

**Daniella Harumy Binoki**

**Alterações cardiopulmonares induzidas em ratos saudáveis  
após a instilação nasal subcrônica de suspensão aquosa de  
material particulado fino em concentração ambiental**

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

Programa de Patologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dolores Helena Rodriguez  
Ferreira Rivero

São Paulo  
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Binoki, Daniella Harumy

Alterações cardiopulmonares induzidas em ratos saudáveis após a instilação nasal subcrônica de suspensão aquosa de material particulado fino em concentração ambiental / Daniella Harumy Binoki. -- São Paulo, 2010.

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

Orientadora: Dolores Helena Rodriguez Ferreira Rivero.

Descritores: 1.Material particulado 2.Sistema nervoso autônomo 3.Lavado broncoalveolar 4.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-157/10

À minha família

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Dolores, que sempre me acompanhou e guiou-me com atenção, carinho e paciência. Muito obrigada!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thais Mauad pelos ensinamentos e enriquecimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva pela oportunidade e confiança.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa Dolhnikoff pelas valiosas sugestões.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leila Antonangelo pelo auxílio na leitura do mielograma.

Às queridas Angela e Maria Cristina do Laboratório de imuno-histoquímica pela simpatia e solicitude na preparação das lâminas.

À Jôse Mára, Tatiana e Luiz Fernando. Obrigada Mára pela ajuda no lavado bronco-alveolar; Tati e Luiz pelo companheirismo no analisador de imagens.

À Liduvina da Secretaria de pós-graduação pela gentileza nas questões burocráticas.

À amiga Patrícia M. Terazaki pelo incentivo, bem querer e amizade verdadeira. Muito obrigada Patty!

Às pessoas que indiretamente participaram da tese e que sem elas tudo ficaria mais difícil: Mamis, Fred, Marco, José Carlos, Na e Lu.

Os grandes vales cheios dos mesmos verdes de sempre,  
As grandes montanhas, longe, mais reais que qualquer sentimento,  
A realidade toda, com o céu e o ar e os campos que existem estão presentes.  
(E de novo o ar, que lhe faltara tanto tempo, lhe entrou fresco nos pulmões)  
E sentiu que de novo o ar lhe abria, mas com dor, uma liberdade no peito.

(Alberto Caieiro, heterônimo de Fernando Pessoa)

# SUMÁRIO

## RESUMO

## ABSTRACT

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. O MATERIAL PARTICULADO .....	5
1.2. REGIÃO METROPOLITANA DE SÃO PAULO (RMSP).....	7
1.3. EFEITOS DO MATERIAL PARTICULADO NOS SISTEMAS RESPIRATÓRIO E CARDIOVASCULAR .....	11
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
<b>3. MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
3.1. COLETA DO MP <sub>2,5</sub> E ANÁLISE DOS ELEMENTOS QUÍMICOS .....	29
3.2. PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES AQUOSAS DE MP <sub>2,5</sub> .....	31
3.3. ANIMAIS .....	31
3.4. INSTILAÇÃO NASAL .....	32
3.5. ANÁLISE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA, VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA E PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA .....	33
3.6. AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA .....	35
3.7. ANÁLISE CELULAR DO LAVADO BRONCOALVEOLAR .....	36
3.8. MIELOGRAMA .....	37
3.9. HISTOPATOLOGIA E ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE ARTERÍOLAS CORONARIANAS E PULMONARES .....	37
3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	40
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
4.1. ANÁLISE ELEMENTAR DAS PARTÍCULAS .....	42
4.2. ANIMAIS .....	44
4.3. ANÁLISE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA, VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA E PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA .....	44
4.4. AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA .....	47
4.5. ANÁLISE CELULAR DO LAVADO BRONCOALVEOLAR .....	49
4.6. MIELOGRAMA .....	51
4.7. HISTOPATOLOGIA E ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE ARTERÍOLAS CORONARIANAS E PULMONARES .....	51
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>65</b>
<b>7. ANEXOS</b> .....	<b>67</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>90</b>

## RESUMO

Binoki DH. *Alterações cardiopulmonares induzidas em ratos saudáveis após a instilação nasal subcrônica de suspensão aquosa de material particulado fino em concentração ambiental* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 110p.

Há diversas evidências epidemiológicas de correlações positivas entre indicadores de morbidade e mortalidade pulmonar e cardiovascular e aumentos na concentração atmosférica de MP<sub>2,5</sub> (material particulado fino). O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da exposição subcrônica de MP<sub>2,5</sub> sobre o tônus cardíaco autonômico, a inflamação pulmonar e sistêmica; o estresse oxidativo e a homeostase sanguínea, após oito semanas de repetidas instilações nasais de suspensão aquosa de MP<sub>2,5</sub> da cidade de São Paulo em concentração ambiental. Dividiram-se os animais em dois grupos: salina e MP<sub>2,5</sub> e avaliaram-se os seguintes parâmetros: frequência cardíaca (FC), variabilidade da frequência cardíaca (VFC), pressão arterial sistólica (PA), hemograma, contagem de plaquetas e reticulócitos, fibrinogênio plasmático, tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA), mielograma, citologia do lavado broncoalveolar (LBA), análise histopatológica e imuno-histoquímica (15-F2t-isoprostano e  $\alpha$ -actina) de pequenas arteríolas pulmonares e coronarianas. Não houve alterações na FC e na PA ( $p > 0,05$ ). Houve interação estatisticamente significativa entre grupos e semanas em relação à VFC. O SDNN (desvio padrão dos intervalos R-R normais), a r-MSSD (raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças sucessivas entre intervalos R-R normais adjacentes) e a AF (alta frequência) do grupo MP<sub>2,5</sub> aumentaram significativamente na 7ª semana em comparação à 1ª semana ( $p < 0,05$ ), enquanto a BF (baixa frequência) não se alterou ( $p > 0,05$ ). A porcentagem de macrófagos no LBA do MP<sub>2,5</sub> diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ). Não se observaram alterações no sangue, mielograma e análise histopatológica e imuno-histoquímica dos vasos ( $p > 0,05$ ). Concluiu-se que a exposição subcrônica pela instilação nasal de suspensão aquosa de MP<sub>2,5</sub> em concentração ambiental causou inflamação pulmonar tênue e alterou o equilíbrio cardíaco autonômico.

**Descritores:** 1.Material particulado 2.Sistema nervoso autônomo 3.Lavado broncoalveolar 4.Ratos Wistar

## ABSTRACT

Binoki DH. *Cardiopulmonary alterations induced in healthy rats after subchronic nasal instillation of aqueous fine particulate matter suspension in ambient concentration* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 110p.

There are several epidemiological evidences of positive correlation between indicators of pulmonary and cardiovascular morbidity and mortality and increases of PM<sub>2.5</sub> (fine particulate matter) air concentration. The aim of this experiment was to evaluate the effects of subchronic exposure of PM<sub>2.5</sub> on cardiac autonomic tone, pulmonary and systemic inflammation, oxidative stress and blood homeostasis of healthy rats after eight weeks of repeated nasal instillations of suspended PM<sub>2.5</sub> from Sao Paulo city in environmental concentration. Rats were divided in two groups: saline and PM<sub>2.5</sub>. The following parameters were evaluated: heart rate (HR), heart rate variability (HRV), systolic blood pressure (BP), hemogram, platelets and reticulocytes count, plasmatic fibrinogen, prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), bone marrow cells, bronchoalveolar lavage cells (BAL), histopathological and immunohistochemical analysis (15-F2t-isoprostane and  $\alpha$ -actin) of pulmonary and coronary small arterioles. No changes were detected in HR and BP ( $p > 0.05$ ). There were a statistically significant interaction between groups and weeks in relation to HRV. SDNN (standard deviation of normal RR intervals), r-MSSD (square root of the mean of the squared differences between adjacent normal RR intervals) and HF (high frequency) of PM<sub>2.5</sub> group significantly increased on 7<sup>th</sup> week compared to 1<sup>st</sup> week ( $p < 0.05$ ), while LF (low frequency) did not alter ( $p > 0.05$ ). BAL macrophages percentage of PM<sub>2.5</sub> group significantly decreased ( $p < 0.05$ ). No alterations were observed in blood, bone marrow cells, histopathological and immunohistochemical analysis of vessels ( $p > 0.05$ ). We concluded that subchronic exposure by nasal instillation of aqueous suspension of PM<sub>2.5</sub> in environmental concentration caused tenuous pulmonary inflammation and altered cardiac autonomic balance.

**Descriptors:** 1.Particulate matter 2.Autonomic nervous system  
3.Bronchoalveolar lavage 4.Wistar rats



## 1. INTRODUÇÃO

---

Diversas são as problemáticas questões ambientais atuais. Fala-se sobre a destruição da camada de ozônio; a mudança climática; o aumento da produção de resíduos sólidos domiciliares e industriais ("lixo"); a má qualidade hídrica de lagos, rios e mares; a contaminação do solo e de águas subterrâneas; o risco de sobrevivência e extinção da fauna e da flora; e a poluição do ar entre outros tópicos. Dentro de cada um desses assuntos realiza-se uma infinidade de debates acerca de monitoramento e controle, padrões de qualidade, soluções a curto, médio e longo prazo, participações em acordos internacionais, criações de leis etc.

Particularmente o tema "Poluição Atmosférica" também recebe atenção graças aos seus impactos sobre a Saúde Pública. Desde o início dos processos de industrialização e de modernização global, a formação e a liberação de poluentes no ar resultantes das atividades humanas apresentam acréscimos anuais. Alguns países desenvolvidos, que inicialmente contribuíram com grande porcentagem do problema, motivaram-se através de dados científicos e esforços legislativos na tentativa de reduzir a emissão de substâncias potencialmente nocivas na atmosfera, visando o menor comprometimento da saúde e do bem estar da população.

Sabe-se, no entanto, que esse problema deixou de ser apenas das nações mais desenvolvidas e passou a ser de relevância mundial, pois nas grandes cidades de países em desenvolvimento como São Paulo, acentuada

exposição ocorre com variados compostos como dióxido de enxofre, monóxido de carbono, ozônio, dióxido de nitrogênio e material particulado (MP). Especificamente o material particulado fino (MP<sub>2,5</sub>) é motivo de atenção por apresentar correlação positiva consistente com morbidade e mortalidade respiratória e cardiovascular nos seres humanos em regiões metropolitanas.

Na capital paulista verificam-se taxas de morbidade e de mortalidade cardiovascular de indivíduos a partir de 65 anos de cerca de 28% e 40,5% respectivamente. Já a morbidade por enfermidades respiratórias representa 12,9%, enquanto a mortalidade neoplásica pulmonar, 19,7% (DATASUS, 2007). De modo preocupante, esses índices são passíveis de aumento, uma vez que estudos englobando banco de dados médicos de mais 500.000 pessoas adultas, residentes em cidades norte americanas, demonstram que para cada aumento de 10 µg/m<sup>3</sup> na concentração anual de MP<sub>2,5</sub> estão associadas elevações nos índices de mortalidade de origem cardiovascular de 4%, pulmonar de 6% e decorrente de neoplasia pulmonar de 6 a 8% sem limiar seguro discernível (Brook et al., 2004; Chen et al., 2008b; Puett et al., 2009). Em contrapartida, os mesmos índices também estão sujeitos à redução, pois pesquisa realizada em cidades européias refere estimativas de diminuição de óbitos prematuros a partir da queda nos níveis ambientais anuais de MP<sub>2,5</sub> (Ballester et al., 2008).

Os mecanismos fisiopatológicos desencadeados pelo MP<sub>2,5</sub> ainda não estão completamente elucidados, sendo necessários dados adicionais para o esclarecimento das dúvidas existentes. Assim, grupos de pesquisa em

distintos países trabalham isolada ou conjuntamente na obtenção de informações a respeito de quais de seus componentes são potencialmente deletérios e tóxicos, quanto eles interferem na saúde e como eles atuam sobre os organismos.

Desde o seu surgimento, o Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) realiza pesquisas com diversos modelos animais de estudo agudo, subcrônico e crônico, para avaliar a importância do MP<sub>2,5</sub> como fator etiológico de processos pulmonares e cardiovasculares, a patogenia provavelmente envolvida, a ocorrência de possíveis alterações morfológicas teciduais e o seu potencial significado clínico.

Experimentos desenvolvidos no LPAE de exposição aguda a altas concentrações de MP<sub>2,5</sub> revelaram sinais de disfunção cardíaca autonômica, reação medular sistêmica, alteração da homeostase sanguínea com sinais de disfunção endotelial em arteríolas pulmonares, além de estresse oxidativo em ratos saudáveis e com bronquite (Batalha et al., 2002; Rivero et al., 2005a; Rivero et al., 2005b). Em adição, ensaio a baixa concentração indicou inflamação pulmonar, interferência na medula óssea e aumento plasmático de fibrinogênio (Medeiros et al., 2004); enquanto estudos de caráter subcrônico e crônico, também com níveis reduzidos de partículas, demonstraram evidências de estresse oxidativo (Lopes et al., 2009) e de disfunção/remodelamento vascular em arteríolas pulmonares e coronarianas

de camundongos doentes (enfisema pulmonar) e saudáveis respectivamente (Lemos et al., 2006; Akinaga et al., 2009; Matsumoto et al., 2010).

### **1.1. O material particulado**

O MP é considerado uma mistura heterogênea de partículas sólidas e líquidas, transportadas pelo ar, que variam em tamanho, composição e origem no tempo e no espaço (Pope, 2000). As partículas podem ser primárias, ou seja, aquelas cuja emissão ocorre diretamente na atmosfera; ou secundárias, criadas por transformações físico-químicas de compostos primários e de constituintes naturais da troposfera associados ou não entre si (Brook et al., 2004).

As fontes do MP são: exaustão em veículos automotores, fragmentação de pneus, suspensão de poeira, processos industriais, atividade metalúrgica, fundição mineral, agricultura, queima de madeira, construções e demolições de obras, grãos de pólen, partículas fúngicas, resíduos vulcânicos etc (Brook et al., 2004). Entre os constituintes mais comuns estão os nitratos e os sulfatos, o carbono elementar e o orgânico, os resíduos biológicos (Ex.: endotoxinas, fragmentos celulares etc) e os metais de transição. (Pope, 2000).

Atualmente analisa-se o MP com base em sua massa e o espaço que ocupa dentro de um modelo trimodal, categorizando-se as partículas em grossas (MP<sub>10</sub>: diâmetro aerodinâmico equivalente inferior a 10 µm), finas

(MP<sub>2,5</sub>: diâmetro aerodinâmico equivalente inferior a 2,5 µm) e ultrafinas (UF: diâmetro aerodinâmico equivalente inferior a 0,1 µm). Como consequência, o foco de atenção deixou de ser a análise do total de estruturas suspensas no ar, para a capacidade das mesmas de penetrarem e se depositarem nas vias aéreas (MP<sub>10</sub>) ou de alcançarem bronquíolos terminais e alvéolos pulmonares (MP<sub>2,5</sub> e UF) (Pope, 2000; Brunokreef e Holgate, 2002; Brook et al., 2004).

O MP<sub>10</sub> é proveniente de fontes naturais da crosta terrestre e de processos de trituração em geral. No grupo também se incluem os bioaerossóis. Já o MP<sub>2,5</sub> origina-se predominantemente da combustão em automóveis e indústrias (Brook et al., 2004). Em relação às partículas grossas, as finas penetram mais facilmente dentro de casas, deslocam-se por longas distâncias e são mais uniformes nas comunidades, tornando ubíqua a sua distribuição (Pope, 2000).

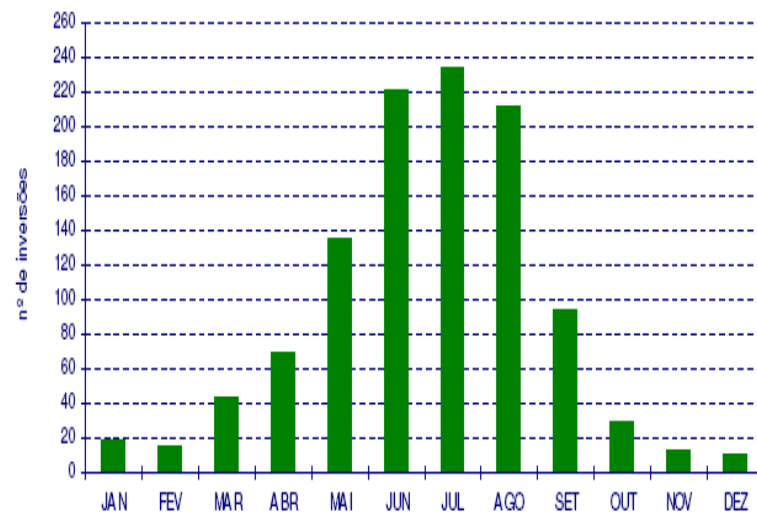
A UF, primariamente resultante da queima de combustíveis, apresenta período de permanência curto na atmosfera, uma vez que tende a coalescência e formação de estruturas maiores (Pope, 2000; Donaldson et al., 2001). Essas partículas demonstram deposição e endocitose alveolar, translocam a barreira epitélio-endotelial pulmonar, são numericamente maiores dentro do MP e expressam alta razão entre superfície de área e massa, o que amplifica sua toxicidade biológica (Donaldson et al., 2001; Stearns et al., 2001; Brunekreef e Holgate, 2002; Shimada et al., 2006; Furuyama et al., 2009).

## 1.2. Região metropolitana de São Paulo (RMSP)

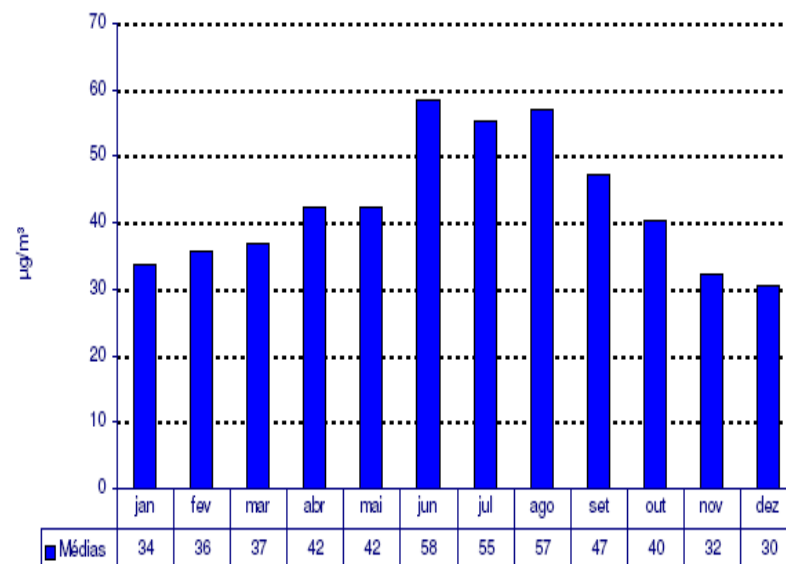
O Estado de São Paulo através da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) mantém redes de monitoramento da qualidade do ar espalhadas pelo território, que têm permitido a avaliação de alguns poluentes atmosféricos. A região metropolitana, considerada prioritária, é influenciada principalmente pelas suas fontes emissoras móveis (veículos leves e pesados) e secundariamente pelas fixas (indústrias), além de suas singularidades meteorológicas e topográficas (CETESB, 2009).

A RMSP conta com cerca de 2000 indústrias de alto potencial poluidor e por uma frota de cerca de 9,2 milhões de veículos automotores, sendo 7,4 milhões de automóveis que realizam ciclo Otto, ou seja, que funcionam a base de gasolina, álcool e gás natural; 490 mil veículos movidos a diesel e 1,2 milhões de motos. De acordo com estimativas de 2008 todas essas fontes foram responsáveis pela emissão na atmosfera de aproximadamente 62,3 mil toneladas de MP só nesse ano (CETESB, 2009).

É importante salientar que mesmo mantidas as emissões, o perfil da qualidade do ar pode variar em função de aspectos meteorológicos (chuvas, frentes frias etc.), que determinam uma maior ou menor diluição dos poluentes. É por isso que a concentração de MP aumenta nos meses da estação inverno, quando as circunstâncias ambientais geram estabilidade atmosférica e inversão térmica próxima à superfície terrestre (abaixo de 200 metros), desfavorável à dispersão de partículas (Figuras 1 e 2) (CETESB, 2009).



**Figura 1.** Número de inversões térmicas inferior a 200 metros na RMSP entre 1985 e 2006 (Aeroporto de Congonhas a Campo de Marte). Fonte: CETESB (2007)



**Figura 2.** Concentrações médias mensais de MP<sub>10</sub> na RMSP (2002 a 2006).  
Fonte: CETESB (2007)

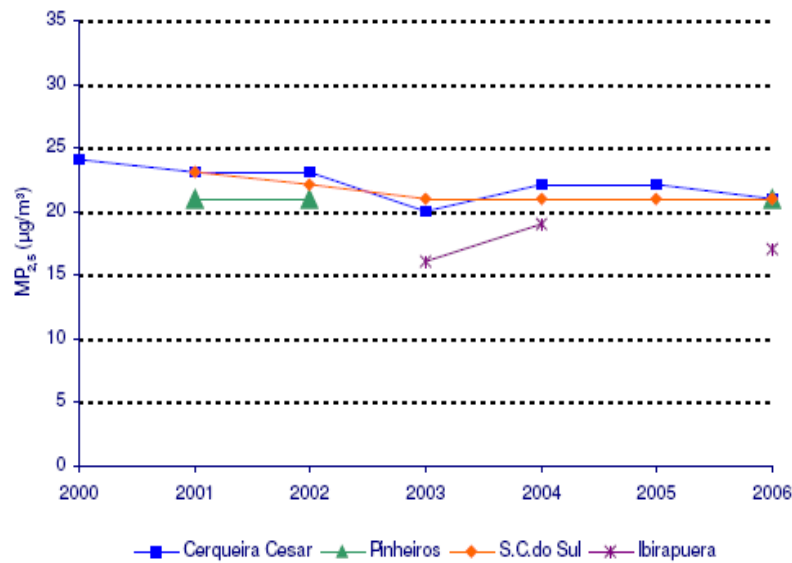


O padrão de qualidade do ar brasileiro define legalmente os limites para a concentração de alguns poluentes atmosféricos (Tabela 1). Embora automaticamente analisado em algumas estações de acompanhamento da CETESB, o  $MP_{2,5}$  que corresponde a cerca de 60% do  $MP_{10}$  na RMSP, não possui limites oficiais estabelecidos (diário e anual). Nos Estados Unidos a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana propõe o valor anual primário máximo para o  $MP_{2,5}$  de  $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$  e o diário máximo de  $65 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Segundo relatórios oficiais realizados na capital, os sítios de monitoramento do  $MP_{2,5}$  vem demonstrando médias anuais superiores ao limite padrão americano (Figura 3) (CETESB, 2007).

**Tabela 1.** Padrões nacionais de qualidade do ar (Resolução CONAMA nº 3 de 28/06/90)

<b>Poluente</b>	<b>Tempo de amostragem</b>	<b>Padrão primário (<math>\mu\text{g}/\text{m}^3</math>)</b>	<b>Padrão secundário (<math>\mu\text{g}/\text{m}^3</math>)</b>	<b>Método de medição</b>
Partículas totais em suspensão	24 horas <sup>1</sup> MGA <sup>2</sup>	240 80	150 60	Amostrador de grandes volumes
Partículas inaláveis ( $\text{MP}_{10}$ )	24 horas <sup>1</sup> MMA <sup>3</sup>	150 50	150 50	Separação Inércia/filtração
Fumaça	24 horas <sup>1</sup> MMA <sup>3</sup>	150 50	100 40	Refletância
Dióxido de enxofre	24 horas <sup>1</sup> MMA <sup>3</sup>	365 80	100 40	Pararosalina
Dióxido de nitrogênio	1 hora <sup>1</sup> MMA <sup>3</sup>	320 100	190 100	Quimiluminescência
Monóxido de carbono	1 hora <sup>1</sup> 8 horas <sup>1</sup>	40.000 35ppm 10.000	40.000 35ppm 10.000	Infravermelho não dispersivo
Ozônio	1 hora <sup>1</sup>	9ppm 160	9ppm 160	Quimiluminescência

1 – Não deve ser excedido mais que uma vez ao ano. 2 – Média geométrica anual. 3 – Média aritmética anual. Padrão primário: concentrações que uma vez ultrapassadas poderão afetar a saúde da população. Padrão secundário: concentração com mínimo efeito adverso sobre o bem estar da população e o meio ambiente.



**Figura 3.** Evolução das concentrações médias anuais de  $MP_{2,5}$  na RMSP em quatro estações de monitoramento (2000 a 2006). Fonte: CETESB (2007)

### 1.3. Efeitos do material particulado nos sistemas respiratório e cardiovascular

Há diversos trabalhos epidemiológicos relacionando a elevação da poluição do ar com o déficit de saúde, que avaliam sinais de morbidade, mortalidade, visitas médicas e hospitalizações. Esses estudos são divididos em investigações após exposições agudas e crônicas e suas conclusões são obtidas através de informações fornecidas por arquivos médicos e por pacientes voluntários acerca de indicadores de enfermidade (Ex.: sintomas clínicos) e mensurações objetivas de função orgânica (Ex.: saturação periférica de oxigênio) (Brunekreef e Holgate, 2002; DeMeo et al., 2004; Yokota et al., 2008; de Hartog et al., 2009).

No Brasil, em particular na cidade de São Paulo, relata-se uma correlação positiva entre o aumento de admissões hospitalares de grupos de crianças, adultos e idosos, e os episódios de piora da qualidade do ar. Nessa condição especial as crianças apresentam maior incidência de enfermidades respiratórias (pneumonias, broncopneumonias, asma e bronquiolite) em relação a outros períodos (Farhat et al., 2005); e a proporção de descompensações cardiovasculares (angina, arritmias, infarto agudo de miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva) em adultos e idosos também é favorecida (Lin et al., 2003; Martins et al., 2006; Santos et al., 2008).

Muitos trabalhos referem os poluentes atmosféricos como fatores de risco em doenças, e embora vários compostos estejam envolvidos individual ou combinadamente, o  $MP_{2,5}$  se sobressai devido à quantidade de evidências de efeitos adversos sobre o sistema respiratório e o cardiovascular (Dominici et al., 2006; Pope et al., 2006; Bai et al., 2007; Chen et al., 2008b; Fan et al., 2009; Johnson e Parker, 2009; Stieb et al., 2009), especialmente em indivíduos com hipertensão arterial, isquemia de miocárdio, aterosclerose, insuficiência cardíaca congestiva, arritmias, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, diabetes e hiperlipidemia (Pope et al., 2004; O'Neill et al., 2005; van Eeden et al., 2005; Yeatts et al., 2007; Hu e Rao, 2009; Ostro et al., 2009; Jacobs et al., 2010).

Comparativamente, nota-se que a grande maioria das correlações epidemiológicas é aferida após exposições agudas ao  $MP_{2,5}$ . Menor proporção de dados há sobre a monitorização de seus efeitos respiratórios e cardiovasculares em contatos diários por períodos prolongados (Brook et al.,

2004; Chang et al., 2004; Chen e Hwang, 2005; Lippmann et al., 2005; Lemos et al., 2006; Akinaga et al., 2009; Lopes et al., 2009; Matsumoto et al., 2010). Verifica-se também a existência substancial de pesquisas com modelos *in vitro* e *in vivo*, para a observação de efeitos orgânicos do MP<sub>2,5</sub>, fornecido em concentrações diversas vezes maiores que a média ambiental e em número reduzido de exposições; ademais a avaliação dos resultados costuma ser imediata e insuficientes informações há sobre os efeitos do MP<sub>2,5</sub> em protocolos longos, com exposições repetidas e em concentrações próximas às ambientais.

Em relação aos mecanismos biológicos, observa-se que o MP<sub>2,5</sub> é capaz de alcançar as unidades alveolares e interagir com macrófagos e células epiteliais, atuando como agente químico e desencadeando lesão e morte celular. Quando administrado em suspensão aquosa é plausível a hipótese de injúria das células por privação temporária de oxigênio, principalmente em experimentos envolvendo animais de pequeno porte como os roedores. Os eventos bioquímicos relacionados com o dano celular por poluentes atmosféricos são: depleção e redução da síntese de ATP, liberação de radicais livres derivados do oxigênio, perda da homeostase do cálcio intracelular, defeitos da permeabilidade da membrana plasmática e lesão mitocondrial irreversível (Kumar et al., 2008).

Além da lesão pulmonar, observam-se frequentes sinais deletérios distais em coração e vasos sanguíneos associadas ao MP<sub>2,5</sub> (Batalha et al., 2002; Rivero et al., 2005a; Lemos et al., 2006; Akinaga et al., 2009; Maatz et al., 2009; Matsumoto et al., 2010). Apesar da patogenia envolvida ainda não

estar amplamente esclarecida, cogitam-se três explicações prováveis de como o MP<sub>2,5</sub> inalado é capaz de afetar regiões do sistema cardiovascular: (1) desequilíbrio autonômico; (2) liberação de mediadores pulmonares pró-oxidativos e pró-inflamatórios na circulação sistêmica, que indiretamente induzem respostas cardiovasculares; e (3) UF e/ou constituintes solúveis, como os metais de transição, que se translocam diretamente para a corrente sanguínea (Pope, 2000; Gonzalez-Flecha, 2004; Schulz et al., 2005; Shimada et al., 2006; Bai et al., 2007; Mills et al., 2007; Brook, 2008; Furuyama et al., 2009).

Visando organizar as informações fornecidas pelos dois últimos parágrafos e esquematizar o estudo dos efeitos do MP<sub>2,5</sub> sobre os sistemas respiratório e cardiovascular, didaticamente podemos dividir em quatro as principais consequências da ação das partículas finas: (a) disfunção cardíaca autonômica, (b) inflamação pulmonar e sistêmica, (c) estresse oxidativo e (d) desequilíbrio da homeostase sanguínea (Medeiros et al., 2004; Rhoden et al., 2004; Park et al., 2005; Rivero et al., 2005a; Frampton, 2006; Mills et al., 2007; Rückerl et al., 2007a; Yeatts et al., 2007; Brook, 2008; Yokota et al., 2008; Bonzini et al., 2009; Mantecca et al., 2009).

O colapso cardiovascular humano associado ao MP<sub>2,5</sub> pode relacionar-se à disfunção cardíaca autonômica (Pope et al., 1999; Brook, 2008). A FC em repouso, a VFC e a PA são moduladas pelo equilíbrio entre o sistema nervoso simpático e o parassimpático (Cunningham et al., 2004; Vanderlei et al., 2009). Com frequência, após exposições agudas a concentrações elevadas de MP<sub>2,5</sub>, registram-se o aumento da FC (Gold et

al., 2000; Pope, 2000; Gong et al., 2004) e da PA (Ibald-Mulli et al., 2001; Zanobetti et al., 2004), juntamente com a queda da VFC (Gold et al., 2000; Devlin et al., 2003; Gong et al., 2004; Park et al., 2005; Yeatts et al., 2007; de Hartog et al., 2009; Fan et al., 2009).

Em ensaios com modelos animais os efeitos na FC decorrentes da inalação ou da instilação aguda de MP concentrado não são característicos (Godleski et al., 2000; Cheng et al., 2003), observando-se elevação (Wellenius et al., 2004; Harder et al., 2005; Upadhyay et al., 2008), redução (Nadziejko et al., 2002b; Cheng et al., 2003; Watkinson et al., 2003) e estabilidade de seus valores (Wellenius et al., 2002; Wellenius et al., 2003). Semelhante fato ocorre com a PA, que não segue um padrão, apresentando-se aumentada (Upadhyay et al., 2008; Bartoli et al., 2009) e diminuída (Cheng et al., 2003; Wichers et al., 2004a). Em contrapartida, a VFC exhibe uma tendência à diminuição (Wellenius et al., 2002; Harder et al., 2005; Corey et al., 2006; Chen et al., 2008a; Upadhyay et al., 2008).

Diferentes estímulos como a respiração, a contração muscular e os variáveis graus de estimulação dos barorreceptores arteriais (aórticos, carotídeos e pulmonares) são responsáveis pela dinâmica da atividade autonômica sobre o complexo estimulador do coração (Reis et al., 1998; Vanderlei et al., 2009). O estímulo vagal sobre o nodo sinusal inicia-se rapidamente, modulando a FC dentro de um ou dois batimentos, enquanto a resposta do nodo à atividade simpática é mais lenta, impedindo a modulação da FC batimento a batimento. A interação entre a modulação rápida,

exercida pelo vago, e a modulação lenta, promovida pelo simpático, produz a VFC (Cunningham et al., 2004; Vanderlei et al., 2009).

A VFC permite observar oscilações no ritmo cardíaco que ocorrem durante gravações eletrocardiográficas de curta (2, 5 e 15 minutos) e de longa duração (24 horas) através de métodos considerados lineares e não lineares. A metodologia linear utiliza a construção de uma série temporal na qual os dados são analisados no domínio do tempo (métodos estatísticos ou geométricos) e no domínio da frequência (análise espectral); já a não linear é bastante complexa e segue o princípio da teoria do caos (fenômenos altamente irregulares, mas não ao acaso) (Cunningham et al., 2004; Park et al., 2005; Vanderlei et al., 2009).

A análise no domínio do tempo verifica a dispersão dos espaços RR em torno da média. Os métodos mais utilizados são os estatísticos, calculados com base nas medidas diretas dos intervalos ou nas mensurações derivadas da diferença entre distâncias adjacentes. Os cálculos de seus índices utilizam registros gráficos normais, desprezando artefatos e ectopias (Cunningham et al., 2004). O estudo no domínio da frequência avalia a densidade do espectro de potência, descrevendo sua distribuição (variância) em função da frequência. Em outras palavras a análise espectral decompõe a variabilidade total em suas subdivisões causadoras, apresentando-as segundo a repetição que alteram a FC (Reis et al., 1998).

Independentemente da maneira de cálculo da densidade espectral, seja pela transformação rápida de Fourier ou pelo modelo auto-regressivo,



delimitam-se diversas faixas de frequência distintas. Uma delas é a AF (alta frequência), modulada pelo sistema nervoso parassimpático e pela respiração. A outra é a BF (baixa frequência), influenciada principalmente pelo ramo simpático, mas também pelo parassimpático e correlacionada às redes barorreceptora e termorreguladora, à atividade periférica vasomotora e ao sistema renina-angiotensina (Reis et al., 1998).

Como as medidas da VFC nos dois domínios são métodos distintos para a avaliação do mesmo fenômeno, é possível demonstrar correlações entre os seus índices. Por exemplo, ao aferir o desvio padrão dos intervalos RR normais, o SDNN do domínio do tempo acaba se correspondendo com a potência total do espectro de frequências do domínio da frequência; e a r-MSSD, também do domínio do tempo, por representar a raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças sucessivas entre intervalos RR normais adjacentes relaciona-se com a faixa AF (Reis et al., 1998; Vanderlei et al., 2009).

Atualmente sabe-se que a diminuição da VFC constitui um importante fator prognóstico para o aparecimento de eventos cardíacos em indivíduos sadios e doentes, por exemplo, portadores de hipertensão arterial, enfermidade coronariana, isquemia de miocárdio e arritmias (Reis et al., 1998; Gold et al., 2000; Devlin et al., 2003; Pope et al., 2004; Park et al., 2005; Bai et al., 2007; Brook et al., 2008; Fan et al., 2009; Vanderlei et al., 2009). Por outro lado, o aumento da VFC pode ser entendido como um sinal de adaptação, caracterizando um organismo com respostas autonômicas cardíacas eficientes (Cunningham et al., 2004; Vanderlei et al., 2009).

Pouco se conhece a respeito dos mecanismos patofisiológicos desencadeados pelo MP sobre o componente autonômico do sistema circulatório e respiratório, porém acredita-se que as partículas depositadas na árvore pulmonar são capazes de atuar sobre receptores específicos e estimular reflexos nervosos com consequente alteração do equilíbrio simpático e parassimpático, além de estimular vias aferentes ao centro vasomotor no sistema nervoso central por meio de citocinas resultantes do estresse oxidativo e/ou da inflamação pulmonar, e da ação direta das UF nos tecidos envolvidos; modulando a FC e o tônus vascular periférico (Gold et al., 2000; Brook et al., 2004; Park et al., 2005; Bai et al., 2007; Brook, 2008; Legramante et al., 2009).

A respeito da inflamação pulmonar, relatos científicos indicam a sua presença em decorrência de inalação ou de instilação aguda de MP concentrado ou não em indivíduos humanos e animais. Através do exame de lavado broncoalveolar é possível averiguar a migração de células inflamatórias como, por exemplo, a elevação de neutrófilos nos espaços alveolares, além de indícios de alteração da permeabilidade epitelial e produção de citocinas (Li et al., 1997; Harder et al., 2001; Kodavanti et al., 2002; Nemmar et al., 2003; Nemmar et al., 2004; Wichers et al., 2004b; Harder et al., 2005; van Eeden et al., 2005; Niwa et al., 2008; Yokota et al., 2008; Mantecca et al., 2009; Nemmar et al., 2009).

O movimento de migração celular para a região inflamada ocorre graças ao aparecimento de fendas na parede vascular, aliado à liberação de substâncias quimiotáticas. Também colabora o fato da velocidade sangüínea

ser reduzida localmente e da adesividade entre o endotélio e as células circulantes ser estimulada. Os neutrófilos são granulócitos de alto potencial de diapedese e rápida velocidade de migração, têm ação fagocítica e normalmente são as primeiras células encontradas nos focos da inflamação. Os linfócitos migram mais lentamente, apresentam atividade fagocitária coadjuvante e reconhecem diversos antígenos. Já os macrófagos são células tipicamente envolvidas com a fagocitose, e os eosinófilos estão relacionados com processos subcrônicos ou alérgicos (Kumar et al., 2008).

Os mesmos mediadores sintetizados e liberados na inflamação local podem ter acesso à circulação sanguínea e incitar uma resposta extrapulmonar. A inflamação sistêmica é expressa pela mobilização e ativação de células inflamatórias e plaquetas na circulação, produção de proteínas de fase aguda e aumento de mediadores inflamatórios circulantes (Pekkanen et al., 2000; van Eeden et al., 2005; Bai et al., 2007; Yokota et al., 2008; Nemmar et al., 2009).

Um dos sinais mais importantes da inflamação sistêmica é a reação dos tecidos hematopoiéticos. Protocolos experimentais com pessoas e animais sugerem que a medula óssea libera uma maior quantidade de células da série branca e plaquetas em resposta ao estímulo do MP, o que pode ser prejudicial à aterosclerose (Tan et al., 2000; van Eeden e Hogg, 2002; Goto et al., 2004; van Eeden et al., 2005; Yokota et al., 2008; Nemmar et al., 2009). De modo interessante o oposto ocorre com a averiguação de menor débito celular leucocitário em ambiente com baixa concentração de MP (Sakai et al., 2004; van Eeden et al., 2005).

Diante de hipóxia tecidual importante, determinadas células renais e hepáticas, estimuladas pelo fator de hipóxia-induzida 1 (HIF-1), secretam na corrente sanguínea o precursor da eritropoietina, à qual se relaciona com a estimulação da diferenciação de progenitores eritroblásticos na medula óssea. Em adição, especula-se também que os metais de transição presentes no MP como cobalto, níquel e manganês são capazes de influenciar a elevação de HIF-1, culminando no aumento do número de hemácias (Sorensen et al., 2003), reticulócitos circulantes e eritroblastos (Medeiros et al., 2004; Rivero et al., 2005b).

Com relação ao estresse oxidativo, sabe-se que durante o processo de redução da molécula de oxigênio em água para a obtenção de energia celular (respiração mitocondrial) há a geração de formas reativas ao oxigênio. Algumas dessas substâncias são radicais livres (RL) capazes de danificar proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Existem mecanismos celulares defensivos contra esses produtos e em situações anormais, o aumento da disponibilidade de RL desencadeia o fenômeno citotóxico estresse oxidativo. Outras origens de RL incluem as reações de metais de transição como o ferro e o cobre (reação Fenton) (Kumar et al., 2008). No plasma a oxidação de compostos proteicos e lipídicos de baixa densidade está intimamente ligada à aterosclerose (Sorensen et al., 2003; Rhoden et al., 2004).

Uma das principais consequências do estresse oxidativo é a lipoperoxidação, que consiste numa cascata de eventos bioquímicos resultante da ação de RL sobre os lípidos insaturados da membrana

plasmática, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e morte celular. As metodologias utilizadas para a avaliação da lipoperoxidação observam a formação de moléculas geradas durante as diferentes fases do processo (Lima e Abdalla, 2001; Janssen, 2008). Entre essas substâncias encontra-se a família dos isoprostanos, considerados isômeros de prostaglandinas e relacionados com a oxidação do ácido aracdônico, que podem ser mensurados ou submetidos a testes semiquantitativos como a análise imuno-histoquímica (Janssen, 2008; Lopes et al., 2009).

Pesquisas apontam sinais de síntese e liberação exacerbada de RL por macrófagos de roedores durante a resposta inflamatória pulmonar induzida pela instilação e inalação aguda de MP<sub>2,5</sub> concentrado ou não (Ghio et al., 2002; Rhoden et al., 2004; Pereira et al., 2007; Huang et al., 2009; Nemmar et al., 2009), principalmente em função da presença de metais de transição (alumínio, ferro, cobre, silício e vanádio) e UF (Donaldson et al., 2001; Sorensen et al., 2003; Huang et al., 2009). Ademais, exposições crônicas de camundongos com enfisema a níveis ambientais de partículas ilustram evidências indiretas de estresse oxidativo no parênquima pulmonar através do estudo imuno-histoquímico com o anticorpo 15-F<sub>2t</sub>-isoprostano (Lopes et al., 2009).

Especificamente com relação aos vasos sanguíneos arteriais, correlaciona-se a elevação da concentração de isoprostanos a algumas doenças vasculares dos pulmões como hipertensão pulmonar e injúrias agudas, visualizando-se a presença e a interferência desses compostos nas

três túnicas da parede desses vasos (Janssen, 2008). Ao mesmo tempo, indivíduos com doenças coronarianas também demonstram o aumento da presença dessas substâncias nas regiões das camadas íntima e média das artérias, como demonstrado pela análise imuno-histoquímica com o anticorpo 15-F<sub>2t</sub>-isoprostano (Mehrabi et al., 1999).

Finalmente a homeostase sanguínea é o resultado de um conjunto de processos regulados que executam duas funções importantes: (1) manutenção do sangue em estado fluido e livre de coágulos nos vasos normais e (2) indução de tampão hemostático rápido e localizado na lesão vascular. Um oposto patológico da homeostase do sangue é a trombose, considerada como uma ativação excessiva dos processos hemostáticos normais, com a formação de coágulo sanguíneo na vasculatura indene ou a oclusão trombótica após uma lesão relativamente pequena. Para realizar a homeostase sanguínea o organismo utiliza mecanismos relacionados com as plaquetas, a cascata de coagulação e a parede vascular (Lorenzi, 2006).

As plaquetas exercem um papel central na homeostase do sangue. Quando circulantes são discos lisos, que expressam receptores glicoprotéicos para a família das integrinas em sua superfície, e que contêm grânulos com diversas substâncias fundamentais para a hemostasia (Lorenzi, 2006; Ruckerl et al., 2007b). Em relação à atividade plaquetária, supõe-se que as partículas atmosféricas são capazes de desencadear a ativação e a agregação de plaquetas (Khandoga et al., 2005; Ruckerl et al., 2007b; Hogg e van Eeden, 2009; Jacobs et al., 2010). Trabalhos com modelo experimental de trombose vascular periférica em hamsters ilustram o

aumento significativo do trombo após a instilação traqueal de partículas derivadas do diesel em alta concentração (Nemmar et al., 2003; Nemmar et al., 2004) e a sua correlação com a elevação plasmática de histamina, indicando uma ligação entre a inflamação pulmonar e a trombose periférica (Nemmar et al., 2004).

Define-se a cascata de coagulação como uma série de conversões de proenzimas em enzimas ativas, que culminam na formação de trombina, responsável pela conversão do fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel. O TTPA e o TP sinalizam a funcionalidade desse sistema. Enquanto o TTPA é capaz de analisar conjuntamente a atividade dos fatores II, V, VIII, IX, X, XI e XII da coagulação; o TP verifica a ação grupal das pró-enzimas II, V, VII e X (Gardner et al., 2000). Comumente o fator VII ativado é analisado de modo isolado e embora relatos não detectem alterações em sua concentração circulante (Harder et al., 2005), presenciaram-se achados circunstanciais, quando do contato com partículas poluentes, como a diminuição (Reed et al., 2004) e a elevação de seus valores em roedores (Donaldson et al., 2001; Reed et al., 2004; Hogg e van Eeden, 2009).

O fibrinogênio desempenha um papel crucial na cascata de coagulação e na viscosidade sangüínea (Gardner et al., 2000; Pekkanen et al., 2000; Donaldson et al., 2001). As informações sobre a sua relação com as partículas do ar são inconclusivas (Rückerl et al., 2007b). Demonstram-se tanto o aumento de sua concentração (Peters et al., 1997; Gardner et al., 2000; Ghio et al., 2000; Pekkanen et al., 2000; Schwartz, 2001; Kodavanti et al., 2002; Ghio et al., 2003; Holgate et al., 2003; Medeiros et al., 2004;

Rückerl et al., 2007b; Hoffmann et al., 2009), quanto a sua diminuição (Seaton et al., 1999; Rivero et al., 2005b) e a sua inalterabilidade em pessoas e animais após exposições de diferentes durações e a concentrações variadas de MP (Nadziejko et al., 2002a; Pope et al., 2004).

De modo semelhante aos seres humanos é possível a divisão dos vasos arteriais dos ratos, segundo os seus diâmetros crescentes em arteríolas, artérias de médio calibre ou musculares e artérias de grande calibre. Nas arteríolas a túnica íntima apresenta camada subendotelial delgada e não existe a membrana limitante elástica interna, exceto nos vasos mais calibrosos; a túnica média é formada apenas por uma ou duas camadas de células musculares lisas e fibras elásticas; e a adventícia é pouco desenvolvida (d' Uscio et al., 2000; Junqueira e Carneiro, 2008).

Os ramos da artéria pulmonar, que acompanham os bronquíolos maiores até os terminais são denominados artérias ou arteríolas pré-acinares; e os que se situam junto aos bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e paredes de alvéolos são designados por arteríolas intra-acinares, capazes de sofrerem adaptações derivadas do estado de relaxamento ou constrição dos ramos mais proximais. Os vasos dos ratos com diâmetro inferior a 300 µm são considerados os de resistência do organismo (d' Uscio et al., 2000).

Estudos morfométricos da parede vascular indicam a ocorrência de vasoconstrição arteriolar pulmonar e coronariana em roedores hígidos e com bronquite, tanto após a exposição aguda por inalação ou instilação traqueal de MP<sub>2,5</sub> concentrado (Batalha et al., 2002; Rivero et al., 2005b),



quanto após a exposição crônica em baixa concentração (Sun et al., 2005; Matsumoto et al., 2010). É provável que o estresse oxidativo e a inflamação dos pulmões, associados à condição de hipóxia, sejam responsáveis pelo início da disfunção e lesão endotelial, ocasionando constrição tanto pela diminuição da participação de óxido nítrico e/ou prostaciclina, quanto pelo aumento da disponibilidade de endotelinas e/ou tromboxana A<sub>2</sub> (Batalha et al., 2002; Rivero et al., 2005b; Janssen, 2008; Matsumoto et al., 2010).

Em comparação a animais respirando ar filtrado, camundongos expostos cronicamente ao ar ambiental não filtrado em região de intenso tráfego veicular apresentam espessamento da camada muscular de artérias pulmonares e coronárias, decorrente em maior grau de hipertrofia muscular do que de fibrose (Lemos et al., 2006); além de outros sinais de remodelamento coronariano envolvendo as túnicas adventícia (fibrose) e média (elastose) (Akinaga et al., 2009). Esses achados, associados ou não à condição do parágrafo anterior, prejudicam a perfusão tecidual e elevam a exigência mecânica do coração (Lemos et al., 2006; Akinaga et al., 2009).

Diante de todas as informações fornecidas neste subitem 1.3, ressalta-se a importância da continuidade dos estudos prévios de exposição aguda, subcrônica e crônica, desenvolvidos pelo LPAE, focando nesse momento um protocolo subcrônico para a complementação das escassas informações disponíveis e avaliando os possíveis efeitos do MP<sub>2,5</sub> sobre os pulmões e o sistema cardiovascular de ratos saudáveis em concentrações próximas às ambientais reais.

## 2. OBJETIVOS

---

Os objetivos deste estudo foram verificar os efeitos do MP<sub>2,5</sub> sobre o tônus cardíaco autonômico, a inflamação pulmonar e sistêmica; o estresse oxidativo e a homeostase sanguínea, envolvendo (1) um modelo animal de ratos saudáveis e (2) um protocolo subcrônico de oito semanas de repetidas instilações nasais de suspensão aquosa em concentração ambiental, preparada com MP<sub>2,5</sub> atmosférico da cidade de São Paulo, avaliando os seguintes parâmetros:

- Freqüência cardíaca (FC);
- Variabilidade da freqüência cardíaca (VFC): SDNN (desvio padrão dos intervalos RR normais), r-MSSD (raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças sucessivas entre intervalos RR normais adjacentes), BF (baixa freqüência) e AF (alta freqüência);
- Pressão arterial sistólica (PA);
- Hemograma com contagem de plaquetas e reticulócitos;
- Concentração plasmática de fibrinogênio;
- Tempos de protrombina (TP) e tromboplastina parcialmente ativada (TTPA);
- Análise celular do lavado bronco-alveolar (LBA);
- Mielograma;
- Histopatologia e análise imuno-histoquímica (15-F<sub>2t</sub>-isoprostano e  $\alpha$ -actina de músculo liso) de arteríolas pulmonares e coronarianas.

### 3. MÉTODOS

---

### 3.1. Coleta do MP<sub>2,5</sub> e análise dos elementos químicos

A coleta das partículas ocorreu no mês de agosto de 2006 através do impactador Harvard<sup>1</sup>, que funcionou num fluxo de 10 L/min durante 24 horas. O equipamento permitiu a captação por gravimetria de partículas com diâmetro aerodinâmico equivalente inferior a 2,5 µm em filtros de policarbonato<sup>2</sup> (Figura 4). O impactador permaneceu ao nível do solo da faculdade, a qual é circundada por vias de tráfego intenso de veículos, sem indústria vizinha e próxima à estação de monitoramento da CETESB (Mauad et al., 2008; Maatz et al., 2009).



**Figura 4.** Filtro de policarbonato com material particulado fino

<sup>1</sup> Air Diagnostict, Harrison, EUA

<sup>2</sup> Isopore Membrane Filters Polycarbonate, Millipore, EUA

Analisou-se quimicamente o  $MP_{2,5}$  através do método da espectrometria da fluorescência de raios X por dispersão de energia. Trata-se de uma técnica de resultados quali-quantitativos, não-destrutiva, capaz de determinar as substâncias químicas elementares. A regra geral baseia-se no fato de que ao serem emitidos raios X sobre um elemento, este tende a ejetar elétrons de camadas internas. Para compensar a vacância induzida, elétrons mais externos realizam salto quântico e cada transição eletrônica gera perda de energia atômica, liberada na forma de fótons de raios X, característica e definida para cada elemento. Desse modo, a intensidade de liberação de fótons produz linhas espectrais típicas, correlacionadas à concentração de cada elemento na amostra (Mauad et al., 2008; Maatz et al., 2009).

Utilizou-se o equipamento EDX-700HS<sup>3</sup> para o estudo do  $MP_{2,5}$ , que comporta tubo gerador de raios X de ródio, voltagem de 5 a 50 kV, corrente elétrica de 1 a 1000 A e detector semicondutor Si. O próprio *software* da Shimadzu auxiliou a obtenção dos resultados quantitativos. Vale ressaltar que filtros não expostos também se submeteram a avaliações das espécies químicas presentes e que se selecionou o carbono na forma de policarbonato ( $C_{16}H_6O_3$ ) para o balanço de massa no cálculo das proporções dos elementos nas amostras (Mauad et al., 2008; Maatz et al., 2009).

---

<sup>3</sup> Shimadzu Corporation, Japão

### 3.2. Preparação das suspensões aquosas de MP<sub>2,5</sub>

A extração das partículas dos filtros ocorreu em solução fisiológica por agitação em banho de ultra-som durante 8 horas. Pela diferença entre o peso inicial e o peso final dos filtros após a extração e a secagem em estufa a 50 °C obteve-se a quantidade em massa de MP<sub>2,5</sub> em volume de água pré-determinado, possibilitando a preparação de suspensões aquosas de 250 µg/ml de concentração, armazenadas em microtubos *ependorf* de 1,5 ml e congeladas (Figura 5). Calculou-se a eficiência da extração pela diferença dos pesos dos filtros antes e após o processo (Maatz et al., 2009).



**Figura 5.** Suspensão aquosa de MP<sub>2,5</sub> congelada (250 µg/ml)

### 3.3. Animais

Selecionaram-se do biotério central da FMUSP 20 ratos adultos (*Rattus norvegicus*) da raça *Wistar*, machos, com aproximadamente 90 dias, pesando cerca de 250 gramas. Durante o experimento os animais

permaneceram alojados em gaiolas coletivas (cinco indivíduos) com ração industrializada e água *ad libitum* em ambiente climatizado e umetizado ( $22 \pm 1$  °C e  $50 \pm 10$  % UR) e com ciclo de luz de 12 horas. Obedeceram-se às recomendações biológicas, estabelecidas por guia internacional de cuidado animal (*Institute of Laboratory Animal Resources*, 1996) e por princípios éticos da legislação brasileira e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Dividiram-se os ratos aleatoriamente em dois grupos compostos por 10 animais:

- Grupo Salina: animais submetidos à instilação de 50 µl de solução fisiológica (cloreto de sódio 0,9 %) em cada narina;
- Grupo MP<sub>2,5</sub>: animais submetidos à instilação de 50 µl de suspensão aquosa de MP<sub>2,5</sub> (250 µg/ml) em cada narina.

### 3.4. Instilação nasal

O experimento realizou-se no LPAE do Departamento de Patologia da FMUSP e compreendeu oito semanas consecutivas de instalações nasais de solução fisiológica ou MP<sub>2,5</sub>. Em cada semana promoveram-se três intervenções em dias alternados. Para a execução do procedimento, sedaram-se os animais em caixa de contenção com isoflurano<sup>4</sup> 4%

---

<sup>4</sup> Isothane®, Baxter Hospitalar Ltda, Brasil



vaporizado em 100% de oxigênio (Figura 6). Utilizou-se o auxílio de pipeta calibrada para as instilações (Figura 7).



**Figura 6.** Sedação em caixa de contenção com isoflurano



**Figura 7.** Instilação nasal

**3.5. Análise da frequência cardíaca, variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial sistólica**

Para a análise da FC, VFC e PA anestesiaram-se os ratos com a associação de cloridrato de quetamina<sup>5</sup> (40 mg/kg, IP) e de xilazina<sup>6</sup> (5 mg/kg, IP). Obtiveram-se os dados referentes à FC, à VFC e à PA antes do início do protocolo e ao término de cada semana. Utilizou-se um sistema digital de aquisição de dados<sup>7</sup>, adaptado ao *software* Chart 5 para *Windows*. Acoplaram-se os ratos por meio de sensor insuflável (*cuff*), ajustado na base da cauda dos animais (Figura 8). Avaliou-se a PA três vezes consecutivas. Analisou-se a VFC durante 3 minutos e o método de estudo foi o linear, tanto no domínio do tempo com os índices SDNN e r-MSSD, quanto da frequência com a BF e a AF. Considerou-se a FC média durante os 3 minutos.



**Figura 8.** Cuff caudal

<sup>5</sup> Ketamin-S<sup>®</sup>, Cristália Produtos Farmacêuticos Ltda, Brasil

<sup>6</sup> Rompun<sup>®</sup>, Bayer S.A., Brasil

<sup>7</sup> Powerlab, ADInstruments, Austrália

### 3.6. Avaliação hematológica

A avaliação hematológica realizou-se no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP. Ao final das oito semanas submeteram-se os animais à laparotomia para punção de sangue da aorta abdominal após anestesia com pentobarbital sódico<sup>8</sup> (30 mg/kg, IP). Acondicionaram-se cerca de 3 ml de sangue em frascos com EDTA K3 para a confecção de hemograma com contagem de plaquetas e reticulócitos. Tanto as plaquetas quanto as séries vermelha e branca processaram-se em analisador hematológico<sup>9</sup> (Medeiros et al., 2004).

O princípio da contagem de plaquetas e de hemácias baseou-se na variação da impedância gerada pela passagem das células através de orifício calibrado. Para os leucócitos valeram as alterações de impedância e de difusão de luz de acordo com a estrutura celular interna. Na pesquisa de reticulócitos diluiu-se o sangue total com corante fluorescente (*thiazole orange*) específico para ácidos nucleicos e observou-se a solução com laser óptico. O equipamento forneceu a porcentagem de reticulócitos presentes (Medeiros et al., 2004).

Armazenaram-se amostras adicionais de sangue em frascos com citrato de sódio para a dosagem plasmática de fibrinogênio e a determinação do TTPA e do TP. Usou-se o método de *von Clauss* para a mensuração do fibrinogênio, sendo o tempo de coagulação estabelecido por equipamento

---

<sup>8</sup> Thiopentax®, Cristália Produtos Farmacêuticos Ltda, Brasil

<sup>9</sup> Pentra 120, ABX Diagnostics, França

automático<sup>10</sup> e a concentração de fibrinogênio estimada através de curva padrão. Obtiveram-se tanto o TTPA quanto o TP também por técnica automatizada após a adição no sangue de fosfolípídeo e tromboplastina tecidual respectivamente (Medeiros et al., 2004).

### 3.7. Análise celular do lavado broncoalveolar

Imediatamente após a traqueotomia, canulou-se o órgão e infundiram-se 5 ml de PBS lentamente, com posterior massagem torácica e aspiração do volume injetado. Repetiu-se a infusão mais 2 vezes e centrifugou-se o volume total recuperado (1810 rpm / 10 minutos / 5 °C)<sup>11</sup>. Ressuspendeu-se o *pellet* obtido em PBS e destinaram-se amostras à câmara de Neubauer para a contagem total de células com microscopia óptica em aumento de 400 vezes. A contagem celular diferencial procedeu-se após nova citocentrifugação (450 rpm / 6 minutos / temperatura ambiente) e preparação de lâminas por extensão. Utilizou-se a coloração *Wright-Giemsa* e determinou-se a proporção dos tipos leucocitários sobre a visualização de 200 unidades em aumento de 1000 vezes. Classificaram-se as células em neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos.

---

<sup>10</sup> Trombolyzer Combi, BioMérieux, França

<sup>11</sup> Cytospin 2, Shandon Scientific, USA

### **3.8. Mielograma**

O material medular originou-se dos fêmures esquerdos. Dessas peças anatômicas retiraram-se as epífises e o tecido muscular. Com uma agulha hipodérmica injetou-se lentamente 1 ml de PBS por uma das extremidades do canal diafisário e recuperou-se o lavado resultante pela outra. Centrifugou-se (810 rpm / 10 minutos / 5 °C) e descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o *pellet* formado em 0,5 ml de PBS e prepararam-se lâminas por extensão para a análise microscópica óptica com aumento final de 1000 vezes. Todo o material recebeu a coloração de *Leishman*. A contagem diferencial das células procedeu-se em sistema cego e baseou-se em 200 unidades por lâmina. Classificaram-se as células medulares em granulócitos jovens (mieloblastos, promielócitos, mielócitos, metamielócitos), granulócitos maduros (bastonetes e segmentados), eritroblastos e linfócitos. A avaliação realizou-se no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP.

### **3.9. Histopatologia e análise imuno-histoquímica de arteríolas coronarianas e pulmonares**

Removeram-se os corações e executou-se a fixação dos órgãos através de imersão em solução de formol tamponado 10 % durante 24 horas. Posteriormente seccionaram-se três fragmentos transversais de 2 mm

de espessura, direcionados aos tratamentos de desidratação, diafanização, impregnação e inclusão em parafina, visando à obtenção de preparados histológicos de 3 a 4  $\mu\text{m}$  de espessura. Coraram-se as lâminas resultantes com hematoxilina e eosina (HE) (Rivero et al., 2005b).

Adicionalmente, separaram-se os pulmões, que previamente à fixação semelhante dos corações, sujeitaram-se à injeção intratraqueal da mesma substância sob pressão constante de 20  $\text{cmH}_2\text{O}$ . Excisionaram-se os lobos pulmonares em seu eixo maior, obtendo no total seis fragmentos de 2 mm de espessura, que assim como os cortes cardíacos, submeteram-se aos tratamentos preparatórios para a confecção de lâminas histológicas (Rivero et al., 2005b).

Avaliaram-se os ramos arteriais coronarianos e pulmonares com cerca de 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro e em cortes transversais, ou seja, cada vaso apresentou uma variação inferior a 10 % entre o seu diâmetro máximo e o mínimo. Até o final do estudo todas as lâminas permaneceram codificadas para leitura mascarada (Rivero et al., 2005b). Além das medidas da área luminal e da área da parede (camada muscular), mensuraram-se o perímetro interno (endotélio) e o externo (limite distal da túnica média), em aumento de 400 vezes, com o auxílio do *software* analisador de imagens *Image-Pro® Plus 6.0* para *Windows*<sup>12</sup>, para a avaliação da espessura da camada média, da razão lúmen / parede (L / P) e do índice de vasoconstrição, abaixo descritos (Herculiani et al., 2009):

---

<sup>12</sup> Median Cybernetics, EUA

- Espessura da camada média = área da parede vascular / perímetro externo
- Razão lúmen / parede = área luminal / área da parede vascular
- Índice de vasoconstrição = perímetro interno / raiz quadrada da área luminal

Parte dos fragmentos pulmonares e cardíacos incluídos em bloco de parafina direcionou-se à confecção de cortes histológicos em lâminas silanizadas para o estudo imuno-histoquímico. As recuperações antigênicas para os anticorpos primários anti-15-F<sub>2t</sub>-isoprostano<sup>13</sup> (título 1:500) e anti- $\alpha$ -actina de músculo liso<sup>14</sup> (título 1:3000) fizeram-se, respectivamente, com tripsina<sup>15</sup> 0,25 % em câmara úmida e citrato em alta temperatura.

Procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena com o peróxido de hidrogênio e aplicaram-se o ABCKit Vecstain<sup>16</sup> como segundo anticorpo para o anti-15-F<sub>2t</sub>-isoprostano, e o Envision<sup>17</sup> para a anti- $\alpha$ -actina. Utilizou-se o 3'3 diaminobenzidine<sup>18</sup> como cromógeno e coraram-se posteriormente as lâminas com hematoxilina de *Harris*. Para os controles negativos, omitiu-se o primeiro anticorpo, utilizando em seu lugar o BSA (soro de albumina bovina).

Em microscopia óptica com o aumento de 400 vezes e com o auxílio do programa analisador de imagens, observaram-se o 15-F<sub>2t</sub>-isoprostano na túnica adventícia de arteríolas com cerca de 100  $\mu$ m de diâmetro e a  $\alpha$ -

---

<sup>13</sup> Oxford Biomedical Research, EUA, código IS20

<sup>14</sup> Novocastra Laboratories, Reino Unido, código NCL-SMA

<sup>15</sup> Sigma Chemical, EUA, código T7409

<sup>16</sup> Vector Elite–Vector Laboratories, EUA, código PK-6105

<sup>17</sup> Dako Cytomation, EUA, código K4061

<sup>18</sup> Sigma Chemical, EUA, código D5637

actina na camada muscular de vasos com aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Mensuraram-se o perímetro externo (limite distal), a área total e a área com marcação pelos anticorpos nas respectivas camadas. Avaliou-se o índice de reação dos anticorpos através da relação entre a área marcada pelo anticorpo e a área total (área marcada pelo anticorpo / área total).

### 3.10. Análise estatística

Inicialmente analisaram-se as unidades amostrais de todas as variáveis quantitativas para a verificação do tipo de distribuição através do teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*, juntamente com a avaliação de sua homogeneidade com o teste *Levine*, ambos importantes tanto para a estatística descritiva quanto para a inferencial. O estudo utilizou significância de 5 % e foi auxiliado pelo programa SPSS versão 17.0 para *Windows*. Analisaram-se os resultados do experimento da seguinte maneira:

- FC, VFC e PA: Análise de variância ANOVA para medidas repetidas.
- Demais parâmetros: Teste *t-student*.



## 4. RESULTADOS

---

#### **4.1. Análise elementar das partículas**

Obtiveram-se no total 10 filtros. Comparando-se os pesos dos filtros antes e após a extração, verificou-se que a eficiência do procedimento foi cerca de 80%. A análise elementar das partículas pela espectrometria de fluorescência de raios X por dispersão de energia demonstrou a presença de elementos químicos entre o sódio e o urânio (Tabela 2). O elemento enxofre, relacionado com emissões veiculares, foi o mais representativo, seguido pelo alumínio, sódio, silício e cálcio, correlacionados com fontes antropogênicas e ressuspensão de material do solo.

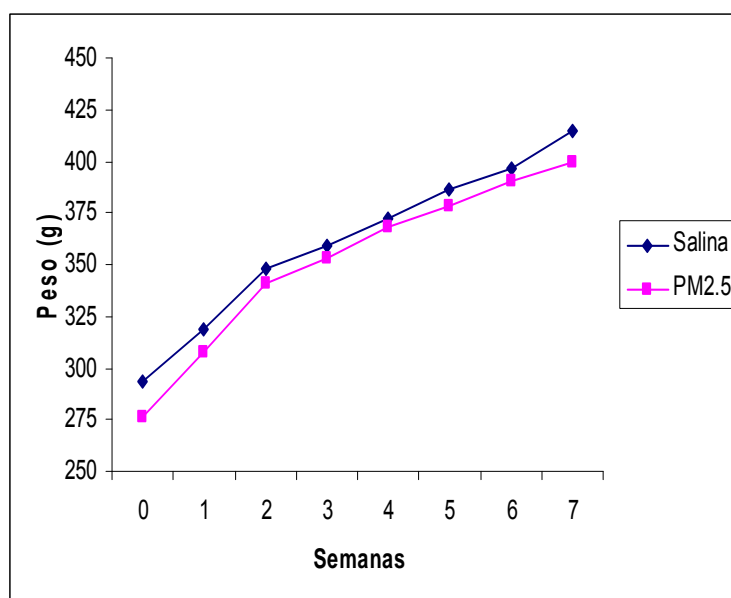
**Tabela 2.** Análise descritiva da composição elementar do MP<sub>2,5</sub> nos filtros

Elemento químico (ppm)	Média (DP)
Enxofre	4805 (2568,4)
Alumínio	4754,07 (1459)
Sódio	3751,43 (2846,16)
Silício	2495,08 (1747,19)
Cálcio	1863,36 (2650,6)
Potássio	1039,28 (813,17)
Ferro	872,76 (1637,92)
Fósforo	311,56 (329,73)
Cobre	83,21 (78,35)
Níquel	40,04 (74,37)
Zinco	31,47 (26,37)
Titânio	15,99 (18,59)
Vanádio	14,93 (23,76)
Chumbo	4,31 (3,86)
Peso dos filtros (mg)	0,48 (0,26)
*Carbono (%)	96,99 (3,54)

Dados apresentados como média e desvio padrão (DP). \*Porcentagem total de carbono (filtro + MP<sub>2,5</sub>).

## 4.2. Animais

Dos vinte animais propostos, um rato do grupo  $MP_{2,5}$  morreu durante a indução anestésica com a associação de cloridrato de quetamina e de xilazina na terceira semana de estudo. Os demais demonstraram crescimento corpóreo e ganho de peso semanal durante o experimento (Figura 9).



**Figura 9.** Valores médios do ganho de peso corpóreo dos animais dos grupos Salina e  $MP_{2,5}$  durante as oito semanas de estudo

## 4.3. Análise da frequência cardíaca, variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial sistólica

Houve aumento significativo da VFC no grupo MP<sub>2,5</sub>, comparado ao grupo Salina, na 7<sup>a</sup> semana em relação à 1<sup>a</sup> semana (pré-instalações), demonstrando interação entre grupo e tempo, de acordo com os resultados obtidos com os índices SDNN, r-MSSD e AF ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3). Nenhuma alteração ocorreu com a FC, a BF e a PA ( $p > 0,05$ ). Os valores individuais de cada animal encontram-se no Anexo.

**Tabela 3.** Análise estatística descritiva da FC, VFC e PA

	GRUPO			
	Salina		MP <sub>2,5</sub>	
	Média (DP)	N	Média (DP)	N
FC 1 (bpm)	282,58 (26,06)	10	274,82 (10,90)	9
FC 2 (bpm)	288,61 (17,07)	10	287,40 (20,41)	9
FC 3 (bpm)	273,02 (19,96)	10	262,04 (16,32)	9
FC 4 (bpm)	284,50 (36,93)	10	289,86 (33,45)	9
FC 5 (bpm)	283,59 (14,97)	10	263,25 (16,52)	9
FC 6 (bpm)	290,05 (31,03)	10	297,13 (34,95)	9
FC 7 (bpm)	276,60 (19,17)	10	295,67 (37,83)	9
FC 8 (bpm)	296,08 (24,82)	10	293,94 (20,77)	9
SDNN 1 (ms)	23,80 (19,65)	10	23,02 (19,05)	9
SDNN 2 (ms)	32,21 (15,53)	10	40,02 (20,17)	9
SDNN 3 (ms)	38,86 (19,01)	10	24,72 (16,01)	9
SDNN 4 (ms)	32,91 (21,08)	10	48,50 (19,05)	9

Continua...

Continuação Tabela 3

SDNN 5 (ms)	36,56 (25,98)	10	41,82 (11,75)	9
SDNN 6 (ms)	45,20 (18,58)	10	43,49 (22,52)	9
SDNN 7 (ms)	24,58 (17,05)	10	# 55,63 (7,42)	9
SDNN 8 (ms)	48,69 (20,25)	10	48,60 (20,18)	9
r-MSSD 1	34,43 (29,27)	10	30,41 (22,99)	9
r-MSSD 2	46,37 (20,26)	10	51,62 (26,24)	9
r-MSSD 3	52,11 (25,08)	10	31,27 (16,93)	9
r-MSSD 4	44,99 (27,87)	10	61,31 (23,73)	9
r-MSSD 5	43,80 (29,35)	10	52,02 (16,85)	9
r-MSSD 6	60,39 (24,62)	10	54,83 (27,53)	9
r-MSSD 7	33,46 (19,27)	10	# 67,67 (9,92)	9
r-MSSD 8	62,00 (24,53)	10	63,99 (23,00)	9
BF 1 (ms <sup>2</sup> )	46,59 (97,09)	10	74,30 (120,68)	9
BF 2 (ms <sup>2</sup> )	101,46 (117,42)	10	217,39 (182,13)	9
BF 3 (ms <sup>2</sup> )	153,12 (156,39)	10	101,27 (137,00)	9
BF 4 (ms <sup>2</sup> )	136,36 (138,30)	10	270,72 (227,22)	9
BF 5 (ms <sup>2</sup> )	231,31 (230,75)	10	192,94 (104,93)	9
BF 6 (ms <sup>2</sup> )	212,43 (169,47)	10	207,32 (170,45)	9
BF 7 (ms <sup>2</sup> )	82,15 (145,07)	10	327,22 (148,03)	9
BF 8 (ms <sup>2</sup> )	260,78 (205,64)	10	266,52 (220,65)	9
AF 1 (ms <sup>2</sup> )	33,96 (68,57)	10	85,64 (157,30)	9
AF 2 (ms <sup>2</sup> )	61,20 (73,55)	10	152,78 (122,69)	9

Continua...

Conclusão Tabela 3

AF 3 (ms <sup>2</sup> )	123,24 (107,33)	10	66,54 (93,06)	9
AF 4 (ms <sup>2</sup> )	95,82 (102,88)	10	168,96 (121,44)	9
AF 5 (ms <sup>2</sup> )	125,42 (130,22)	10	142,48 (72,75)	9
AF 6 (ms <sup>2</sup> )	136,80 (96,93)	10	148,86 (122,54)	9
AF 7 (ms <sup>2</sup> )	67,93 (115,29)	10	#268,66 (140,57)	9
AF 8 (ms <sup>2</sup> )	172,33 (137,53)	10	173,55 (137,81)	9
PA 1 (mmHg)	141,24 (37,89)	10	170,88 (32,12)	9
PA 2 (mmHg)	157,06 (34,15)	10	160,08 (36,81)	9
PA 3 (mmHg)	158,75 (20,31)	10	177,05 (15,83)	9
PA 4 (mmHg)	161,21 (14,58)	10	164,87 (32,71)	9
PA 5 (mmHg)	155,06 (24,06)	10	160,50 (25,50)	9
PA 6 (mmHg)	156,44 (27,95)	10	153,31 (41,07)	9
PA 7 (mmHg)	152,88 (23,00)	10	152,95 (22,68)	9
PA 8 (mmHg)	159,41 (20,76)	10	160,83 (34,48)	9

1ª semana: pré-instalações. Dados apresentados como média e desvio padrão (DP). # MP<sub>2,5</sub> ≠ Salina (p < 0.05).

#### 4.4. Avaliação hematológica

O hemograma com contagem de plaquetas e reticulócitos, a dosagem plasmática de fibrinogênio, o TTPA e o TP não demonstraram diferenças entre os grupos (p > 0,05) (Tabela 4). Os valores individuais de cada animal encontram-se no Anexo.

**Tabela 4.** Análise estatística descritiva dos parâmetros hematológicos

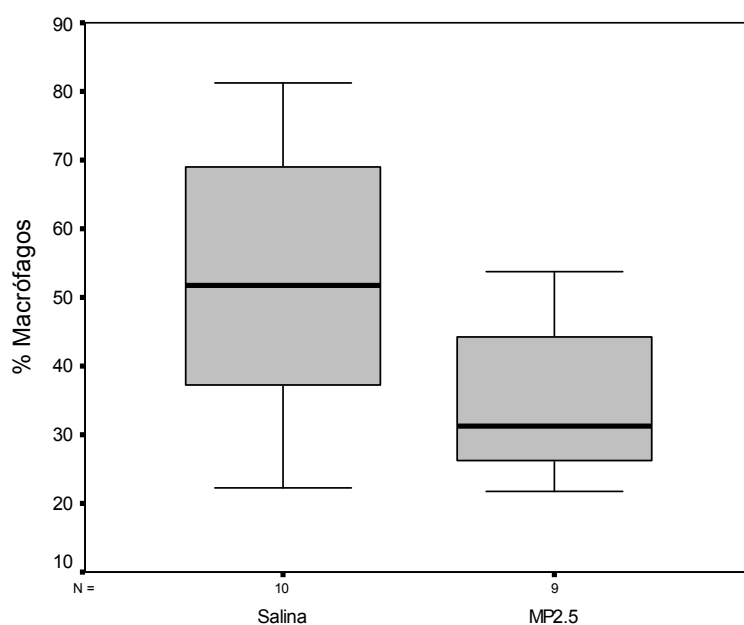
	GRUPO			
	Salina		MP <sub>2,5</sub>	
	Média (DP)	N	Média (DP)	N
Eritrócitos (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	8,34 (0,34)	10	8,38 (0,39)	9
Hemoglobina (g/dL)	14,46 (0,65)	10	14,44 (0,78)	9
Hematócrito (%)	43,31 (1,79)	10	42,74 (2,07)	9
VCM (fL)	51,93 (1,41)	10	50,98 (1,12)	9
HCM (pg)	17,33 (0,44)	10	17,22 (0,50)	9
CHCM (g/dL)	33,40 (1,02)	10	33,81 (1,49)	9
Leucócitos (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	4,99 (2,26)	10	4,18 (1,75)	9
Neutrófilos (%)	21,11 (5,21)	10	23,88 (7,40)	9
Eosinófilos (%)	0,40 (0,51)	10	1,22 (1,48)	9
Basófilos (%)	0,20 (0,63)	10	0	9
Linfócitos (%)	71,40 (5,77)	10	68,77 (7,74)	9
Monócitos (%)	6,1 (1,72)	10	5,66 (2,06)	9
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	879,20 (119,75)	10	928,00 (93,39)	9
Reticulócitos (%)	2,90 (0,73)	10	2,47 (0,80)	9
Fibrinogênio (mg/dL)	150,50 (30,36)	10	146,55 (12,81)	9
TP (s)	11,5 (0)	10	11,5 (0)	9
TTPA (s)	19,9 (0,31)	10	22,28 (7,85)	9

Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

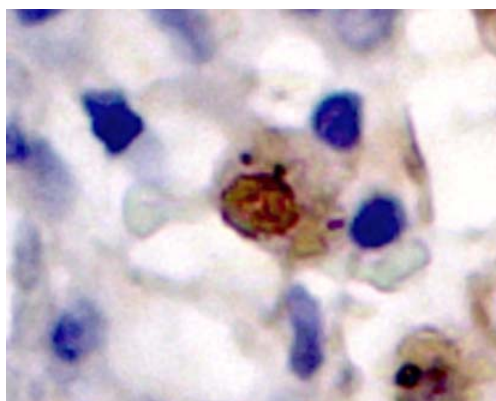


#### 4.5. Análise celular do lavado broncoalveolar

Não houve diferença na contagem total de leucócitos entre os grupos ( $p > 0,05$ ). A porcentagem de macrófagos do grupo  $MP_{2,5}$  foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) (Figura 10 e 11). As porcentagens de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos não se diferenciaram ( $p > 0,05$ ) (Tabela 5). Os valores individuais de cada animal encontram-se no Anexo.



**Figura 10.** Média e desvio padrão da porcentagem de macrófagos no LBA



**Figura 11.** Macrófago alveolar com material particulado fagocitado (aumento 1000x)

**Tabela 5.** Análise estatística descritiva das células do LBA

	GRUPO			
	Salina		MP <sub>2,5</sub>	
	Média (DP)	N	Média (DP)	N
Leucócitos totais (10 <sup>5</sup> /ml)	70,00 (53,59)	10	75,55 (68,16)	9
Macrófagos (%)	51,63 (20,24)	10	*35,07 (10,90)	9
Linfócitos (%)	7,33 (6,02)	10	10,18 (7,49)	9
Eosinófilos (%)	1,23 (3,20)	10	1,48 (1,51)	9
Neutrófilos (%)	39,80 (22,48)	10	53,25 (11,62)	9

Dados apresentados como média e desvio padrão (DP). \* MP<sub>2,5</sub> ≠ Salina (p < 0.05).

#### 4.6. Mielograma

A avaliação celular da medula óssea não constatou diferenças entre as porcentagens de granulócitos jovens, granulócitos maduros, linfócitos e eritroblastos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 6). Os valores individuais de cada animal encontram-se no Anexo.

**Tabela 6.** Análise estatística descritiva do mielograma

	GRUPO			
	Salina		MP <sub>2.5</sub>	
	Média (DP)	N	Média (DP)	N
Granulócitos jovens (%)	10,10 (8,90)	10	8,00 (5,38)	9
Granulócitos maduros (%)	40,10 (12,67)	10	38,78 (8,81)	9
Linfócitos (%)	21,00 (8,53)	10	24,67 (6,08)	9
Eritroblastos (%)	10,80 (7,58)	10	13,11 (8,83)	9

Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

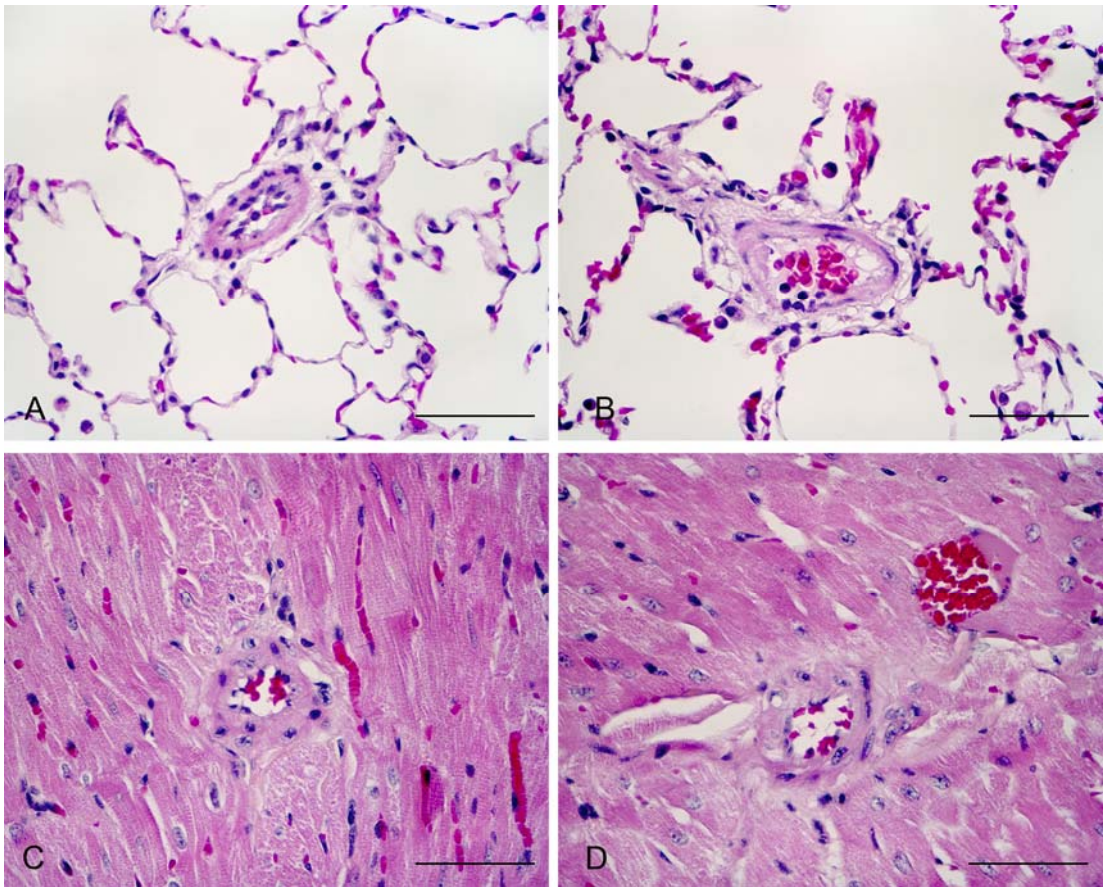
#### 4.7. Histopatologia e análise imuno-histoquímica de arteríolas coronarianas e pulmonares

Não houve diferenças entre os resultados da histopatologia e da análise imuno-histoquímica das arteríolas coronarianas e pulmonares ( $p > 0,05$ ) (Tabela 7) (Figuras 12-14). Os valores individuais de cada animal encontram-se no Anexo.

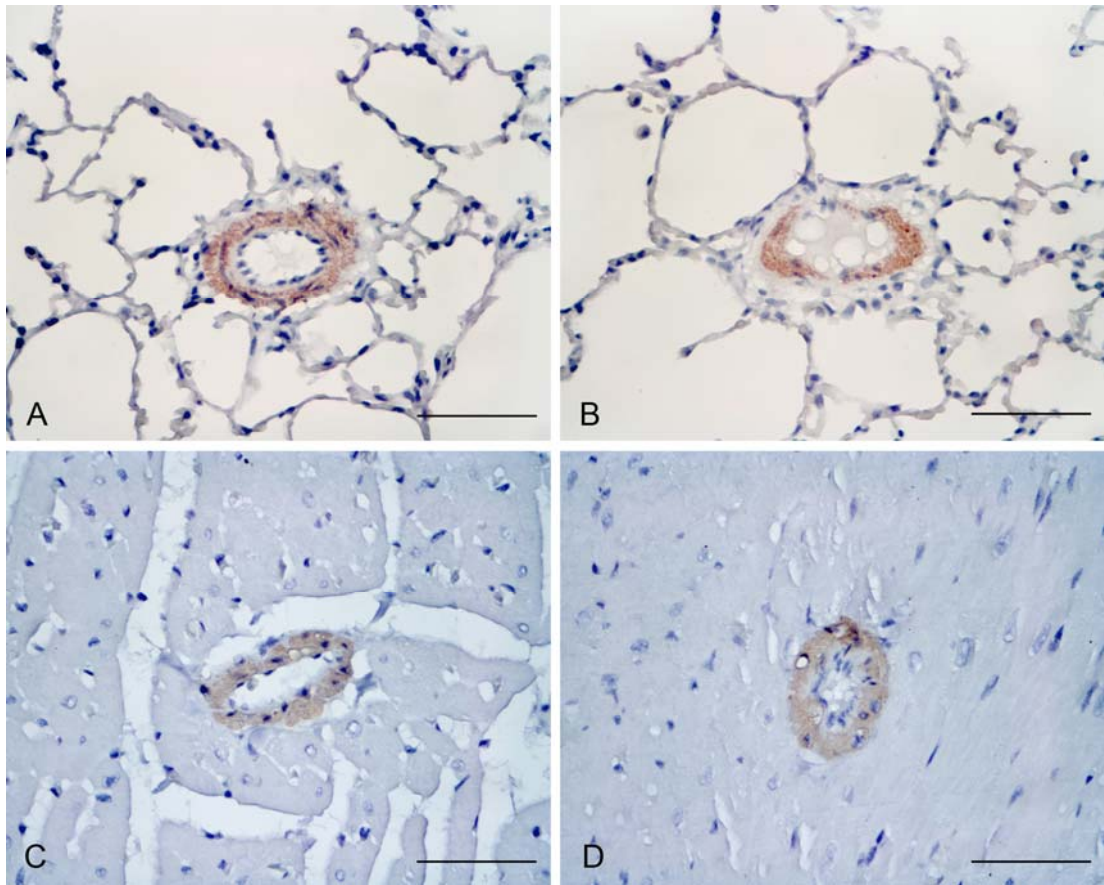
**Tabela 7.** Análise estatística descritiva das medidas morfométricas das arteríolas coronarianas e pulmonares

	GRUPO			
	Salina		MP <sub>2,5</sub>	
	Média (DP)	N	Média (DP)	N
Espessura da camada muscular AC ( $\mu\text{m}$ )	5,99 (0,77)	10	5,52 (0,73)	8
Razão L/P AC	0,48 (0,14)	10	0,55 (0,17)	8
Índice de vasoconstrição AC	4,69 (0,54)	10	4,84 (0,42)	8
Índice de reação do 15-F <sub>2t</sub> -isoprostano AC	0,08 (0,05)	10	0,08 (0,06)	9
Índice de reação da $\alpha$ -actina AC	0,25 (0,09)	10	0,27 (0,11)	9
Espessura da camada muscular AP ( $\mu\text{m}$ )	4,55 (1,17)	10	4,64 (0,61)	9
Razão L/P AP	1,07 (0,55)	10	0,90 (0,27)	9
Índice de vasoconstrição AP	4,46 (0,24)	10	4,41 (0,28)	9
Índice de reação do 15-F <sub>2t</sub> -isoprostano AP	0,05 (0,02)	10	0,04 (0,03)	9
Índice de reação da $\alpha$ -actina AP	0,18 (0,11)	10	0,17 (0,09)	9

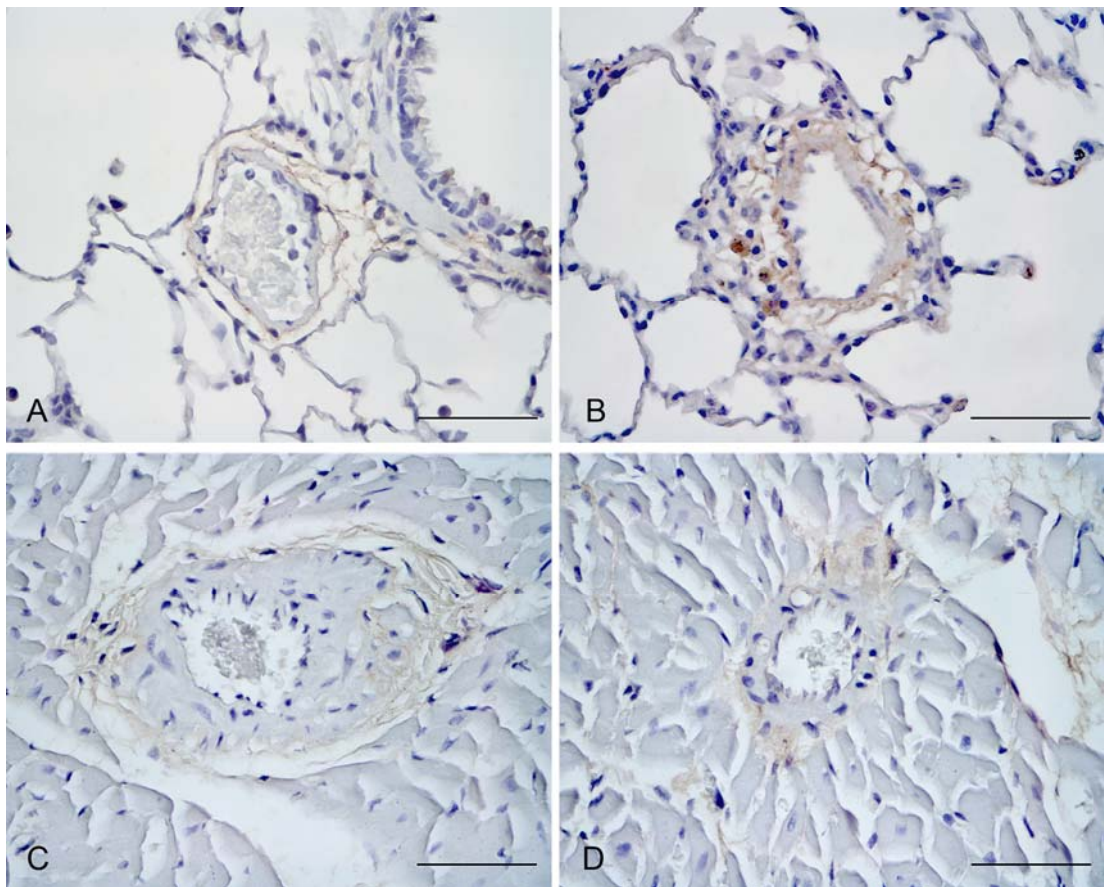
Legenda – AC: arteríolas coronarianas; AP: arteríolas pulmonares. Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).



**Figura 12.** Arteriolas pulmonares e coronarianas. HE. **A.** Arteriola pulmonar (grupo Salina). **B.** Arteriola pulmonar (grupo MP<sub>2,5</sub>). **C.** Arteriola coronariana (grupo Salina). **D.** Arteriola coronariana (grupo MP<sub>2,5</sub>). Barra de escala = 50 $\mu$ m (aumento 400x).



**Figura 13.** Arteriolas pulmonares e coronarianas. Marcação em camada média de  $\alpha$ -actina. **A.** Arteriola pulmonar (grupo Salina). **B.** Arteriola pulmonar (grupo MP<sub>2,5</sub>). **C.** Arteriola coronariana (grupo Salina). **D.** Arteriola coronariana (grupo MP<sub>2,5</sub>). Barra de escala = 50 $\mu$ m (aumento 400x).



**Figura 14.** Arteriolas pulmonares e coronarianas. Marcação em túnica adventícia de 15-F<sub>2t</sub>-isoprostano. **A.** Arteriola pulmonar (grupo Salina). **B.** Arteriola pulmonar (grupo MP<sub>2,5</sub>). **C.** Arteriola coronariana (grupo Salina). **D.** Arteriola coronariana (grupo MP<sub>2,5</sub>). Barra de escala = 50µm (aumento 400x).

## 5. DISCUSSÃO

---



A inflamação pulmonar, caracterizada entre outras maneiras pela presença de maior quantidade de células inflamatórias locais, foi observada de forma discreta através da análise citológica do LBA. O grupo MP<sub>2,5</sub> apresentou menor porcentagem de macrófagos e tendência a maior proporção de neutrófilos, indicando migração celular e atividade pró-inflamatória, como demonstradas em trabalhos agudos com animais (Li et al., 1997; Rice et al., 2001; Nemmar et al., 2003; Nemmar et al., 2004; Wichers et al., 2004b; Harder et al., 2005; Yokota et al., 2008; Mantecca et al., 2009; Nemmar et al., 2009). Atribuiu-se como causa possível desse processo a somatória dos metais de transição presentes frequentemente correlacionados como o alumínio, o enxofre, o ferro, o níquel, o vanádio, o zinco, o cobre e o chumbo (Grabowski et al., 1999; Rice et al., 2001; Ghio et al., 2002; Saldiva et al., 2002; Alfaro-Moreno et al., 2007; Franklin et al., 2008), além da hipótese de contribuição de estruturas organizadas não avaliadas como o carbono orgânico (Saldiva et al., 2002).

Apesar de presente, esse achado parece não ter extrapolado os limites pulmonares de modo perceptível em função provavelmente de sua tenuidade. O leucograma e a análise quantitativa das plaquetas não revelaram alterações significativas, como observado em relatos de exposição aguda de animais (Gardner et al., 2000; Goto et al., 2004; Reed et al., 2004; Upadhyay et al., 2008; Nemmar et al., 2009) e pessoas (Tan et al.,

2000; van Eeden e Hogg, 2002; van Eeden et al., 2005; Bräuner et al., 2008). O eritrograma, a contagem de reticulócitos e o mielograma também não evidenciaram modificações, sugerindo que nem os metais de transição, nem a hipóxia da instilação nasal ou as citocinas geradas na inflamação pulmonar estimularam tanto a proliferação e a liberação aumentada de eritrócitos e de seus precursores, como referidas em estudos agudos com ratos (Medeiros et al., 2004; Rivero et al., 2005b) e pessoas (Bräuner et al., 2008); quanto de células inflamatórias, opondo-se aos indícios de reação medular, observados em outras pesquisas (Tan et al., 2000; van Eeden e Hogg, 2002; Goto et al., 2004; van Eeden et al., 2005).

Na escolha da concentração da suspensão, considerou-se que o montante de MP<sub>2,5</sub> instilado em cada animal corresponderia hipoteticamente ao que seria depositado em seus pulmões durante 24 horas de inalação natural na região do estudo, que apresentou média anual aproximada de 22 µg/m<sup>3</sup> segundo a CETESB. Supondo-se que a ventilação pulmonar de um rato adulto em repouso é cerca de 200 ml/min, a quantidade estimada de MP<sub>2,5</sub> inalado diariamente seria 6,5 µg e 364 µg em 8 semanas (Maatz et al., 2009). Sendo assim, teoricamente cada animal recebeu quase 50% a mais de partículas (600 µg), comparado ao que inalaria em 8 semanas, sem descontar possíveis perdas com retenção em vias aéreas, deglutição e espirros.

A quantidade total de partículas utilizada nesse experimento está relacionada a marcantes efeitos inflamatórios pulmonares e sistêmicos em avaliações agudas após 24 horas (Harder et al., 2001; Goto et al., 2004;

Medeiros et al., 2004; Nemmar et al., 2004; Harder et al., 2005; Mantecca et al., 2009). Mesmo quando administradas por meio de instilação nasal em doses baixas e fornecidas aos animais de modo fracionado em oito semanas de acompanhamento, as partículas finas que alcançaram o parênquima pulmonar foram capazes de desencadear reações inflamatórias sutis. Esse fato desperta atenção no que se refere às consequências da exposição contínua de indivíduos ao  $MP_{2,5}$  durante suas vidas.

Apesar da não detecção de alterações na FC e na PA, descritas também em avaliação crônica de camundongos saudáveis (Lippmann et al., 2005) e tendencialmente oposta em estudos subcrônico e crônico com ratos hipertensos (Cheng et al., 2003; Chang et al., 2004), os resultados encontrados nesse estudo pelos registros eletrocardiográficos de 3 minutos de duração demonstraram aumento da VFC através dos índices SDNN, r-MSSD e AF na 7ª semana no grupo  $MP_{2,5}$  em relação à 1ª semana e ao grupo Salina, evidenciando influência das partículas no sistema cardíaco autonômico e mais particularmente no componente parassimpático dos animais.

Considerou-se que o aumento da VFC nesse caso representou, possivelmente, um mecanismo compensatório a uma injúria constante e/ou um indício inicial de desequilíbrio autonômico ou disautonomia, assim como observado em estudo crônico com camundongos (Chen e Hwang, 2005); mais relacionado à atuação direta das partículas em receptores pulmonares específicos e menos à intermediação indireta de citocinas resultantes do estresse oxidativo e/ou da inflamação pulmonar e às UF, devido à magnitude

da inflamação pulmonar e à tendência de coalescência das nanopartículas, respectivamente.

No que diz respeito à confiabilidade do sistema de aquisição digital de dados por meio de *cuff* caudal e à necessidade de anestesia dos animais para a obtenção dessas informações, pode-se afirmar que o método automatizado apresenta credibilidade no estudo do eletrocardiograma, sendo utilizado e reconhecido em diversas pesquisas. No entanto, sabe-se que existe técnica com maior poder de precisão, a telemetria, capaz de avaliar os animais em estado alerta; mas é preciso levar em consideração que também há a possibilidade de óbito durante a intervenção cirúrgica para a implantação do micro-eletrôdo e que o custo financeiro dessa metodologia é elevado.

A respeito da homeostase sanguínea, os resultados da contagem das unidades plaquetárias e dos testes utilizados para averiguar a funcionalidade da cascata de coagulação (TTPA, TP e fibrinogênio plasmático) não demonstraram diferenças significativas entre os grupos, acordando com ensaios de exposição aguda de animais ao MP concentrado (Gardner et al., 2000; Nadziejko et al., 2002a; Nemmar et al., 2004; Harder et al., 2005; Rivero et al., 2005b) e de pessoas a concentrações ambientais (Bräuner et al., 2008; Bonzini et al., 2009), indicando que sob o protocolo experimental utilizado não há alteração numérica das plaquetas nem modificação da eficiência das reações cadenciadas da coagulação. A ausência de tendência pró-trombótica pode estar relacionada à concentração das partículas utilizada e também ao discreto processo inflamatório desencadeado.

A análise morfométrica das arteríolas não detectou alterações significativas na razão L/P e no índice de vasoconstrição tanto para os vasos coronarianos quanto para os pulmonares, desacordando com relatos de sinais de vasoconstrição tanto após a exposição aguda e crônica em alta concentração (Batalha et al., 2002; Rivero et al., 2005b; Sun et al., 2005), quanto após a subcrônica e a crônica em baixa concentração de MP<sub>2,5</sub> em roedores (Akinaga et al., 2009; Matsumoto et al., 2010). Em adição a camada média também não apresentou diferença considerável, como relatado em estudo crônico com camundongos (Lemos et al., 2006; Akinaga et al., 2009), inclusive com a avaliação imuno-histoquímica com o anticorpo  $\alpha$ -actina de músculo liso.

Vale ressaltar, no entanto, discreta tendência do grupo MP<sub>2,5</sub> à diminuição da razão L/P e ao aumento da espessura da camada média das arteríolas pulmonares de menor calibre, sugerindo hipoteticamente sinais de disfunção e reatividade vascular. Sabe-se que frente a estímulos injuriantes de diferentes naturezas, a rede vascular pulmonar é passível de sofrer alterações compensatórias, conhecidas como remodelamento patológico da circulação e de caráter pró-trombótico (Aiello, 2005; Barreto et al., 2005; Janssen, 2008). Acredita-se que possivelmente a duração do protocolo foi fator decisivo para a ausência de detecção do espessamento da camada muscular, já que as avaliações em estudos prévios com camundongos expostos a concentrações ambientais de MP<sub>2,5</sub> ocorreram após 4 meses (Lemos et al., 2006; Akinaga et al., 2009).

Com relação à análise imuno-histoquímica com o anticorpo 15-F<sub>2t</sub>-isoprostano nas porções mais distais da túnica média e na camada adventícia das arteríolas também não se demonstraram evidências de estresse oxidativo. Esse achado vai contra indícios do fenômeno previamente obtidos (Ghio et al., 2002; Sorensen et al., 2003; Choi et al., 2004; Rhoden et al., 2004; Pereira et al., 2007; Huang et al., 2009; Lopes et al., 2009), relacionados à presença de metais de transição solúveis presentes no MP<sub>2,5</sub> e de partículas ultrafinas (Donaldson et al., 2001; Sorensen et al., 2003; Huang et al., 2009); mas de forma condizente com a resposta inflamatória pulmonar induzida.

No referente às técnicas de coleta, análise dos elementos químicos e preparação das suspensões aquosas de MP<sub>2,5</sub>, já adotadas pelo LPAE em pesquisas prévias (Rivero et al., 2005b; Mauad et al., 2008; Maatz et al., 2009), não se demonstraram intercorrências. A eficiência de 80% da extração das partículas dos filtros foi semelhante a estudo anterior (Rivero et al., 2005b). Em relação à análise elementar das partículas, os elementos químicos encontrados em maior quantidade (enxofre, alumínio, silício e cálcio) condizem com o esperado para o local da amostragem (fontes antropogênicas e ressuspensão de material do solo) (Mauad et al., 2009). Estruturas consideradas pró-inflamatórias também estiveram presentes (ferro, níquel, vanádio, zinco, cobre e chumbo) (Grabowski et al., 1999; Rice et al., 2001; Ghio et al., 2002; Alfaro-Moreno et al., 2007).

Atribuiu-se a morte de um dos animais durante o experimento com a técnica de aplicação intraperitoneal e não com a associação anestésica em

si, e apesar das constantes manipulações, sedações e anestésias, os ratos continuaram se alimentando e ganhando peso semanalmente em ambos os grupos, sugerindo que a dose semanal de exposição ao MP<sub>2,5</sub> também não interferiu nesse parâmetro. A contenção química dos animais para a execução do protocolo experimental foi fundamental, e a associação de cloridrato de xilazina e quetamina satisfatórios pelo seu efeito de duração relativamente curto.

Sem dúvida as principais limitações desse trabalho foram a forma de exposição às partículas através da instilação nasal e a impossibilidade de se determinar com precisão qual a quantidade de MP<sub>2,5</sub> que realmente se forneceu aos animais, levando-se em consideração às perdas inerentes ao protocolo. No entanto, o que se pode aferir com certa segurança é que essas partículas atingiram o parênquima pulmonar em concentrações baixas e muito próximas às condições ambientais reais do dia a dia; e mais, induziram alterações no sistema cardio-respiratório de animais hígidos em apenas 8 semanas de estudo. Portanto, apesar de não ser ideal, o modelo de instalação nasal apresentou certa sensibilidade.

Um ponto vantajoso que deve ser citado foi a escolha e a utilização de ratos nesse estudo, pois essa espécie permitiu a coleta de sangue em volume suficiente para a realização de provas hematológicas de triagem, para a avaliação da inflamação sistêmica e da coagulabilidade do sangue, já alteradas em estudos toxicológicos agudos de instilação traqueal de suspensão aquosa de MP<sub>2,5</sub> realizados pelo LPAE (Medeiros et al., 2004; Rivero et al., 2005).

Por fim é preciso salientar que apesar dos estudos epidemiológicos se basearem em dados diversificados e muitas vezes não uniformizados, eles convergem suas informações no sentido de que a poluição atmosférica interfere no sistema respiratório e cardiovascular, principalmente no que diz respeito ao  $MP_{2,5}$ . Os resultados aqui obtidos com a proposta experimental reforçam essa tendência e alertam sobre a influência das partículas no organismo, mesmo em concentrações relativamente baixas. Pesquisas adicionais de exposição e acompanhamento prolongado necessitam ser realizadas, a fim de que a importância da exposição a longo prazo ao  $MP_{2,5}$  sobre a saúde seja esclarecida, uma vez que as fontes poluidoras não podem ser eliminadas e os indivíduos estarão expostos a elas durante toda a sua vida.



## 6. CONCLUSÃO

---

Concluiu-se que a exposição subcrônica de oito semanas de ratos saudáveis, através de repetidas instilações nasais de suspensão aquosa de MP<sub>2,5</sub> em concentração ambiental, preparada com partículas atmosféricas da cidade de São Paulo:

- Causou inflamação pulmonar tênue através da diminuição do número de macrófagos e da tendência ao aumento quantitativo de neutrófilos no grupo MP<sub>2,5</sub> em relação ao grupo Salina;
- Alterou o equilíbrio cardíaco autonômico pelo aumento da VFC, manifestado pelos índices SDNN, r-MSSD e AF no grupo MP<sub>2,5</sub> em relação ao grupo Salina;
- Não modificou a FC e a PA;
- Não ocasionou alterações nos parâmetros hematológicos e no mielograma;
- Não desencadeou alterações nas pequenas arteríolas pulmonares e coronarianas.



**Tabela 8.** Análise descritiva da FC dos animais do grupo Salina (bpm)

	<b>Semanas</b>							
	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>	<b>S6</b>	<b>S7</b>	<b>S8</b>
Rato 1	336,82	311,48	294,46	309,82	299,06	280,33	295,16	274,74
Rato 2	299,15	290,85	293,91	307,31	274,82	252,26	273,23	282,60
Rato 3	285,94	310,56	255,33	267,03	283,86	285,03	274,45	266,25
Rato 4	277,13	279,14	302,82	331,84	295,21	266,55	275,87	314,04
Rato 5	238,20	289,03	285,21	281,80	272,07	274,61	259,99	275,27
Rato 6	253,89	288,27	266,87	256,73	287,18	295,19	291,31	308,05
Rato 7	281,33	303,41	249,29	337,12	302,15	289,97	283,72	324,61
Rato 8	281,96	267,02	247,53	217,67	290,98	275,48	232,30	340,03
Rato 9	281,20	286,63	271,03	266,34	252,02	318,42	296,43	276,88
Rato 10	290,24	259,75	263,76	269,34	278,63	362,74	283,59	298,34
Média (DP)	282,58 (26,06)	288,61 (17,07)	273,02 (19,96)	284,50 (36,93)	283,59 (14,97)	290,05 (31,03)	276,60 (19,17)	296,08 (24,82)

Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

**Tabela 9.** Análise descritiva da FC dos animais do grupo MP<sub>2,5</sub> (bpm)

	Semanas							
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Rato 11	270,18	293,03	239,66	280,18	251,08	297,55	278,41	273,57
Rato 12	258,38	250,38	275,95	330,59	294,53	319,41	364,75	331,30
Rato 13	262,43	286,13	262,69	312,69	253,86	262,60	273,27	322,92
Rato 14	283,60	302,18	249,98	285,97	255,49	269,76	273,27	293,83
Rato 15	272,04	317,42	283,26	349,10	278,97	295,77	356,75	287,16
Rato 16	274,34	285,48	261,37	271,41	249,02	258,19	271,76	271,66
Rato 17	290,16	306,54	266,01	266,14	252,23	285,00	273,28	286,96
Rato 18	273,86	275,11	239,56	258,65	279,50	370,10	297,79	298,03
Rato 19	288,41	270,39	279,93	254,09	254,58	315,82	271,78	280,05
Média (DP)	274,82	287,40	262,04	289,86	263,25	297,13	295,67	293,94
	(10,90)	(20,41)	(16,32)	(33,45)	(16,52)	(34,95)	(37,83)	(20,77)

Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

**Tabela 10.** Análise descritiva do SDNN dos animais do grupo Salina (ms)

	Semanas							
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Rato 1	3,91	14,11	8,64	4,72	3,92	31,15	8,46	5,24
Rato 2	58,04	6,33	27,19	8,33	42,52	6,15	30,18	48,85
Rato 3	38,34	21,31	37,40	46,91	45,08	66,68	4,75	18,83
Rato 4	9,52	41,66	69,65	57,39	58,03	44,31	56,90	58,61
Rato 5	23,39	29,11	14,09	17,55	53,68	34,25	45,34	60,33
Rato 6	22,76	41,16	38,41	12,53	11,04	36,46	34,05	62,00
Rato 7	14,04	51,87	36,88	60,49	64,53	54,20	11,28	62,03
Rato 8	53,13	54,30	57,82	28,24	69,32	57,27	25,07	62,56
Rato 9	8,66	31,17	54,82	47,45	15,77	63,29	13,37	48,30
Rato 10	6,23	31,15	43,74	45,57	1,75	58,33	16,44	60,21
Média (DP)	23,80 (19,65)	32,21 (15,53)	38,86 (19,01)	32,91 (21,08)	36,56 (25,98)	45,20 (18,58)	24,58 (17,05)	48,69 (20,25)

Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

**Tabela 11.** Análise descritiva do SDNN dos animais do grupo MP<sub>2,5</sub> (ms)

	Semanas							
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Rato 11	4,09	29,82	19,09	62,25	49,03	61,50	62,37	59,04
Rato 12	37,83	34,95	24,10	63,80	51,95	67,96	58,97	65,61
Rato 13	59,30	47,00	3,66	62,08	36,34	42,18	49,40	57,25
Rato 14	27,59	54,61	8,80	23,28	38,38	52,84	49,40	61,83
Rato 15	13,67	68,88	43,01	64,62	57,30	64,34	62,00	17,19
Rato 16	36,29	16,78	26,46	24,64	40,40	13,41	42,56	33,46
Rato 17	4,03	6,46	27,44	32,52	20,47	17,75	53,96	17,22
Rato 18	20,27	58,92	15,37	68,33	51,58	57,25	56,87	62,72
Rato 19	4,11	42,81	54,57	34,96	31,00	14,24	65,15	63,16
Média (DP)	23,02 (19,05)	40,02 (20,17)	24,72 (16,01)	48,50 (19,05)	41,82 (11,75)	43,49 (22,52)	55,63 (7,42)	48,60 (20,18)

Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

**Tabela 12.** Análise descritiva da r-MSSD dos animais do grupo Salina

	<b>Semanas</b>							
	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>	<b>S6</b>	<b>S7</b>	<b>S8</b>
Rato 1	5,03	24,35	14,44	7,97	5,44	46,61	13,67	6,19
Rato 2	97,75	10,09	47,39	14,02	65,42	10,23	50,85	83,96
Rato 3	62,81	30,50	39,41	78,25	46,81	99,55	5,95	30,53
Rato 4	18,61	56,73	99,03	79,46	62,32	64,21	65,52	66,45
Rato 5	32,76	42,46	23,82	30,37	60,84	38,88	48,36	65,97
Rato 6	34,06	68,99	50,96	17,02	16,08	60,37	50,17	81,83
Rato 7	15,08	68,85	39,97	73,10	73,33	58,40	19,50	71,95
Rato 8	54,25	68,16	61,71	31,59	81,71	71,05	31,04	77,15
Rato 9	13,46	50,46	69,89	57,29	23,31	82,21	22,40	68,97
Rato 10	10,53	43,17	74,49	60,85	2,83	72,46	27,16	67,03
Média (DP)	34,43 (29,27)	46,37 (20,26)	52,11 (25,08)	44,99 (27,87)	43,80 (29,35)	60,39 (24,62)	33,46 (19,27)	62,00 (24,53)

Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).



**Tabela 13.** Análise descritiva da r-MSSD dos animais do grupo MP<sub>2,5</sub>

	Semanas							
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Rato 11	6,91	48,33	31,59	78,75	62,15	72,54	72,54	90,77
Rato 12	39,89	37,94	36,53	85,20	58,24	90,86	80,97	87,85
Rato 13	67,90	54,90	5,10	73,09	44,72	44,68	56,02	62,40
Rato 14	44,12	62,93	11,87	35,32	50,17	57,11	56,02	74,47
Rato 15	22,04	94,69	48,76	85,41	85,92	87,37	79,29	29,22
Rato 16	56,38	27,85	29,90	28,64	45,86	19,25	55,28	52,72
Rato 17	5,45	9,48	36,38	44,88	29,45	27,90	71,86	28,54
Rato 18	25,10	82,40	22,05	81,48	58,09	71,09	66,48	75,65
Rato 19	5,97	46,13	59,32	39,08	33,58	22,71	70,57	74,31
Média (DP)	30,41 (22,99)	51,62 (26,24)	31,27 (16,93)	61,31 (23,73)	52,02 (16,85)	54,83 (27,53)	67,67 (9,92)	63,99 (23,00)

Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

**Tabela 14.** Análise descritiva da BF dos animais do grupo Salina (ms<sup>2</sup>)

	Semanas							
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Rato 1	0,73	0,19	0,60	0,18	0,19	61,89	0,26	0,54
Rato 2	33,10	0,20	1,57	0,24	72,97	1,19	1,05	6,00
Rato 3	40,43	35,84	189,11	59,43	307,67	237,20	0,31	1,85
Rato 4	0,41	219,61	230,10	243,44	480,65	108,87	372,17	374,43
Rato 5	18,07	23,29	0,60	0,86	445,16	141,23	335,16	508,41
Rato 6	26,01	22,77	150,76	0,06	2,43	38,10	58,85	319,97
Rato 7	25,74	275,10	187,67	296,77	476,45	424,30	0,34	460,69
Rato 8	319,64	279,07	495,02	149,64	507,65	485,07	51,07	242,70
Rato 9	1,53	7,36	249,41	287,38	19,92	362,64	1,60	191,44
Rato 10	0,33	151,21	26,36	319,69	0,08	263,84	0,69	501,79
Média (DP)	46,59 (97,09)	101,46 (117,42)	153,12 (156,39)	136,36 (138,30)	231,31 (230,75)	212,43 (169,47)	82,15 (145,07)	260,78 (205,64)

Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

**Tabela 15.** Análise descritiva da BF dos animais do grupo MP<sub>2,5</sub> (ms<sup>2</sup>)

	Semanas							
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Rato 11	0,44	19,33	2,59	404,62	260,40	462,65	386,33	173,33
Rato 12	164,93	127,05	24,64	295,02	341,72	345,89	197,56	300,17
Rato 13	361,94	251,06	0,48	400,27	147,54	169,82	340,32	448,09
Rato 14	18,98	427,56	2,94	7,18	109,73	273,30	340,32	586,36
Rato 15	7,59	435,00	317,98	315,21	177,21	356,41	250,18	0,39
Rato 16	80,27	4,66	85,00	64,23	199,62	15,37	186,99	42,55
Rato 17	0,53	0,45	105,48	61,95	40,89	3,45	247,32	1,18
Rato 18	33,85	352,21	23,29	726,89	344,38	234,00	318,66	379,34
Rato 19	0,24	339,27	349,05	161,14	114,98	5,00	677,36	467,28
Média (DP)	74,30	217,39	101,27	270,72	192,94	207,32	327,22	266,52
	(120,68)	(182,13)	(137,00)	(227,22)	(104,93)	(170,45)	(148,03)	(220,65)

Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

**Tabela 16.** Análise descritiva da AF dos animais do grupo Salina (ms<sup>2</sup>)

	Semanas							
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Rato 1	0,09	0,56	0,30	0,13	0,08	31,07	0,34	0,23
Rato 2	38,09	0,32	3,57	0,27	33,17	0,45	3,35	11,42
Rato 3	22,37	20,02	201,40	49,88	164,32	190,25	0,15	2,61
Rato 4	0,17	81,84	186,66	182,40	303,83	123,67	323,09	302,19
Rato 5	9,75	30,56	0,54	1,75	191,54	96,46	232,58	276,06
Rato 6	24,12	34,70	120,18	6,47	1,66	36,10	72,41	216,20
Rato 7	18,37	155,30	186,35	294,03	218,99	246,56	0,22	356,19
Rato 8	225,59	221,15	293,59	94,90	323,41	289,34	45,18	254,25
Rato 9	0,86	5,45	209,48	195,09	17,22	150,23	0,66	65,39
Rato 10	0,22	62,18	30,39	133,33	0,03	203,87	1,33	238,78
Média (DP)	33,96 (68,57)	61,20 (73,55)	123,24 (107,33)	95,82 (102,88)	125,42 (130,22)	136,80 (96,93)	67,93 (115,29)	172,33 (137,53)

Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

**Tabela 17.** Análise descritiva da AF dos animais do grupo MP<sub>2,5</sub> (ms<sup>2</sup>)

	<b>Semanas</b>							
	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>	<b>S6</b>	<b>S7</b>	<b>S8</b>
Rato 11	0,26	19,42	3,48	278,71	173,93	331,05	379,37	97,26
Rato 12	176,14	132,17	14,67	219,37	237,25	246,18	123,97	257,64
Rato 13	477,02	303,29	0,23	265,13	112,43	124,75	305,22	245,26
Rato 14	18,99	246,74	0,74	4,03	124,44	226,18	305,22	315,43
Rato 15	5,83	305,67	145,35	210,10	154,28	246,53	231,97	0,43
Rato 16	65,47	4,16	92,66	31,64	125,06	10,64	97,87	34,54
Rato 17	0,26	0,32	49,43	65,70	18,84	3,12	181,29	0,93
Rato 18	26,80	195,10	15,75	345,28	252,07	147,49	236,24	308,71
Rato 19	0,04	168,20	276,62	100,76	84,07	3,86	556,80	301,46
Média (DP)	85,64	152,78	66,54	168,96	142,48	148,86	268,66	173,55
	(157,30)	(122,69)	(93,06)	(121,44)	(72,75)	(122,54)	(140,57)	(137,81)

Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

**Tabela 18.** Análise descritiva da PA dos animais do grupo Salina (mmHg)

	Semanas							
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Rato 1	95,83	181,64	172,48	185,32	175,74	173,49	162,98	177,54
Rato 2	144,52	149,22	172,63	177,01	152,29	151,78	140,63	123,47
Rato 3	117,68	99,71	170,49	154,16	191,20	176,71	166,91	166,68
Rato 4	108,67	144,88	149,95	159,46	166,58	147,45	165,86	156,12
Rato 5	82,43	150,56	161,05	170,43	157,81	141,59	162,82	160,05
Rato 6	173,54	193,36	167,19	148,99	153,00	181,38	152,07	139,83
Rato 7	189,56	202,32	176,44	169,65	174,35	203,70	117,90	195,73
Rato 8	149,82	106,67	137,17	135,62	112,02	104,10	156,11	141,95
Rato 9	172,21	176,09	168,01	158,09	143,71	143,65	114,32	173,16
Rato 10	178,21	166,23	112,09	153,42	123,90	140,57	189,27	159,65
Média (DP)	141,24 (37,89)	157,06 (34,15)	158,75 (20,31)	161,21 (14,58)	155,06 (24,06)	156,44 (27,95)	152,88 (23,00)	159,41 (20,76)

Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

**Tabela 19.** Análise descritiva da PA dos animais do grupo MP<sub>2,5</sub> (mmHg)

	Semanas							
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Rato 11	166,09	90,10	153,52	118,71	152,05	139,93	153,04	122,48
Rato 12	166,40	168,04	185,62	179,55	189,86	69,96	169,06	172,34
Rato 13	124,55	180,54	199,33	146,60	191,44	177,29	140,83	182,23
Rato 14	196,37	171,85	165,13	170,38	143,42	181,21	181,69	173,43
Rato 15	131,88	112,41	158,99	111,04	120,35	136,83	153,13	103,55
Rato 16	143,99	160,45	194,35	207,96	180,20	191,37	101,27	208,45
Rato 17	208,99	210,26	173,79	190,57	130,71	194,99	151,79	195,49
Rato 18	195,17	164,28	175,64	181,40	165,66	170,49	165,52	148,40
Rato 19	204,52	182,85	187,15	177,68	170,83	117,74	160,30	141,13
Média (DP)	170,88 (32,12)	160,08 (36,81)	177,05 (15,83)	164,87 (32,71)	160,50 (25,50)	153,31 (41,07)	152,95 (22,68)	160,83 (34,48)

Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

**Tabela 20.** Análise descritiva do hemograma do grupo Salina

	Parâmetros										
	He	Hb	Ht	VCM	HCM	CHCM	LT	NE	EO	LI	MO
Rato 1	8,14	14,5	43,9	53,9	17,8	33,0	3,16	0,6	0	2,3	0,2
Rato 2	8,31	14,5	44,1	53,1	17,4	32,9	5,49	0,7	0,1	4,4	0,4
Rato 3	8,37	14,3	44,7	53,4	17,1	32,0	4,15	1,2	0	2,7	0,2
Rato 4	8,29	13,5	41,2	49,7	16,3	32,8	3,68	0,8	0	2,7	0,1
Rato 5	8,40	14,6	43,6	51,9	17,4	33,5	5,64	1,2	0,1	4,1	0,2
Rato 6	8,07	13,8	43,0	53,3	17,1	32,1	2,11	0,6	0	1,4	0,1
Rato 7	9,03	15,7	45,6	50,5	17,4	34,4	9,31	2,0	0,1	6,4	0,7
Rato 8	8,80	15,2	45,1	51,3	17,3	33,7	8,17	1,2	0,1	6,6	0,3
Rato 9	7,85	13,9	40,0	51,0	17,7	34,8	3,41	0,6	0	2,4	0,3
Rato 10	8,18	14,6	41,9	51,2	17,8	34,8	4,80	1,2	0	3,2	0,3
Média	8,34	14,46	43,31	51,93	17,33	33,4	4,99	0,95	0,04	3,62	0,31
(DP)	(0,34)	(0,65)	(1,79)	(1,41)	(0,44)	(1,02)	(2,26)	(0,45)	(0,05)	(1,74)	(0,22)

Legenda – He: hemáceas ( $10^6/\text{mm}^3$ ); Hb: hemoglobina (g/dl); Ht: hematócrito (%); VCM: volume corpuscular médio (fL); HCM: hemoglobina corpuscular média (pg); CHCM: concentração da hemoglobina corpuscular (g/dl); LT: leucócitos totais ( $\text{mil}/\text{mm}^3$ ); NE: neutrófilos ( $\text{mil}/\text{mm}^3$ ); EO: eosinófilos ( $\text{mil}/\text{mm}^3$ ); LI: linfócitos ( $\text{mil}/\text{mm}^3$ ); MO monócitos ( $\text{mil}/\text{mm}^3$ ). Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).



**Tabela 21.** Análise descritiva do hemograma do grupo MP<sub>2,5</sub>

	Parâmetros										
	He	Hb	Ht	VCM	HCM	CHCM	LT	NE	EO	LI	MO
Rato 11	8,31	14,0	43,0	51,7	16,8	32,6	1,63	0,6	0	0,9	0,1
Rato 12	7,61	12,8	39,1	51,4	16,8	32,7	2,59	0,8	0	1,7	0,1
Rato 13	9,04	15,1	46,4	51,3	16,7	32,5	4,80	1,2	0,2	3,0	0,3
Rato 14	8,36	14,1	43,4	51,9	16,9	32,5	3,72	0,8	0	2,7	0,1
Rato 15	8,35	14,3	44,0	52,7	17,1	32,5	3,58	0,9	0,1	2,4	0,3
Rato 16	8,75	15,3	43,4	49,6	17,5	35,3	6,07	1,5	0,1	4,4	0,1
Rato 17	8,26	14,3	40,6	49,2	17,3	35,2	2,68	0,4	0	2,1	0,1
Rato 18	8,24	15,0	41,9	50,8	18,2	35,8	6,06	1,0	0,2	4,4	0,5
Rato 19	8,53	15,1	42,9	50,3	17,7	35,2	6,51	1,3	0,1	4,8	0,5
Média	8,38	14,44	42,74	50,98	17,22	33,81	4,18	0,4	0,07	2,93	0,23
(DP)	(0,39)	(0,78)	(0,07)	(1,12)	(0,50)	(1,49)	(1,75)	(0,34)	(0,08)	(1,34)	(0,17)

Legenda – He: hemáceas ( $10^6/\text{mm}^3$ ); Hb: hemoglobina (g/dl); Ht: hematócrito (%); VCM: volume corpuscular médio (fL); HCM: hemoglobina corpuscular média (pg); CHCM: concentração da hemoglobina corpuscular (g/dl); LT: leucócitos totais ( $\text{mil}/\text{mm}^3$ ); NE: neutrófilos ( $\text{mil}/\text{mm}^3$ ); EO: eosinófilos ( $\text{mil}/\text{mm}^3$ ); LI: linfócitos ( $\text{mil}/\text{mm}^3$ ); MO monócitos ( $\text{mil}/\text{mm}^3$ ). Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

**Tabela 22.** Análise descritiva dos parâmetros sanguíneos do grupo Salina

	<b>Parâmetros</b>				
	<b>Fibrinogênio</b>	<b>TTPA</b>	<b>TP</b>	<b>Plaquetas</b>	<b>Reticulócitos</b>
	<b>(mg/dl)</b>	<b>(segundos)</b>	<b>(segundos)</b>	<b>(10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	<b>(10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>
Rato 1	175	11,5	20,0	656	3,29
Rato 2	223	11,5	20,0	834	3,24
Rato 3	139	11,5	20,0	1099	2,84
Rato 4	144	11,5	20,0	991	1,99
Rato 5	124	11,5	19,0	838	2,72
Rato 6	135	11,5	20,0	917	2,62
Rato 7	126	11,5	20,0	921	3,19
Rato 8	167	11,5	20,0	866	3,77
Rato 9	132	11,5	20,0	896	3,70
Rato 10	140	11,5	20,0	774	3,99
Média (DP)	150,5 (30,36)	11,5 (0)	19,9 (0,31)	879,2 (119,75)	3,13 (0,60)

Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

**Tabela 23.** Análise descritiva dos parâmetros sanguíneos do grupo MP<sub>2,5</sub>

	Parâmetros				
	Fibrinogênio	TPPA	TP	Plaquetas	Reticulócitos
	(mg/dl)	(segundos)	(segundos)	(10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	(10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )
Rato 11	136	11,5	18,8	1040	2,07
Rato 12	158	11,5	20,0	791	1,86
Rato 13	145	11,5	20,0	921	2,06
Rato 14	167	11,5	20,0	774	1,72
Rato 15	154	11,5	19,0	1044	2,23
Rato 16	141	11,5	20,0	943	2,57
Rato 17	136	11,5	20,0	945	2,80
Rato 18	127	11,5	43,2	949	3,56
Rato 19	155	11,5	19,6	945	3,85
Média (DP)	146,55 (12,81)	11,5 (0)	22,28 (7,85)	928 (93,39)	2,52 (0,75)

Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

**Tabela 24.** Análise descritiva das células do LBA do grupo Salina

	<b>Parâmetros</b>				
	<b>LT (<math>10^5/\text{cm}^3</math>)</b>	<b>NE (%)</b>	<b>EO (%)</b>	<b>LI (%)</b>	<b>MA (%)</b>
Rato 1	95,00	54,67	0	4,00	41,33
Rato 2	80,00	56,67	0,33	5,67	37,33
Rato 3	50,00	4,00	10,33	16,67	69,00
Rato 4	25,00	43,67	0,66	9,67	46,00
Rato 5	70,00	64,00	0	13,67	22,33
Rato 6	20,00	27,33	0	15,33	57,34
Rato 7	180,00	72,00	0	1,33	26,67
Rato 8	130,00	19,33	0,66	4,00	76,00
Rato 9	10,00	16,33	0	2,34	81,33
Rato 10	40,00	40,00	0,33	0,67	59,00
Média (DP)	70,00 (53,59)	39,8 (22,48)	1,23 (3,20)	7,33 (6,02)	51,63 (20,24)

Legenda – LT: linfócitos totais; NE: neutrófilos; EO: eosinófilos; LI: linfócitos; MA: macrófagos. Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

**Tabela 25.** Análise descritiva das células do LBA do grupo MP<sub>2,5</sub>

	<b>Parâmetros</b>				
	<b>LT (10<sup>5</sup>/cm<sup>3</sup>)</b>	<b>NE (%)</b>	<b>EO (%)</b>	<b>LI (%)</b>	<b>MA (%)</b>
Rato 11	30,00	37,66	0	8,67	53,67
Rato 12	35,00	54,00	5,00	19,33	21,67
Rato 13	220,00	63,00	2,33	8,33	26,34
Rato 14	150,00	48,00	1,33	14,33	36,34
Rato 15	55,00	44,00	2,00	22,67	31,33
Rato 16	15,00	43,34	1,00	11,33	44,33
Rato 17	35,00	50,66	0,33	2,35	46,66
Rato 18	45,00	67,33	0,67	3,00	29,00
Rato 19	95,00	71,33	0,67	1,67	26,33
Média (DP)	75,56 (68,17)	53,25 (11,62)	1,48 (1,51)	10,18 (7,49)	35,07 (10,90)

Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

**Tabela 26.** Análise descritiva do mielograma do grupo Salina

	<b>Parâmetros</b>			
	<b>GJ (%)</b>	<b>GM (%)</b>	<b>LI (%)</b>	<b>E (%)</b>
Rato 1	13,00	30,00	22,00	16,00
Rato 2	25,00	33,00	12,00	15,00
Rato 3	8,00	35,00	32,00	7,00
Rato 4	9,00	37,00	20,00	21,00
Rato 5	20,00	25,00	22,00	21,00
Rato 6	20,00	25,00	25,00	15,00
Rato 7	1,00	51,00	29,00	3,00
Rato 8	2,00	58,00	22,00	2,00
Rato 9	2,00	52,00	24,00	5,00
Rato 10	1,00	55,00	2,00	3,00
Média (DP)	10,10 (8,90)	40,10 (12,67)	21,00 (8,53)	10,80 (7,58)

Legenda – GJ: granulócitos jovens; GM: granulócitos maduros; LI: linfócitos; E: eritroblastos. Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

**Tabela 27.** Análise descritiva do mielograma do grupo MP<sub>2,5</sub>

	<b>Parâmetros</b>			
	<b>GJ (%)</b>	<b>GM (%)</b>	<b>LI (%)</b>	<b>E (%)</b>
Rato 11	9,00	39,00	17,00	22,00
Rato 12	13,00	34,00	18,00	20,00
Rato 13	16,00	32,00	20,00	20,00
Rato 14	11,00	31,00	25,00	22,00
Rato 15	12,00	28,00	20,00	20,00
Rato 16	2,00	46,00	0	32,00
Rato 17	1,00	44,00	2,00	34,00
Rato 18	4,00	39,00	7,00	32,00
Rato 19	4,00	56,00	9,00	20,00
Média (DP)	8,00 (5,38)	38,78 (8,81)	24,67 (6,08)	13,11 (8,83)

Legenda – GJ: granulócitos jovens; GM: granulócitos maduros; LI: linfócitos; E: eritroblastos. Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

**Tabela 28.** Análise descritiva das medidas morfométricas das arteríolas coronarianas e pulmonares do grupo Salina

	Índices									
	Arteríolas coronarianas					Arteríolas pulmonares				
	EM	L/P	IVC	ISO	AC	EM	L/P	IVC	ISO	AC
Rato 1	7,72	0,39	4,15	0,02	0,27	2,53	2,04	4,38	0,05	0,15
Rato 2	6,26	0,47	4,45	0,02	0,15	4,65	0,92	4,70	0,04	0,31
Rato 3	5,46	0,44	5,25	0,04	0,22	4,64	1,07	4,31	0,06	0,23
Rato 4	5,20	0,68	4,40	0,12	0,17	4,81	0,87	4,44	0,02	0,10
Rato 5	6,51	0,67	4,06	0,16	0,12	4,83	0,80	4,47	0,11	0
Rato 6	6,16	0,67	4,40	0,06	0,22	3,21	2,07	4,03	0,02	0,24
Rato 7	5,74	0,48	4,96	0,13	0,41	5,29	0,71	4,67	0,03	0,10
Rato 8	5,94	0,27	5,02	0,06	0,34	5,06	0,73	4,49	0,07	0,21
Rato 9	4,95	0,36	5,78	-	0,35	6,75	0,38	4,21	0,04	0,08
Rato 10	5,94	0,36	4,47	-	0,21	3,76	1,12	4,88	0,02	0,23
Média	5,99	0,48	4,69	0,08	0,25	4,55	1,07	4,46	0,05	0,17
(DP)	(0,77)	(0,14)	(0,54)	(0,05)	(0,09)	(1,17)	(0,55)	(0,24)	(0,02)	(0,09)

Legenda – EM: espessura da camada média ( $\mu\text{m}$ ); L/P: razão área luminal / área da parede; IVC: índice de vasoconstrição; ISO: índice de reação do 15-F<sub>2t</sub>-isoprostano; AC: índice de reação da  $\alpha$ -actina. Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).



**Tabela 29.** Análise descritiva das medidas morfométricas das arteríolas coronarianas e pulmonares do grupo MP<sub>2,5</sub>

	Índices									
	Arteríolas coronarianas					Arteríolas pulmonares				
	EM	L/P	IVC	ISO	AC	EM	L/P	IVC	ISO	AC
Rato 11	6,03	0,55	4,12	0,21	0,20	5,17	0,67	4,19	0,02	0
Rato 12	6,03	0,49	4,62	0	0,23	5,49	0,66	4,33	0,02	0,14
Rato 13	4,62	0,94	4,51	0,08	0,17	4,10	1,04	4,28	0,08	0,31
Rato 14	5,92	0,36	4,96	0,12	0,18	4,16	1,45	4,05	0	0,20
Rato 15	4,33	0,63	5,56	0,01	0,47	5,00	0,69	4,42	0,01	0,15
Rato 16	5,17	0,49	5,08	0,03	0,35	3,95	0,91	4,84	0,08	0,08
Rato 17	6,38	0,52	4,87	0,10	0,13	4,97	0,97	4,34	0,04	0,37
Rato 18	5,66	0,40	4,91	0,09	0,38	3,86	1,08	4,29	0,04	0,23
Rato 19	-	-	-	-	0,34	5,04	0,59	4,90	0,05	0,14
Média	5,52	0,55	4,84	0,08	0,27	4,64	0,90	4,41	0,04	0,18
(DP)	(0,73)	(0,17)	(0,42)	(0,06)	(0,11)	(0,61)	(0,27)	(0,28)	(0,03)	(0,11)

Legenda – EM: espessura da camada média ( $\mu\text{m}$ ); L/P: razão área luminal / área da parede; IVC: índice de vasoconstrição; ISO: índice de reação do 15-F<sub>2t</sub>-isoprostano; AC: índice de reação da  $\alpha$ -actina. Dados apresentados como média e desvio padrão (DP).

## 8. REFERÊNCIAS

---

Aiello VD. Características estruturais, desenvolvimento normal e remodelamento patológico da circulação pulmonar. In: Lopes AA. *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia – Diagnóstico, avaliação e terapêutica da hipertensão pulmonar*. Lopes AA. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2005.

Alfaro-Moreno E, Ponce de León S, Osornio Vargas AR, García Cuellar C, Martínez L, Rosas I. Potential toxic effects associated to metals and endotoxin present in PM10: an ancillary study using multivariate analysis. *Inhal Toxicol*. 2007;19:49-53.

Akinaga LM, Lichtenfels AJ, Carvalho-Oliveira R, Caldini EG, Dolhnikoff M, Silva LF, Bueno HM, Pereira LA, Saldiva PHN, Garcia ML. Effects of chronic exposure to air pollution from Sao Paulo city on coronary of Swiss mice, from birth to adulthood. *Toxicol Pathol*. 2009;37:306-14.

Bai N, Khazaei M, van Eeden SF, Laher I. The pharmacology of particulate matter air pollution-induced cardiovascular dysfunction. *Pharmacol Ther*. 2007;113:16-29.

Ballester F, Medina S, Boldo E, Goodman P, Neuberger M, Iñiguez C, Künzli N. Reducing ambient levels of fine particulates could substantially improve health: a mortality impact assessment for 26 European cities. *J Epidemiol Community Health*. 2008;62:98-105.

Barreto AC, Franchi SM, Pereira AC, Lopes AA. Hipertensão arterial pulmonar: fisiopatologia, aspectos genéticos e resposta ao uso crônico do sildenafil. *Arq Bras Cardiol.* 2005;85:147-54.

Bartoli CR, Wellenius GA, Diaz EA, Lawrence J, Coull BA, Akiyama I, Lee LM, Okabe K, Verrier RL, Godleski JJ. Mechanisms of inhaled fine particle air pollution-induced arterial blood pressure changes. *Environ Health Perspect.* 2009;117:361-6.

Batalha JRF, Saldiva PHN, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GGK, Koutrakis P, Godleski JJ. Concentrated ambiente air particles induce vasoconstriction of small pulmonary arteries in rats. *Environ Health Perspect.* 2002;110:1191-7.

Bonzini M, Tripodi A, Artoni A, Tarantini L, Marinelli B, Bertazzi PA, Apostoli P, Baccarelli A. Effects of inhalable particulate matter on blood coagulation. *J Thromb Haemost.* 2009;8:662-8.

Bräuner EV, Moller P, Barregard L, Dragsted LO, Glasius M, Wahlin P, Vinzents P, Raaschou-Nielsen O, Loft S. Exposure to ambient concentrations of particulate air pollution does not influence vascular function or inflammatory pathways in young healthy individuals. *Part Fibre Toxicol.* 2008;5:13.

Brook RD. Potencial health risks of air pollution beyond triggering acute cardiopulmonary events. *JAMA.* 2008;18:2194-6.

Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, Mittleman M, Samet J, Smith Jr SC, Tager I. Air pollution and cardiovascular disease

– a statement for healthcare professionals from the expert panel on population and prevention science of the American Heart Association. *Circulation*. 2004;109:2655-71.

Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet*. 2002;360:1233-42.

CETESB. Secretaria do Estado do Meio Ambiente. *Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo 2006*. São Paulo: CETESB; 2007.

CETESB. Secretaria do Estado do Meio Ambiente. *Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo 2008*. São Paulo: CETESB; 2009.

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*. 2004;16:421-9.

Chen CY, Chow D, Chiamvimonvat N, Glatter KA, Li N, He Y, Pinkerton KE, Bonham AC. Short-term secondhand smoke exposures decreases heart rate variability and increases arrhythmia in susceptibility mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008a;2:H632-9.

Chen H, Goldberg MS, Villeneuve PJ. A systematic review of the relation between long term exposure to ambient air pollution and chronic diseases. *Rev Environ Health*. 2008b;23:243-97.

Chen LC, Hwang JS. Effects of subchronic exposures to concentrated ambient particles (CAPs) in mice. IV. Characterization of acute and chronic effects of ambient

air fine particulate matter exposures on heart-rate variability. *Inhal Toxicol.* 2005;17:209-16.

Cheng TJ, Hwang JS, Wang PY, Tsai CF, Chen CY, Lin SH, Chan CC. Effects of concentrated ambient particles on heart rate and blood pressure in pulmonary hypertensive rats. *Environ Health Perspect.* 2003;111:147-50.

Choi JH, Kim JS, Kim YC, Kim YS, Chung NH, Cho MH. Comparative study of PM<sub>2,5</sub> and PM<sub>10</sub> – induced oxidative stress in rat lung epithelial cells. *J Vet Sci.* 2004;5:11-8.

Corey LM, Baker C, Luchtel DL. Heart rate variability in the apolipoprotein-E knockout transgenic mouse following exposure to Seattle particulate matter. *J Toxicol Environ Health A.* 2006;69:953-65.

Cuninghant IA, Paula RS, Mansur AJ, Shinzato AR, Peres CA, Grupi CJ. Influence of age, gender, body mass index and functional capacity on heart rate variability in cohort of subjects without heart disease. *Am J Cardio.* 2004;93:381-85.

DATASUS - Caderno de Informação de Saúde - Município de São Paulo. 2007. <http://tabnet.datasus.gov.br/tabdata/cadernos/sp.htm>.

de Hartog JJ, Lanki T, Timonen KL, Hoek G, Janssen NA, Ibaldo-Mulli A, Peters A, Heinrich J, Tarkiainen TH, van Grieken R, van Wijnen JH, Brunekreef B, Pakkanen J. Associations between PM<sub>2.5</sub> and heart rate variability are modified by particle composition and beta-blocker use in patients with coronary heart disease. *Environ Health Perspect.* 2009;117:105-11.

DeMeo DL, Zanobetti A, Litonjua AA, Coull BA, Schwartz J, Gold DR. Ambient air pollution and oxygen saturation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170:383-7.

Devlin RB, Ghio AJ, Kehrl H, Sanders G, Cascio W. Elderly humans exposed to concentrated air pollution particles have decreased heart rate variability. *Eur Respir J.* 2003;40:76s-80s.

Dominici F, Peng RD, Bell ML, Pham L, McDermott A, Zeger SL, Samet JM. Fine particulate air pollution and hospital admission for cardiovascular and respiratory diseases. *JAMA.* 2006;295:1127-34.

Donaldson K, Stone V, Seaton A, MacNee W. Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potencial mechanisms. *Environ Health Perspect.* 2001;109:523-7.

d' Uscio LV, Kilo J, Lüscher TF, Gassmann M. Circulation. In: Krinke GJ. *The laboratory rat.* 1<sup>th</sup> ed. London: Academic Press; 2000. p.345-57.

Fan ZT, Meng Q, Weisel C, Laumbach R, Ohman-Strickland P, Shalat S, Hernandez MZ, Black K. Acute exposure to elevated PM<sub>2.5</sub> generated by traffic and cardiopulmonary health effects in healthy older adults. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2009;19:525-33.

Farhat SCL, Paulo RLP, Shimoda TM, Conceição GMS, Lin CA, Braga ALF, Warth MPN, Saldiva PHN. Effect of air pollution on pediatric respiratory emergency room visits and hospital admissions. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38:227-35.

Frampton MW. Inflammation and airborne particles. *Clin Occup Environ Med.* 2006;5:797-815.

Franklin M, Koutrakis P, Schwartz P. The role of particle composition on the association between PM<sub>2.5</sub> and mortality. *Epidemiology.* 2008;19:680-9.

Furuyama A, Kanno S, Kobayashi T, Hirano S. Extrapulmonary translocation of intratracheally instilled fine and ultrafine particles via direct and alveolar macrophage associated routes. *Arch Toxicol.* 2009;83:429-37.

Gardner SY, Lehmann JR, Costa DL. Oil fly ash induced elevation of plasma fibrinogen levels in rats. *Toxicol Sci.* 2000;56:175-80.

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

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

Ghio AJ, Silbajoris R, Carson JL, Samet JM. Biologic effects of oil fly ash. *Environ Health Perspect.* 2002;110:89-94.

Godleski JJ, Verrier RL, Koutrakis P, Catalano P, Coull B, Reinisch U, Lovett EG, Lawrence J, Murthy GG, Wolfson JM, Clarke RW, Nearing BD, Killingsworth C.



Mechanisms of morbidity and mortality from exposure to ambient air particles. *Res Rep Health Eff Inst.* 2000;91:5-88.

Gold DR, Litonjua A, Schwartz J, Lovett E, Larson A, Nearing B, Allen G, Verrier M, Cherry R, Verrier R. Ambient pollution and heart rate variability. *Circulation.* 2000;101:1267-73.

Gong Jr H, Linn WS, Terrell SL, Clark KW, Geller MD, Anderson KR, Cascio WE, Sioutas C. Altered heart rate variability in asthmatic and healthy volunteers exposed to concentrated ambient coarse particles. *Inhal Toxicol.* 2004;16:335-43.

Gonzalez-Flecha B. Oxidant mechanisms in response to ambient air particles. *Mol Aspects Med.* 2004;25:169-82.

Goto Y, Ishii H, Hogg JC, Shih CH, Yatera K, Vincent R, van Eeden SF. Particulate matter air pollution stimulates monocyte release from the bone marrow. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170:891-7.

Grabowski GM, Paulauskis JD, Godleski JJ. Mediating phosphorylation events in the vanadium-induced respiratory burst of alveolar macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999;156:170-8.

Harder V, Gilmour P, Lentner B, Karg E, Takenaka S, Ziesenis A, Stampfl A, Kodavanti U, Heyder J, Schulz H. Cardiovascular responses in unrestrained WKY rats to inhaled ultrafine carbon particles. *Inhal Toxicol.* 2005;17:29-42.

Harder SD, Soukup JM, Ghio AJ, Devlin RB, Becker S. Inhalation of PM<sub>2.5</sub> does not modulate host defense or immune parameters in blood or lung of normal human subjects. *Environ Health Perspect.* 2001;109:599-604.

Herculiani PP, Pires Neto RC, Bueno HM, Zorzetto JC, Silva LC, Santos AB, Garcia RC, Yonamine M, Detregiachi CR, Saldiva PHN, Mauad T. Effects of chronic exposure to crack cocaine on the respiratory tract of mice. *Toxicol Pathol.* 2009;37:324-32.

Hoffmann B, Moebus S, Dragano N, Stang A, Möhlenkamp S, Schmermund A, Memmesheimer M, Bröcker-Preuss M, Mann K, Erbel R, Jöckel KH. Chronic residential exposure to particulate matter air pollution and systemic inflammatory markers. *Environ Health Perspect.* 2009;117:1302-8.

Hogg JC, van Eeden S. Pulmonary and systemic response to atmospheric pollution. *Respirology.* 2009;14:336-46.

Holgate ST, Devlin RB, Wilson SJ, Frew AJ. Health effects of acute exposure to air pollution. Part II: Healthy subjects exposed to concentrated ambient particles. *Res Rep Health Eff Inst.* 2003;112:31-50.

Hu Z, Rao KR. Particulate air pollution and chronic ischemic heart disease in the eastern United States: a county level ecological study using satellite aerosol data. *Environ Health.* 2009;8:26.

Huang YC, Li Z, Carter JD, Soukup JM, Schwartz DA, Yang IV. Fine ambient particles induce oxidative stress and metal binding genes in human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;41:544-52.

Ibald-Mulli A, Stieber J, Wichmann HE, Koenig W, Peters A. Effects of air pollution on blood pressure: a population based approach. *Am J Public Health.* 2001;91:571-7.

Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. *Guide for the care and use of laboratory animals.* Washington: National Academy Press; 1996. Cap.2, p.21-55: Animal Environmental, housing and managment.

Jacobs L, Emmerechts J, Mathieu C, Hoylaerts MF, Fierens F, Hoet PH, Nemery B, Nawrot TS. Air pollution related prothrombotic changes in persons with diabetes. *Environ Health Perspect.* 2010;118:191-6.

Janssen LJ. Isoprostanes and lung vascular pathology. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;38:383-9.

Johnson D, Parker JD. Air pollution exposure and self-reported cardiovascular disease. *Environ Res.* 2009;109:582-9.

Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia básica.* 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. Cap.11, p.179-91: Sistema Circulatório.

Khandoga A, Stampfl A, Takenaka S, Schulz H, Radykewicz R, Kreyling W,

Krombach F. Ultrafine particles exert prothrombotic but not inflammatory effects on the hepatic microcirculation in healthy mice in vivo. *Circulation*. 2004;109:1320-5.

Kodavanti UP, Schladweiler MC, Ledbetter AD, Hauser R, Christiani DC, McGee J, Richards JR, Costa DL. Temporal association between pulmonary and systemic effects of particulate matter in healthy and cardiovascular compromised rats. *J Toxicol Environ Health A*. 2002;65:1545-69.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. (2008). *Robbins, Patologia Básica*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Legramante JM, Valentini F, Magrini A, Palleschi G, Sacco S, Iavicoli I, Pallante M, Moscone D, Galante A, Bergamaschi E, Bergamaschi A, Pietroiusti A. Cardiac autonomic regulation after after lung exposure to carbon nanotubes. *Hum Exp Toxicol*. 2009;28:369-75.

Lemos M, Mohallem SV, Macchione M, Dolhnikoff M, Assunção JV, Godleski JJ, Saldiva PHN. Chronic exposure to urban air pollution induces structural changes in murine pulmonary and coronary arteries. *Inhal Toxicol*. 2006;18:247-53.

Li XY, Gilmour PS, Donaldson K, MacNee W. In vivo and in vitro proinflammatory effects of particulate air pollution (PM10). *Environ Health Perspect*. 1997;105:1279-83.

Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Braz J Pharm Sci*. 2001;37:293-303.

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

Lippmann M, Gordon T, Chen LC. Effects of subchronic exposures to concentrated ambient particles (CAPs) in mice. I. Introduction, objectives, and experimental plan. *Inhal Toxicol.* 2005;17:177-187.

Lopes FD, Pinto TS, Arantes-Costa FM, Moriya HT, Biselli PJ, Ferraz LF, Lichtenfels AJ, Saldiva PHN, Mauad T, Martins MA. Exposure to ambient levels of particles emitted by traffic worsens emphysema in mice. *Environ Res.* 2009;109:544-51.

Lorenzi TF. *Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica.* 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

Maatz LF, Wood GJA, Rivero DHRF, Saldiva PHN. Tracheal instillation of urban PM<sub>2.5</sub> suspension promotes acute cardiac polarization changes in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2009;42:207-13.

Mantecca P, Sancini G, Moschini E, Farina F, Gualtieri M, Rohr A, Miserochi G, Palestini P, Camatini M. Lung toxicity induced by intratracheal instillation of size-fractionated tire particles. *Toxicol Lett.* 2009;189:206-14.

Martins LC, Pereira LA, Lin CA, Santos UP, Prioli G, Carmo Luiz O, Saldiva PH, Braga ALF. The effects of air pollution on cardiovascular diseases: lag structures. *Rev Saude Publica.* 2006;40:677-83.

Matsumoto G, Kondo NN, de Paula Vieira R, Mauad T, da Silva LF, de André CD, Carvalho-Oliveira R, Saldiva PHN, Garcia ML. The time course of vasoconstriction and endothelin receptor A expression in pulmonary arterioles of mice continuously exposed to ambient urban levels of air pollution. *Environ Res.* 2010;110:237-43.

Mauad T, Rivero DHRF, Oliveira RC, Lichtenfels AJFC, Guimarães ET, Andre PA, Kasahara DI, Bueno HMS, Saldiva PHN. Chronic exposure to ambient levels of urban particles affects mouse lung development. *Am J Respi Crit Care Med.* 2008;178:721-8.

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

Mehrabi MR, Ekmekcioglu C, Tatzber F, Oguogho A, Ullrich R, Morgan A, Tamaddon F, Grimm M, Glogar HD, Sinzinger H. The isoprostane 8-epi-PGF<sub>2</sub> alpha is accumulated in coronary arteries isolated from patients with coronary heart disease. *Cardiovasc Res.* 1999;43:492-9.

Mills NL, Törnqvist H, Robinson SD, Gonzalez MC, Söderberg S, Sandström T, Blomberg A., Newby DE, Donaldson K. Air pollution and atherothrombosis. *Inhal Toxicol.* 2007;19:81-9.

Nadziejko C, Fang K, Chen LC, Cohen B, Karpatkin M, Nadas A. *Effect of concentrated ambient particulate matter on blood coagulation parameters in rats.* *Res Rep Health Eff Inst.* 2002a;111:7-29,31-8.

Nadziejko C, Fang K, Nadziejko E, Narciso SP, Zhong M, Chen LC. Immediate effects of particulate air pollutants on heart rate and respiratory rate in hypertensive rats. *Cardiovasc Toxicol*. 2002b;2:245-52.

Nemmar A, Dhanasekaran S, Yasin J, Ba-Omar H, Fahim MA, Kazzam EE, Ali BH. Evaluation of the direct systemic, and cardiopulmonary effects of diesel particles in spontaneously hypertensive rats. *Toxicology*. 2009;262:50-6.

Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PHM, Nemery B. Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicol Lett*. 2004;149:243-53.

Nemmar A, Nemery B, Hoet PH, Vermeylen J, Hoylaerts MF. Pulmonary inflammation and thrombogenicity caused by diesel particles in hamsters: role of histamine. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:1366-72.

Niwa Y, Hiura Y, Sawamura H, Iwai N. Inhalation exposure to carbon black induces inflammatory responses in rats. *Circ J*. 2008;72:144-9.

O'Neill MS, Veves A, Zanobetti A, Sarnat, JA, Gold DR, Economides PA, Horton ES, Schwartz J. Diabetes enhances vulnerability to particulate air pollution – associated impairment in vascular reactivity and endothelial function. *Circulation*. 2005;111:2913-20.

Ostro B, Roth L, Malig B, Marty M. The effects of fine particle components on respiratory hospital admissions in children. *Environ Health Perspect*. 2009;117:475-80.

Park SK, O'Neill MS, Vokonas PS, Sparrow D, Schwartz J. Effects of air pollution on heart rate variability: the VA normative aging study. *Environ Health Perspect.* 2005;113:304-9.

Pekkanen J, Brunner EJ, Anderson HR, Tiittanen P, Atkinson RW. Daily concentrations of air pollution and plasma fibrinogen in London. *Occup Environ Med.* 2000;57:818-22.

Pereira CE, Heck TG, Saldiva PHN, Rhoden CR. Ambient particulate air pollution from vehicles promotes lipid peroxidation and inflammatory responses in rat lung. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40:1353-9.

Peters A, Doring A, Wichmann HE, Koenig W. Increased plasma viscosity during an air pollution episode: a link to mortality? *Lancet.* 1997;349:1582-7.

Pope III CA. Epidemiology of particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk? *Environ Health Perspect.* 2000;108:1-24.

Pope III CA, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Godleski JJ. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution. *Circulation.* 2004;109:71-7.

Pope III CA, Muhlestein JB, May HT, Renlund DG, Anderson JL, Horen BD. Ischemic heart disease events triggered by short-term exposure to fine particulate air pollution. *Circulation.* 2006;114:2430-1.



Pope III CA, Verrier RL, Lovett EG, Larson AC, Raizenne ME, Kanner RE, Schwartz J, Villegas GM, Gold DR, Dockery DW. Heart rate variability associated with particulate air pollution. *Am Heart J*. 1999;138:890-9.

Puett RC, Hart JE, Yanosky JD, Paciorek C, Schwartz J, Suh H, Speizer FE, Laden F. Chronic fine and coarse particulate exposure, mortality, and coronary heart disease in the Nurses' Health Study. *Environ Health Perspect*. 2009;117:1697-701.

Reed MD, Gigliotti AP, McDonald JD, Seagrave JC, Seilkop SK, Mauderly JL. Health effects of subchronic exposure to environmental levels of diesel exhaust. *Inhal Toxicol*. 2004;16:177-93.

Reis AF, Bastos BG, Mesquita ET, Romão Filho LJM, da Nóbrega ACL. Disfunção parassimpática, variabilidade da frequência cardíaca e estimulação colinérgica após infarto agudo de miocárdio. *Arq Bras Cardiol*. 1998;70:193-9.

Rhoden CR, Lawrence J, Godleski JJ, Gonzalez-Flecha B. N-acetylcysteine prevents lung inflammation after short-term inhalation exposure to concentrated ambient particles. *Toxicol Sci*. 2004;79:296-303.

Rice TM, Clarke RW, Godleski JJ, Al-Mutairi E, Jiang NF, Hauser R, Paulauskis JD. Differential ability of transition metals to induce pulmonary inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001;177:46-53.

Rivero DHRF, Sasaki C, Lorenzi-Filho G, Saldiva PHN. PM<sub>2.5</sub> induces electrocardiographic alterations in healthy rats. *Environ Res*. 2005;99:262-6.

Rivero DHRF, Soares SRC, Lorenzi-Filho G, Saiki M, Godleski JJ, Antonangelo L, Dolhnikoff M, Saldiva PHN. Acute cardiopulmonary alterations induced by fine particulate matter of Sao Paulo, Brazil. *Toxicol Sci.* 2005b;85:898-905.

Rückerl R, Greven S, Ljungman P, Aalto P, Antoniadou C, Bellander T, Berglind N, Chrysohoou C, Forastiere F, Jacquemin B, von Klot S, Koenig W, Küchenhoff H, Lanki T, Pekkanen J, Perucci CA, Schneider A, Sunyer J, Peters A. Air pollution and inflammation (interleukin-6, C-reactive protein, fibrinogen) in myocardial infarction survivors. *Environ Health Perspect.* 2007a;115:1072-80.

Rückerl R, Phipps RP, Schneider A, Frampton M, Cyrus J, Oberdörster G, Wichmann HE, Peters A. ultrafine particles and platelet activation in patients with coronary heart disease – results from a prospective panel. *Part Fibre Toxicol.* 2007b;4:1.

Sakai M, Sato Y, Sato S, Ihara S, Onizuka M, Sakakibara Y, Takahashi H. Effect of relocating to areas of reduced atmospheric particulate matter levels on the human circulating leukocyte count. *J Appl Physiol.* 2004;97:1774-80.

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

Santos UP, Terra-Filho M, Lin CA, Pereira LA, Vieira TC, Saldiva PHN, Braga AL. Cardiac arrhythmia emergency room visits and environmental air pollution in São Paulo, Brazil. *J Epidemiol Community Health.* 2008;62:267-72.

Schulz H, Harder V, Ibaldi-Mulli A, Khandoga A, Koenig W, Krombach F, Radykewicz R, Stampfl A, Thorand B, Peters A. Cardiovascular effects of fine and ultrafine particles. *J Aerosol Med.* 2005;18:1-22.

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

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

Shimada A, Kawamura N, Okajima M, Kaewamatawong T, Inoue H, Morita T. Translocation pathway of the intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the blood circulation in the mouse. *Toxicol Pathol.* 2006;34:949-57.

Sorensen M, Daneshvar B, Hansen M, Dragsted LO, Hertel O, Knudsen L, Loft S. Personal PM<sub>2.5</sub> exposure and markers of oxidative stress in blood. *Environ Health Perspect.* 2003;111:161-5.

Stearns RC, Paulauskis JD, Godleski JJ. Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24:108-15.

Stieb DM, Szyszkowicz M, Rowe BH, Leech JA. Air pollution and emergency department visits for cardiac and respiratory conditions: a multi-city time-series analysis. *Environ Health.* 2009;8:25.

Sun Q, Wang A, Jin X, Natsnzon A, Duquaine D, Brook RD, Aquinaldo JG, Fayad ZA, Fuster V, Lippmann M, Chen LC, Rajagopalan S. Long term air pollution

exposure and acceleration of atherosclerosis and vascular inflammation in an animal model. *JAMA*. 2005;294:3003-10.

Tan WC, Qiu D, Liam BL, NG TP, Lee SH, van Eeden SF, D'yachkova Y, Hogg JC. The human bone marrow response to acute air pollution caused by forest fires. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1213-17.

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*. 2008;5:19.

Vanderlei LCM, Pastre CM, Roshi RA, Carvalho TD, Godoy MF. Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. *Rev bras cir cardiovasc*. 2009;24,205-17.

van Eeden SF, Yeung A, Quinlan K, Hogg JC. Systemic response to ambient particulate matter: relevance to chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2:61-7.

van Eeden SF, Hogg JC. Systemic inflammatory response induced by particulate matter air pollution: the importance of bone-marrow stimulation. *J Toxicol Environ Health A*. 2002;65:1597-613.

Watkinson WP, Campen MJ, Wichers LB, Nolan JP, Costa DL. Cardiac and thermoregulatory responses to inhaled pollutants in healthy and compromised

rodents: modulation via interaction with environmental factors. *Environ Res.* 2003;92:35-47.

Wellenius GA, Batalha JRF, Diaz EA, Lawrence J, Coull BA, Katz T, Verrier RL, Godleski JJ. Cardiac effects of carbon monoxide and ambient particles in a rat model of myocardial infarction. *Toxicol Sci.* 2004;80:367-76.

Wellenius GA, Coull BA, Godleski JJ, Koutrakis P, Okabe K, Savage ST, Lawrence JE, Murthy GGK, Verrier RL. Inhalation of concentrated ambient air particles exacerbates myocardial ischemia in conscious dogs. *Environ Health Perspect.* 2003;111:402-8.

Wellenius GA, Saldiva PHN, Batalha JRF, Murthy GGK, Coull BA, Verrier RL, Godleski JJ. Electrocardiographic changes during exposure to residual oil fly ash (ROFA) particles in a rat model of myocardial infarction. *Toxicol Sci.* 2002;66:327-35.

Wichers LB, Nolan JP, Winset DW, Ledbetter AD, Kodavanti UP, Schladweiler MC, Costa DL, Watkinson WP. Effects of instilled combustion derived particles in spontaneously hypertensive rats. Part I: Cardiovascular responses. *Inhal Toxicol.* 2004a;16:391-405.

Wichers LB, Nolan JP, Winset DW, Ledbetter AD, Kodavanti UP, Schladweiler MC, Costa DL, Watkinson WP. Effects of instilled combustion derived particles in spontaneously hypertensive rats. Part II: Pulmonary responses. *Inhal Toxicol.* 2004b;16:405-19.

Yeatts K, Svendsen E, Creason J, Alexis N, Herbst M, Scott J, Kupper L, Williams R, Neas L, Cascio W, Devlin RB, Peden DB. Coarse particulate matter (PM<sub>2.5-10</sub>) affects heart rate variability, blood lipids, and circulating eosinophils in adults with asthma. *Environ Health Perspect.* 2007;5:709-14.

Yokota S, Seki T, Naito Y, Tachibana S, Hirabayashi N, Nakasaka T, Ohara N, Kobayashi H. Tracheal instillation of diesel exhaust particles component causes blood and pulmonary neutrophilia and enhances myocardial oxidative stress in mice. *J Toxicol Sci.* 2008;33:609-20.

Zanobetti A, Canner MJ, Stone PH, Schwartz J, Sher D, Eagan-Bengston E, Gates KA, Hartley H, Suh H, Gold DR. Ambient pollution and blood pressure in cardiac rehabilitation patients. *Circulation.* 2004;110:2184-9.