arrhythmia. *Epidemiology* 11, 11-17.

Peters, A., Dockery, D.W., Muller, J.E. and Mittleman, M.A. 2001. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation* 103, 2810-2815.

Pope III, C.A., Thun, M.J., Namboodiri, M.M., Dockery, D.W., Evans, J.S., Speizer, F.E. and Heath Jr, C.W. 1995. Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. *Am. J. Crit. Care Med.* 151, 669-674.

Pope III, C.A., Verrier, R.L., Lovett, E.G., Larson, A.C., Raizenne, M.E.B.A., Kanner, R.E., Schwartz, J., Villegas, G.M., Gold, D.R. and

Dockery, D.W. 1999. Heart rate variability associated with particulate air pollution. *Am. Heart J.* 138, 890-899.

Pope III, C.A. 2000a. Epidemiological basis for particulate air pollution health standards. Review. *Aerosol. Sci. Technol.* 32, 4-14.

Pope III, C.A. 2000b. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk? *Environ. Health Perspect.* 108(4), 713-723.

Pope III, C.A., Hansen, M.L., Long, R.W., Nielsen, K.R., Eatough, N.L., Wilson, W.E. and Eatough, D.J. 2004. Ambient particulate air pollution, heart rate variability, and blood markers of inflammation in a panel of elderly subjects. *Environ. Health Perspect.* 112(3), 339-345.

Population Reference Bureau. 2002. Washington, DC., <http://www.prb.org/>.

Prahalad, A.K., Soukup, J.M., Inmon, J., Willis, R., Ghio, A.J., Becker, S. and Gallagher, J.E. 1999. Ambient air particles: effects on cellular oxidant radical generation in relation to particulate elemental chemistry. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* 158, 81-91.

Saldiva, P.H.N., King, M., Delmonte, V.L., Macchione, M., Parada, M.A.C., Daliberto, M.L., Sakae, R.S., Criado, P.M., Silveira, P.S.P., Zin, W.A., Böhm, G.M. 1992. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. *Environ. Res.* 57, 19-33.

Saldiva, P.H.N., Lichtenfels, A.J.F.C., Paiva, P.S.O., Barone, I.A., Martins, M.A., Massad, E., Pereira, J.C.R., Xavier, V. P., Singer,

J.M., Böhm, G.M. 1994. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo-Brazil. *Environ. Res.* 65, 218-225.

Saldiva, P.H.N., Pope, C.A., Schwartz, J., Dockery, D.W., Lichtenfels, A.J.F.C., Salge, J.M., Barone, I.A., Böhm, G.M. 1995. Air pollution and mortality in elderly people: a time series study in São Paulo, Brazil. *Arch. Environ. Health* 501, 59-163.

Saldiva, P.H.N., Clarke, R.W., Coull, B.A., Stearns, R.C., Murthy, J.L.G.G., Diaz, E., Koutrakis, P., Suh, H., Tsuda, A. and Godleski, J.J. 2002. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 1610-1617.

Santos, U.P., Braga, A.L.F., Giorgi, D.M.A., Pereira, L.A.A., Grupi, C.J., Lin, C.A., Bussacos, M.A., Zanetta, D.M., Saldiva, P.H.N., Terra Filho, M. 2005. Effects of Air Pollution on Blood Pressure and Heart Rate Variability: A Panel Study of Vehicular Traffic Controllers in the City of São Paulo, Brazil. *European Heart Journal* 26(2), 193 – 200.

Schins, R.P.F., Lightbody, J.H., Borm, P.J.A., Shi, T., Donaldson, K. and Stone, V. 2004. Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195, 1-11.

Schwartz, J. 1999. Air pollution and hospital admissions for heart disease in eight U.S. countries. *Epidemiology* 10, 17-22.

Schwartz, J. 2001. Air pollution and blood markers of cardiovascular risk. *Environ. Health Perspect.* 109 (3), 405-409.

Schwartz, J., Ballester, F., Saez, M., Perez-Hoyos, S., Bellido, J., Cambra, K., Arribas, F., Cañada, A., Perez-Boillos, M.J. and Sunyer, J. 2001. The concentration-response relation between air pollution and daily deaths. *Environ. Health Perspect.* 109, 1001-1006.

Schwartz, J., Laden, F. and Zanobetti, A. 2002. The concentration-reponse relation between PM_{2.5} and daily deaths. *Environ. Health Perspect.* 110, 1025-1029.

Seaton, A., MacNee, W., Donaldson, K., Godden, D. 1995. Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet* 345, 176-178.

Seaton, A., Soutar, A., Crawford, V., Elton, R., McNerlan, S., Cherrie, J., Watt, M., Agius, R and Stout, R. 1999. Particulate air pollution and the blood. *Thorax* 54, 1027-1032.

Sosnowski, M., MacFarlane, P.W., Czyz, Z., Skrzypek-Wanha, J., Boczkowska-Gaik, E. and Tendera, M. 2002. Age-adjustment of HRV measures and its prognostic value for risk assessment in patients late after myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* 86, 249-258.

Stone, P.H. and Godleski, J.J. 1999. First steps toward understanding the pathophysiologic link between air pollution and cardiac mortality. *Am. Heart J.* 138, 804-807.

Tan, W.C., Qiu, D., Liam, B.L., NG, T.P., Lee, S.H., Van Eeden, S.F., D'yachkova, Y. and Hogg, J.C. 2000. The human bone marrow response to acute air pollution caused by forest fires. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 1213-1217.

Tao, F., González-Flecha, B. and Kobzik, L. 2003. Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. *Free Radical Biology & Medicine* 35(4), 327-340.

Tarkiainen, T.H., Timonen, K.L., Vanninen, E.J., Alm, S., Hartikainen, J.E.K., and Pekkanen, J. 2003. Effect of acute carbon monoxide exposure on heart rate variability in patients with coronary artery disease. *Clin. Physiol. and Func. Im.* 23, 98-102.

Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. 1996. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *European Heart Journal* 17, 354-381.

Touyz, R.M. and Schiffrin, E.L. 2004. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem. Cell. Biol.* 122(4), 339-352.

U.S.EPA. Air quality criteria for particulate matter. Environmental Protection.

Utell, M.J., Frampton M.W. 2000. Acute health effects of ambient air pollution: the ultrafine particle hypothesis. *J. Aerosol Med.* 13, 355-359.

Vaishnav, S., Stevenson, R., Marchant, B., Lagi, K., Ranjadayalan, K. and Timmis, A.D. 1994. Relation between heart rate variability early after acute myocardial infarction and long-term mortality. *Am. J. Cardiol.* 73, 653-657.

Van Eeden, S.F. and Hogg, J.C. 2002. Systemic inflammatory response induced by particulate matter air pollution: the

importance of bone-marrow stimulation. *J. Toxicol. Environ. Health* 65, 1597-1613.

Verrier, R.L., Mittleman, M.A. and Stone, P.H. 2002. Air pollution: an insidious and pervasive component of cardiac risk. *Circulation* 106(8), 890-892.

Watkinson, W.P., Campen, M.J. and Costa, D.L. 1998. Cardiac arrhythmia induction after exposure to residual oil fly ash particles in a rodent model of pulmonary hypertension. *Toxicol. Sci.* 41, 209-216.

Watkinson, W.P., Campen, M.J., Nolan, J.P. and Costa, D.L. 2001. Cardiovascular and systemic responses to inhaled pollutants in rodents: effects of ozone and particulate matter. *Environ. Health Perspect.* 109(4), 539-546.

Wellenius, G. A., Saldiva, P.H.N., Batalha, J.R.F., Murthy, G.G.Krishna, Coull, B.A., Verrier, R.L. and Godleski, J.J. 2002. Electrocardiographic changes during exposure to residual oil fly ash (ROFA) particles in a rat model of myocardial infarction. *Toxicol. Sci.* 66, 327-335.

Wichers, L.B., Nolan, J.P., Winsett, D.W., Ledbetter, A.D., Kodavanti, U.P., Schladweiler, C.J., Costa, D.L. and Watkinson, W.P. 2004. Effects of instilled combustion-derived particles in spontaneously hypertensive rats. Part I: Cardiovascular Responses. *Inhalation Toxicol.* 16, 391-405.

Widdicombe, J. and Lee, L.Y. 2001. Airway reflexes, autonomic function, and cardiovascular responses. *Environ. Health Perspect.* 109(4), 579-584.

World Health Organization. 2002. Statistical Information System. Mortality database. <http://www.who.int/entity/en/>.

World Health Organization. 2003. Health aspects of air pollution with particulate matter, ozone and nitrogen dioxide. Report on a WHO Working Group, Bonn, Germany.

World Resources Institute. 2003. <http://www.wri.org/>.

Zareba, W., Nomura, A. and Philippe, J. 2001. Cardiovascular effects of air pollution: what to measure in ECG? Environ. Health Perspect. 109(4), 533-538.