Natalia Madureira de Almeida

**Efeitos hemodinâmicos, inflamatórios e histológicos após a
exposição à exaustão do combustível diesel em modelo experimental
de hipertensão arterial**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da

Universidade de São Paulo para obtenção de

Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Elia Espin Garcia Caldini

São Paulo
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Almeida, Natalia Madureira

Efeitos hemodinâmicos, inflamatórios, histológicos após a exposição à
exaustão do combustível diesel em modelo experimental de hipertensão arterial /
Natalia Madureira Almeida. -- São Paulo, 2017.

**Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo.**

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Elia Tasmazo Espin Garcia Caldini.

*Aos meus pais Ana e Rubens pelo amor incondicional
Meu irmão Guilherme pelo apoio e força
Meu noivo Gustavo pelo incentivo, inspiração e amor.*

“Todas as vitórias ocultam uma renúncia”

(Simone de Beauvoir).

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Dra. Dolores Helena Rivero pelo carinho, apoio, suporte e incentivo sem fim nessa caminhada, que viu em mim os sonhos e a capacidade de realizá-los.

A Dra. Elia Caldini pela orientação e auxílio.

A Dra. Cláudia Naves pela sabedoria e parceria e pelo suporte e auxílio nas minhas análises de microscopia de luz.

A Dra. Josemara de Brito por todo apoio na estatística, ensinamentos e palavras de incentivo.

A Larissa dos Santos Emídio por todo apoio e ajuda, esse trabalho foi realizado graças a sua boa vontade e trabalho árduo, sem você nada disso seria possível.

A Dra. Beatriz Saraiva pelos ensinamentos e parceria.

A Dra. Clarice Olivo pela parceria e troca de experiências, sempre com muito carinho principalmente nos momentos difíceis.

A Denise Ariane de Jesus Gomes, bioterista que ajudou a cuidar dos nossos animais com tanta dedicação.

Ao Dr. Manoel Carneiro de Oliveira Junior por horas de ELISA, sua paciência e sabedoria.

Ao Dr. Rodolfo de Paula Vieira pela parceria e apoio para as análises de perfil inflamatório.

A Deus que me deu forças e sabedoria para chegar ao fim dessa etapa.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 JUSTIFICATIVA E ESTRATÉGIA DE ESTUDO.....	21
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4 METODOLOGIA.....	24
4.1 MODELO EXPERIMENTAL.....	24
4.2 ANIMAIS E AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO.....	24
4.3 EXPOSIÇÃO NO LABORATÓRIO MÓVEL DE COMBUSTÍVEIS.....	25
4.4 ANÁLISE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA), VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA) E PRESSÃO ARTERIAL.....	27
4.5 COLETA E ANÁLISE LABORATORIAL DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	28
4.6 COLETA E ANÁLISE DO LAVADO BRONCOALVEOLAR.....	29
4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	29
4.7.1 COLETA ESTEREOLÓGICA.....	30
4.8 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA.....	31
4.9 ANÁLISE DAS CITOCINAS.....	31
4.9.1 ANÁLISE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE.....	32
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5.RESULTADOS.....	33
5.1 FREQUÊNCIA CARDÍACA, VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA E PRESSÃO ARTERIAL.....	35
5.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	44
5.3 PARÂMETROS DE COAGULAÇÃO.....	51
5.4 PARÂMETROS ESTEREOLÓGICOS.....	57

5.5 CITOCINAS.....	62
5.6 ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE.....	66
5.7 LAVADO BRONCOALVEOLAR.....	69
6. DISCUSSÃO.....	72
7.CONCLUSÃO.....	82
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

Almeida NM. Efeitos hemodinâmicos, inflamatórios, histológicos após a exposição à exaustão do combustível diesel em modelo experimental de hipertensão arterial [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Resumo

É plausível que a poluição urbana das grandes metrópoles possa favorecer o desenvolvimento ou mesmo agravar o quadro de hipertensão arterial. A possibilidade de estudar o efeito direto do DE em roedores é extremamente importante e eficaz através do modelo de exposição com o gerador de combustíveis instalado no campus da Faculdade de Medicina da USP. A nossa proposta principal foi avaliar os efeitos hemodinâmicos, aspectos de remodelamento das fibras da matriz extracelular cardíaca e perfil inflamatório pulmonar, visando obter uma conexão entre a exposição ao DE e seus efeitos sistêmicos em 60 ratos hipertensos: SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) e 60 normotensos: WKY (Wistar Kyoto). Esses animais foram divididos em 2 grupos: expostos ao ar filtrado e expostos ao diesel e também em 3 tempos de exposição: 15, 30 e 45 dias. Para tanto, foi proposto neste estudo a avaliação dos seguintes parâmetros: Frequência cardíaca, variabilidade da frequência cardíaca, pressão arterial, lavado broncoalveolar, hemograma completo e fatores de coagulação; expressão de marcadores de estresse oxidativo através das análises de citocinas (IL1 β , IL6, CINC e TNF- α) e da enzima superóxido dismutase (SOD) e avaliação qualitativa e quantitativa do tamanho e número de cardiomiócitos e volume de ventrículo esquerdo, através de técnicas estereológicas, e o remodelamento dos elementos fibrilares da matriz extracelular do ventrículo esquerdo dos ratos. **Resultados:** A exposição DE causou uma diminuição da VFC: SDNN: ($p=0,017$), RMSSD ($p=0,045$) nos SHR comparados com WKY todos os tempos de exposição, também foi observado um aumento do tempo de tromboplastina parcial ativada no grupo de 45 dias ($p= 0,000$), do tempo de protombina nos

grupos 30 ($p=0,004$) e 45 ($p=0,000$) e uma diminuição da concentração de fibrinogênio no grupo 15 dias ($p=0,020$). Houve um aumento da concentração de plaquetas nos grupos 30 ($p=0,000$) e 45 dias ($p=0,004$) e hipertrofia ventricular esquerda, no grupo 45 dias ($p=0,000$) para os animais SHR quando comparado aos animais WKY expostos ao DE. Notamos um aumento das fibras colagênicas no grupo 45 dias ($p=0,000$) e aumento de volume de cardiomiócitos nos grupos 15 ($p=0,000$) 30 ($p=0,000$) e 45 dias ($p=0,023$) em ratos SHR expostos ao DE comparados aos WKY. Também ocorreu um aumento da produção das citocinas IL1 β nos grupos 30 ($p=0,002$) e 45 dias ($p=0,000$) e TNF- α nos grupos 30 ($p=0,012$) e 45 dias ($p=0,003$) e CINC no grupo 45 dias ($p=0,021$) em ratos SHR expostos ao DE. Comparando as linhagens, os ratos SHR expostos ao DE apresentaram maiores valores de IL1 β no grupo 45 dias ($p=0,043$). Os valores de SOD foram menores em ratos SHR no grupo 30 dias ($p=0,016$) de exposição ao DE. Nos ratos SHR, expostos ao DE, nos grupos 30 ($p=0,008$) e 45 dias ($p=0,002$), notou-se um aumento de macrófagos no lavado broncoalveolar.

Conclusões: De acordo com esses achados, notamos que a exposição ao diesel promove inflamação pulmonar e sistêmica, desbalanço do sistema nervoso autônomo e remodelamento do miocárdio em animais hipertensos. Estes fatores poderão promover ou agravar os quadros de hipertensão arterial sistêmica em indivíduos suscetíveis e expostos a poluição urbana.

Descritores: Diesel, Hipertensão Arterial, Material Particulado, Variabilidade da Frequência Cardíaca, Inflamação Pulmonar e SHR.

Almeida NM. Hemodynamic, inflammatory and histological effects after exposure to diesel exhaust in experimental model of arterial hypertension [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Abstract

The exposure to DEP (Diesel Exhaust Particles) is related to oxidative stress, it is possible that air pollution of the cities may aggravate hypertension. The possibility of studying the direct effects of DEP in rats is important and effective through intoxication model with the fuel generator installed in Medicine University of USP.

The fuel generator system is possible to evaluate the toxicological risks to the use of diesel. The study allowed hemodynamics effects, remodeling of left ventricle, pulmonary inflammation, having the connection between exposure to DEP and its systemic effects. It was evaluated: heart rate, heart rate variability, blood pressure, bronchoalveolar lavage, complete blood count and coagulation factors, cytokines evaluation (IL1 β , IL6, CINC and TNF- α) and SOD, vascular endothelium peribronchial vessels in bronchoalveolar lavage through immunoassay and qualitative and quantitative remodeling of extracellular matrix elements in left ventricle of 60 rats hypertensive: SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) and 60 normotensive WKY (Wistar Kyoto). These animals were divided in 2 groups: exposed to filtered air and exposed to diesel and to 3 times exposures groups: 15, 30 and 45 days. **Results:** The DE exposure caused decreased in HRV: SDNN: ($p=0,017$), RMSSD ($p=0,045$) in SHR in all times of exposure, increased in the values of coagulation factors in SHR exposed to DE after 30 ($p=0,001$) and 45 days ($p=0,000$), an aggregation of platelets after 30 ($p=0,000$) and 45 days ($p=0,004$), and left ventricular hypertrophy after 45 days ($p=0,000$) in SHR exposed to DE. We noticed an increase in collagenous fibers after 45 days ($p=0,000$) in SHR rats exposed to DE and increased volume of cardiomyocytes after 15 ($p=0,000$), 30 ($p=0,000$) and 45 days

($p=0,023$). A increased in cytokines production IL1 β after 30 ($p=0,002$) and 45 days ($p=0,000$) e TNF- α after 30 ($p=0,012$) and 45 days ($p=0,003$) and CINC after 45 days ($p= 0,021$) in SHR exposed to DE. Comparing the lineages, the SHR exposed to DE presented increased in values of IL1 β after 45 days ($p=0,043$). The SOD values increased in SHR after 30 days ($p= 0,016$) of exposure to DE. In SHR exposed to DE presented increased after de 30 ($p= 0,008$) and 45 days ($p= 0,002$), in values of macrophages. **Conclutions:** According to these findings, we noticed that exposure to diesel can promote pulmonary and systemic inflammation, imbalance the autonomic nervous system and remodeling the myocardium. These factors may promote or worsen hypertension in susceptible individuals exposed to urban pollution.

Descriptors: Diesel, Hypertension, Particulate Matter, Heart Rate Variability, Pulmonary Inflammation and SHR.

1. Introdução

Os estilos de vida da sociedade moderna que contemplam uma maior utilização de veículos automotores, têm causado uma liberação excessiva gases e partículas. A poluição gerada nas cidades são resultado, principalmente, da queima de combustíveis fósseis como por exemplo, carvão mineral e derivados do petróleo (gasolina e diesel). A sua composição é variável e depende da origem do poluente, de fatores ambientais como condições meteorológicas, tempo e dia da semana, atividade industrial e de densidade de tráfego.

São Paulo é a unidade da federação de maior ocupação territorial, maior contingente populacional, em torno de 44 milhões de habitantes (IBGE 2014), maior desenvolvimento econômico e maior frota automotiva. Os problemas de qualidade do ar ocorrem principalmente em função dos poluentes provenientes dos veículos, cerca de 14.808.384, desses 885.445 operam a diesel (Relatório CETESB, 2016).

Os poluentes podem ser lançados diretamente na atmosfera (poluentes primários) ou formados por reações químicas (poluentes secundários), e são subdivididos em gases, aerossóis e material particulado (MP) (CETESB 2016). O tamanho aerodinâmico do MP possui uma distribuição tri-modal, podendo ser dividido em frações grossas (MP_{10} - diâmetro $\leq 10 \mu m$), finas ($MP_{2,5}$ - diâmetro $\leq 2,5 \mu m$) e ultrafinas ($MP_{0,1}$ - diâmetro $\leq 0,1 \mu m$). As partículas grossas representam cerca de 40% da massa total do PM e pode ser derivado de inúmeras fontes como partículas da crosta terrestre (solo, pó vulcânico, areia, erosão), queima natural (madeira) ou uso de veículos (atrito do pneu, por exemplo) (Araujo e Nel, 2009; A.O. Lawal et al. 2016).

Os gases tóxicos do ar lançados pela combustão do diesel incluem monóxido de carbono, dióxido de enxofre, arsênico, acetaldeído, benzeno, formaldeído, chumbo inorgânico, manganês, compostos de mercúrio, metanol, fenol e compostos de cianeto. Os gases originados do diesel liberados na atmosfera contêm 100 vezes mais partículas do que os gases dos motores a gasolina nas mesmas condições de carga e de motor (Lucking et al., 2011). O diesel em sua fase gasosa é composto de CO, CO₂, óxidos de nitrogênio (NO_x), óxidos de enxofre (SO_x), oxigênio (O₂), nitrogênio (N₂), vapor de água e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) de baixo peso molecular. Estudos mostram que entre os hidrocarbonetos estão incluídos o hidrocarboneto alifático e o polímero policíclico não polar, que compreendem os principais constituintes químicos da DEP. No entanto, em fase particulada, suas partículas são compostas basicamente de carbono elementar (CE), concentrações elevadas de HPAs adsorvidos em sua superfície e quantidades pequenas de sulfatos, nitratos e metais (Popovicheva et al. 2014).

A fração solúvel do MP oriundo do diesel é a DEP (nomenclatura internacional para Diesel Exhaust Particles), que são partículas originárias da exaustão do diesel, importantes na constituição de partículas finas e ultrafinas (MP_{2,5} e MP_{0,1}, respectivamente), e derivadas da combustão de combustíveis fósseis pelas indústrias e veículos automotores (Araujo e Nel, 2009). Estas frações são de extrema importância nas associações de efeitos à saúde provocados pelo MP porque atingem as regiões mais profundas das vias aéreas, podem atravessar a barreira alvéolo-capilar e agem nos órgãos como cérebro e coração (Lerssel et al., 2014). Vários elementos indicam que os poluentes, em particular MP, afetam seriamente o sistema cardiovascular. De fato, a inalação de MP, especialmente MP_{2,5} e MP₁₀, promovem eventos cardiovasculares ocorrendo em horas ou dias após a exposição (Mustafic H 2012; Tofler GH 2006). O

coração e o sistema vascular são altamente vulneráveis à exposição a curto e longo prazo ao MP_{2,5}, especialmente em associação com o envelhecimento e doenças cardíacas estruturais (Pope CA et. al. 2006). Assim, estudos descrevem que uma exposição a curto prazo ao MP_{2,5} aumentam o risco de eventos cardiovasculares de 0,4 a 1,0% (Schlesinger RB et. al. 1990; Fiordelisi A. et. al. 2017).

A exposição ao DEP causa alterações nas funções cardiovasculares principalmente aumentando a pressão sistólica, induzindo vasodilatação e/ou vasoconstrição (Cosselman et al., 2012; Mills et al., 2011) e prejudicando a regulação do tônus vascular (Miller M.R et al., 2013). Exposições ao MP_{2,5} estão associadas ao infarto agudo do miocárdio e aumentam a progressão da espessura da camada íntima média da carótida de 5,5 µm até 10 µm por ano (Adar, S. D et.al., 2013; Wilker, E. H. et.al., 2013; Kuñzli, N. et.al., 2010). Similarmente, a exposição a gases de escape do diesel e a poluição relacionada com o tráfego aumenta a rigidez arterial (Lundback, M. et.al., 2009) e a pressão arterial sistólica (Cosselman, K. E. et.al. 2012), e está associada a um aumento da mortalidade (Medina-Ramon, M. et.al. 2008).

A exposição ao MP pode causar alterações na frequência cardíaca (FC), variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e desequilíbrio autonômico com alterações de ritmo cardíaco. Embora estas respostas possam ser inofensivas em pessoas com bom estado de saúde, o contrário é observado em pacientes com doenças cardiovasculares ou metabólicas pré-existentes, podendo evoluir para quadros mais graves (Sacks J.D. et. al., 2011). O balanço autonômico, em um sistema saudável, está em constante mudança. A FC é um indicador do equilíbrio relativo entre os sistemas simpático e parassimpático, sendo que o sistema nervoso atua sobre uma célula do nódulo sinoatrial, no qual sofrem o potencial de ação. Ao receber estímulo acima de seu

limiar de excitabilidade, se iniciam fluxos iônicos pela membrana celular, inicialmente com o rápido afluxo de sódio, que se denomina fase 1 e a parte intracelular fica brevemente mais positiva que a extracelular. Com a entrada de sódio e saída de potássio em equilíbrio se inicia a fase platô, ou fase 2, seguida pela fase 3, ocorrendo a repolarização celular e a saída de potássio da célula. Por fim, na fase 4, o potencial transmembrana e a bomba de sódio-potássio entram em equilíbrio (Sanches P. C. & Moffa P. J., 2010).

O sistema simpático tem por característica a finalidade de estimular a FC através do neurotransmissor noradrenalina, tornando a membrana da célula mais permeável ao potássio, favorecendo o retorno da célula ao seu potencial de repouso mais rapidamente, e acelerando a FC. Por outro lado, o sistema parassimpático utiliza como neurotransmissor a acetilcolina, que por sua vez reduz a permeabilidade da membrana, desacelerando a FC (Palatini P et. al., 1999, Opthof T. et. al., 2000).

A contração cardíaca é promovida pela despolarização do coração através da propagação das correntes elétricas pelo miocárdio, através das células do marca-passo em um tecido de condução especializado. No entanto, o ECG (Eletrocardiograma) registra apenas os potenciais de despolarização (estimulação) e repolarização (recuperação) gerados pelo miocárdio ventricular e atrial. O estímulo de despolarização para a contração cardíaca se origina no nó sinoatrial (SA), um conjunto de células marca-passo que apresentam automaticidade. A primeira fase de ativação elétrica cardíaca é a propagação da onda de despolarização pelos átrios, seguida da contração atrial. Em seguida as áreas do fascículo atrioventricular e nó atrioventricular (AV), o marca-passo e os tecidos de condução especializados, são estimuladas pelo impulso (Atwood D., Wadlund D. 2015). O Fascículo Atrioventricular (feixe de His) possui bifurcações em dois

ramos principais, direito e esquerdo, que transmitem rapidamente a onda de despolarização, por meio dos Ramos Subendocárdicos (fibras de Purkinje), para o miocárdio ventricular direito e esquerdo. O ramo principal esquerdo se bifurca em fascículo anterior esquerdo e fascículo posterior esquerdo. Então a despolarização se propaga pela parede ventricular do endocárdio para o epicárdio deflagrando a contração ventricular (Mirvis D. M. et. al., 2015).

A massa do ventrículo esquerdo (VE) é cerca de 2 a 3 vezes maior que do ventrículo direito, sendo que as forças elétricas do VE predominam despolarizando o septo da esquerda para a direita, e no ECG observa-se uma onda negativa inicial (Onda Q), correspondente à ativação do septo. Em seguida ocorre a despolarização das paredes livres dos ventrículos, que apresentam maior massa. A orientação QRS é determinada pela soma das forças elétricas dos dois ventrículos, o ECG registra ondas R nas derivações esquerdas bem como ondas S no lado oposto, decorrentes da predominância elétrica do VE (Sanches PCR & Moffa P.J., 2010).

A ativação das porções basais dos ventrículos, próximas do sulco atrioventricular, é responsável pela porção final do QRS, onda S. O eletrocardiograma registra esta variação no sentido da corrente elétrica nos ventrículos, como um complexo QRS. A primeira onda a ser observada no ECG é a onda P que se refere a despolarização atrial, seguida pelo complexo QRS. O intervalo PR tem início na onda P e vai até o início da QRS, correspondendo ao tempo gasto pelo estímulo elétrico desde sua origem no nó sinoatrial até alcançar os ventrículos. O segmento ST representa a parte inicial da repolarização dos ventrículos, representando uma porção do traçado do ECG entre o complexo QRS e a onda T. O ponto em que o complexo QRS e o segmento T se encontram é denominado ponto J. A onda T é resultante da repolarização ventricular, é

uma onda de maior duração e menor voltagem, com porção ascendente mais lenta que a descendente. Por sua vez, o intervalo QT é definido no início da onda QRS ao término da onda T e representa a sístole elétrica ventricular, que é o tempo total de despolarização e repolarização dos ventrículos no ECG. A onda U de baixa amplitude é uma onda de repolarização tardia, é maior em frequências cardíacas mais lentas e sua base eletrofisiológica é incerta, podendo ser causada pela repolarização dos ramos subendocárdicos ou por despolarização tardia em áreas do ventrículo. O intervalo RR consiste em intervalos entre os complexos QRS em despolarização sinusal normal. As variações do domínio do tempo calculadas podem ser simples tal como o intervalo RR, frequência cardíaca média e a diferença entre o intervalo RR mais curto e o mais longo, ou a diferença entre a frequência cardíaca diurna e noturna; e mais complexas baseadas em medições estatísticas. Estes índices estatísticos do domínio do tempo dividem-se em duas categorias, incluindo intervalos batimento-a-batimento, ou variáveis derivadas diretamente destes intervalos (Porth, C. M.; Matfin, G., 2010, Friedman, A. et. al. 2007).

Dentre os preditores de risco cardiovascular, a VFC é considerada uma medida da função neurocárdica que reflete interações entre o coração, o cérebro e o sistema nervoso autônomo (Shaffer F et. al., 2014, McCraty R et. al., 2009). Um nível regular de VFC reflete uma função saudável e estável, e uma capacidade de adaptação e resistência (Segerstrom SC et. al., 2007). A diminuição da VFC é preditor de alto índice de mortalidade pós infarto do miocárdio, progressão de arterosclerose, presença de inflamação em pessoas sem cardiopatia aparente e está relacionada ao alto índice de mortalidade, pois reflete uma diminuição da capacidade e habilidade de resposta adaptativa à desafios fisiológicos, como o exercício (Berntson GG et. al., 2008).

Estudos epidemiológicos demonstram que a exposição ao $MP_{2,5}$ pode levar à arritmia e diminuição da variabilidade da frequência cardíaca além de causar reações inflamatórias que passam para o sistema circulatório contribuindo para ativação de plaquetas e disfunção endotelial (Samoli et. al., 2006). A preocupação com esses múltiplos efeitos coincide com a crescente consciência de que a DEP leva a eventos cardiovasculares, bem como, em pessoas com doença cardiovascular preexistente como a hipertensão arterial (Hazari M. et. al., 2011). Os efeitos sobre a VFC e a repolarização ventricular podem acontecer 1 hora depois de um aumento na $MP_{2,5}$ ambiente (He et al, 2011; Liao et al., 2010). A literatura refere-se a componentes da MP ambiente como carbono e gases elementares como monóxido de carbono, NO_x e SO_2 como principais contribuintes para essas respostas (Fan et al, 2009; Suh & Zanobetti, 2010; Lucking et al., 2011; Peretz et al., 2008; Huang et al. 2010).

Nas últimas décadas, vários estudos experimentais também demonstraram alterações de balanço autonômico cardíaco em roedores expostos ao $MP_{2,5}$ (Yan et al. 2008; Huang et al. 2010; Anselme et al., 2007, Rivero DH et. al. 2001 Rivero DH et. al. 2005^a e 2005 b; Wagner J et. al. 2014; Wang G et. al. 2012; Kamal AS et. al. 2012; Upadhyay S et. al. 2008; Chang CC et. al. 2004).

Nos últimos anos, os estudos experimentais voltaram-se aos efeitos cardiovasculares originados pela exaustão do combustível diesel pela sua maior toxicidade e por ser potencialmente carcinogênico. Estas partículas promovem arritmia espontânea acompanhada de diminuição ou aumento da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), indicando possível mediação autonômica dos efeitos (Carll AP et. al. 2013; Carll AP et. al. 2012; Rohr AC et. al. 2011; Huang CH et. al. 2010; Anselme F et. al. 2007; Brito J et. al. 2010; Carll et al., 2012).

A VFC pode ser determinada por duas formas: no domínio do tempo (são utilizados métodos estatísticos ou geométricos na análise dos intervalos RR, podendo esta ser avaliada em pequenos intervalos, batimento a batimento, representando mudanças rápidas na frequência cardíaca; ou em intervalos maiores, geralmente medidos pelo Holter, que são flutuações mais lentas na frequência cardíaca); e no domínio da frequência (análise espectral que envolve a decomposição de séries de intervalos RR consecutivos em uma soma de funções sinusoidais de diferentes amplitudes e frequências através do algoritmo de transformação de Fourier de um conjunto de intervalos R-R, sendo a variabilidade analisada em relação ao espectro de frequência em Hz de seus componentes). Essas metodologias fornecem diferentes informações da influência neural e outras modificações fisiológicas sobre o coração, sendo um exame rápido, barato, não-invasivo e facilmente reproduzido quando utilizado seguindo normas convencionais (Task Force of the European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology).

O SDNN (Standard Deviation of the Normal-to-Normal Index) é a medida entre os intervalos RR, uma medida que estima a variabilidade dos fatores que afetam a VFC, portanto o SDNN é uma medida da influência autonômica da VFC. O RMSSD por sua vez, considera diferenças entre intervalos RR adjacentes, quantificam variações rápidas da FC e, conseqüentemente, correlacionam-se com o componente de alta frequência, o RMSSD reflete a capacidade de auto-regulação da VFC (Shaffer F. et. al., 2014, Rollin M. et. al., 2015). A Alta Frequência (AF) modulada pelo sistema nervoso parassimpático e gerado pela respiração, durante a inspiração, o centro cardiorrespiratório inibe o sistema vagal acelerando a FC, na expiração o contrário ocorre e a FC diminui (Shaffer F. et. al., 2014). A Baixa Frequência (BF) é modulada tanto pelo

sistema simpático como pelo parassimpático, tem sido correlacionada ao sistema barorreceptor e termorregulador à atividade periférica vasomotora e ao sistema renina angiotensina (Bowers EJ et. al., 2004, Malliani et. al., 1995). A razão entre AF/BF tem sido usada para avaliar o equilíbrio entre as atividades simpáticas e parassimpáticas (MacKinnon S. et. al., 2013).

Em relação à pressão arterial (PA), um crescente corpo de evidências suporta que a exposição ao $MP_{2,5}$ também é capaz de alterar a hemodinâmica sistêmica. A PA de um indivíduo ou população é um traço altamente variável, onde os níveis de PA têm correlação positiva com doenças cardiovasculares, renais e mortalidade. O JNC VI (Sixth Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure) classifica a hipertensão arterial em adultos com base na média entre duas medidas de PA sistólica e diastólica pelo médico, definindo como hipertensos, quem apresente valores de PA acima de 140/90 mmHg (Ribeiro & Plavinilk, 2007).

Estudos demonstram que após 24 horas de exposição ao diesel, a frequência cardíaca e a pressão arterial em ratos hipertensos SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) se mostrou mais alta em comparação com ratos normotensos WKY (Wistar Kyoto) (Nemmar et. al., 2010; Lang R.M. et al., 2015). Em observações epidemiológicas, verificou-se que, ao longo do tempo, as pessoas são mais suscetíveis a depleções cardiovasculares após exposição a essas partículas em comparação com pessoas mais jovens ou de saúde (Upadhyay S. et al., 2008; Hazari M. et. al., 2011; Brook RD et. al. 2016; Wold LE 2012; Mordukhovich I et. al. 2016). Diversos estudos como em Boston, MA, Detroit, MI e Pequim, China mostraram associações significativas entre variações diárias de $PM_{2,5}$ e o aumento da PA (Dvonch J.T. et al., 2009). Os mecanismos de

fisiopatologia do aumento da pressão arterial têm sido relacionados ao estresse oxidativo sistêmico e a alteração da biodisponibilidade de óxido nítrico nos vasos, ocasionando aumento de substâncias vasoconstritoras tais como a endotelina, e, além disso, um desequilíbrio no sistema nervoso autônomo, favorecendo um aumento do estímulo simpático na resposta hipertensiva (Peretz et al., 2008; Zuo L et. al. 2011; Okayama Y 2006).

O estilo de alimentação também pode aumentar as chances do desenvolvimento ou piora da hipertensão arterial. No início dos anos 1900, Allen e Sherrill encontraram diminuições na PA em 60% dos 180 pacientes com hipertensão arterial quando a ingestão de sal foi severamente limitada a menos de 2 gramas por dia (Cerca de 800 mg de sódio por dia ou menos) (Pines K.L. et. al. 1949). Orientações dietéticas de 2010 recomendaram uma ingestão de sódio em valores menores que 2300 mg/dia para a população geral, e menores que 1500 mg/dia entre certas populações de "risco", como negros, pessoas com 51 anos de idade ou mais e pessoas que têm hipertensão, diabetes mellitus ou doença renal crônica (DiNicolantonio J. et. al. 2016). É importante salientar que além do excesso de sal, o açúcar também pode levar a um quadro hipertensivo. A restrição salina pode reduzir a pressão arterial, mas uma retenção excessiva de água e sódio foi observada como sendo causada por um excesso de consumo de açúcar na dieta (DiNicolantonio J. et. al. 2016).

Cerca de 90 a 95% dos pacientes hipertensos, são considerados portadores de hipertensão primária, ou seja, não se consegue estabelecer a causa exata da hipertensão. O sistema nervoso simpático é um mediador no controle da PA e da FC e alterações do seu funcionamento podem contribuir para o início da hipertensão arterial sistêmica. Na fase aguda da doença, as mudanças são determinadas pela ação do

simpático mediando o aumento da constrição arterial venosa, bem como no débito cardíaco (Ferreira C. et al., 2009).

A prevalência global de hipertensão é estimada em cerca de 30 a 40% da população e cresce à medida que a população envelhece (Kaplan N.M. et al. 2010). A hipertensão é o mais importante contribuinte para a morbidade e mortalidade em todo o mundo e um grande número de estudos epidemiológicos apoiam a evidência que os níveis de PA estão diretamente relacionados com o risco de acidente vascular cerebral, doença miocárdica, infarto, morte súbita, insuficiência cardíaca e doença renal (Britton K.A. et al. 2009; Kalaitzidis R.G. et al. 2010). As diretrizes (Mancia G. et al., 2013; James P.A. et al. 2014) geralmente definem a PA elevada como valores de 140 mmHg para a PA sistólica e /ou 90 mmHg para a PA diastólica.

Na maioria dos casos de hipertensão arterial não há sintomas, este fator pode aumentar o risco de arterosclerose, hipertrofia cardíaca, acidente vascular cerebral e falência cardíaca. Hipertensão é uma combinação de fatores genéticos e ambientais que podem levar ao aumento do volume de sangue e /ou resistência periférica (Hoek G, 2013; Robbins & Cotran, 2016). A hipertensão arterial é uma doença cardiovascular degenerativa crônica, com causas multifatoriais que comprometem o equilíbrio dos sistemas vasoconstritor e vasodilatador, levando a uma redução da luz dos vasos e danos aos órgãos (Drager L. et al., 2009; Van den Hoogen PC et al., 2000, Liang R et al., 2015). Estudos têm descrito mecanismos patológicos que os poluentes podem mediar doenças cardiovasculares, também incluem inflamação pulmonar e sistêmica, estresse oxidativo, alterações trombóticas e o processo de coagulação, vasoconstrição e alterações da PA, disfunção vascular e arteriosclerose (Wauters et al., 2013; Hoek G et al., 2013, Lucking et al., 2011, Rivera et al., 2013). Os pesquisadores também relataram

as deficiências respiratórias e cardiovasculares em resposta à composição do tamanho e / ou química do particulado (MP) e as características da população (idade, predisposição genética e condições pré-existent) (Nemmar A. et al., 2003; Gold DR & Mittleman MA, 2013).

O Canadá Health Measure Survey testou a associação entre os parâmetros cardiopulmonares e os poluentes ($PM_{2,5}$, O_3 e NO_2), monitorando a PA em uma ampla população nacional (5011 indivíduos). Cada aumento diário de $PM_{2,5}$ de $4,5 \text{ g/m}^3$ foi significativamente associado com elevações tanto na PAS (pressão arterial sistólica) como na PAD (pressão arterial diastólica), em cerca de 0,5 mmHg (Cakmak S. et. al. 2011). Observou-se que após 24 horas de exposição ao $PM_{2,5}$, houve um aumento da PA (1,4 mmHg) (Brook R.D. et.al. 2011), confirmando resultados análogos obtidos em um estudo anterior (Brook R.D. et.al. 2009). Similarmente, Liu et al. 2009, encontraram 3,4 mmHg de aumento na PA após 24 de exposição ao $PM_{2,5}$ ($7,1 \text{ g/m}^3$) em indivíduos idosos não fumantes recrutados de três casas de repouso situadas em Windsor (Canadá).

Estudos recentes descrevem o efeito da poluição do ar na hipertensão incidente (Chen H. et.al. 2014; Coogan P.F. et.al. 2012; Sorensen M. et. al. 2012). Em um estudo entre mais de 3000 mulheres negras que vivem em Los Angeles com acompanhamento de 10 anos, os autores relataram associação entre níveis de NO_x e aumento do risco de hipertensão, também controlando os níveis de $MP_{2,5}$ (Coogan P.F. et.al. 2012). Vários outros estudos confirmaram o efeito sobre a PA clínica/domiciliar a partir de horas (24 horas) (Wu S. et.al. 2013; Sérgio Chiarelli et.al. 2011) a poucos dias (8 dias) após a exposição ao ambiente exterior MP (Hoffmann B. et. al. 2012; Baccarelli A. et.a. 2011), apesar dos diferentes níveis de MP.

A hipertensão arterial sistêmica crônica não tratada leva ao quadro de hipertensão crônica, o coração responde ao aumento hemodinâmico com alterações estruturais e funcionais, as alterações estruturais incluem hipertrofia dos miócitos existentes e a adição de sarcômeros juntamente com um aumento no tecido conjuntivo, levando a um aumento geral da massa ventricular. (Gosse P. et.al., 2012; Lovic D et.al. 2014).

O miocárdio corresponde à porção muscular do coração, seu tecido é subdividido em três compartimentos contínuos entre si e com o conjuntivo das válvulas cardíacas e das cordas tendíneas: epimísio, perimísio e endomísio. O endomísio envolve cada cardiomiócito e os conecta entre si, o perimísio corresponde a grandes trabéculas de tecido conjuntivo que envolve grupos de cardiomiócitos, delimitando feixes de fibras musculares e o epimísio corresponde ao revestimento conjuntivo fibroso que se continua como epicárdio e endocárdio (Burlew e Weber, 2000). O tecido miocárdico responsável pelos movimentos de contração do coração, é constituído pelos compartimentos muscular, com vasculatura, fibroblastos, fibras colágenas, material amorfo e intersticial, formado pelos cardiomiócitos: células cilíndricas que são responsáveis pelo ciclo cardíaco as quais possuem grande número de mitocôndrias que garantem o trabalho contrátil e a homeostase cardíaca. (Opie LH. 2001). O sarcolema origina o sistema tubular T, responsável pela uniformidade da contração. As miofibrilas são compostas pelas proteínas, miosina, troponinas (tipos T, C e I), complexo tropomiosina e titina que formam as unidades contráteis do miocárdio que são denominados sarcômeros. Outras organelas importantes são o retículo sarcoplasmático (RS), contendo uma proteína, a calsequestrina, com depósitos de íons cálcio que são liberados e captados de volta durante a contração e o relaxamento miocárdico (Colucci WS et. al., 2001). Outros componentes importantes para a função dos cardiomiócitos são a actina, miosina e

aquelas proteínas com função regulatória (troponina, tropomiosina e titina), o trânsito intracelular de cálcio e a disponibilidade celular de ATP. Dois tipos de miofilamentos estão associados a contração muscular, os filamentos finos (6 a 8 nm de diâmetro e 1,0 µm de comprimento) são compostos principalmente de proteína actina. Os filamentos grossos (cerca de 15 nm de diâmetro e 1,5 µm de comprimento), cada filamento consiste em 200 a 300 moléculas de miosina II, os dois tipos de miofilamentos constituem a maior parte do citoplasma denominado sarcoplasma (Ross MH e Pawlina W., 2012).

A matriz extracelular tem o papel de fornecer suporte estrutural para os tecidos, participa direta ou indiretamente de processos de morfogênese, diferenciação e migração celulares, pois é um importante meio de transição de informações entre as células, além de participar ativamente de processos de reparo e fibrose. As diversas associações de seus componentes resultam em adaptações específicas, permitindo a homeostase em cada fase de diferenciação e adaptações à novos estímulos (Montes, 1996). A matriz extracelular cardíaca é formada predominantemente por proteínas estruturais como colágeno tipo I e II, fibrilina e elastina. Também se encontram presentes proteínas adesivas como colágeno IV e VI, fibronectina e laminina e proteoglicanos (Corda et al., 2000). Os tecidos conjuntivos são formados pela matriz extracelular juntamente com células como os fibroblastos, condrócitos e osteócitos, denominadas “células nativas”, ou leucócitos, macrófagos e mastócitos, que são células responsáveis por respostas imunológicas. As fibras de colágeno, que podem ter forma fibrilar ou não fibrilar, também compõem a matriz extracelular, formadas por proteoglicanos, ácido hialurônico, fibras do sistema de elástico, glicoproteínas adesivas, minerais e também água de solvatação. (Galhardo, 2012).

A hipertensão arterial crônica pode levar a alterações estruturais do VE que inclui um remodelamento, hipertrofia ou uma combinação de hipertrofia com uma combinação variável de aumento de espessura da parede do ventrículo esquerdo e dimensões diastólica e sistólica do VE (Lang R.M.et.al.2015). Em uma publicação recente do Dallas Heart Study, onde 31% da população era hipertensa, a prevalência de hipertrofia do VE concêntrica foi muito maior do que a da hipertrofia excêntrica. A hipertrofia do VE estava presente em 730 (30%) dos 2458 pacientes, classificados como indeterminados em 404, hipertrofia espessa (concêntrica) isolada em 289, dilatada (excêntrica). No seguimento, o resultado foi pior em pacientes com hipertrofia excêntrica do que naqueles com espessura espessa (concêntrica) e pior naquelas que tiveram uma combinação dos dois tipos de hipertrofia (Garg S. et.al.2015). Esses tipos de adaptações são necessárias na normalização do estresse da parede do VE, preservando a função mecânica, e em última análise, o débito cardíaco contra uma pós-carga no entanto, estes mecanismos compensatórios são deletérios a longo prazo, levando a disfunção diastólica e/ou sistólica. Quando estas adaptações já não são suficientes para compensar começa a ocorrer o aumento do estresse da parede ventricular, morte de miócitos, a espessura de parede cardíaca diminui e a cavidade do VE aumenta, resultando em hipertrofia excêntrica. Essas alterações cardíacas levam a um declínio progressivo da contratilidade e insuficiência cardíaca (Garg S. et. al. 2015; Lovic D. et.al. 2014; Vasan R.S. et.al. 1999).

Já no caso de hipertrofia do cardiomiócito, ocorre o aumento da expressão de proteínas contráteis, ocorre a reexpressão de isoformas fetais de miosina e actina, além do aumento da expressão do peptídeo natriurético atrial (PNA) e a da enzima conversora de angiotensina I (ECA). Acredita-se que isso permite a síntese coordenada de proteínas necessárias para o aumento do tamanho dos cardiomiócitos e a adequação da energia

necessária para trabalhar com tamanhos maiores (Galhardo, 2012). A hipertensão tem sido considerada em parte como um distúrbio inflamatório (Gupta et al., 2011; Montecucco et al., 2011). A inflamação pode levar a produção de proteínas de coagulação sanguínea que aumentam o risco de doenças cardiovasculares (Knol et al., 2009), principalmente potenciando a pressão arterial (Touyz and Briones, 2011; Urrutia et al., 2005). Estresse oxidativo e disfunção endotelial são consistentemente observados em indivíduos hipertensos, e evidências sugerem que elas também têm um papel causal nas alterações moleculares que conduzem à hipertensão (Touyz e Briones, 2011).

A exposição as partículas do diesel estão associadas a inflamação pulmonar, caracterizada pelo aumento de neutrófilos no LBA (Lavado broncoalveolar) (Nemmar et al., 2009), inflamação sistêmica observada pelo aumento do número de monócitos e granulócitos e uma redução na série vermelha da hemoglobina do sangue (Nemmar et al., 2008; Kim HJ et al. 2017). Estudos demonstram que a exposição ao DEP provoca um aumento significativo de leucócitos no sangue, indicando a ocorrência de inflamação sistêmica. Além disso, verificou-se que as concentrações de IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que são citocinas pró-inflamatórias, foram significativamente aumentadas após a exposição a DEP (Farina F et al. 2017; Overocker e Pfau, 2012; Tomašek I et al. 2016; Labranche N et al. 2017; Vieira et al. 2012) seus níveis têm sido correlacionados com fatores de risco para doenças cardiovasculares, tais como, a contagem de células brancas do sangue e viscosidade do sangue medida pelo fibrinogênio que pode aumentar sua síntese, cerca de 20 vezes, com um estímulo inflamatório (Welsh et al., 2008).

A indução de estresse oxidativo e resposta inflamatória são considerados eventos importantes na saúde causados pela exposição a MP (Lawal et al., 2015, Montiel-

Davalos et al., 2010). O MP_{2,5} e MP₁₀ têm sido relatados por induzir o estresse oxidativo e apoptose de células (Montiel-Davalos et al., 2010). Assim, as doenças cardiovasculares e pulmonares tem sido associadas como efeitos adversos para a saúde causados pelo MP graças à sua capacidade de gerar estresse oxidativo (Liu et al., 2009, Miller et al., 2009). Os radicais livres gerados pelo MP são os responsáveis pelos efeitos inflamatórios observados in vitro e in vivo (MontielDavalos et al., 2010). Alguns marcadores de estresse oxidativo, como as espécies reativas de oxigênio (ERO) (Montiel-Davalos et al., 2010) e liberação de TNF-α (Overocker e Pfau, 2012) têm sido utilizados para explicar o mecanismo.

O DEP induz a geração de radicais livres que levam a um estado de estresse oxidativo celular (Hawley B. et. al., 2014; Moller P. et. al. 2015), estudos in vitro demonstram que a DEP estimula as enzimas oxidantes em vários tipos de células, incluindo brônquica e pulmonar células epiteliais, macrófagos, linfócitos e células endoteliais (Miller M. et. al., 2012). Vários estudos têm demonstrado aumento da produção de ERO e estresse oxidativo na parede vascular que estão envolvidos com o desenvolvimento de disfunção endotelial e doenças cardiovasculares como diabetes, hipertensão e hipercolesterolemia (Chhaba, 2009; Osto e Cosentino, 2010).

Estresse oxidativo é denominado como um desequilíbrio entre antioxidantes e pró-oxidantes, consequência da superprodução de espécies reativas de oxigênio: ERO, leva a problemas cardiovasculares como dano tecidual, arteriosclerose, problemas de perfusão, insuficiência cardíaca e hipertensão (Fiordelisi et. al., 2017). A ERO é uma importante ferramenta fisiológica de sinalização celular, regula crescimento e diferenciação celular, tônus vascular, inflamação e respostas imunes (Lushchak VI. 2014). O aumento da biodisponibilidade de ERO e/ ou a diminuição de mecanismos de

defesa antioxidantes celular contribuem para o estresse oxidativo vascular, um importante fator causador de disfunção endotelial, apoptose de cardiomiócitos, remodelamento das fibras da matriz extracelular e da hipertensão, através do envolvimento de danos celulares (Nguyen DCA. et. al., 2013). As ERO influenciam a atividade proteica e funções celulares, proteínas que contém resíduos de cisteína são mais sensíveis a mudanças oxidativas (Go YM. et. al., 2013). Essas modificações influenciam na estrutura, atividade e função dessas proteínas, incluindo transporte de íons, receptores, quinases, fosfatases, fatores de transcrição, proteínas estruturais, e matriz de metaloproteases, que são importantes para regulação endotelial e função das células da musculatura lisa vascular (CMLV) (Go Y M. et. al., 2013; García-Redondo AB. et. al., 2015). As ERO também regulam a sinalização e produção de prostaglandinas, importante regulador da função vascular. Na hipertensão, o estresse oxidativo induz uma diminuição da produção de prostanóides (COX-1) e induz (COX-2) ciclogenases, que leva a uma vasoconstrição e redução da vasodilatação (Wang WT. et. al., 2014; Hernanz R. et. al., 2014). O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) estimula a produção do vasoconstritor prostanóide tromboxane, prostaciclina e prostaglandina E₂, que causa vasoconstrição na hipertensão (Hernanz R. et. al., 2014). Além de estimular a atividade da COX, a própria COX pode produzir as ROS oxidando o fosfato de nicotinamida adenina (NADPH) (García-Redondo AB. Et. al., 2015; Hernanz R. et. al., 2014). As ROS também regulam os receptores de proteína G acoplada (GPCRs) em células vasculares, como o subtipo 1 receptor da angiotensina II (Spiegelberg B D. et. al., 2013). A ativação de mediadoras de ERO sinalizam e influenciam na concentração de células, crescimento, migração, depósito de colágeno e ativação da matriz de metaloproteinasas, processos celulares importantes de regulação da estrutura e tônus vascular (Ushio-Fukai M., 2009).

Mediadores de GPCR estimulam a ativação de fatores de transcrição e genes pró-inflamatórios, produção de quimiocinas e citocinas e o recrutamento e ativação de células inflamatórias que causam inflamação vascular (Ushio-Fukai M., 2009; Mochin MT. et. al., 2015).

Como as espécies reativas danificam as células e a matriz extracelular, os mecanismos de defesa evoluíram para protegê-los contra a lesão oxidante (Li N etl a.l 2005). Essas enzimas antioxidantes são superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST). O teor de partículas de produtos químicos orgânicos e metais de transição apresentados em DEP pode gerar ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (Rollin M etl al. 2015). Estudos descrevem que pode ocorrer a indução de enzimas antioxidantes como uma resposta de organismos expostos à poluição, mas os mesmos antioxidantes podem ser reduzidos se a poluição alcançar níveis são extremos (Regoli et al., 2011). Portanto, o aumento ou diminuição na actividade enzimática de biomarcadores antioxidantes podem resultar do estresse oxidativo, com duração e intensidade do estressor pró-oxidante que conduz tais respostas opostas (Regoli et al., 2011).

Estudos evidenciaram que a exposição ao DEP durante 4 h induziu efeitos de stress oxidativo significativos, que foram acompanhados por aumento da citotoxicidade e diminuição viabilidade celular (Lawal et al., 2015). Além disso, outros estudos mostraram que o DEP pode induzir a produção de ROS, como em células endoteliais das veias do cordão umbilical humano (Tseng et al., 2015a, 2015b), células endoteliais microvasos do cérebro humano (Tobwala et al., 2013), células endoteliais da aorta humana (Li et al., 2009) e células endoteliais de aorta bovina (Yin et al., 2013). A produção de ROS por DEP foi ligada à ativação da NADPH oxidase endotelial (Mo et al.,

2009) e / ou fugas em elétrons dos complexos de transporte de elétrons mitocondriais (Li et al., 2009). Estudos com animais mostraram também aumento do estresse oxidativo e expressão de antioxidantes vasculares após a exposição ao DEP, acompanhada de aumento da exposição aterosclerótica e tamanho da placa que são marcadores de aumento da aterosclerose e da doença cardiovascular (Davel et al., 2012; Miller et al., 2013). A integridade das junções aderentes é importante na manutenção da barreira de permeabilidade da célula-célula e funções celulares. A ERO pode estimular a permeabilidade da barreira celular induzindo a liberação do fator de permeabilidade vascular. A perturbação da aderência que conduz à permeabilidade vascular, tem efeitos negativos sobre a vasculatura, como o infarto agudo do miocárdio e aterosclerose, foi relatado que a DEP aumenta essa permeabilidade vascular (Tseng et al., 2015a).

Vários estudos mostraram apoiar o papel das células imunes na hipertensão. Estas perturbações foram notadas em ratos espontaneamente hipertensos. Estudos muito detalhados mostraram que a inalação de MP aumentou a PA em ratos infundidos com angiotensina-II. O efeito foi associado a níveis de O₂ aórtico, de NO endotelial e estimulação de NADPH oxidase (Ying Z. et. al. 2009a; Ying Z. et. al. 2009b). Além disso, a elevação do tônus simpático foi acompanhada por uma inflamação hipotalâmica, evidenciando a expressão de genes pró-inflamatórios como TNF- α , molécula de adesão intercelular (ICAM) -1 e a ativação de vias pró-inflamatórias (Ying Z. t. al., 2014). Essas respostas inflamatórias sistêmicas podem então ativar o estresse oxidativo vascular, com mecanismos interdependentes, estimulando citocinas locais, geração de superóxidos e mecanismos da NADPH oxidase gerando ERO, que pode, por sua vez, agir dentro dos vasos sanguíneos limitando a não biodisponibilidade de ERO (Kampfrath T. et. al., 2011). Em conformidade, estudos experimentais demonstraram que a exposição à poluição

está associada à liberação de potentes mediadores vasoconstritores endógenos na circulação (Baccarelli A. et. al., 2010).

2. Justificativa e estratégia de estudo

A frota de automóveis a diesel é muito grande e tende a aumentar com o passar do tempo, por isso é importante estudar sua toxicidade, uma vez que o mecanismo fisiopatológico sobre a morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares, não está totalmente estabelecido. A poluição atmosférica pode contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e a exposição ao diesel pode levar a uma translocação de partículas, especificamente $MP_{2,5}$ para as vias circulatórias e também um desenvolvimento de estresse oxidativo e inflamação dentro da vasculatura. Esses fatores podem acarretar no desenvolvimento de hipertensão arterial, essa doença é um dos grandes problemas de saúde no mundo desenvolvido, na maioria dos casos é silenciosa, esse fator pode aumentar o risco de acidente vascular cerebral, doença coronariana aterosclerótica, hipertrofia cardíaca, insuficiência cardíaca, dissecção aórtica e insuficiência renal. A hipertensão resulta da combinação de polimorfismo genético e fatores ambientais que podem levar ao aumento do volume sanguíneo e/ou resistência periférica. Por esses motivos há a necessidade de estudar o que a emissão dessas partículas pode causar em pessoas normotensas e hipertensas que vivem em grandes centros urbanos.

De forma inédita no Brasil, o sistema de gerador de combustíveis possibilita avaliar os riscos toxicológicos de combustíveis e suas misturas em uma ampla gama de

desfechos. Tivemos como proposta principal avaliar os efeitos dos componentes da exaustão do diesel sobre a função autonômica cardíaca (frequência cardíaca, pressão arterial, e VFC: alta frequência, baixa frequência, razão entre alta e baixa frequência, SDNN e RMSSD), sobre o remodelamento das fibras da matriz extracelular cardíaca (sistema colagênico) hipertrofia ventricular e grau de comprometimento dos cardiomiócitos, e sobre o perfil inflamatório pulmonar, visando obter uma conexão entre a exposição pulmonar e seus efeitos sistêmicos, incluindo a integração do sistema cardiovascular. As hipóteses deste estudo pretenderam responder 4 questionamentos principais sobre os efeitos dos componentes da exaustão do diesel no modelo experimental de hipertensão arterial:

1. Promovem um desbalanço do sistema nervoso autônomo através de alterações da frequência cardíaca, variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial?
2. Promovem inflamação pulmonar através de alteração de celularidade no lavado broncoalveolar e sistêmica?
3. Promovem aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no sangue periférico ($IL1\beta$, $TNF-\alpha$, IL6, CINC) e sobre a enzima antioxidante superóxido dismutase?
4. Poderá ocorrer uma modificação morfofuncional que possa levar a um remodelamento do miocárdio como alterações no número e tamanho de cardiomiócitos, colágeno e hipertrofia de ventrículo esquerdo?

3. Objetivos

O objetivo do estudo foi avaliar a toxicidade cardiovascular e pulmonar, após exposição de ratos hipertensos e normotensos aos componentes da exaustão do combustível diesel durante 15, 30 e 45 dias, através de parâmetros hemodinâmicos, histológicos e inflamatórios.

3.1. Objetivos específicos

1. Quantificar o número de células totais e diferenciais no lavado broncoalveolar.
2. Avaliar o hemograma completo, plaquetas, reticulócitos e fatores de coagulação (trombogênicos: fibrinogênio, tempo de protrombina e tempo de trombroplastina parcial ativada).
3. Analisar os parâmetros de variabilidade de frequência cardíaca, frequência cardíaca e pressão arterial.
4. Analisar o perfil inflamatório pulmonar através das citocinas: IL1 β , TNF- α , IL6, CINC e SOD.
5. Avaliar qualitativamente e quantitativamente, através de técnicas estereológicas (tamanho e número de cardiomiócitos e volume de ventrículo esquerdo), o remodelamento dos elementos fibrilares da matriz extracelular (sistema colagênico) do ventrículo esquerdo de ratos SHR.

4. Metodologia

4.1. Modelo Experimental

Através do cruzamento entre ratos Wistar Kyoto com altos níveis de pressão sanguínea, Okamoto e Aoki (1963) obtiveram uma linhagem de ratos hipertensos (SHR spontaneously hypertensive rat). Os SHR começam a manifestar hipertensão com aproximadamente quatro semanas de idade, apresentando níveis considerados hipertensivos já entre a sétima e a décima quinta semanas, atingindo pressão sistólica de 180-200 mmHg que permanece em platô até a vigésima oitava semana. Com um ano e meio de idade, os animais começam a desenvolver um quadro de insuficiência cardíaca congestiva, com alta taxa de mortalidade. A linhagem SHR tem sido usada como modelo experimental, uma vez que esses animais desenvolvem muitas características de hipertensão como os humanos, como, elevação de resistência periférica total com restrição arteriolar e venular, hipertrofia precoce do músculo cardíaco e da musculatura vascular, comprometimento renal e insuficiência cardíaca tardia (Varo et al., 2000).

4.2. Animais e Ambiente de Experimentação

Foram utilizados 120 ratos das seguintes espécies: 60 Wistar-Kyoto normotensos e 60 espontaneamente hipertensos da linhagem SHR, com 10 semanas de idade e mantidos em Sistema de Micro ventilação independente em Rack padronizado (marca Alesco®), os animais receberam ração e água *ad libitum*. Foram realizadas 1 troca

semanal nas gaiolas para fins de higienização. Os ensaios biológicos foram realizados no Gerador de Partículas, da Faculdade de Medicina da USP, após a devida aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais de Experimentação, em ambiente apropriado com temperatura, luz e umidade ambiental controladas.

2.3. Exposição no Container Laboratório

A exposição dos animais no Container Laboratório para Combustíveis (Gerador de material particulado e gases oriundos da exaustão do diesel) iniciou-se em abril de 2015. Foram formados 3 grupos de exposição, com 10 animais de cada linhagem, expostos durante: 15, 30 e 45 dias (de segunda a sexta feira), que por sua vez foram subdivididos em 2 grupos: os que foram expostos a exaustão do diesel (DE) e ao ar filtrado (AF) e foram divididos em **(Figura 1)**. Os ratos foram expostos a $600\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2.5}$ da queima do combustível diesel, o que equivale a uma dose acumulada diária de $25\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{PM}_{2.5}$.

Figura 1. Desenho Experimental do Estudo

Os gases resultantes do processo de queima ocorrido no gerador portátil estacionário de energia a diesel (BD-2500 CFE, Branco, China) foram conduzidos por um breve período de tempo (3 minutos) até um BAG para armazenamento das partículas e gases em seguida foi injetado o ar limpo por 3 minutos, com o objetivo de diluir os gases **(Figura 2A)**. Com esse material já diluído, os gases e partículas foram direcionados para a câmara de inalação **(Figura 2B)**. Durante todo o período de exposição (60 minutos) na câmara de inalação, alguns parâmetros foram monitorados em tempo real: concentração de $MP_{2,5}$ (TrakPro versão 3.6.1.0, EUA), emissões de NO_x , NO_2 , NO (ThermoScientific) e a pressão dentro da câmara. Para expor os animais ao AF, uma bomba a vácuo foi responsável em captar o ar externo e direcioná-lo ao sistema de filtração de ar e posteriormente ao sistema de filtração HEPA. Em seguida, o AF foi direcionado a câmara de exposição. Durante a exposição ao AF, a válvula de abertura

dos gases e partículas provenientes da queima do combustível em estudo foi fechada. Após atravessar a câmara, os gases foram conduzidos para fora do equipamento. Ao final de cada exposição o BAG era limpo, todo ar era direcionado para fora da câmara e o ar atmosférico era direcionado ao BAG duante 3 minutos. Em seguida, esse ar atmosférico era ejetado para fora da câmara para a expulsão de qualquer poluente dos canos. A capacidade total de acomodação dos ratos nas câmaras é de 20 animais para cada exposição, ou seja, dividíamos 10 animais SHR e 10 animais WKY por exposição para cada tipo (AF e D). Todos os animais foram mantidos em aclimação na câmara (1 hora durante duas semanas) para adaptação ao ruído, cheiro e estrutura.

Figura 2. A- Esquema representativo da geração de partículas e gases da exaustão do diesel. B- Câmara de exposição e monitores de poluentes.

2.4. Análise da frequência cardíaca (FC), variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e pressão arterial (PA)

Ao final da exposição ao AF e/ou diesel os animais receberam relaxante muscular (ketamina – 80 mg/Kg), e um *cuff* específico para ratos será ajustado na base da cauda do animal. Foi utilizado um sistema digital de aquisição de dados da marca Powerlab (*ADInstruments*) para o registro da FC, VFC e PA. Os parâmetros registrados pela VFC foram: SDNN (desvio-padrão da média de todos os intervalos RR normais), RMSSD (desvio-padrão das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes), BF (baixa frequência), AF (alta frequência), BF/AF (relação entre baixa frequência e alta frequência).

2.5. Coleta e análise laboratorial dos parâmetros hematológicos

Após o tempo de exposição ao material em estudo (AF e diesel), os ratos foram sacrificados após 24 horas. Foram anestesiados via intraperitoneal com Rompum® (Xilasina, 12 mg/kg de peso) e Ketamina-S(+) ® (Cloridrato de Ketamina, 80 mg/kg de peso). Em seguida, coletado o sangue via punção da aorta abdominal. O sangue foi acondicionado em frascos contendo EDTA K2 para análise de hemograma, contagem de plaquetas, reticulócitos, para fatores de coagulação utilizamos frascos com anticoagulantes Citrato. O material coletado foi encaminhado ao Serviço de Hematologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para análise.

2.6. Coleta e análise do lavado broncoalveolar (LBA)

Após a coleta do sangue, realizamos o sacrifício dos ratos via secção total da aorta abdominal. Para a realização do LBA, foi realizada uma traqueostomia. 10 ml de PBS (tampão fosfato-salino) foi infundido na traqueia por meio de uma cânula traqueal. O volume recuperado foi acondicionado em tubos tipo *ependorf* e centrifugado a 1210 rpm por 10 minutos a 5°C (Centrífuga GS-6R, Beckman).

Em seguida, coletou-se o sobrenadante que foi congelado (-70 °C) para análise de citocinas inflamatórias. Para a contagem total de células, o “*pellet*” será ressuspensionado em volume de 1000 µL de PBS e homogeneizado. A seguir, 10 µL (+10 µL de azul tripan) foram acondicionados na câmara de Neubauer para a contagem total das células em microscópio óptico com aumento de 400 x. A partir da mesma ressuspensão de 400 µL de PBS, foram coletados 200 µL e adicionados em centrífuga cytopspin (Cytospin 3 – Shandon) e citocentrifugados a 450 rpm por 6 minutos. Fixamos a lâmina com metanol. O material depositado na lâmina do cytopspin foi corado com Instant-Prov (New Prov produtos para laboratório): *corante n° 2*, por 5” e *corante n° 3*, por 20”, passado na água, para contagem diferencial de 300 células inflamatórias: macrófagos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos em microscópio óptico com aumento de 1000 x.

2.7. Obtenção do material e técnicas histológicas

Os corações foram retirados e os átrios imediatamente dissecados; os ventrículos foram pesados a fresco em bloco e então fixados em paraformaldeído neutro

a 4%, em tampão PBS por 12 horas à temperatura ambiente. A parede livre do ventrículo direito foi então retirada e o ventrículo esquerdo (parede livre + septo) foi novamente pesado para obtenção do volume. Todas as fatias de ventrículo esquerdo foram desidratadas em gradientes de concentração de álcool, emblocadas em parafina e cortadas com 4 micrômetros de espessura num micrótomo manual (LEICA, RM 2245 – Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Cortes foram corados pela Hematoxilina-Eosina.

2.7.1. Obtenção do material para análise estereológica.

Para que fossem obtidas fatias em direção aleatória (cortes IUR – Isotrópicos Uniformes Randômicos) os ventrículos inteiros foram incluídos em blocos de ágar (4% Acumedia), mantidos em geladeira e recortados em até 24 horas. A escolha da direção de corte, em cada caso, foi feita de acordo com o método descrito por Gundersen, et al 1988. Brevemente: o bloco de ágar é sobreposto a um círculo radiado; uma direção de corte é sorteada baseada numa tabela de números randômicos e corta-se o bloco naquela direção, sem atingir o tecido; o bloco é virado de modo que a face recém cortada seja posicionada sobre a mesa utilizando-se um segundo círculo radiado diferente; outra direção de corte é sorteada na tabela e um segundo corte é feito no bloco de ágar. Esta última direção foi sorteada randômicamente e é considerada aleatória; e era diferente para cada ventrículo, que foi totalmente fatiado. As fatias paralelas com 2mm de espessura foram emblocadas em parafina.

2.7.2. Análise Estereológica

Um corte histológico de cada fatia foi analisado utilizando um retículo de 25 pontos acoplado a uma Nikon Optiphot-2 (Nikon, Tokio, Japão). Todos os pontos atingindo o miocárdio foram contados (a uma ampliação de $\times 100$), área associada ao ponto ($0,025 \text{ mm}^2$), todos os pontos no miocárdio foram então multiplicados pela espessura das fatias (2 mm) para obter o volume de ventrículo esquerdo. Para estimar o número total de cardiomiócitos (apenas ventrículo esquerdo), o número de núcleos de cardiomiócitos foi contado na área de miocárdio com aumento de $\times 400$. Número total de cardiomiócitos por área $\times$ volume total de ventrículo esquerdo. O volume médio de cardiomiócitos foi então calculado: volume total de cardiomiócitos $\div$ número total de cardiomiócitos.

Os pontos que atingiram fibras colagênicas foram registrados. A fração de área de fibras colagênicas foi calculada: número de pontos atingindo fibras colagênicas $\div$ número total de pontos no miocárdio; quando esta fração de área em multiplicada pelo volume de ventrículo esquerdo, o volume total de tecido conjuntivo é obtido.

2.8. Análise das Citocinas

Para analisar Interleucina 1 Beta ($\text{IL1}\beta$), Interleucina-6 (IL6), Fator de necrose tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) e Citocina induzida quimioatratante de neutrófilos (CINC) o lavado broncoalveolar passou pela técnica denominada ELISA. Primeiro foi necessário fazer o coating Buffer 18 horas antes nas placas utilizadas, foram colocados nos tubos falcon $9960 \mu\text{l}$ do Coating Buffer* + $40 \mu\text{l}$ de Antibody Capture, foram então incubados durante a noite em geladeira (overnight) protegidos. No dia seguinte as placas foram lavadas

com Wash Buffer (950µl PBS 1X + 500µl de Tween 20) e foi feito o bloqueio com o Assay Diluent com PBS + FBS 10%, e permaneceram por 1 hora. Após a lavagem das placas as amostras foram pipetadas, 100 µl em cada poço, para fazer a curva foi necessário 1,5 ml de cada citocina e 1 ml do assay (PBS 1X + FBS 10%), então aguardamos 2 horas. Depois da lavagem foi pipetado o “detection” em todas as placas e deixamos agir por 30 minutos. Em seguida foram aplicados o substrato – TMB (Substrate reagent A e B = 5 ml de cada um e colocar 100 µl em cada amostra) e deixamos agir por 30 minutos protegidas da luz, por fim levamos para a leitora ELISA para obter os resultados.

2.8.1. Análise da Enzima Superóxido Dismutase

A técnica utilizada para analisar a enzima superóxido dismutase (SOD) foi baseada na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm durante 2 minutos. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado. No meio de reação, foram utilizados 20 mL de homogeneizado, 973 mL de tampão Tris-Fosfato a 50 mmol/L (pH 8,2), 8 mL de pirogalol a 24 mmol/L, 4 mL de CAT a 30 mmol/L. Esta curva obtida foi utilizada como branco. Também foi feito uma curva padrão utilizando três concentrações distintas de SOD (0,25U, 0,5U e 1U), através da qual foi obtida a equação da reta para realização dos cálculos.

2.9. Análise Estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados descritivos estão apresentados como média $\pm$ DP. A significância da VFC, PA e FC foi determinada empregando modelos lineares gerais com medidas repetidas. As transformações em log10 foram feitas para estabelecer normalidade na VFC para a relação LF, HF e LF / HF e BAL. Os parâmetros hematológicos, histológicos, citocinas e a enzima antioxidante foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) para dois fatores. As comparações post hoc foram feitas usando o teste de Bonferroni. As análises estatísticas foram realizadas com SPSS 21.0. O nível de significância foi fixado em 5%.

3. Resultados

Poluentes

Os poluentes foram medidos em tempo real durante toda a exposição e os valores de MP, NO, NO₂ e NO_x foram registrados a cada 5 minutos durante todo o tempo de exposição (**Tabela 1**). Os ratos SHR apresentaram 5% de taxa de mortalidade, com maior intensidade após 30 dias de exposição ao diesel.

Tabela 1. Estatística Descritiva de MP_{2,5}, NO, NO₂, NO_x medidos dentro da câmara em tempo real, com monitor automático, para os grupos AF e DE para todos os grupos experimentais (15, 30 e 45 dias) expostos por 1 hora.

Poluentes	Tempo	AF			DE		
		Média	±	DP	Média	±	DP
MP _{2.5} (µg/m ³)	15	0,1	±	0,0	608,6	±	100,1
	30	0,3	±	0,0	610,7	±	111,3
	45	0,2	±	0,0	599,7	±	105,4
NO (ppm)	15	4,9	±	0,2	7,9	±	1,0
	30	6,0	±	0,3	8,9	±	0,9
	45	7,3	±	0,2	3,9	±	0,7
NO ₂ (ppm)	15	1,0	±	0,1	1,4	±	0,1
	30	1,5	±	0,3	1,8	±	0,3
	45	1,2	±	0,2	1,5	±	0,2
NO _x (ppm)	15	5,9	±	0,2	9,3	±	1,2
	30	6,5	±	0,1	10,7	±	1,0
	45	8,5	±	0,2	11,8	±	0,9

AF: Ar filtrado; DE: Diesel exhaust; DP: Desvio padrão MP_{2.5}:

material particulado < 2,5 µm; NO: oxido de nitrogênio; NO₂: dióxido de nitrogênio; NO_x: oxidos de nitrogênio; ppm: particulas por milhão.

Em todos os tempos de exposição (15, 30 e 45 dias), não houve diferenças estatisticamente significativas nos poluentes recebidos para os grupos DE todos os animais receberam os mesmos valores de poluentes.

5.1. Análise da Frequência Cardíaca, Variabilidade da Frequência Cardíaca e Pressão Arterial

Na comparação entre os ratos SHR e ratos WKY expostos ao diesel, notou-se uma diminuição da FC em nos grupos 30 e 45 dias ($p=0,001$) (**Figura 2**); e uma diminuição dos valores de SDNN em todos os tempos de exposição 15 ($p=0,000$), 30 ($p=0,000$) e 45 dias ($p=0,013$) (**Figura 3**); em relação aos valores de RMSSD, também foram observados valores menores nos ratos SHR em todos os tempos de exposição ($p=0,000$) (**Figura 4**). A pressão arterial dos ratos WKY foram mais baixas em todos os tempos de exposição em relação aos animais SHR expostos ao diesel ($p=0,000$) (**Figura 5**).

Figura 2- Média e desvio padrão dos valores de FC entre as linhagens SHR e WKY após a exposição ao DE em todos os tempos. **WKY:** Wistar-Kyoto; **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; **AF:** Ar Filtrado; **DE:** Diesel Exhaust **FC:** Frequência cardíaca; **SHR** $\neq$ **WKY** (* $p=0,001$).

Figura 3- Média e desvio padrão dos valores de SDNN entre as linhagens SHR e WKY após a exposição ao DE em todos os tempos.

WKY: Wistar-Kyoto; **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; **AF:** Ar Filtrado; **DE:** Diesel Exhaust **SDNN:** standard deviation of normal beats; **SHR ≠ WKY** (**p=0,000; #p=0,013).

Figura 4- Média e desvio padrão dos valores RMSSD (C) entre as linhagens SHR e WKY após a exposição ao DE em todos os tempos.

WKY: Wistar-Kyoto; **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; **AF:** Ar Filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **RMSSD:** root mean square of successive differences in the heart beat interval; **SHR ≠ WKY** (**p=0,000).

Figura 5- Média e desvio padrão dos valores PA entre as linhagens SHR e WKY após a exposição ao DE em todos os tempos. **WKY:** Wistar-Kyoto; **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; **AF:** Ar Filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **SHR ≠ WKY** (** $p=0,000$).

Os ratos SHR expostos ao DE apresentaram um aumento dos valores de SDNN em relação aos animais expostos ao AF no grupo 45 dias ($p=0,017$) (**Figura 6-A**), não foram observadas diferenças estatísticas nos WKY (**Figura 6-B**); já os valores de RMSSD diminuíram nos grupos 30 ($p=0,045$) e 45 dias ($p=0,032$) de exposição (**Figura 7-A**), não foram observadas diferenças estatísticas nos WKY (**Figura 7-B**).

Figura 6- Média e desvio padrão dos valores de SDNN entre as exposições nos ratos SHR e WKY em todos os tempos. **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; **WKY:** Wistar Kyoto; **AF:** Ar Filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **FC:** Frequência Cardíaca; **SDNN:** standard deviation of normal beats; **AF** $\neq$ **DE** (* $p=0,017$).

Figura 7- Média e desvio padrão dos valores de RMSSD entre as exposições nos ratos SHR e WKY em todos os tempos. **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; **WKY:** Wistar Kyoto; **AF:** Ar Filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **RMSSD:** root mean square of successive differences in the heart beat interval; **AF ≠ DE** (**p=0,045; #p=0.032).

Os ratos WKY expostos a DE apresentaram diminuição significativa na PA ($p = 0,002$) em comparação com ratos WKY expostos a FA no grupo 15 dias (**Figura 8-B**), não foram observadas diferenças nos valores de PA nos ratos SHR (**Figura 8-A**). Os ratos SHR expostos ao DE apresentaram maiores valores de LF ($p=0,000$) e HF ($p=0,000$) no tempo 45 em comparação ao AF. Já na comparação entre linhagens os ratos SHR expostos tanto ao DE como ao AF apresentaram menores valores de LF ($p=0,000$) e HF ($p=0,000$) em comparação aos WKY em todos os tempos de exposição; 0, 15, 30 e 45 (**Tabela 3**). Não foram encontradas diferenças significativas nos outros parâmetros analisados (**Tabela 2 e 3**).

Figura 8- Média e desvio padrão dos valores de PA entre as exposições nos ratos SHR e WKY em todos os tempos. **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats **WKY:** Wistar Kyoto; **AF:** Ar Filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **PA:** pressão arterial; **AF** $\neq$ **DE** (* $p=0,002$).

Tabela 2. Valores descritivos da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), frequência cardíaca (FC) e pressão arterial (PA) de cada grupo exposto na câmara de inalação (Ar filtrado e Diesel). Os valores estão apresentados em média e desvio padrão.

Parâmetros	Tempo (dias)	WKY								SHR							
		AF				D				AF				D			
		N	Média	±	DP	N	Média	±	DP	n	Média	±	DP	n	Média	±	DP
1- SDNN (ms)	0	10	58,3	±	13,7	11	60,2	±	7,0	9	18,5	±	18,3	10	5,7	±	2,7*
	15	10	55,7	±	14,1	10	56,5	±	13,4	10	16,5	±	8,9	11	8,4	±	5,0*
	30	9	59,0	±	8,7	10	54,5	±	10,0	9	10,7	±	6,5	10	12,4	±	8,4*
	45	8	55,2	±	5,5	9	53,0	±	15,3	7	17,0	±	9,5	9	35,2	±	20,1*#
2- RMSSD (ms)	0	10	80,3	±	27,6	11	77,6	±	25,9	9	30,9	±	31,9	10	9,2	±	4,7*
	15	10	78,4	±	13,5	10	77,4	±	24,1	10	32,9	±	18,0	11	14,4	±	6,1*
	30	9	73,9	±	10,2	10	76,8	±	12,6	9	29,2	±	9,7	10	15,9	±	7,6*#
	45	8	68,7	±	13,5	9	67,0	±	18,1	7	33,1	±	11,0	9	17,9	±	8,5*#
3- NN (ms)	0	10	351,3	±	29,0	11	310,7	±	50,9	9	279,5	±	76,2	10	233,0	±	49,5
	15	10	338,3	±	28,8	10	322,3	±	73,4	10	254,1	±	48,2	11	284,3	±	40,6
	30	9	317,4	±	73,8	10	342,0	±	13,4	9	272,4	±	37,2	10	296,8	±	67,7
	45	8	362,7	±	102,1	9	338,6	±	80,1	7	258,3	±	58,4	9	305,5	±	48,1
4- FC (bpm)	0	10	299,2	±	46,9	11	309,6	±	39,4	9	302,6	±	13,7	10	325,0	±	22,7
	15	10	348,5	±	66,5	10	333,8	±	79,2	10	307,2	±	11,7	11	298,1	±	9,3
	30	9	354,8	±	48,7	10	360,9	±	47,9	9	299,8	±	21,3	10	290,6	±	9,9*
	45	8	366,7	±	37,6	9	356,3	±	67,0	7	288,1	±	15,5	9	274,8	±	16,2*
5- PA (mmHg)	0	10	136,1	±	19,5	11	139,3	±	20,9	9	191,0	±	18,1	10	204,6	±	3,2*
	15	10	148,0	±	17,8	10	118,4	±	21,8**	10	197,5	±	5,9	11	196,5	±	7,3*
	30	9	130,9	±	40,8	10	116,2	±	23,3	9	193,8	±	10,5	10	197,0	±	7,6*
	45	8	120,7	±	26,7	9	107,3	±	26,0	7	199,3	±	8,6	9	187,1	±	22,1*

WKY: ratos normotensos Wistar-Kyoto; **SHR:** ratos espontaneamente hipertensos; **AF:** Ar filtrado; **D:** Diesel; **SDNN:** Desvio padrão de todos os intervalos RR normais; **RMSSD:** Raiz quadrada da soma das diferenças sucessivas entre intervalos RR normais adjacentes ao quadrado; **PA:** Pressão arterial; **FC:** Frequência cardíaca. ***SHR DE ≠ WKY DE** [0 e 15 dias: 1, 2, 5 (p= 0.000); 30 dias: 1, 2, 5 (p= 0.000) e 4 (p= 0.001); 45 dias: 1 (p= 0.013), 2, 5 (p= 0.000) e 4 (p= 0.001)]; ****WKY DE ≠ WKY AF** [15 dias: 5 (p= 0.002)]; #**SHR DE ≠ SHR AF** [30 dias: 2 (p= 0.045); 45 dias: 1 (p= 0.017) e 2 (p= 0.032)]

Tabela 3. Valores descritivos em Log10 da variabilidade da frequência cardíaca de cada grupo exposto na câmara de inalação (Ar filtrado e Diesel). Os valores estão apresentados em média e desvio padrão.

Parâmetros (Log10)	Tempo (dias)	WKY				SHR			
		AF		D		AF		D	
		N	Média ± DP	N	Média ± DP	n	Média ± DP	n	Média ± DP
1- BFreq (ms ²)	0	10	2,30 ± 0,20	11	2,10 ± 0,50	9	-0,30 ± 0,80	10	-0,50 ± 0,80*
	15	10	2,30 ± 0,20	10	2,10 ± 0,40	10	-0,30 ± 0,80	11	0,00 ± 0,40*
	30	9	2,40 ± 0,30	10	2,10 ± 0,40	9	-0,50 ± 0,50	10	0,10 ± 0,50**
	45	8	2,30 ± 0,20	9	2,30 ± 0,40	7	-0,50 ± 0,40	9	1,00 ± 0,90**
2- AFreq (ms ²)	0	10	2,20 ± 0,20	11	1,90 ± 0,40	9	0,00 ± 1,00	10	-1,20 ± 0,50**
	15	10	2,30 ± 0,30	10	2,00 ± 0,30	10	-0,50 ± 0,80	11	0,20 ± 0,50**
	30	9	2,20 ± 0,30	10	2,00 ± 0,40	9	-0,60 ± 0,80	10	0,10 ± 0,80**
	45	8	2,20 ± 0,20	9	2,00 ± 0,40	7	-0,70 ± 0,70	9	0,80 ± 1,10**
3- BFreq/AFreq	0	10	0,10 ± 0,20	11	0,10 ± 0,20	9	0,00 ± 0,40	10	0,00 ± 0,40
	15	10	0,10 ± 0,10	10	0,10 ± 0,20	10	0,10 ± 0,30	11	0,00 ± 0,30
	30	9	0,20 ± 0,10	10	0,10 ± 0,10	9	0,10 ± 0,40	10	0,00 ± 0,40
	45	8	0,10 ± 0,10	9	0,30 ± 0,20	7	0,20 ± 0,30	9	0,20 ± 0,20

WKY: Wistar-Kyoto; SHR: Spontaneously Hypertensive Rats; AF: Ar filtrado; D: Diesel; BFreq: Baixa Frequência; AFreq: Alta Frequência; BFreq/AFreq: Proporção Baixa Frequência/ Alta Frequência. *SHR D ≠ WKY D [0, 15, 30 e 45 dias: 1, 2 (p= 0,000)]; *SHR D ≠ SHR AF [0 dias: 2 (p= 0,004); 15 dias: 2 (p= 0,014); 30 dias: 1 (p= 0,023), 2 (p= 0,021); 45 dias: 1, 2 (p= 0,000)].

5.2. Análise dos parâmetros hematológicos

Nos ratos expostos ao DE pudemos observar que no grupo 45 dias houve uma queda dos valores de HCM (p=0,001) (**Figura 9**) e de VCM (p= 0,004) na linhagem SHR em comparação a WKY (**Figura 10**); em contrapartida houve um aumento dos valores

de plaquetas nos grupos 30 ($p=0,004$) e 45 ($p=0,001$) dias nos ratos SHR expostos ao diesel em comparação com os WKY (**Figura 11**).

Figura 9- Média e desvio padrão dos valores de HCM linhagens SHR e WKY após a exposição ao DE em todos os tempos. **WKY:** Wistar-Kyoto; **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; **AF:** Ar Filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **HCM:** Hemoglobina corpuscular médio. **SHR $\neq$ WKY** (* $p=0,001$).

Figura 10- Média e desvio padrão dos valores de VCM das linhagens SHR e WKY após a exposição ao DE em todos os tempos. **WKY:** Wistar-Kyoto; **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; **AF:** Ar Filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **VCM:** Volume corpuscular médio **SHR** $\neq$ **WKY** (# $p=0,004$).

Figura 11- Média e desvio padrão dos valores de Plaquetas das linhagens SHR e WKY após a exposição ao DE em todos os tempos.

WKY: Wistar-Kyoto; **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; **AF:** Ar Filtrado; **DE:** Diesel Exhaust. **SHR** ≠ **WKY** (**p=0,000; #p=0,004).

Houve um aumento significativo do VCM ($p = 0,022$) no grupo 30 dias em ratos SHR expostos a DE comparados com ratos SHR expostos a AF (**Figura 12-A**), não foram observadas diferenças estatísticas nos WKY (**Figura 12-B**). Os ratos WKY expostos a DE comparados aos expostos a AF apresentaram uma diminuição significativa na MCHC ($p = 0,001$) nos grupos 15 dias e RDW-SD aumentado ($p = 0,013$) após 45 dias, não foram observadas diferenças nos demais parâmetros analisados (**Tabela 4 e 5**).

Figura 12. Média e desvio padrão dos valores VCM nos ratos SHR e WKY em todos os tempos. **SHR:** Spontaneously hypertensive rats; **WKY:** Wistar Kyoto; **AF:** Ar filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **VCM:** Volume corpuscular médio; **SHR $\neq$ WKY** (* $p = 0,022$).

Tabela 4. Valores descritivos da série vermelha e branca do hemograma dos ratos WKY expostos na câmara de inalação (Ar Filtrado e Diesel). Os valores estão apresentados como média e desvio padrão (DP).

Parâmetros	WKY					
	15 Dias		30 Dias		45 Dias	
	AF (n=10)		D (n=10)		AF (n=8)	
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
1- Eritrócitos (milhões/mm ³)	9,64 ± 0,40	9,65 ± 0,41	10,56 ± 1,47	9,37 ± 1,29	9,95 ± 0,51	9,95 ± 0,94
2- Hemoglobina (g/dL)	15,64 ± 1,00	15,56 ± 0,91	17,06 ± 2,22	15,09 ± 2,06	15,98 ± 0,82	15,95 ± 1,47
3- Hematócrito (%)	43,99 ± 2,35	43,91 ± 2,04	47,30 ± 6,87	41,41 ± 5,66	44,18 ± 2,30	44,34 ± 4,62
4- VCM (fL)	45,77 ± 1,10	45,48 ± 1,01	44,75 ± 0,91	44,21 ± 0,90	44,39 ± 0,67	44,51 ± 0,88
5- HCM (pg)	16,25 ± 0,51	16,16 ± 0,43	16,18 ± 0,25	16,11 ± 0,21	16,08 ± 0,17	16,04 ± 0,20
6- CHCM (g/dL)	35,54 ± 0,68	33,28 ± 6,50*	36,16 ± 0,75	36,41 ± 0,38 [£]	36,18 ± 0,30	36,01 ± 0,61
7- RDW-CV (%)	20,60 ± 1,09	20,61 ± 0,87	23,74 ± 2,21	21,84 ± 2,51	22,19 ± 1,14	22,45 ± 1,39
8- RDW-SD (fL)	26,30 ± 0,93	26,19 ± 0,87	29,11 ± 4,92	28,48 ± 2,20*	27,83 ± 2,60	29,66 ± 2,00*
9- Leucócitos (mil/mm ³)	8,10 ± 1,56	6,77 ± 1,41	6,39 ± 1,08	8,65 ± 6,87	6,73 ± 1,75	6,65 ± 1,18
10- Neutrófilos (mil/mm ³)	2,41 ± 0,62	2,07 ± 0,43	1,96 ± 0,71	3,60 ± 3,76	1,64 ± 0,50	1,61 ± 0,44
11- Eosinófilos (mil/mm ³)	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,20 ± 0,36	0,16 ± 0,38	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,02
12- Basófilos (mil/mm ³)	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,01
13- Linfócitos (mil/mm ³)	5,03 ± 0,80	4,19 ± 0,97	3,65 ± 1,09	4,48 ± 2,41	4,56 ± 0,99	4,61 ± 0,97
14- Monócitos (mil/mm ³)	0,63 ± 0,44	0,49 ± 0,27	0,55 ± 0,62	0,39 ± 0,50	0,49 ± 0,37	0,38 ± 0,22
15- Plaquetas (mil/mm ³)	666,30 ± 82,39	694,90 ± 81,59	546,38 ± 187,61	556,00 ± 227,85	648,57 ± 274,70	676,63 ± 82,11

WKY: Wistar-Kyoto; AF: Ar Filtrado; DE: Diesel Exhaust; *WKY DE ≠ WKY AF [15 dias: 6 (*p= 0.001); 45 dias: 8 (°p= 0.013)].

Tabela 5- Valores descritivos da série vermelha e branca do hemograma dos ratos SHR expostos na câmara de inalação (Ar Filtrado e Diesel). Os valores estão apresentados como média e desvio padrão (DP).

Parâmetros	SHR					
	15 Dias		30 Dias		45 Dias	
	AF (n=9)		D (n=9)		AF (n=7)	
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
1- Eritrócitos (milhões/mm ³)	9,54 ± 0,53	9,61 ± 0,56	9,44 ± 1,02	9,57 ± 0,45	9,84 ± 2,10	10,07 ± 0,77
2- Hemoglobina (g/dL)	15,08 ± 0,84	15,14 ± 0,78	15,06 ± 1,68	15,43 ± 0,58	15,19 ± 3,08	15,66 ± 1,14
3- Hematócrito (%)	43,19 ± 3,23	43,81 ± 3,00	42,16 ± 5,39	43,54 ± 1,81	41,40 ± 7,91	42,60 ± 3,15
4- VCM (fL)	45,29 ± 1,59	45,59 ± 2,00	44,60 ± 1,72	45,33 ± 1,09*	42,37 ± 1,76	42,33 ± 0,85
5- HCM (pg)	15,83 ± 0,88	15,78 ± 0,86	15,96 ± 0,22	16,07 ± 0,29	15,49 ± 0,28	15,56 ± 0,14
6- CHCM (g/dL)	34,93 ± 1,69	34,62 ± 1,72	35,79 ± 1,02	35,43 ± 0,42	36,57 ± 0,94	37,09 ± 1,18
7- RDW-CV (%)	21,57 ± 1,10	21,77 ± 1,21	22,85 ± 2,04	23,20 ± 0,43	22,90 ± 3,33	23,23 ± 1,23
8- RDW-SD (fL)	28,39 ± 3,01	28,92 ± 3,10	30,03 ± 2,90	30,46 ± 1,53	29,01 ± 2,02	29,44 ± 0,78
9- Leucócitos (mil/mm ³)	6,43 ± 1,11	6,29 ± 1,89	5,81 ± 2,38	7,49 ± 1,39	6,63 ± 3,40	6,51 ± 1,39
10- Neutrófilos (mil/mm ³)	1,80 ± 1,11	1,38 ± 0,91	1,41 ± 0,63	1,77 ± 0,68	1,77 ± 0,44	1,60 ± 0,46
11- Eosinófilos (mil/mm ³)	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,28 ± 0,52	0,18 ± 0,38	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,03
12- Basófilos (mil/mm ³)	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,03
13- Linfócitos (mil/mm ³)	4,33 ± 1,64	4,58 ± 1,24	3,81 ± 1,69	5,10 ± 1,24	5,31 ± 1,33	4,42 ± 1,21
14- Monócitos (mil/mm ³)	0,28 ± 0,26	0,30 ± 0,26	0,29 ± 0,18	0,42 ± 0,15	0,46 ± 0,32	0,47 ± 0,25
15- Plaquetas (mil/mm ³)	836,56 ± 279,35	992,00 ± 100,08	640,88 ± 379,65	871,75 ± 160,70 [#]	1101,29 ± 224,80	1127,11 ± 147,18 [£]

SHR: Spontaneously Hypertensive Rats; **AF**: Ar Filtrado; **DE**: Diesel Exhaust; *SHR DE ≠ SHR FA [30 dias: 4 (*p= 0.022) (#p=0,000); 45 dias (£p=0,004)].

5.3. Análise dos parâmetros de coagulação

Na comparação entre as linhagens (SHR e WKY) expostas a DE, observou-se uma redução de concentração de fibrinogênio ($p = 0,020$) no grupo 15 dias nos ratos SHR (**Figura 13**). Os valores de TTPA ($p = 0,000$) nos SHR foram significativamente aumentados no grupo 45 dias (**Figura 14**), também houve um aumento significativo de TP no grupo 30 dias ($p = 0,004$) e 45 dias ($p = 0,000$) (**Figura 15-A**), não foram observadas diferenças estatísticas nos WKY (**Figura 15-B**).

Figura 13- Média e desvio padrão dos valores de fibrinogênio entre as linhagens SHR e WKY expostos ao DE em todos os tempos. **WKY:** Wistar-Kyoto; **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; **AF:** Ar Filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **SHR $\neq$ WKY** (* $p=0,020$).

Figura 14- Média e desvio padrão dos valores de TTPA entre as linhagens SHR e WKY expostos ao DE em todos os tempos (15, 30 e 45). **WKY:** Wistar-Kyoto; **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; **AF:** Ar Filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **SHR $\neq$ WKY** (** $p=0,000$).

Figura 15- Média e desvio padrão dos valores de TP entre as linhagens SHR e WKY expostos ao DE em todos os tempos. **WKY:** Wistar-Kyoto; **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; **AF:** Ar Filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **SHR ≠ WKY** (# $p=0,004$; ** $p=0,000$).

Verificou-se um aumento significativo nos valores de TTPA nos ratos SHR após 45 dias ($p = 0,000$) e também nos WKY ($p = 0,022$) expostos ao DE comparados aos AF (**Figura 16-A e B**), observamos maiores valores de concentração de fibrinogênio (**Figura**

17-A) e de TP (**Figura 18-A)** nos grupos 30 dias ($p=0,001$, $p=0,003$ respectivamente) e 45 dias ($p=0,000$, $p=0,001$ respectivamente) nos ratos SHR expostos ao DE quando comparados aos AF. Não foram observadas diferenças nos ratos WKY (**Figura 17-B, 18-B**). Não foram observadas diferenças nos demais parâmetros analisados (**Tabela 6**).

Figura 16- Média e desvio padrão dos valores de TTPA nos ratos SHR e WKY todos os tempos. **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; **WKY:** Wistar Kyoto; **AF:** Ar Filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **AF $\neq$ DE** (* $p=0,001$; ** $p=0,022$).

Figure 17- Média e desvio padrão dos valores de Fibrinogênio nos ratos SHR e WKY em todos os tempos. **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; **WKY:** Wistar Kyoto; **AF:** Ar Filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **AF $\neq$ DE** (* $p=0,001$; ** $p=0,000$).

Figure 18- Média e desvio padrão dos valores TP nos ratos SHR e WKY em todos os tempos. **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; **WKY:** Wistar Kyoto; **AF:** Ar Filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **AF $\neq$ DE** (* $p=0,003$; ** $p=0,001$).

Tabela 6. Valores descritivos dos parâmetros de coagulação de cada grupo exposto na câmara de inalação (Ar Filtrado e Diesel).

Os valores estão apresentados como média e desvio padrão (DP).

Parâmetros	Tempo (dias)	WKY								SHR							
		AF				D				AF				D			
		n	Média	±	DP	N	Média	±	DP	n	Média	±	DP	n	Média	±	DP
1- Fibrinogênio (mg/dL)	15	10	300.88	±	27.04	10	320.60	±	121.63	9	212.89	±	59.52	10	264.80	±	26.49*
	30	8	310.29	±	36.28	8	311.43	±	40.28	8	211.33	±	43.81	9	313.29	±	21.82 [#]
	45	8	261.00	±	61.58	8	293.57	±	39.48	7	214.17	±	53.89	10	332.90	±	37.22 [#]
2- TP (segundos)	15	10	1.22	±	0.02	10	1.23	±	0.14	9	1.33	±	0.07	10	2.10	±	0.15
	30	8	1.27	±	0.10	8	1.29	±	0.14	8	1.27	±	0.14	9	2.31	±	0.14 ^{**}
	45	8	1.65	±	0.41	8	1.37	±	0.37	7	2.25	±	0.74	10	3.47	±	1.40 ^{**}
3- TTPA (segundos)	15	10	0.77	±	0.17	10	0.74	±	0.13	9	0.83	±	0.12	10	0.83	±	0.13
	30	8	0.71	±	0.08	8	0.71	±	0.06	8	0.41	±	0.39	9	0.59	±	0.34
	45	8	0.94	±	0.09	8	1.36	±	0.42 ^{**}	7	1.06	±	0.08	10	2.54	±	0.33 ^{**}

WKY: Wistar-Kyoto; **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; **AF:** Ar Filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **TP:** Tempo de Protombina; **TTPA:** Tempo de tromboplastina parcial ativada; ***SHR DE ≠ WKY D** [15 dias: 1 (p= 0,020); 30 dias: 2 (p= 0,004); 45 dias: 2, 3 (p= 0,000)]; ****WKY DE ≠ WKY AF** [45 dias: 3 (p= 0,022)]; [#]**SHR DE ≠ SHR AF** [30 dias: 1 (p= 0,001), 2 (p= 0,003); 45 dias: 1, 3 (p= 0,000), 2 (p= 0,001)].

5.4. Análise Estereológica

Comparando as linhagens (SHR e WKY) expostas a DE, observamos aumento nas fibras de colagênicas em ventrículo esquerdo (**Figura 19**) e volume de ventrículo esquerdo no grupo 45 dias ($p = 0,000$) (**Figura 20**) e no volume médio de cardiomiócitos após todos os tempos de exposições 15 ($p = 0,000$), 30 ($p=0,000$) e 45 ($p = 0,023$) dias (**Figura 21**) nos ratos SHR quando comparados com os WKY.

Figura 19- Média e desvio padrão dos valores de de fibras colagênicas em ventrículo esquerdo entre as linhagens SHR e WKY expostos ao DE em todos os tempos. **WKY:** Wistar Kyoto; **SHR:**

Spontaneously hypertensive rats; **AF**: Ar filtrado; **DE**: Diesel Exhaust;

SHR $\neq$ **WKY** (*p = 0,000).

Figura 20- Média e desvio padrão dos valores de volume de ventriculo esquerdo entre as linhagens SHR e WKY expostos ao DE em todos os tempos. **WKY**: Wistar Kyoto; **SHR**: Spontaneously hypertensive rats; **AF**: Ar filtrado; **DE**: Diesel Exhaust; **SHR** $\neq$ **WKY** (*p = 0,000).

Figura 21- Média e desvio padrão dos valores de volume médio de cardiomiócitos entre as linhagens SHR e WKY expostos ao DE em todos os tempos. **WKY:** Wistar Kyoto; **SHR:** Spontaneously hypertensive rats; **AF:** Ar filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **SHR** $\neq$ **WKY** (* $p = 0,000$, ** $p=0,023$).

Comparando as exposições, observamos diferenças estatisticamente significativas nos valores de volume médio de cardiomiócitos após 30 ($p = 0,006$) e 45 ($p = 0,002$) dias, os valores de DE foram maiores que os valores de AF. **(Figura 23-A) (Tabela 7)** nos ratos SHR que foram expostos DE comparados aos AF. Não foram observadas diferenças nos ratos WKY **(Figura 22-A,B e 23-B)**.

Figura 22- Média e desvio padrão dos valores de volume de ventriculo esquerdo nos ratos SHR e WKY em todos os tempos. **SHR:** Spontaneously hypertensive rats; **WKY:** Wistar Kyoto; **FA:** Ar filtrado; **DE:** Diesel Exhaust.

Figura 23- Média e desvio padrão dos valores de volume médio de cardiomiócitos para SHR e WKY em todos os tempos. **SHR:** Spontaneously hypertensive rats; **WKY:** Wistar Kyoto; **FA:** Ar filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **AF ≠ DE** (*p = 0,006; **p = 0,002).

Tabela 7. Valores descritivos dos parâmetros de estereológicos do coração de cada grupo exposto na câmara de inalação (Ar Filtrado e Diesel). Os valores estão apresentados como média e desvio padrão (DP).

Parâmetros	Tempo (dias)	WKY				SHR			
		AF		D		AF		D	
		n	Média ± DP	N	Média ± DP	n	Média ± DP	n	Média ± DP
Miocárdio em ventrículo esquerdo (mm ³)	15	8	37 ± 10	10	39 ± 7	7	43 ± 7	10	45 ± 7
	30	8	39 ± 8	5	46 ± 16	8	49 ± 6	5	47 ± 11
	45	9	35 ± 9	9	31 ± 7*	6	56 ± 10**	8	44 ± 9* **
Fibras colagênicas em ventrículo esquerdo (mm ³)	15	8	8,8 ± 2,6	10	11,2 ± 3,6	7	10,7 ± 4,9	10	12,7 ± 4,2
	30	8	8,3 ± 1,9	5	10,6 ± 5,4	8	10,9 ± 2,6	5	13,3 ± 3,9
	45	9	1,6 ± 3,9	9	8,4 ± 3,2*	6	13,1 ± 3,1	8	15,6 ± 4,5*
Número de cardiomiócitos em ventrículo esquerdo	15	8	15394 ± 5119	10	17773 ± 4011	7	13857 ± 2308	10	13219 ± 2074
	30	8	13906 ± 3516	5	18633 ± 7330	8	16323 ± 4673	5	11130 ± 3434
	45	9	11443 ± 3315	9	10363 ± 4431	6	15738 ± 3212	8	10628 ± 3130
Volume de cardiomiócitos (mm ³)	15	8	,0019 ± ,0004	10	,0016 ± ,0003	7	,0024 ± ,0006	10	,0025 ± ,0005
	30	8	,0022 ± ,0003	5	,0020 ± ,0003*	8	,0025 ± ,0006**	5	,0031 ± ,0003* **
	45	9	,0023 ± ,0005	9	,0024 ± ,0007*	6	,0028 ± ,0006**	8	,0027 ± ,0003* **

WKY: Wistar-Kyoto; **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; **AF:** Ar Filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; ***SHR DE ≠ WKY DE** [30 dias: 4 (p= 0,000); 45 dias: 1, 2 e 4 (1 p= 0,000), 2 (p= 0,000), 4 (p= 0,037)]; ****SHR DE ≠ SHR AF** [30 dias: 3 (p= 0,006); 45 dias: 1 (p= 0,008), 4 (p= 0,002)].

5.5. Análise de Citocinas

No grupo 45 dias de exposição notou-se um aumento de IL1- β nos ratos SHR em comparação aos WKY expostos ao DE ($p=0,043$) (**Figura 24**). Nos tempos de 30 e 45 dias, a exposição ao DE elevou a expressão da IL-1 β ($p=0,002$; $p=0,000$, respectivamente) (**Figura 25-A**). Similarmente, no tempo de 45 dias houve aumento do CINC ($p=0,021$) nos ratos SHR expostos ao DE comparado aos ratos SHR expostos ao AF (**Figura 26-A**). Após 30 e 45 os valores de TNF- α aumentaram ($p=0,012$; $p=0,003$, respectivamente) nos ratos SHR comparado aos ratos SHR expostos ao AF (**Figura 27-A**). Não foram encontradas diferenças nas comparações com ratos WKY (**Figura 25-B, 26-B e 27-B**). Não foram encontradas diferenças estatísticas nos demais parâmetros analisados (**Tabela 8**).

Figura 24- Média e desvio padrão dos valores de IL1 β entre as linhagens SHR e WKY expostos ao DE em todos os tempos. **WKY:** Wistar Kyoto; **SHR:** Spontaneously hypertensive rats; **FA:** Ar filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **AF $\neq$ DE** (* $p = 0,043$).

Figura 25- Média e desvio padrão dos valores de IL1 β nos ratos SHR e WKY em todos os tempos. **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; **WKY:** Wistar Kyoto; **FA:** Ar filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **AF $\neq$ DE** (* $p = 0,002$; ** $P=0,000$).

Figura 26- Média e desvio padrão dos valores de CINC nos ratos SHR e WKY em todos os tempos. **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; **WKY:** Wistar Kyoto; **FA:** Ar filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **AF $\neq$ DE** (* $p = 0,021$).

Figura 27- Média e desvio padrão dos valores de TNF- α nos ratos SHR e WKY em todos os tempos. **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; **WKY:** Wistar Kyoto; **FA:** Ar filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **AF $\neq$ DE** (*p = 0,012; **p=0,003).

Tabela 8. Valores descritivos em Log10 das citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, CINC e TNF- α) para os grupos expostos na câmara de inalação (Ar Filtrado e Diesel). Os valores estão apresentados como média e desvio padrão (DP).

Citocinas (Log10)	Tempo (dias)	WKY				SHR			
		AF		D		AF		D	
		n	Média $\pm$ DP	N	Média $\pm$ DP	n	Média $\pm$ DP	n	Média $\pm$ DP
1- IL-1 β (pg/ml)	15	9	3,03 $\pm$ 0,77	9	3,03 $\pm$ 0,86	10	2,90 $\pm$ 0,51	10	2,94 $\pm$ 0,60
	30	9	3,00 $\pm$ 0,60	7	2,84 $\pm$ 0,70	10	2,51 $\pm$ 0,41	10	3,30 $\pm$ 0,72 [#]
	45	6	2,85 $\pm$ 0,78	10	3,08 $\pm$ 0,83	5	2,25 $\pm$ 0,19	10	3,34 $\pm$ 0,63 ^{*#}
2- IL-6 (pg/ml)	15	9	3,08 $\pm$ 0,77	9	3,00 $\pm$ 0,82	10	3,32 $\pm$ 0,73	10	3,33 $\pm$ 0,82
	30	9	3,44 $\pm$ 0,84	7	3,19 $\pm$ 0,94	10	3,33 $\pm$ 0,82	10	2,98 $\pm$ 0,75
	45	6	2,85 $\pm$ 0,78	10	3,08 $\pm$ 0,83	5	2,67 $\pm$ 0,47	10	2,96 $\pm$ 0,87
3- CINC (pg/ml)	15	9	2,01 $\pm$ 0,54	9	1,86 $\pm$ 0,52	10	2,32 $\pm$ 0,38	10	2,20 $\pm$ 0,51
	30	9	2,59 $\pm$ 1,06	7	2,17 $\pm$ 0,69	10	2,38 $\pm$ 0,49	10	2,22 $\pm$ 0,56
	45	6	2,12 $\pm$ 0,52	10	2,49 $\pm$ 0,21	5	1,74 $\pm$ 0,14	10	2,28 $\pm$ 0,55 [#]
4- TNF- α (pg/ml)	15	9	2,73 $\pm$ 0,46	9	2,68 $\pm$ 0,49	10	2,86 $\pm$ 0,60	10	2,76 $\pm$ 0,47
	30	9	2,73 $\pm$ 0,61	7	2,54 $\pm$ 0,64	10	2,38 $\pm$ 0,22	10	3,06 $\pm$ 0,29 [#]
	45	6	2,64 $\pm$ 0,39	10	2,92 $\pm$ 0,36	5	2,29 $\pm$ 0,07	10	3,14 $\pm$ 0,20 [#]

WKY: Wistar-Kyoto; SHR: Spontaneously Hypertensive Rats; IL-1 β : Interleucina 1-beta; IL-6: Interleucina 6; CINC: Citocina induzida quimioattractante de neutrófilos; TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa; *SHR DE $\neq$ WKY DE [45 dias: 1 (p= 0,043)]; #SHR DE $\neq$ SHR AF [30 dias: 1 (p= 0,002), 4 (p= 0,012); 45 dias: 1 (p= 0,000) 3 (p= 0,021) e 4 (p= 0,003)].

5.6. Enzima Superóxido Dismutase

Quando analisados os ratos SHR em comparação com os ratos WKY expostos ao DE, notou-se menores valores de SOD (p=0,016) no grupo 15 dias de exposição (**Figura 28**). No grupo 15 dias, houve aumento da SOD (p=0,038) nos ratos WKY expostos ao DE comparado aos ratos WKY expostos ao AF (**Figura 29-B**), não notamos diferenças nas

comparações com ratos SHR (**Figura 29-A**). Não foram encontradas diferenças nos outros parâmetros analisados (**Tabela 10**).

Figura 28- Média e desvio padrão dos valores de SOD entre as linhagens SHR e WKY expostos ao DE em todos os tempos. WKY: Wistar Kyoto; **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; **AF:** Ar filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **SHR** $\neq$ **WKY** (** p =0,016).

Figura 29- Média e desvio padrão dos valores de SOD nos ratos SHR e WKY em todos os tempos. **WKY:** Wistar Kyoto; **AF:** Ar filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **AF ≠ DE** (* $p=0,038$).

Tabela 9. Valores descritivos da SOD para os grupos expostos na câmara de inalação (Ar Filtrado e Diesel). Os valores estão apresentados como média e desvio padrão (DP).

Parâmetro	Tempo (dias)	KY				SHR			
		AF		D		AF		D	
		n	Média ± DP	N	Média ± DP	N	Média ± DP	n	Média ± DP
SOD (pg/ml)	15	8	308 ± 150	8	468 ± 217	8	394 ± 188	8	281 ± 105
	30	9	325 ± 200	7	437 ± 155**	10	357 ± 96	5	328 ± 90*
	45	6	295 ± 128	11	295 ± 158	5	226 ± 87	9	298 ± 125

WKY: ratos normotensos Wistar-Kyoto; **SHR:** ratos espontaneamente hipertensos; **AF:** ar filtrado; **D:** diesel;

SOD: superoxide dismutase ***WKY DE ≠ WKY AF** [30 dias; ($p=0,038$)]; ****SHR DE ≠ WKY DE** [30 dias; ($p=0,016$)].

5.7. Análise do Lavado Broncoalveolar

No grupo 30 dias, os ratos WKY expostos ao DE apresentaram aumento da celularidade total ($p=0,002$) (**Tabela 10**) e aumento de neutrófilos ($p=0,000$) comparado aos ratos WKY expostos ao AF (**Figura 31-B**), nos ratos SHR não foram encontradas diferenças estatísticas (**Figura 31-A**). Os ratos SHR expostos ao DE apresentaram aumento da celularidade ($p=0,025$) após 45 dias (**Tabela 10**), da contagem de macrófagos no grupo 30 dias ($p=0,008$) e 45 dias de exposição ($p=0,002$) (**Figura 32-A**), não foram encontradas diferenças nas comparações com ratos WKY (**Figura 32-B**). Não foram encontradas diferenças significativas nos outros parâmetros analisados (**Tabela 10**).

Figura 31- Média em log10 dos valores de neutrófilos nos ratos SHR e WKY em todos os tempos. **WKY:** Wistar Kyoto; **AF:** Ar filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **AF ≠ DE** (* $p=0,000$).

Figura 32- Média em log10 dos valores de Macrófagos nos ratos SHR e WKY em todos os tempos. **SHR:** Spontaneously hypertensive rats; **WKY:** Wistar Kyoto; **AF:** Ar filtrado; **DE:** Diesel Exhaust; **AF ≠ DE** (*p=0,008), (**p =0,002).

Tabela 10. Valores descritivos em Log10 das células inflamatórias do LBA para os grupos expostos na câmara de inalação (Ar Filtrado e Diesel). Os valores estão apresentados como média e desvio padrão (DP).

Células Inflamatórias (Log10)	Tempo (dias)	WKY								SHR							
		AF				D				AF				D			
		n	Média	±	DP	N	Média	±	DP	n	Média	±	DP	n	Média	±	DP
1- Total (cel/mm²)	15	9	1,42	±	0,25	10	1,43	±	0,25	10	1,67	±	0,18	10	1,64	±	0,13
	30	6	1,59	±	0,16	6	2,00	±	0,32**	9	1,60	±	0,17	8	1,78	±	0,17*
	45	5	1,57	±	0,35	9	1,76	±	0,12	6	1,35	±	0,45	11	1,87	±	0,18 [#]
2- Macrófagos (cel/mm²)	15	9	1,17	±	0,19	10	1,28	±	0,09	10	1,56	±	0,14	10	1,53	±	0,14*
	30	6	1,28	±	0,47	6	1,17	±	0,13	9	1,33	±	0,13	8	1,65	±	0,17**
	45	5	1,17	±	0,26	9	1,07	±	0,22	6	1,20	±	0,39	11	1,81	±	0,21**
3- Neutrófilos (cel/mm²)	15	9	0,61	±	0,54	10	0,79	±	0,44	10	0,94	±	0,34	10	0,50	±	0,45
	30	6	0,82	±	0,64	6	1,57	±	0,79**	9	0,96	±	0,26	8	0,94	±	0,30*
	45	5	1,29	±	0,37	9	1,60	±	0,21	6	0,72	±	0,42	11	0,56	±	0,28*
4- Linfócitos (cel/mm²)	15	9	0,76	±	0,41	10	0,56	±	0,44	10	0,34	±	0,34	10	0,37	±	0,27 [#]
	30	6	0,79	±	0,34	6	0,76	±	0,27	9	0,52	±	0,54	8	0,45	±	0,55
	45	5	0,86	±	0,14	9	0,74	±	0,25	6	0,56	±	0,48	11	0,33	±	0,36

WKY: Wistar-Kyoto; **SHR:** Spontaneously Hypertensive Rats; ***SHR DE ≠ WKY DE** [15 dias: 2 (p= 0,000); 30 dias: 1 (p= 0,017), 2 e 3 (p= 0,000); 45 dias: 2 e 3 (p= 0,000)]; ****WKY DE ≠ WKY AF** [30 dias: 1 (p= 0,002) e 3 (p= 0,000)]; **#SHR DE ≠ SHR AF** [15 dias: 4 (p= 0,044); 30 dias: 2 (p= 0,008); 45 dias: 1 (p= 0,025) e 2 (p= 0,002)].

6. Discussão

De acordo com os achados deste estudo, foi observado que a exposição ao DE foi capaz de causar efeitos toxicológicos no sistema cardiovascular.

Nossos resultados também demonstram que os animais SHR expostos a queima do diesel apresentaram redução da VFC em todos os tempos de exposição (15, 30 e 45 dias). Além disso, nos tempos de 30 e 45 dias, foi evidenciado nesses animais aumento dos fatores de coagulação, agregação plaquetária e ventrículo esquerdo aumentado. Os níveis de TNF- α e IL1 β , após 30 e 45 dias, foram maiores nos ratos SHR expostos ao DE. Na comparação entre as linhagens, níveis de IL1 foram maiores nos animais SHR em relação aos WKY expostos ao DE após 45 dias. No caso da citocina CINC, níveis mais altos foram encontrados nos ratos SHR expostos ao DE após 45 dias em comparação aos expostos ao AF. Na enzima SOD, os níveis foram mais altos nos ratos SHR comparado ao WKY após 30 dias de exposição do DE, o mesmo ocorreu com os ratos WKY expostos ao DE.

Os valores diminuídos de SDNN e RMSSD após exposição ao material particulado oriundo do tráfego (diesel exhaust particles) são marcadores de risco cardiovascular, essa queda significa diminuição da variabilidade da frequência cardíaca. Estudos mostram a presença de várias anomalias nos marcadores autonômicos após exposição ao MP_{2,5}, como diminuição da variabilidade da frequência cardíaca, com desbalanço do SNA autonômico (simpático e parassimpático (Rivero DH et al., 2005; Rivero DH et al. 2001, Lucini D et al., 2002; Rohr et al., 2011). Em estudo recente, a associação entre VFC, hipertensão e pressão arterial foi examinada em 11.061 homens e mulheres, a VFC foi avaliada por registros em holter por nove anos. As 7099 pessoas sem hipertensão na linha de base com valores mais baixos de HRV, baseando-se nos valores RMSSD, foram associados a uma razão de risco de 1,36 para o desenvolvimento de hipertensão nove anos

depois em comparação com aqueles que apresentaram valores mais altos (Schroeder EB et.al., 2003). A medida da VFC, mostrando a condução simpática e parassimpática para ajustes do tônus cardíaco foi estabelecida nos estágios iniciais da hipertensão essencial, sugerindo que a desregulação neuro-hormonal pode ser fundamental para sua etiologia, a progressão da hipertensão e posterior dano ao órgão final, como a rigidez arterial aumentada e a hipertrofia ventricular esquerda (Palatini P et. al. 2009). No Framingham Heart Study foi encontrado uma redução da VFC em homens e mulheres com hipertensão arterial sistêmica primária demonstraram, redução da VFC, LF,BF confirmaram a hipótese de que a desregulação do sistema nervoso autônomo desempenha um papel na patogênese da hipertensão (Singh JP et.al. 1998).

Estudos epidemiológicos também associam a poluição do ar com a diminuição da VFC (Adar, et al. 2007), assim como o aumento da arritmia cardíaca à exposição aos compostos das partículas (Brito et. al. 2010; Dockery et al 2005). Já foram demonstrados diminuições da VFC em exposições agudas ao diesel, em estudo analisando animais SHR expostos ao diesel em diferentes estações do ano, demonstraram a mesma queda de SDNN e uma elevação dos parâmetros de RMSSD após a exposição ao diesel (Rohr AC et. al. 2011). Estudos anteriores também têm demonstrado que a exposição a diesel ou DEP provoca a ativação de receptores inflamatórios pulmonares, que é conhecido por causar reflexos parassimpáticos (Deering-Rice et al, 2011;. Hazari et al, 2011). Também foram observados os efeitos múltiplos do diesel sobre arritmia e VFC em ratos idade avançada contra os efeitos mínimos desta mesma exposição em ratos jovens (Carll et al., 2012) apoia a evidência epidemiológica que a idade e a progressão da doença cardíaca aumenta a susceptibilidade ao poluente (Brook et al., 2004). Assim como em nosso estudo, foram observados os efeitos em componentes que refletem mudanças na variação de alta frequência na frequência cardíaca, o que sugere que a exposição a PM pode resultar em

uma perda de controle parassimpático da frequência cardíaca. Nossos resultados estão de acordo com um estudo de residentes idosos em Boston, que mostram associações entre MP e a queda das médias de RMSSD, uma medida que se correlaciona com componentes de alta frequência da VFC (Gold D.R., et.al., 2010). Voluntários humanos expostos às partículas ultra – finas apresentaram repolarização cardíaca indicadas por alterações no intervalo QT corrigido no ECG (Frampton MW. 2001). Os resultados desta investigação se mostram biologicamente plausíveis, as partículas de material particulado podem influenciar o sistema nervoso autônomo diretamente, estimulando nervos aferentes nos pulmões ou danificar o miocárdio, como resultado da translocação das partículas para o coração (Nemmar A., et. al., 2002). Acredita-se também que as partículas podem causar efeitos indiretos para o sistema nervoso autônomo via vias inflamatórias (Utell M.J., 2002). De acordo com nossos resultados e estudos importantes, a evidência de que o tônus vagal, medido pela VFC, é menor em pessoas com hipertensão do que em normotensos, estes estudos sugerem que essa diminuição pode aumentar quando expostos ao MP derivado do tráfego e preceder o desenvolvimento deste fator de risco crítico para doenças cardiovasculares. A hipertensão também pode levar a danos no coração ocasionados pela necessidade adaptativa para lidar com o aumento da pressão arterial.

Também de acordo com nossos resultados, o número de plaquetas circulantes foi significativamente aumentado em ratos SHR expostos ao DE, o que foi observado em estudos similares. Em uma pesquisa utilizando camundongos hipertensos tratados com DEP versus tratamento com solução salina também se observou esse aumento plaquetário (Nemmar A. et. al. 2010). Nosso achado sugere uma resposta da medula óssea, levando a um aumento no estímulo para o aumento da produção de plaquetas. Recentemente, também foi relatado que a exposição ao material particulado MP_{2,5} leva a um aumento rápido e persistente no número de plaquetas (Tamagawa et al., 2008). Nemmar et. al.

também observaram aumento do número de plaquetas e agravamento de eventos trombótico em uma observação in vitro, levando a agregação plaquetária no sangue e a ativação da coagulação intravascular nos níveis de TP e TTPA (Nemmar et. al. 2011; Nemmar et al., 2010).

Está bem estabelecido que os eventos trombóticos representam uma complicação da hipertensão arterial, indicando que a hipercoagulação e o estado protrombótico acompanham a hipertensão, esses eventos podem causar alta morbidade e mortalidade (Yang et al., 2010; Remkova e Remko, 2010). O fibrinogênio é uma glicoproteína sintetizada no fígado, que é a principal fonte de muitos fatores de coagulação, notamos um aumento de níveis de fibrinogênio, o aumento do número de plaquetas e anemia em animais hipertensos expostos ao DE quando comparados aos expostos ao AF, demonstrando que complicações trombóticas causadas por poluentes podem ser mais graves em casos de hipertensão, o sangue mais viscoso, prejudica o débito cardíaco que pode provocar quadros hipertensivos, aumento da força contratilidade cardíaca, disfunção diastólica e sistólica e levar a insuficiência cardíaca congestiva (Ravel R. 1995). Trabalhos utilizando instilação intratraqueal de DEP demonstram que pode ocorrer rápida ativação sistema de formação de trombos, incluindo ativação de plaquetas, sugerindo que o DEP pode aumentar o risco de doenças vasculares isquêmicas (Nemmar A. et. al., 2003). Vários estudos experimentais relataram que a exposição a partículas provocam efeitos protrombóticos na veia da orelha de ratos (Silva et al., 2005), veia femoral e artéria de hamsters (Nemmar et al., 2002, 2003 a, b) e artéria carótida de camundongos (Mutlu et al., 2007). Há dados epidemiológicos que demonstraram a estreita correlação entre altos níveis de fibrinogênio e o risco de isquemia por doenças cardiovasculares, no entanto, os impactos da exposição pulmonar para DEP e /ou componentes de perturbação circulatória de formação de trombos resposta da inflamação pulmonar tem sido pouco descritos. Mutlu et al. (2007) relataram fenômeno pró-

trombótico em camundongos, caracterizados por diminuição no tempo de coagulação marcados por TP e TTPA e aumentos relativamente elevados nos níveis de plaquetas do sangue circulante e fibrinogênio 24 horas após a instilação, tempo de exposição muito inferior do que em nosso estudo. Na verdade, alguns outros estudos experimentais em roedores observaram alterações pró-coagulantes nos níveis de fibrinogênio e proteína C activada, mas apenas em doses de MP iguais ou superiores a 100 µg (Mutlu et al., 2011).

Em nossos estudos observamos a massa ventricular esquerda aumentada em ratos SHR expostos ao DE após 45 dias, quando comparados aos ratos SHR expostos ao AF e aos WKY expostos ao AF e DE. A hipertensão arterial pode levar a uma hipertrofia ventricular esquerda, devido a uma resposta adaptativa miocárdica causada pela sobrecarga de pressão, para reduzir o estresse da parede ventricular, permitindo manter sua capacidade mecânica (Berk et. al., 2007; Kehat and Molkentin J D., 2010). Em resposta ao esforço, o processo de remodelamento se estabelece, para compensar o estresse nas paredes do coração. Esse estresse leva a quebra da homeostase da matriz extracelular tendo como resultado o remodelamento irreversível que pode levar a insuficiência cardíaca (Graham et al., 2008).

A hipertensão é conhecida por promover remodelamento cardíaco adverso, por induzir a hipertrofia concêntrica, hipertrofia excêntrica, disfunção diastólica e sistólica e por fim insuficiência cardíaca (Santos AB et.al. 2014). A hipertrofia concêntrica e disfunção diastólica são tradicionalmente associadas a um pequeno volume diastólico, enquanto o mesmo está associado a um ventrículo dilatado e disfunção (Wilson A. J. et al 2017). A insuficiência cardíaca é uma condição em que o coração é incapaz de bombear sangue suficiente para atender às demandas metabólicas do corpo. A prevalência mundial de insuficiência atingem mais de 23 milhões de pessoas (Roger 2013). Pacientes com insuficiência cardíaca possuem taxa de mortalidade acima de 20% em comparação aos

pacientes com fração de ejeção preservada (MAGGIC 2012). Metade dos pacientes com insuficiência são reinternados depois de 6 meses (Desai e Stevenson 2012). A insuficiência cardíaca pode ser resultado do remodelamento cardíaco, que é o rearranjo progressivo da estrutura do tecido miocárdico e geometria ventricular (Wilson A. J. et al 2017).

A disfunção diastólica é considerada um importante característica da progressão da insuficiência cardíaca, relacionadas à miocardiopatia hipertensiva (Lamb et al.1999). Estudos anteriores mostraram que, em comparação com controle, os SHR de 10 meses exibiram a disfunção (Cingolani et al., 2003) e em 12 meses os corações SHR se tornaram mais rígidos (LeGrice et al., 2012). Já em outro estudo foi analisado a relação com a exposição a poluição do ar, a hipertrofia cardíaca e função ventricular esquerda, usando uma estimativa da exposição baseada na proximidade das principais estradas em uma população de indivíduos multi- étnica livre de doenças, os pacientes que vivem perto de grandes estradas apresentaram um aumento do índice de massa do ventrículo esquerdo (Van Hee et al., 2009), um achado importante é que assim como em nosso estudo, a exposição de PM_{2,5} aumentou o remodelamento cardíaco, hipertrofia de cardiomiócitos e deposição de colágeno. (Van Hee et al., 2010).

O aumento de depósito total de colágeno pode prejudicar tanto a função sistólica, como a diastólica. Em modelos animais, o aumento do colágeno está associado a insuficiência cardíaca diastólica, degradação dos componentes endomisiais e perimisiais do colágeno acompanhada com a dilatação ventricular e insuficiência cardíaca (Iwanaga Y. et al. 2002). Ratos SHR mostraram maior depósito de colágeno tipo I quando comparados com ratos WKY, levando a hipertrofia cardíaca em ratos SHR (Norton, G.R., et al. 1997). O aumento de pressão sistólica e diastólica, causados pela hipertensão arterial, levam ao aumento de tensão e estiramento das células contráteis, dos fibroblastos e da matriz extracelular. Essas variáveis mecânicas podem ativar os mecanismos para o crescimento

celular em cardiomiócitos sobrecarregados (Franchinni, 2001). Em corações de humanos e em modelos experimentais se observa uma poliploidia nos cardiomiócitos, que indica a multiplicação de seu material genético (Vliegen et al., 1995). O número de miofibrilas aumenta significativamente e também a área celular ocupada por organelas e mitocôndrias e retículo, isso para impedir um desequilíbrio entre a capacidade de produção de energia e a massa das microfibrilas (Rabinowitz e Zak, 1975).

Em nosso estudo, os níveis de macrófagos foram mais altos em animais SHR expostos a DE. Estudos têm demonstrado que existe uma relação direta e positiva entre o grau de exposição MP_{2,5} e o número de macrófagos presentes nos pulmões. Os macrófagos encontradas no pulmão, fazem parte da primeira linha de defesa e desempenham um papel importante na resposta celular das vias aéreas após a inalação de MP, eles situam-se em grande parte nas superfícies epiteliais e atuam como uma barreira à matéria inalada fagocitando partículas e processando-as intracelularmente (Kampfrath T. et. al. 2011). Essas células também desempenham um papel no sistema imune secretando citocinas e quimiocinas e recrutando e ativando outras células receptoras. Através da ativação de receptores tipo 1, a angiotensina (Ang) II condiciona lesão hemodinâmica (Papaharalambus C. et. al. 2007) e posterior recrutamento de monócitos e outras células inflamatórias na vasculatura do coração e rim durante a hipertensão arterial (Wenzel P. et. al. 2011).

Após a infiltração nos tecidos, podem se dividir em pelo menos dois fenótipos classicamente descritos, macrófagos M1 ou M2 (Ricardo S. et. al. 2008). Macrófagos M1 induzem a inflamação através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), juntamente com citocinas, incluindo interleucina-1 beta (IL-1 β) e fator-alfa necrose tumoral (TNF- α). Os macrófagos M2 desempenham um papel anti-inflamatório, mediando o reparo tecidual através da secreção de IL-10 e fator de crescimento de transformação beta (TGF- β) (Sica A. et. al. 2012). Várias linhas de evidência indicam que o protótipo M1 macrófagos

e as citocinas TNF- α e IL-1 β , podem desempenhar um papel na homeostase da pressão arterial. Os níveis séricos de ambas citocinas são marcadamente elevadas durante a hipertensão (Go W. et.al. 2004). Além disso, a infusão intravenosa de TNF- α ou a IL-1 β pode desencadear a natriurese e assim aumentar a pressão sanguínea (Shahid M. et. al. 2008). Por outro lado, a deleção genética de TNF- α ou o receptor de IL-1 β alivia a elevação da pressão sanguínea (Sriramula S. et. al. 2008; Zhang J. et. al. 2014; Zhang J. et. al.2016).

Em nosso estudo observamos um aumento de TNF- α nos animais SHR expostos a DE durante 30 e 45 dias. A TNF- α é um potente mediador inflamatório de respostas imunes, o aumento da produção dessa citocina ativada por macrófagos tem sido associada com inflamação pulmonar, estudos demonstram que a exposição ao DEP leva a produção de macrófagos alveolares que induzem a liberação da citocina inflamatória TNF- α (Kafoury R.M., et. al., 2005). Foi demonstrado que as partículas urbanas DEP são um importante componente na liberação significativa de TNF- α , quando instiladas em pulmões de ratos, na corrente sanguínea, o TNF- α tem propriedades pró - oxidativas e estimula geração de ROS no músculo cardíaco de pacientes com insuficiência cardíaca (Eleuteri, E. et. al., 2009). Estudos demonstram que a inalação de DEP após 24 horas pode levar a formação de TNF- α e sua acumulação em grandes quantidades no plasma humano (Tornqvist, H., et. al., 2007), isso altera a expressão de aderência moléculas em células endoteliais, facilitando a transmigração de neutrófilos e alterando a permeabilidade vascular (Forchhammer, L., et. al., 2012).

Uma variedade de tipos de células incluindo macrófagos, células T, células epiteliais de rim e células cardíacas desencadeiam a produção de TNF- α (Kleinbongard P. et. al. 2010). Após secreção, o TNF- α medeia seus efeitos através de um dos dois receptores, TNFR1 e TNFR2 (Bruggeman L. et. al. 2011; Chen C. et. al. 2010). A ativação do receptor, por sua vez, ativa a sinalização múltipla vias, incluindo a proteína quinase ativada por

mitogenio (MAPK), TGF- β , NF- κ B e NADPH oxidase, a ativação desses receptores parece ter diferentes efeitos sobre a pressão arterial (Chen C. et. al. 2010; Castillo A. et. al. 2012; Singh P. et. al. 2013). Contudo, experimentos com animais ilustram que, o TNF- α leva a elevação da pressão aumentando o apetite do sal, a atividade no sistema nervoso central (SNC) e estimular a reabsorção de sódio (Ramseyer V. et. al., 2013; Sriramula S. et. al. 2008). O TNF ocasiona danos aos rins e ao coração em casos de hipertensão (Zhang J. et. al. 2014).

O MP_{2,5} também pode aumentar a secreção da citocina interleucina - 1 β (IL -1 β) (Veranth, J. M., et. al., 2008). Nos ratos SHR de nosso estudo expostos a DE mostraram maiores expressões de IL1- β , essa citocina tem sido descrita como pró-inflamatória e potente mediador de uma ampla gama de doenças sistêmicas humanas (Allantaz et. al, 2007). A secreção de IL-1 β também pode ser considerada como um evento preditivo na doença cardiovascular e respiratória, devido à sua capacidade de induzir a apoptose, inibir a diferenciação de miofibroblastos e reprimir a proliferação de fibroblastos em células de pulmões de ratos (Zhang e Phan, 1999). Estudos evidenciam a exposição ao DEP provoca a elevação de IL1- β , em células epiteliais, após exposição, observou-se maior expressão dessa citocina (Kumar RK et. al., 2014). Em resposta à elevação da pressão arterial, pode ocorrer um aumento da expressão de IL-1 β (Krishnan S. et. al. 2016; Shirasuna K. et. al. 2015), sua a ativação pode ocasionar quadros de hipertensão através de vários mecanismos específicos dos tecidos, ela estimula a liberação de catecolamina e elevação da pressão arterial sistêmica, pode também induzir vasoconstrição na aorta e na vasculatura pulmonar (Shi P. et. al. 2010).

O esgotamento da SOD, sugere estresse oxidativo que pode ser a ligação entre inflamação e hipertensão (Arora et al.,2010; Lee et al., 2011; Touyz e Briones, 2011). Diminuição da SOD também tem sido relatada em pré-hipertensos e hipertensos no Irã

(Amirkhizi et al., 2010). Pode-se notar que o estresse oxidativo pode ser uma causa ou consequência da hipertensão, e pode aumentar a pressão elevação na presença de outros fatores pró-hipertensivos (Touyz e Briones, 2011) e, assim, aumentar o risco de doenças cardiovasculares. Foram adotados diferentes mecanismos para os efeitos adversos à saúde causados pelo DEP. A indução de estresse oxidativo e resposta inflamatória são considerados eventos importantes na saúde causados pelos efeitos da exposição ao MP (Lawal et al., 2015, Montiel-Davalos et al., 2010). O $MP_{2,5}$ e MP_{10} têm sido relatados por induzir estresse oxidativo e apoptose de células (Montiel-Davalos et al., 2010). Os radicais livres gerados pelo MP são os responsáveis pela efeitos inflamatórios observados in vitro e in vivo (MontielDavalos et al., 2010), assim, as doenças cardiovasculares e pulmonares foram atribuídos à sua capacidade de gerar estresse oxidativo (Liu L et al., 2009, Miller et al., 2012).

Em suma, podemos concluir que a exposição aos componentes da exaustão do diesel podem promover inflamação pulmonar e sistêmica, desbalancear o sistema nervoso autonômico e remodelar o miocárdio. Estes fatores poderão promover ou agravar os quadros de hipertensão arterial sistêmica em indivíduos suscetíveis e expostos a poluição urbana. Existem poucos estudos demonstrando os efeitos da exposição crônica aos poluentes do ar, principalmente diesel, em animais e até mesmo em estudos epidemiológicos no enfoque da hipertensão arterial, uma doença cardiovascular crônica de grande repercussão na prática clínica. A população das grandes metrópoles habita em ambientes com alto teor de poluição do ar sem ter condições de proteger-se deste agravo ambiental. Torna-se então de extrema relevância científica e clínica, aprofundar os conhecimentos acerca da associação entre poluentes do ar e os marcadores de risco cardiovasculares envolvidos na hipertensão arterial para a compreensão dos mecanismos que levam ao aumento súbito de mortalidade por esta doença.

7. Conclusão

A exposição aos componentes da exaustão do combustível diesel, foi capaz de causar toxicidade cardiovascular induzindo inflamação pulmonar e sistêmica, desbalanço do sistema nervoso autônomo e remodelamento do miocárdio. Os animais hipertensos apresentaram alterações de maior intensidade comparados aos animais normotensos. Especificamente, a exaustão do combustível diesel promoveu os seguintes efeitos:

1. Inflamação pulmonar com níveis aumentados de macrófagos nos ratos hipertensos e neutrófilos nos ratos normotensos através do lavado broncoalveolar.
2. Inflamação sistêmica com níveis aumentados de hemácias microcíticas, alterações nos fatores de coagulação: aumento dos tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada, diminuição nos valores de fibrinogênio e agregação plaquetária nos animais hipertensos.
3. Desbalanço do sistema nervoso autônomo com redução da variabilidade da frequência cardíaca através da diminuição na modulação parassimpática dos animais hipertensos.
4. Níveis aumentados das citocinas pró-inflamatórias e redução da defesa antioxidante nos animais hipertensos.
5. Remodelamento do miocárdio através de aumento do volume de cardiomiócitos e aumento das fibras colagênicas nos animais hipertensos.

8. Referências bibliográficas

Adar, S. D., Sheppard, L., Vedal, S., Polak, J. F., Sampson, P. D., Diez Roux, A. V., et al. Fine particulate air pollution and the progression of carotid intima-medial thickness: A prospective cohort study from the multi-ethnic study of atherosclerosis and air pollution. *PLoS medicine*, 2013. 10, e1001430.

Allantaz F1, Chaussabel D, Stichweh D, Bennett L, Allman W, Mejias A, Ardura M, Chung W, Smith E, Wise C, Palucka K, Ramilo O, Punaro M, Banchereau J, Pascual V. Blood leukocyte microarrays to diagnose systemic onset juvenile idiopathic arthritis and follow the response to IL-1 blockade. *J Exp Med*. 2007 Sep 3; 204(9):2131-44.

Amirkhizi, F., Siassi, F., Djalali, M., Foroushani, A.R., Assessment of antioxidant enzyme activities in erythrocytes of pre-hypertensive and hypertensive women. 2010. *J. Respir. Med. Sci*. 15, 270–278.

Anselme, F., Lorient, S., Henry, J. P., Dionnet, F., Napoleoni, J. G., Thuillez, C., and Morin, J. P. Inhalation of diluted diesel engine emission impacts heart rate variability and arrhythmia occurrence in a rat model of chronic ischemic heart failure. 2007 *Arch. Toxicol*. 81, 299–307

Araujo, J.A., Nel, A.E., Particulate matter and atherosclerosis: role of particle size, composition and oxidative stress. *Part. Fibre Toxicol*. 2009. 6, 24.

Arora, S., Vaishya, R., Dabla, P.K., Singh, B., NAD (P) H oxidases in coronary artery disease. 2010. *Adv. Clin. Chem*. 50, 65–86.

Ataya, Ali, et al. "Pulmonary arterial hypertension and associated conditions." *Disease-a-Month* 2016.

Atwood D., Wadlund D. L. *ECG Interpretation Using the CRISP Method: A Guide for Nurses*. Vol. 102. 2014.

Baccarelli A, Barretta F, Dou C, et al. Effects of particulate air pollution on blood pressure in a highly exposed population in Beijing, China: a repeated-measure study. *Environ Health*; 2011. 10: 108.

Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest* 2007 p. 117: 568–575, 2007

Berntson GG, Norman GJ, Hawkley LC, Cacioppo JT. Cardiac autonomic balance versus cardiac regulatory capacity. *Psychophysiology*. 2008. 45(4):643-52.

Brito J.M, Belotti L., Toledo AC, Antonangelo L, Silva FS, Débora Alvim DS, Andre PA, Saldiva PHN, Rivero DHRF Acute cardiovascular and inflammatory toxicity induced by inhalation of diesel and biodiesel exhaust particles. *Toxicological Sciences* 2010.

Britton KA, Gaziano JM, Djousse L. Normal systolic blood pressure and risk of heart failure in US male physicians. *Eur J Heart Fail*; 2009. 11: 1129-34.

Bowers EJ, Murray A. Effects on baroreflex sensitivity measurements when different protocols are used to induce regular changes in beat-to-beat intervals and systolic pressure. *Physiol Meas*. 2004. 25(2):523-38.

Brook RD, Sun Z, Brook JR, Zhao X, Ruan Y, Yan J, Mukherjee B, Rao X, Duan F, Sun L, Liang R, Lian H, Zhang S, Fang Q, Gu D, Sun Q, Fan Z, Rajagopalan S Extreme air pollution conditions adversely affect blood pressure and insulin resistance: the air pollution and cardiometabolic disease study. 2016 *Hypertension* 67(1):77–85.

Brook, R. D., & Rajagopalan, S. Particulate matter, air pollution, and blood pressure. *Journal of the American Society of Hypertension*, 3, 332–350. 32. Peters, A. (2009). Air quality and cardiovascular health: Smoke and pollution matter. *Circulation*, 2009. 120, 924–927.

Brook RD, Bard RL, Burnett RT, et al. (2011) Adverse cardiovascular responses to alterations in daily levels of personal and ambient fine particulate matter air pollution. *Circulation* 2008; 118: S1159.

Bruggeman L, Drawz O, Kahoud N, Lin K, Barisoni L, Nelson P. TNFR2 interposes the proliferative and NF-kappaB mediated inflammatory response by podocytes to TNF-alpha. 2011. *Lab Invest* 91:413–425.

Burlew B, Welber KT. Connective tissue and heart. Functional significance and regulatory mechanisms, *Cardiol. Clin*; 2000. 18: 435-42.

Cakmak S, Dales R, Leech J, Liu L. The influence of air pollution on cardiovascular and pulmonary function and exercise capacity: Canadian Health Measures Survey (CHMS). *Environ Res*; 2011. 111(8): 1309-12.

Carll AP, Hazari MS, Perez CM, Krantz QT, King CJ, Winsett DW, Costa DL, Farraj AK. Whole and particle-free diesel exhausts differentially affect cardiac electrophysiology, blood pressure, and autonomic balance in heart failure-prone rats. *Toxicol Sci*. 2012 p. 128(2):490-9.

Carll AP, Hazari MS, Perez CM, Krantz QT, King CJ, Haykal-Coates N, Cascio WE, Costa DL, Farraj AK. An autonomic link between inhaled diesel exhaust and impaired cardiac performance: insight from treadmill and dobutamine challenges in heart failure-prone rats. *Toxicol Sci*. 2013Oct;135(2):425-36.

Castillo A, Islam M, Prieto M, Majid D Tumor necrosis factor-receptor type 1, not type 2, mediates its acute responses in the kidney. 2012 *Am J Physiol Renal Physiol* 302:F1650–F1657.

CETESB <http://ar.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-relatorios/> acesso 02/04/2016 às 7:20.

Chang CC, Hwang JS, Chan CC, Wang PY, Hu TH, Cheng TJ. Effects of concentrated ambient particles on heart rate, blood pressure, and cardiac contractility in spontaneously hypertensive rats. *Inhal Toxicol*. Jun;16(6-7):421-9. 2004.

Cingolani, O. H., X.-P. Yang, M. A. Cavasin, and O. A. Carretero. Increased systolic performance with diastolic dysfunction in adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2003 p.41:249–254.

Coogan PF, White LF, Jerrett M, et al. Air pollution and incidence of hypertension and diabetes mellitus in black women living in Los Angeles. *Circulation*; 2012. 125: 767-72.

Colucci WS, Braunwald E. Pathophysiology of heart failure. In: Braunwald E, Zipes DP, Libby P, editors. *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*. 6th ed. Philadelphia: Saunders; 2001. p. 503-33.

Corda, Stefano, Jane-Lise Samuel, and Lydie Rappaport. "Extracellular matrix and growth factors during heart growth." *Heart failure reviews* 2000. 5.2: 119-130.

Cosselman, K. E., Krishnan, R. M., Oron, A. P., Jansen, K., Peretz, A., Sullivan, J. H., et al. (2012). Blood pressure response to controlled diesel exhaust exposure in human subjects. *Hypertension*, 59, 943–948.

Chhaba, N., Endothelial dysfunction — a predictor of atherosclerosis. *Internet J. Med. Update* 2009. 4, 33–41.

Chen C, Pedraza P, Hao S, Stier C, Ferreri N TNFR1- deficient mice display altered blood pressure and renal responses to ANG II infusion. 2010. *Am J Physiol Renal Physiol* 299:F1141– F1150.

Chen H, Burnett RT, Kwong JC, et al. Spatial association between ambient fine particulate matter and incident hypertension. *Circulation*; 2014. 129(5): 562-9.

Davel, A.P., Lemos, M., Pastro, L.M., Pedro, S.C., André, P.A., Hebeda, C., Farsky, S.H., Saldiva, P.H., Rossoni, L.V., Endothelial dysfunction in the pulmonary artery induced by concentrated fine particulate matter exposure is associated with local but not systemic inflamma. *Toxicology* 2012. 295, 39–46.

Deering-Rice CE, Romero EG, Shapiro D, Huguen RW, Light AR, Yost GS, Veranth JM, Reilly CA. Electrophilic components of diesel exhaust particles (DEP) activate transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1): a probable mechanism of acute pulmonary toxicity for DEP. *Chem Res Toxicol*.2011 p.24(6):950-9.

Desai AS, Stevenson LW. Rehospitalization for heart failure: predict or prevent? *Circulation*. 2012 Jul 24;126(4):501-6.

DiNicolantonio JJ, O'Keefe JH. Hypertension Due to Toxic White Crystals in the Diet: Should We Blame Salt or Sugar? *Prog Cardiovasc Dis*. 2016 Nov - Dec;59(3):219-225. doi: 10.1016/j.pcad.2016.07.004.

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

Dvonch JT, Kannan S, Schulz AJ, Keeler GJ, Mentz G, House J, Benjamin A, Max P, Bard RL, Brook RD Acute effects of ambient particulate matter on blood pressure: differential effects across urban communities. *Hypertension*, 2009. 53(5):853–859.

Drager, Luciano F., et al. "Additive effects of obstructive sleep apnea and hypertension on early markers of carotid atherosclerosis." *Hypertension* 2009. 53.1: 64-69.

Eleuteri E, Magno F, Gnemmi I, Carbone M, Colombo M, La Rocca G, Anzalone R, Tarro Genta F, Zummo G, Di Stefano A, Giannuzzi P. Role of oxidative and nitrosative stress biomarkers in chronic heart failure. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009 Jan 1;14:2230-7.

Fan ZT, Meng Q, Weisel C, Laumbach R, Ohman-Strickland P, Shalat S, Hernandez MZ, Black K. Acute exposure to elevated PM_{2.5} generated by traffic and cardiopulmonary health effects in healthy older adults. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2009. 19:525–533.

Farina F, Lonati E, Brambilla A, Magro RD, Milani C, Botto L, Sancini G, Palestini P, Bulbarelli A. Diesel exhaust particles (DEP) pre-exposure contributes to the anti-oxidant response impairment in hCMEC/D3 during post-oxygen and glucose deprivation damage. *Toxicol Lett*. 2017 Apr 8;274:1-7.

Fiordelisi A. Piscitelli P. Trimarco B. Coscioni E. Laccarino G Sorriento D. "The mechanisms of air pollution and particulate matter in cardiovascular diseases" *Heart Fail Rev* DOI 2017. 10.1007/s10741-017-9606-7.

Forchhammer L, Møller P, Riddervold IS, Bønløkke J, Massling A, Sigsgaard T, Loft S. Controlled human wood smoke exposure: oxidative stress, inflammation and microvascular function. *Part Fibre Toxicol*. 2012 Mar 27;9:7.

Frampton MW. Systemic and cardiovascular effects of airway injury and inflammation: ultrafine particle exposure in humans. *Environ Health Perspect*. 2001 Aug;109 Suppl 4:529-32.

Ferreira C., Póvoa R. *Cardiologia Clínica*. 1ª edição, São Paulo. Atheneu, 2009, 1569 p.

Franchini, Kleber G. "Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares." *Rev Bras Hipertens* 8.1 (2001): 125-42.

Friedmann, A.; Grindler j.; Oliveira, C. *Diagnóstico diferencial em ECG*. Barueri: Manole 2007.

Galhardo, Milene Sanches. *Distribuição diferencial e remodelamento dos elementos fibrilares da matriz extracelular no coração de ratos espontaneamente hipertensos*. Diss. Universidade de São Paulo, 2012.

García-Redondo, Ana B., et al. "c-Src, ERK1/2 and Rho kinase mediate hydrogen peroxide-induced vascular contraction in hypertension: role of TXA2, NAD (P) H oxidase and mitochondria." *Journal of hypertension*; 2015. 33.1: 77-87.

Garg S, de Lemos JA, Ayers C, et al. Association of a 4-tiered classification of LV hypertrophy with adverse CV outcomes in the general population. *J Am Coll Cardiol Img*; 2015. 8:1034–1041.

Go YM, Orr M, Jones DP. Increased nuclear thioredoxin-1 potentiates cadmium-induced cytotoxicity. *Toxicol Sci*. 2013. Jan; 131(1):84-94.

Go W, Liu X, Roti M, Liu F, Ho S. NFAT5/TonEBP mutant mice define osmotic stress as a critical feature of the lymphoid microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 p.101:10673– 10678.

Gold, Diane R., et al. "Ambient pollution and heart rate variability." *Circulation* 101.11 2013. 1267-1273.

Gosse P, Cremer A, Vircoulon M, et al. Prognostic value of the extent of left ventricular hypertrophy and its evolution in the hypertensive patient. *J Hypertens*. 2012. 30:2403–2409.

Graham HK, Horn M, Trafford AW. Extracellular matrix profiles in the progression to heart failure. European Young Symposium Keynote Lecture- Bratislava Ata Physiol (Ofx). 2008; 194 (1): 3-21.

Gupta, V., Sachdeva, S., Khan, A.S., Haque, S.F. Endothelial dysfunction and inflammation in different stages of essential hypertension. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl*. 2011. 22, 97–103.

Hawley, B., L'Orange, C., Olsen, D. B., Marchese, A. J., & Volckens, J. Oxidative stress and aromatic hydrocarbon response of human bronchial epithelial cells exposed to petro- or biodiesel exhaust treated with a diesel particulate filter. *Toxicological Sciences*; 2014.

Hazari, Mehdi S., et al. "TRPA1 and sympathetic activation contribute to increased risk of triggered cardiac arrhythmias in hypertensive rats exposed to diesel exhaust." *Environmental health perspectives* 2011. 119.7: 951.41, 505–514.

He F, Shaffer ML, Li X, Rodriguez-Colon S, Wolbrette DL, Williams R, Cascio WE, Liao D. Individual-level PM_{2.5} exposure and the time course of impaired heart rate variability: The APACR Study. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2011. 21:65–73.

Hernanz R, Briones AM, Salaices M, Alonso MJ. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 2014. Jan; 126(2):111-21.

Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, et al. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013. 62 (25_S): D42–D50.

Hoek G, Brunekreef B, Goldbohm S, Fischer P, van den Brandt PA. Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: a cohort study. *Lancet*; 2002. 360 (9341): 1203-9.

Hoek G, Krishnan RM, Beelen R, Peters A, Ostro B, Brunekreef B, Kaufman JD. Long-term air pollution exposure and cardio- respiratory mortality: a review. *Environ Health*, 2013. 12:43.

Hoffmann B, Luttmann-Gibson H, Cohen A, et al. Opposing effects of particle pollution, ozone, and ambient temperature on arterial blood pressure. *Environ Health Perspect*; 2012. 120: 241-6.

Huang, C. H., Lin, L. Y., Tsai, M. S., Hsu, C. Y., Chen, H. W., Wang, T. D., Chang, W. T., Cheng, T. J., and Chen, W. J. Acute cardiac dysfunction after short-term diesel exhaust particles exposure. *2010 Toxicol. Lett.* 192, 349–355.

Iwanaga, Y., et al. Excessive activation of matrix metalloproteinases coincides with left ventricular remodeling during transition from hypertrophy to heart failure in hypertensive rats. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; 39:1384–1391.

James PA, Oparil S, Carter BL, et al. Evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*; 2014. 311(5): 507-20.

Kalaitzidis RG, Bakris GL. Prehypertension: is it relevant for nephrologists? *Kidney Int*; 2010. 77: 194-200.

Kamal AS, Rohr AC, Mukherjee B, Morishita M, Keeler GJ, Harkema JR, Wagner JG. PM_{2.5}-induced changes in cardiac function of hypertensive rats depend on wind direction and specific sources in Steubenville, Ohio. *Inhal Toxicol*. Jun;23(7):417-30. 2011.

Kampfrath T, Maisseyeu A, Ying ZK, Shah Z, Deiuliis JA, Xu XH, Kherada N, Brook RD, Reddy KM, Padture NP, Parthasarathy S, Chen LC, Moffatt-Bruce S, Sun QH, Morawietz H, Rajagopalan S. Chronic fine particulate matter exposure induces systemic vascular dysfunction via NADPH oxidase and TLR4 pathways. *Circ Res* 2011. 108(6):716–U400. doi:10.1161/Circresaha.110.237560.

Kaplan NM, Victor RG. Hypertension in the population at large. In: Kaplan's Clinical Hypertension. 10th ed, 2010. Philadelphia: Wolter's Kluwer.

Kafoury M. R. and Madden M.C. (2005) Diesel Exhaust Particles Induce the Over expression of Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) Gene in Alveolar Macrophages and Failed to Induce Apoptosis through Activation of Nuclear Factor- κ B (NF- κ B). *Int. J. Environ. Res. Public Health* p. 2(1), 107-113.

Kehat I, Molkentin JD. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiologicval stimulation. *Circulation* 2010 p.122: 2727–2735.

Kim JH, Choi MG, Park MK, Seo YR. Predictive and Prognostic Biomarkers of Respiratory Diseases due to Particulate Matter Exposure Review *JOURNAL OF CANCER PREVENTION* Vol. 22, No. 1, 2017.

Krishnan S, Dowling J, Ling Y, Diep H, Chan C, Ferens D, Kett M, Pinar A, Samuel C, Vinh A, Arumugam T, Hewitson T, KempHarper B, Robertson A, Cooper M, Latz E, Mansell A, Sobey C, Drummond G (2016) Inflammasome activity is essential for one kidney/deoxycorticosterone acetate/salt-induced hypertension in mice. *Br J Pharmacol* 173:752–765.

Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R. TNFalpha in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. 2010. *Pharmacol Ther* 127:295–314. 2010.

Labranche N, Khattabi CE, Berkenboom G, Pochet S. Effects of diesel exhaust particles on macrophage polarization. *Hum Exp Toxicol*. 2017 Apr;36(4):412-420.

Lawal, A., Zhang, M., Dittmar, M., Lulla, A., Araujo, J.A., Heme oxygenase-1 protects endothelial cells from the toxicity of air 2 pollutant chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2016. 284, 281–291.

Lerssel, S.H.V., Jorens, P.G., Craenenbroeck, E.M.V., Conraads, V.M., The endothelium, a protagonist in the pathophysiology of critical illness: focus on cellular markers. *BioMed Res. Int*. 2014, 985813.

Liao G, Chen R, He J. Prophylactic use of noninvasive positive pressure ventilation in post-thoracic surgery patients: A prospective randomized control study. *J Thorac Dis.* 2010. :205-9.

Li, R., Ning, Z., Cui, J., Khalsa, B., Ai, L., Takabe, W., Beebe, T., Majumdar, R., Sioutas, C., Hsiai, T., Ultrafine particles from diesel engines induce vascular oxidative stress via JNK activation. *Free Radic. Biol. Med.* 2009, 46, 775–782.

Liu L, Ruddy T, Dalipaj M, et al. Effects of indoor, outdoor, and personal exposure to particulate air pollution on cardiovascular physiology and systemic mediators in seniors. *J Occup Environ Med*; 2009, 51(9): 1088-98.

Lucini D, Mela G, Malliani A, Pagani M. 'Impairment in Cardiac Autonomic Regulation Preceding Arterial Hypertension in Humans Insights From Spectral Analysis of Beat-by-Beat Cardiovascular Variability' 2002.

Lucking, A.J., Lundback, M., Barath, S.L., Mills, N.L., Sidhu, M.K., Langrish, J.P., Boon, N.A., Pourazar, J., Badimon, J.J., Gerlofs-Nijland, M.E., Cassee, F.R., Boman, C., Donaldson, K., Sandstrom, T., Newby, D.E., Blomberg, A.B., 2011. Particle traps prevent adverse vascular and prothrombotic effects of diesel engine exhaust inhalation in men. *Circulation* 123, 1721–1728.

Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014 Dec 5;224:164-75.

Knol, A.B., de Hartog, J.J., Boogaard, H., Slottje, P., van der Sluijs, J.P., Lebret, E., Cassee, F.R., Wardekker, J.A., Ayres, J.G., Borm, P.J., Brunekreef, B., Donaldson, K., Forastiere, F., Holgate, S.T., Kreyling, W.G., Nemery, B., Pekkanen, J., Stone, V., Wichmann, H.E., Hoek, G., Expert elicitation on ultrafine particles: likelihood of health effects and causal pathways. Part. *Fibre Toxicol.* 2009. 6, 19–34.

Kumar RK1, Shadie AM, Bucknall MP, Rutledge H, Garthwaite L, Herbert C, Halliburton B, Parsons KS, Wark PA. Differential injurious effects of ambient and traffic-derived particulate matter on airway epithelial cells. *Respirology.* 2015 Jan;20(1):73-9. doi: 10.1111/resp.12381.

Kuñzli, N., Jerrett, M., Garcia-Esteban, R., Basagaña, X., Beckermann, B., Gilliland, F., et al. Ambient air pollution and the progression of atherosclerosis in adults. *PLoS One*, 2010. 5, 1–10.

Lamb, H. J., H. P. Beyerbach, A. van der Laarse, B. C. Stoel, J. Doornbos, E. E. van der Wall, et al. Diastolic dysfunction in hypertensive heart disease is associated with altered myocardial metabolism. *Circulation* 1999 p.99:2261–2267.

Lawal, A., Zhang, M., Dittmar, M., Lulla, A., Araujo, J.A.,. Heme oxygenase-1 protects endothelial cells from the toxicity of air 2 pollutant chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2015 284, 281–291.

LeGrice, I. J., A. J. Pope, G. B. Sands, G. Whalley, R. N. Doughty, and B. H. Smaill. Progression of myocardial remodeling and mechanical dysfunction in the spontaneously hypertensive rat. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2012 p.303: H1353–H1365.

Li N, Nel AE. The cellular impacts of diesel exhaust particles: beyond inflammation and death. *Eur Respir J.* 2006; 27: 667–678.

Liang RM, Badano LP, Mor-Avi V, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr.* 2015. 28:1–39.

Lovic D, Erdine S, Catakoğlu AB. How to estimate left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2014; 14:389–95.

Lucking, A. J., Lundbäck, M., Barath, S. L., Mills, N. L., Sidhu, M. K., Langrish, J. P., Boon, N. A., Pourazar, J., Badimon, J. J., Gerlofs-Nijland, M. E., et al. Particle traps prevent adverse vascular and prothrombotic effects of diesel engine exhaust inhalation in men. 2011 *Circulation* 123, 1721–1728.

Lushchak, Volodymyr I. "Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification." *Chemico-biological interactions* 2014. p.224164-175.

MacKinnon S, Gevirtz R, McCraty R, Brown M. Utilizing heartbeat evoked potentials to identify cardiac regulation of vagal afferents during emotion and resonant breathing. *Appl Psychophysiol Biofeedback.* 2013. p. 38(4):241-55.

Malliani A. Association of heart rate variability components with physiologicalregulatory mechanisms. In: Malik M, Camm AJ, editors. *Heart RateVariability*. Armonk NY: Futura Publishing Company, 1995. Inc;;173-188.

Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, et al. (2013) ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial

Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2013; 34(28): 2159-219.

Medina-Ramon, M., Goldberg, R., Melly, S., Mittleman, M. A., & Schwartz, J. Residential exposure to traffic-related air pollution and survival after heart failure. *Environmental Health Perspectives*, 2008. p. 116, 481–485

Meng, Q., Richmond-Bryant, J., Lu, S.-E., Buckley, B., Welsh, W. J., Whitsel, E. A., et al. Cardiovascular outcomes and the physical and chemical properties of metal ions found in particulate matter air pollution: A QICAR Study. *Environmental Health Perspectives*, 2013. p. 121, 558–564.

Meta-analysis Global Group in Chronic Heart Failure (MAGGIC). The survival of patients with heart failure with preserved or reduced left ventricular ejection fraction: an individual patient data meta-analysis. *Eur. Heart J.* 2012 p.33:1750–1757.

McCraty R, Atkinson M, Tomasino D, Bradley RT. The coherent heart: heartbrain interactions, psychophysiological coherence, and the emergence of system-wide order. Boulder Creek, CA: Institute of Heartmath 2009.

Miller MR, Shaw CA, Langrish JP. From particles to patients: oxidative stress and the cardiovascular effects of air pollution. *Future Cardiol.* 2012; 8(4):577-602.

Miller, M.R., McLean, S.G., Duffin, R., Lawal, A.O., Araujo, J.A., Shaw, C.A., Mills, N.L., Donaldson, K., Newby, D.E., Hadoke, P.W.F., Diesel exhaust particulate increases the size and complexity of lesions in atherosclerotic mice. *Part. Fibre Toxicol.* 2013. p. 10, 61.

Mirvis DM, Goldberger AL. Electrocardiography. In: Mann DL, Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E, eds. *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 10th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2015 p.114-152.

Mochin MT et. al. Hyperglycemia and redox status regulate RUNX2 DNA-binding and an angiogenic phenotype in endothelial cells. *Microvasc Res.* 2015 Jan; 97:55-64.

Moller, P., Jensen, D. M., Christophersen, D. V., Kermanizadeh, A., Jacobsen, N. R., Hemmingsen, J. G., et al. Measurement of oxidative damage to DNA in nanomaterial exposed cells and animals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*; 2015 p. 56, 97–110.

Montes, Gregorio S. "Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems." *Cell biology international* 1996 p. 20.1: 15-27.

Montiel-Davalos, A., Ibarra-Sanchez Mde, J., Ventura-Gallegos, J.L., Alfaro-Moreno, E., Lopez-Marure, R., Oxidative stress and apoptosis are induced in human endothelial cells exposed to urban particulate matter. *Toxicol. in Vitro* 2010 p. 24, 135–141.

Montecucco, F., Pende, A., Quercioli, A., Mach, F., Inflammation in the pathophysiology of essential hypertension. *J. Nephrol.* 2011 p. 24, 23–34

Mutlu H, Leppo J. Coronary steal and ST elevation during dipyridamole stress testing leading to coronary artery bypass grafting. *J Nucl Cardiol.* 2011 p.14(6):892-7.

Mordukhovich I, Kloog I, Coull B, Koutrakis P, Vokonas P, Schwartz J Association between particulate air pollution and QT interval duration in an elderly cohort. 2016 *Epidemiology* 27(2):284–290.

Mustafic H, Jabre P, Caussin C, Murad MH, Escolano S, Tafflet M, Perier MC, Marijon E, Vernerey D, Empana JP, Jouven X Main air pollutants and myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. 2012. *JAMA* 307(7):713–721. doi:10.1001/jama.2012.126

Nemmar, A., Al Salam, S., Zia, S., Dhanasekaran, S., Shudadevi, M., Ali, B.H., Time-course effects of systemically administered diesel exhaust particles in rats. *Toxicol. Lett.* 2010 p. 194, 58–65.

Nemmar, A., Ziaa S., Subramaniyana D., Fahima M A., Ali B H., Exacerbation of thrombotic events by diesel exhaust particle in mouse model of hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011.

Nemmar, A., Hoylaerts, M., Hoet, P.H., Vermynen, J., Nemery, B., Size effect of intratracheally instilled ultrafine particles on pulmonary inflammation and vascular thrombosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003a p.186, 38–45.

Nemmar, A., Nemery, B., Hoet, P.H.M., Vermynen, J., Hoylaerts, M.F., 2003b. Pulmonary inflammation and thrombogenicity caused by diesel particles in hamsters – role of histamine. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168, 1366–1372.

Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation.* 2002; 105(4):411-4.

Nguyen DC, Tanaka S, Nishino H, Manabe K, Ito S. 3-D solar cells by electrochemical-deposited layer as extremely-thin absorber and hole conducting layer on nanocrystalline TiO₂ electrode. *Nanoscale Res Lett.* 2013 Jan 3;8(1):8

Norton, G.R., et al. Myocardial stiffness is attributed to alterations in cross-linked collagen rather than total collagen or phenotypes in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 1997; 96:1991–1998.

Okayama Y, Kuwahara M, Suzuki AK, Tsubone H Role of reactive oxygen species on diesel exhaust particle-induced cytotoxicity in rat cardiac myocytes. *Journal of toxicology and environmental health* 2006. Part A 69(18):1699–1710.

Opie, Lionel H., and Michael N. Sack. "Enhanced Angiotensin II Activity in Heart Failure: Reevaluation of the Counterregulatory Hypothesis of Receptor Subtypes." *Circulation research* 2001 p. 88.7: 654-658.

Ophthof T. 2000. The normal range and determinants of the intrinsic heart rate in man. *Cardiovasc Res*. 45(1):173-6.

Osto, E., Cosentino, F., The role of oxidative stress in endothelial dysfunction and vascular inflammation. In: Ignarro, L.J. (Ed.), *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*, second ed. Academic Press, London, 2010 pp. 705–754.

Overacker J, Pfau JC. Cytokine Production Modified by System X(c)- After PM10 and Asbestos Exposure. *J Young Investig*. 2012 Jun 1;23(6):34-39.

Palatini P. Elevated heart rate as a predictor of increased cardiovascular morbidity. *J Hypertens Suppl*. 2009 p.17(3): S3-10.

Papaharalambus C, Griending K Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends Cardiovasc Med* 2007 p.17:48–54.

Peretz, A., Kaufman, J. D., Trenga, C. A., Allen, J., Carlsten, C., Aulet, M. R., Adar, S. D., and Sullivan, J. H. Effects of diesel exhaust inhalation on heart rate variability in human volunteers. 2008. *Environ. Res*. 107, 178–184

Pines KL, Perera GA. Sodium chloride restriction in hypertensive vascular disease. *Med Clin North Am*. 1949 p. 33:713-725.

Pope CA 3rd, Muhlestein JB, May HT, Renlund DG, Anderson JL, Horne BD Ischemic heart disease events triggered by short-term exposure to fine particulate air pollution. 2006. *Circulation* 114(23):2443–2448.

Popovicheva, O.B., Kireeva, E.D., Steiner, S., Rothen-Rutishauser, B., Persiantseva, N.M., Timofeev, M.A., Shonija, N.K., Comte, P., Czerwinski, J., Microstructure and chemical composition of diesel and biodiesel particle exhaust. *Aerosol Air Qual. Res*. 2014 p. 14, 1392–1401.

Porth, Carol Mattson, and Glenn Matfin. *Fisiopatologia*. Guanabara Koogan Editora 2010.

Rabinowitz, Murray, and Radovan Zak. "Mitochondria and cardiac hypertrophy." *Circulation Research* 36.3 (1975): 367-376.

Ramseyer V, Garvin J Tumor necrosis factor- α : regulation of renal function and blood pressure. 2013. *Am J Physiol Renal Physiol* 304:F1231–F1242.

Ravel, R. Clinical laboratory medicine. 6. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc; 1995.

Regoli F, Giuliani ME, Benedetti M, Arukwe A Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: a comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. 2011. *Aquat Toxicol* 105:56–66

Remkova, A., Remko, M., The role of renin–angiotensin system in prothrombotic state in essential hypertension. *Physiol. Res.* 2010 p.59, 13–23.

Ricardo S, Van Goor H, Eddy A Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest* 208 p.118:3522–3530.

Ribeiro, A. B. & Plavinilk F. L. Atualização em Hipertensão Arterial Clínica, Diagnóstica e Terapêutica. 2ª Edição. São Paulo: Atheneu. 2007 p. 1567 p.

Rivera M, Basagaña X, Aguilera I, et al. Association between long-term exposure to traffic-related air pollution and subclinical atherosclerosis: the REGICOR study. *Environ Health Perspect*; 2013 p. 121:223–30.

Rivero DH Alterações eletrocardiográficas, hematológicas e histológicas induzidas pelo material particulado fino da cidade de São Paulo. 2005.

Rivero DH, Soares SR, Lorenzi-Filho G, Saiki M, Godleski JJ, Antonangelo L, Dolhnikoff M, Saldiva PH. Acute cardiopulmonary alterations induced by fine articulate matter of Sao Paulo, Brazil. *Toxicol Sci*; 2005 p. 85(2): 898-905.

Rivero DH, Lorenzi-Filho G, Pazetti R, Jatene FB, Saldiva PH. Effects of bronchial transection and reanastomosis on mucociliary system. 2001. *Chest* 119 (5):1510-5.

Robbins & Cotran. Patologia: Bases patológicas das doenças. 8ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 1458 p.

Roger, V. L. Epidemiology of heart failure. *Circ. Res.* 2013 p. 113:646–659.

Rollin M, Jaulim A1, Vaz F1, Sandhu G, Wood S2, Birchall M, Dawas K. Caustic ingestion injury of the upper aerodigestive tract in adults. *Ann R Coll Surg Engl.* 2015 May;97(4):304-7. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* November 2015, Vol.56, 7058-7066.

Ross M H., Pawlina W. Histologia, 6ª edição, São Paulo, Guanabara, 2012; 322-330.

Rohr AC, Kamal A, Morishita M, Mukherjee B, Keeler GJ, Harkema JR, Wagner JG. Altered heart rate variability in spontaneously hypertensive rats is associated with specific particulate matter components in Detroit, Michigan. *Environ Health Perspect*; 2011 p. 119(4):474-80.

Sacks JD, Stanek LW, Luben TJ, Johns DO, Buckley BJ, Brown JS, Ross M "Particulate matter-induced health effects: who is susceptible? *Environ Health Perspect*" 2011 p.466-54.

Schlesinger RB The interaction of inhaled toxicants with respiratory tract clearance mechanisms.1990 *Crit Rev Toxicol* 20(4): 257–286.

Samoli, E., et al. "Short-term effects of nitrogen dioxide on mortality: an analysis within the APHEA project." *European Respiratory Journal* 2006 p. 27.6: 1129-1138.

Sanches, P. C., Moffa, P. J. Eletrocardiograma uma abordagem didática, 1 ed. São Paulo: Roca 2010.

Santos AB, Kraigher-Krainer E, Gupta DK, Claggett B, Zile MR, Pieske B, Voors AA, Lefkowitz M, Bransford T, Shi V, Packer M, McMurray JJ, Shah AM, Solomon SD; PARAMOUNT Investigators. Impaired left atrial function in heart failure with preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail*.2014 p.16(10):1096-103.

Segerstrom SC, Nes LS. Heart rate variability reflects self-regulatory strength, effort, and fatigue. *Psychol Sci*.2007 p. 18(3):275-81.

Singh JP, Larson MG, Tsuji H, Evans JC, O'Donnell CJ, Levy D. Reduced heart rate variability and new-onset hypertension. *Hypertension* 1998; 32:293e7.

Shahid M, Francis J, Majid D Tumor necrosis factor- induces renal vasoconstriction as well as natriuresis in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008 p. 295: F1836–F1844.

Shaffer F, McCraty R, Zerr CL. A healthy heart is not a metronome: an integrative review of the heart's anatomy and heart rate variability. *Front Psychol*. 2014 p. 5:1040. 4.

Shi P, Diez-Freire C, Jun J, Qi Y, Katovich M, Li Q, Sriramula S, Francis J, Sumners C, Raizada M (2010) Brain microglial cytokines in neurogenic hypertension. *Hypertension* 56:297–303.

Sica A, Mantovani A Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012 p.122:787–795.

Sørensen M, Hoffmann B, Hvidberg M, et al. Long-term exposure to traffic-related air pollution associated with blood pressure and self-reported hypertension in a Danish cohort. *Environ Health Perspect*; 2012 p.120: 418-24.

Spiegelberg BD. G Protein coupled-receptor signaling and reversible lysine acetylation. *J Recept Signal Transduct Res*. Oct; 2013 p. 33(5):261-6.

Sriramula S, Haque M, Majid D, Francis J. Involvement of tumor necrosis factor-alpha in angiotensin II-mediated effects of salt appetite, hypertension, and cardiac hypertrophy. *Hypertension* 2008 p. 51:1345–1351.

Sun, Q., Hong, X., & Wold, L. E. Cardiovascular effects of ambient particulate air pollution exposure. *Circulation*, 2010 p.121, 2755–2765.

Suh HH, Zanobetti A. Exposure error masks the relationship between traffic-related air pollution and heart rate variability. 2010 *Med* .52(11):1138.

Tamagawa E, Bai N, Morimoto K, Gray C, Mui T, Yatera K, Zhang X, Xing L, Li Y, Laher I, Sin DD, Man SF, van Eeden SF. Particulate matter exposure induces persistent lung inflammation and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.2008 p. 295(1):L79-85.

Tomašek I, Horwell CJ, Damby DE, Barošová H, Geers C, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B, Clift MJ. Combined exposure of diesel exhaust particles and respirable Soufrière Hills volcanic ash causes a (pro-)inflammatory response in an in vitro multicellular epithelial tissue barrier model. *Part Fibre Toxicol*. 2016 Dec 12;13(1):67.

Task Force of the European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology. Guidelines – Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Eur Heart J*. 1996;7:354-81

Tobwala, S., Zhang, X., Zheng, Y., Wang, H., Banks, W.A., Ercal, N., Disruption of the integrity and function of brain microvascular endothelial cells in culture by exposure to diesel engine exhaust particles. *Toxicol*. 2013 *Lett*. 220, 1–7.

Toda, N., & Okamura, T. Obesity impairs vasodilatation and blood flow increase mediated by endothelial nitric oxide: An overview. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2013 p. 53, 1228–1239.

Tofler GH, Muller JE Triggering of acute cardiovascular disease and potential preventive strategies. 2006 *Circulation* 114(17): 1863–1872

Touyz, R.M., Briones, A.M., Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens. Res*. 2011 p. 34, 5–14.

Törnqvist H, Mills NL, Gonzalez M, Miller MR, Robinson SD, Megson IL, Macnee W, Donaldson K, Söderberg S, Newby DE, Sandström T, Blomberg A. Persistent endothelial dysfunction in humans after diesel exhaust inhalation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Aug 15;176(4):395-400.

Tseng, C.Y., Wang, J.S., Chang, Y.J., Chang, J.F., Chao, M.W., Exposure to high-dose diesel exhaust particles induces intracellular oxidative stress and causes endothelial apoptosis in cultured in vitro capillary tube cells. *Cardiovasc. Toxicol*. 2015 p.15, 345–354.

Upadhyay S, Stoeger T, Harder V, Thomas RF, Schladweiler MC, Semmler-Behnke M, Takenaka S, Karg E, Reitmeir P, Bader M, Stampfl A, Kodavanti UP, Schulz H. Exposure to ultrafine carbon particles at levels below detectable pulmonary inflammation affects cardiovascular performance in spontaneously hypertensive rats. *Part Fibre Toxicol*. Dec 4;5:19, 2008.

Ushio-Fukai M. Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Jun;11 (6):1289-99.

Urch, B., Silverman, F., Corey, P., Brook, J.R., Lukic, K.Z., Rajagopalan, S., Brook, R.D., Acute blood pressure responses in healthy adults during controlled air pollution exposures. *Environ. Health Perspect*. 2005 p.113, 1052–1055.

Utell MJ, Frampton MW, Zareba W, Devlin RB, Cascio WE. Cardiovascular effects associated with air pollution: potential mechanisms and methods of testing. *Inhal Toxicol*. 2002 p.1231-47.

Uzoigwe, J. C., Prum, T., Bresnahan, E., & Garelnabi, M. The emerging role of outdoor and indoor air pollution in cardiovascular disease. *North American Journal of Medical Sciences*, 2013 p. 5, 445–453

Van den Hoogen PC, Feskens EJ, Nagelkerke NJ, Menotti A, Nissinen A, Kromhout D. The relation between blood pressure and mortality due to coronary heart disease among men in different parts of the world. Seven Countries Study Research Group. *N Engl J Med*; 2000 p. 342:1–8.

Van Hee VC, Adar SD, Szpiro AA, Barr RG, Bluemke DA, Diez Roux AV, et al. Exposure to traffic and left ventricular mass and function: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 p.179:827–34.

Van Hee VC, Adar SD, Szpiro AA, Barr RG, Diez Roux A, Bluemke DA, Sheppard L, Gill EA, Bahrami H, Wassel C, Sale MM, Siscovick DS, Rotter JI, Rich SS, Kaufman JD.

Common genetic variation, residential proximity to traffic exposure, and left ventricular mass: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Environ Health Perspect* 2010 p.118(7):962-9.

Vasan RS, Larson MG, Benjamin EJ, Evans JC, Reiss CK, Levy D. Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction: prevalence and mortality in a populationbased cohort. *J Am Coll Cardiol*; 1999 p.33:1948–1955.

Veranth JM1, Cutler NS, Kaser EG, Reilly CA, Yost GS. Effects of cell type and culture media on Interleukin-6 secretion in response to environmental particles. *Toxicol In Vitro*. 2008 Mar;22(2):498-509.

Vieira RP, Toledo AC, Silva LB, Almeida FM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Santos AB, Rivero DH, Hizume DC, Lopes FD, Olivo CR, Castro-Faria-Neto HC, Martins MA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Anti-inflammatory effects of aerobic exercise in mice exposed to air pollution. *Med Sci Sports Exerc*. 2012 Jul;44 (7):1227-34.

Vliegen HW, Euderink F, Bruscheke AV, van der Laarse A, Cornelisse CJ, Polyploidy of myocyte nuclei in pressure-overloaded human hearts: a flow cytometric study in left and right ventricular myocardium. *Am J Cardiovas Pathol*. 1995; 5: 2731-42

Wagner JG, Kamal AS, Morishita M, Dvonch JT, Harkema JR, Rohr AC PM2.5-induced cardiovascular dysregulation in rats is associated with elemental carbon and temperature-resolved carbon subfractions. *Part Fibre Toxicol*. May 22;11:25, 2014.

Wang G, Jiang R, Zhao Z, Song W. Effects of ozone and fine particulate matter (PM(2.5)) on rat system inflammation and cardiac function. *Toxicol Lett*. Feb 13;217(1):23-33, 2013.

Wang T, Garcia JG, Zhang W. Epigenetic Regulation in Particulate Matter-Mediated Cardiopulmonary Toxicities: A Systems Biology Perspective. *Curr Pharmacogenomics Person Med*; 2012 p. 10(4): 314-321.

Wauters A, Dreyfuss C, Pochet S, et al. Acute exposure to diesel exhaust impairs nitric oxide-mediated endothelial vasomotor function by increasing endothelial oxidative stress. *Hypertension*; 2013 p. 62:352–8.

Welsh, Eric A., et al. "The genome of Cyanothece 51142, a unicellular diazotrophic cyanobacterium important in the marine nitrogen cycle." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008 p.105.39: 15094-15099.

Wenzel P, Knorr M, Kossmann S, Stratmann J, Hausding M, Schuhmacher S, Karbach S, Schwenk M, Yogev N, Schulz E et. al. Lysozyme M-positive monocytes mediate

angiotensin II-induced arterial hypertension and vascular dysfunction. *Circulation* 2011 p. 124:1370–1381.

Wilson A. J., Wang V Y., Sands G B., Young A A., Nash M P. LeGrice I J., “Increased cardiac work provides a link between systemic hypertension and heart failure” 2017.

Wilker, E. H., Mittleman, M. A., Coull, B. A., Gryparis, A., Bots, M. L., Schwartz, J., et al. Long-term exposure to black carbon and carotid intima-media thickness: The normative aging study. *Environmental Health Perspectives*, 2013 p. 121, 1061–1067.

Wold LE, Ying Z, Hutchinson KR, Velten M, Gorr MW, Velten C, Youtz DJ, Wang A, Lucchesi PA, Sun Q, Rajagopalan S Cardiovascular remodeling in response to long-term exposure to fine particulate matter air pollution. 2012 *Circ Heart Fail* 5(4):452–461.

Yan, Y. H., Huang, C. H., Chen, W. J., Wu, M. F., and Cheng, T. J. Effects of diesel exhaust particles on left ventricular function in isoproterenol-induced myocardial injury and healthy rats. *Inhal. 2008 Toxicol.* 20, 199–203.

Yang, P., Liu, Y.F., Yang, L., Wei, Q., Zeng, H., Mechanism and clinical significance of the prothrombotic state in patients with essential hypertension. *Clin. Cardiol.* 2010 p.33, E81–E86.

Ying Z, Yue P, Xu X, et al. Air pollution and cardiac remodeling: a role for RhoA/Rho-kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009a; 296(5): H1540-50.

Ying Z, Kampfrath T, Thurston G, et al. Ambient particulates alter vascular function through induction of reactive oxygen and nitrogen species. *Toxicol Sci* 2009b; 111(1): 80-8.

Zhang J, Patel M, Griffiths R, Mao A, Song Y, Karlovich N, Sparks M, Jin H, Wu M, Lin E, Crowley S. Tumor necrosis factor- α produced in the kidney contributes to angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension* 2014 p. 64:1275–1281.

Zhang J, Rudemiller N, Patel M, Karlovich N, Wu M, McDonough A, Griffiths R, Sparks M, Jeffs A, Crowley S. Interleukin-1 receptor activation potentiates salt reabsorption in angiotensin II-induced hypertension via the NKCC2 Co-transporter in the nephron. *Cell Metab* 2016 p. 23:360–368.

Zuo L, Youtz DJ, Wold LE (2011) Particulate matter exposure exacerbates high glucose-induced cardiomyocyte dysfunction through ROS generation. *PLoS One* 6(8): e23116.