

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

Daniela Perroni Frias

Estudo da expressão de oncogenes em co-cultura de células BEAS-2B e macrófago tipo 1 ou tipo 2 expostas à antracose e ao material particulado da poluição atmosférica (PM_{2,5})

São Paulo

2023

DANIELA PERRONI FRIAS

**Estudo da expressão de oncogenes em co-cultura de células
BEAS-2B e macrófago tipo 1 ou tipo 2 expostas à antracose e ao
material particulado da poluição atmosférica (PM_{2,5})**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Dr^a. Mariangela Macchione

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 03 de outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Frias, Daniela Perroni

Estudo da expressão de oncogenes em co-cultura de células BEAS-2B e macrófago tipo 1 ou tipo 2 expostas à antracose e ao material particulado da poluição atmosférica (PM_{2,5}) / Daniela Perroni Frias. -- São Paulo, 2023.

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

Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Mariangela Macchione.

Descritores: 1.Antracose 2.Material particulado 3.Poluição ambiental 4.Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos 5.Sistema respiratório 6.Brônquios 7.Macrófagos 8.Oncogenes 9.Citocinas 10.Citocromo P-450

USP/FM/DBD-484/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: FRIAS, Daniela Perroni

Título: Estudo da expressão de oncogenes em co-cultura de células BEAS-2B e macrófago tipo 1 ou tipo 2 expostas à antracose e ao material particulado da poluição atmosférica (PM_{2,5}).

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profa. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço e dedico esse trabalho à minha família (mãe Marlene, pai Cláudio e irmão Felipe), por todo apoio e incentivo que me deram na minha jornada acadêmica, além de terem aguentado todas as minhas crises e incertezas, eles também mereciam um doutorado cada um.

À minha orientadora Mariangela Macchione, comigo há mais de uma década, por todo cuidado e atenção tanto nesta tese, quanto em outros aspectos da minha carreira, sempre colaborando e demonstrando confiança no meu trabalho.

À minha colega de laboratório (que foi também colega de faculdade) Juliana Smelan, uma companheira durante esses quatro anos e meio de desafios e trabalho intenso.

Ao doutor Aristides Correa, do LIM 61- InCor, por todas as discussões importantes que tivemos sobre este trabalho e sobre a prática de cultura de células. Estendo o agradecimento aos alunos no LIM 61 também.

À doutora Marisa Dolhnikoff pelas discussões durante a execução da pesquisa e pelo apoio na implantação do laboratório de cultura celular do LIM 05.

Às doutoras Regiani Carvalo Oliveira e Naomi Kondo Nakagawa, pelas oportunidades, pelo apoio à minha carreira e a amizade desde o mestrado.

À doutora Sônia Jancar, ao doutor Idelfonso Junior e à doutora Marlise Montes, do laboratório de imunofarmacologia do ICB IV, pelo treinamento da cultura de macrófagos, células THP-1 e citometria de fluxo.

À equipe do LIM 05, pelo espaço cedido ao laboratório de cultura de células, que foi estabelecido, entre outros, para a execução deste trabalho.

À equipe do LIM 33 pelo suporte também na implementação do laboratório.

À Divisão de Pesquisa e Ensino pelos espaços cedidos para a coleta de sangue de voluntários.

Ao Serviço de Verificação de Óbitos da Capital pela coleta do material biológico para obtenção do particulado da antracose.

À CAPES e à FAPESP pelo financiamento dos projetos que possibilitaram a realização deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Experimental pela flexibilidade durante as dificuldades da pandemia de COVID-19.

RESUMO

Frias DP. Estudo da expressão de oncogenes em co-cultura de células BEAS-2B e macrófago tipo 1 ou tipo 2 expostas à antracose e ao material particulado da poluição atmosférica (PM_{2,5}) [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Antracose é um termo usado para descrever a pigmentação preta dos pulmões e árvore traqueobrônquica causada pelo depósito de partículas de carbono inaladas. Evidências recentes indicam que o particulado da poluição atmosférica tem um papel importante no estabelecimento da antracose e possivelmente no desenvolvimento de câncer no sistema respiratório, devido às substâncias carcinogênicas provenientes da poluição que permanecem depositadas no pulmão. O objetivo deste trabalho foi verificar a reatividade do particulado da antracose (MPA), avaliando a expressão de oncogenes em células de brônquios humanos normais (BEAS-2B) ou adenocarcinoma de pulmão (A549) em co-cultura com macrófagos M1 ou M2 expostas ao MPA. O material particulado ambiental (DEP) foi coletado da exaustão de um motor a diesel e o MPA foi coletado de pacientes que vieram a óbito e foram submetidos a autópsia do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da USP (SVO). Ambos foram quimicamente caracterizados para Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Após a exposição a diferentes concentrações de cada particulado, foram realizados testes de viabilidade MTT e LDH em monoculturas de BEAS-2B e A549. Após 24 horas de exposição a MPA ou DEP a 50 µg/mL em co-culturas e monoculturas, foram avaliadas por RT-PCR as expressões dos genes envolvidos nas vias de resposta a xenobióticos CYP1A1 e CYP1B1 e marcadores de câncer: TP53, AGR2 (mecanismo de reparo do DNA e ciclo celular) PTEN, PIK3CA e EGFR (crescimento celular). Foi realizada imunofenotipagem por citometria de fluxo dos macrófagos expostos ao MPA e dosadas citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 e INF- γ no sobrenadante das mono e co-culturas. Os resultados mostraram que para MPA, os HPAs mais frequentes apresentavam-se com 2 anéis e 4 ou 5 anéis para DEP, e maior quantidade de HPA em µg/g em DEP em comparação com MPA. MTT e LDH apontaram baixa citotoxicidade de MPA e DEP após 24 horas de exposição. A imunofenotipagem mostrou heterogeneidade entre os macrófagos, exibindo marcadores M1 e M2 tanto em mono, quanto em co-culturas, enquanto as citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 aumentaram após a exposição a MPA, mas não em DEP. Os oncogenes permaneceram inalterados nas mono e co-culturas, enquanto os genes CYP1A1 e CYP1B1 aumentaram a expressão após exposição ao DEP, mas não ao MPA. Os achados deste trabalho indicam que o MPA não é um particulado inerte, mas provocou uma resposta diferente nas células pulmonares e nas co-culturas em comparação ao DEP, provavelmente relacionado às diferenças em suas composições.

Palavras-chave: Antracose. Material particulado. Poluição ambiental. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Cultura de células. Brônquios. Macrófagos. Oncogenes. Citocinas. Citocromo P-450.

ABSTRACT

Frias DP. Study of oncogene expression in co-culture of BEAS-2B cells and type 1 or type 2 macrophages exposed to anthracose and particulate matter from atmospheric pollution (PM_{2.5}) [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Anthracosis is a term used to describe the black pigmentation of the lungs and tracheobronchial tree caused by the deposition of inhaled carbon particles. Recent evidence indicates that particulate matter from air pollution plays an important role in the establishment of anthracosis and possibly in the development of cancer in the respiratory system, due to carcinogenic substances from pollution that remain deposited in the lung. The aim of this work was to verify the reactivity of anthracosis particulate matter (MPA), evaluating the expression of oncogenes in normal human bronchial cells (BEAS-2B) or lung adenocarcinoma (A549) in co-culture with M1 or M2 macrophages exposed to MPA. Environmental particulate matter (DEP) was collected from diesel exhaust engine and MPA was collected from at the USP Capital Death Verification Service (SVO). Both were chemically characterized for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) by gas chromatography coupled to mass spectrometry. After exposure to different concentrations of each particulate, MTT and LDH viability tests were performed on monocultures of BEAS-2B and A549. After 24 hours of exposure to MPA or DEP at 50 µg/mL in co-cultures and monocultures, the expressions of genes involved in the xenobiotic response CYP1A1 and CYP1B1 and cancer markers TP53, AGR2 (DNA repair mechanism and cell cycle), PTEN, PIK3CA and EGFR (cell growth) were evaluated by RT-PCR. Immunophenotyping of macrophages exposed to MPA was performed by Flow Cytometry and the cytokines IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8, IL-10 and INF-γ were measured in the supernatant of mono and co-cultures. The results showed PAHs with 2 rings for MPA and 4 or 5 rings for DEP, also a higher amount of PAH in µg/g in DEP compared to MPA. MTT and LDH showed low cytotoxicity of MPA and DEP after 24 hours of exposure. Immunophenotyping showed heterogeneity in macrophages, displaying M1 and M2 markers both in mono and co-cultures, while the cytokines IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8 increased after exposure to MPA, but not DEP. Oncogenes remained unchanged in mono- and co-cultures, while CYP1A1 and CYP1B1 genes increased expression after exposure to DEP, but not MPA. The findings of this work indicate that MPA is not an inert particulate, but induced a different response in pulmonary cells and co-cultures compared to DEP, probably related to differences in their compositions.

Keywords: Anthracosis. Particulate matter. Environmental pollution. Polycyclic aromatic hydrocarbons. Cell culture. Bronchi. Macrophages. Oncogenes. Cytokines. Cytochrome P-450.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	18
Figura 2.....	22
Figura 3.....	23
Figura 4.....	28
Figura 5.....	32
Figura 6.....	35
Figura 7.....	39
Figura 8.....	40
Figura 9.....	41
Figura 10.....	45
Figura 11.....	46
Figura 12.....	55
Figura 13.....	56
Figura 14.....	57
Figura 15.....	58
Figura 16.....	59
Figura 17.....	60
Figura 18.....	61
Figura 19.....	62
Figura 20.....	63
Figura 21.....	64
Figura 22.....	65
Figura 23.....	66
Figura 24.....	67
Figura 25.....	69
Figura 26.....	70

Figura 27.....	71
Figura 28.....	72
Figura 29.....	73
Figura 30.....	74
Figura 31.....	75
Figura 32.....	76
Figura 33.....	78
Figura 34.....	80
Figura 35.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....	16
Tabela 2.....	20
Tabela 3.....	42
Tabela 4.....	51
Tabela 5.....	52
Tabela 6.....	55

Sumário

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Poluição atmosférica	15
2.1.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA).....	19
2.1.2 Câncer de pulmão	22
2.1.2.1 Marcadores de câncer de pulmão.....	26
2.2 Defesas do Sistema Respiratório	27
2.2.1 Poluição atmosférica e defesa imune inata	32
2.3 Fisiopatologia da antracose.....	33
3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos específicos	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Coleta das partículas.....	37
4.1.1 Material Particulado do Diesel (DEP)	37
4.1.2 Material Particulado da Antracose (MPA)	38
4.2 Extração do MPA.....	38
4.2.1 Digestão dos pulmões	38
4.2.2 Lavagem, liofilização e esterilização do MPA.....	39
4.3 Caracterização das partículas.....	41
4.3.1 Compostos orgânicos	41
4.4 Grupos de estudo	42
4.5 Cultura de células	43
4.5.1 Cultivo e manutenção de BEAS-2B	43
4.5.2 Cultivo e manutenção de A549.....	43
4.5.3 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico.....	44
4.5.3.1 Cultivo e manutenção de macrófagos derivados de monócitos.....	44
4.5.4 Estabelecimento das co-culturas.....	45
4.5.5 Exposição das células e co-culturas às partículas.....	45
4.6 Testes de citotoxicidade	46
4.6.1 Ensaio MTT	46
4.6.2 Ensaio LDH	47
4.6.3 Análise estatística.....	47

4.7 Citometria de fluxo.....	48
4.7.1 Co-cultura	48
4.7.2 Imunofenotipagem de macrófagos expostos ao MPA.....	48
4.7.3 Análise estatística.....	50
4.8 Expressão gênica	50
4.8.1 PCR em tempo real – RT-PCR.....	50
4.8.2 Padronização de genes endógenos.....	51
4.8.3 Análise estatística.....	51
4.9 Análise de citocinas.....	51
4.9.1 Análise estatística.....	52
5. RESULTADOS.....	52
5.1 Compostos orgânicos - HPA.....	52
5.2 Citotoxicidade.....	56
5.2.1 MTT	56
5.2.2 LDH.....	57
5.3 Citometria.....	59
5.3.1 Macrófagos.....	59
5.3.2 Co-cultura macrófagos e BEAS-2B.....	63
5.4 Expressão gênica por RT-PCR.....	65
5.5 Quantificação de citocinas.....	73
6. DISCUSSÃO.....	79
7. CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

A antracose (anthracosis = *anthrac* - significando carvão, carbono + *osis* significando condição) é resultado da deposição de partículas pretas de carbono nos pulmões pela inalação repetida de partículas de poluentes atmosféricos, fumaça de cigarro ou partículas de fuligem de carvão. A antracose pulmonar pode ser identificada macroscopicamente pela presença de manchas pretas no parênquima pulmonar e na mucosa brônquica, acompanhadas de antracose pleural (1) (2) (3).

Poluição do ar urbano, tabagismo, mineração de carvão, exposição ocupacional à poeira são reconhecidos como um dos principais fatores da etiologia das doenças pulmonares. A inalação de fuligem de carbono tem relação direta com a exposição à poeira, especialmente poeira de carvão pela queima de biomassa (1) (2). Os resultados do estudo de Qorbani et al., 2014 (2) demonstram uma associação positiva entre a exposição à fumaça em ambientes fechados devido ao cozimento tradicional e antracose (principalmente em mulheres). Contudo, outros elementos como ferro, chumbo, cádmio, sílica, fenol, complexos de hidrocarbonetos e outras substâncias inorgânicas ou orgânicas também podem causar essa pigmentação através de suas exposições ocupacionais (4).

A doença pulmonar de mineradores de carvão e outros trabalhadores expostos a poeiras minerais demonstra o acúmulo inicial de partículas de poeira. Amoli et al. (2009) (5) reportaram 102 casos de mudanças crônicas das vias aéreas com depósitos antracóticos significativos, em que as mulheres (n = 60) foram expostas à inalação de fumaça interna a longo prazo, enquanto assavam pão caseiro, e os homens (n = 42) tinham uma variedade de atividades que envolviam inalação ocupacional de fumaça. A histopatologia do tecido pulmonar mostrou partículas semelhantes a carbono dentro do citoplasma dos macrófagos na parede brônquica e partículas livres nos linfonodos mediastinais

Estas exposições gerada pela queima de combustíveis fósseis tem uma relação com a pigmentação antracótica devido a concentração e também com a duração da exposição como demonstrou o estudo de Takano et al. (2019) (3), que mostrou que a quantidade de antracose depositada nos pulmões tem relação com tempo e dose (tempo de vida e dose na cidade de São Paulo), com a ressalva de que o tabagismo não foi considerado. Os resultados indicam que a proporção de antracose na superfície pleural dos pulmões está positivamente associada à exposição à

poluição do ar derivada do tráfego e à idade dos indivíduos, sugerindo um padrão dependente do tempo. Outro estudo feito por Souza et al. (1998) (6), constatou que moradores não-fumantes de Guarulhos, região metropolitana de São Paulo, que vivem em ambiente poluído, apresentaram maior quantidade de pigmento de carbono em parede traqueobrônquica, quando comparados a moradores não-fumantes de regiões menos expostas à poluição, em Ribeirão Preto e Ourinhos, sugerindo que a antracose pode representar um marcador de exposição à poluição atmosférica.

Lesões malignas associadas à antracose foram relatadas esparsamente, mas não há ainda associação epidemiológica ou etiológica entre antracose e câncer de pulmão (1). Contudo, entre os muitos componentes da fumaça do tabaco e da poluição do ar interno e externo estão os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que são considerados os carcinógenos mais importantes nessas misturas complexas e a exposição por inalação a substâncias contendo HPA aumenta o risco de câncer de pulmão em humanos (7).

Em geral, os HPAs são compostos lipofílicos que podem ser captados para o interior das células após a inalação. As moléculas de HPA que entram nas células pulmonares são consideradas pró-carcinógenos, porque sua metabolização dentro das células gera metabólitos cancerígenos que contribuem para a etiologia do câncer. A transformação desses compostos envolve várias enzimas e 3 vias principais conhecidas: via das aldo-ceto redutases (via AKR), a via do CYP1A1/1B1 e da epóxido hidrolase (via CYP/EH)(7).

Estudos em modelo animal demonstram que exposições crônicas ao particulado urbano resultam em aumento significativo na expressão dos marcadores de tumor: VEGF, EGFR, Wnt, TGF- β 1, e-caderina, β -catenina, c-Myc e K-Ras (8) e aumento da expressão de supressores de tumor no estágio inicial da exposição, mas que diminuem nos estágios intermediários e tardios, indicando possível inativação dos supressores de tumor após exposição prolongada (9).

Um aspecto importante no estabelecimento do câncer, que não envolve mutações de oncogenes, é a ação de células do sistema imune na tumorigênese como ocorre com os macrófagos em câncer de pulmão. A atividade fagocítica dos macrófagos remove as células mortas ou em processo de morte. Em resposta à vários estímulos de citocinas, os macrófagos passam por uma mudança em suas vias metabólicas que leva à diferenciação em dois subtipos principais: inflamatório (M1) ou

regulatório (M2) (10). Os macrófagos apresentam plasticidade, com múltiplas subpopulações que possivelmente se alteram temporariamente durante o desenvolvimento do câncer. M1 é um fenótipo pró-inflamatório com atividade anti-tumoral, enquanto M2 é um tipo de célula imunossupressora, que contribui para a progressão do tumor. Os metabólitos do câncer, como o ácido láctico, são promotores da polarização M2, fazendo com que os tumores consigam modular o metabolismo dos macrófagos em algum nível para prevenir a inflamação e a morte das células tumorais, facilitando o crescimento do tumor e induzindo a supressão imunológica (11).

Pritchard et al. (2020) (12) demonstraram que as células da linhagem de câncer de pulmão A549 produzem exossomos (pequenas vesículas com conteúdo proteico que são externadas das células) capazes de regular a plasticidade dos macrófagos. Em co-cultura, os macrófagos internalizaram exossomos derivados das A549 e se diferenciaram no fenótipo M2. Os exossomos derivados de tumor aumentaram a taxa de consumo de oxigênio dos macrófagos, alterando seu estado bioenergético consistente com o dos macrófagos M2.

O objetivo principal desta pesquisa é avaliar a expressão de oncogenes clássicos e/ou relacionados ao câncer de pulmão em co-cultura de células de via aérea normal (BEAS-2B) ou cancerígena (A549) e macrófagos (M1 ou M2) expostas ao particulado ambiental ou material antracótico total extraído de pulmão.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Poluição atmosférica

A poluição do ar pode ser considerada um dos grandes problemas ambientais do mundo atualmente, não apenas pelo seu impacto nas mudanças climáticas, mas também pelo seu impacto na saúde pública e individual, sendo um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas e suas incapacidades e mortalidade associadas (13, 14). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, poluição atmosférica é a contaminação do ambiente por qualquer agente químico, físico ou biológico que altere as características naturais da atmosfera (15).

A poluição pode ser originada por fontes naturais, como erupções vulcânicas, poeira da superfície terrestre, sal marinho em áreas costeiras, tempestades de areia em áreas desérticas, material biológico sob a forma de pólen, esporos ou detritos vegetais e animais, raios, erosão eólica e zonas úmidas, como pântanos e turfeiras, que produzem metano (16). No entanto, as atividades humanas como queima de combustíveis fósseis pelos motores a combustão, intenso tráfego rodoviário e aéreo, atividade das indústrias siderúrgicas e químicas, construção civil, práticas de agropecuária, entre outros, são as fontes de poluição mais comuns em grandes cidades e países industrializados (17) (16).

Os poluentes podem ser classificados em duas categorias: poluentes primários, aqueles emitidos diretamente pelas fontes de emissão, e poluentes secundários, aqueles formados através da reação química entre poluentes primários e componentes naturais da atmosfera (13, 18). Segundo a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), os poluentes são escolhidos para monitoramento da qualidade do ar de acordo com a frequência de sua ocorrência, dos seus efeitos adversos e dos recursos disponíveis para seu acompanhamento. São eles: material particulado (PM), dióxido de enxofre (SO₂), monóxido de carbono (CO), ozônio (O₃), compostos orgânicos voláteis (COV) e óxidos de nitrogênio (NO_x).

Estudos sobre a poluição atmosférica e os efeitos na saúde da população têm demonstrado que, mesmo abaixo dos níveis determinados pela legislação, os poluentes atmosféricos ainda são capazes de provocar efeitos deletérios na saúde das pessoas, principalmente naqueles mais suscetíveis, como idosos, crianças e pessoas que já sofrem de problemas respiratórios (17). A tabela 1 a seguir informa as

características de cada poluente monitorado e as possíveis consequências da exposição a eles:

Tabela 1: Poluentes monitorados e seus efeitos na saúde.

Poluente	Característica	Efeito na saúde dos indivíduos
Partículas Inaláveis Finas (PM _{2,5})	Partículas de material sólido ou líquido suspensas no ar, na forma de poeira, neblina, aerossol, fumaça, fuligem etc., que podem permanecer no ar e percorrer longas distâncias. Faixa de tamanho ≤ 2,5 µm.	Os efeitos das partículas na saúde dependem do seu tamanho, mas geralmente causam: irritação do nariz e da garganta e crises de bronquite; a longo prazo pode causar danos nos pulmões, risco de parada cardíaca, efeitos cancerígenos se transportarem compostos tóxicos e morte precoce
Partículas Inaláveis (PM ₁₀) e Fumaça	Mesma definição das partículas inaláveis finas, mas com faixa de tamanho ≤ 10 µm	
Partículas Totais em Suspensão (PTS)	Mesma definição das partículas inaláveis finas, mas com faixa de tamanho de 50 µm	
Ozônio (O ₃)	Gás incolor, inodoro nas concentrações ambientais e o principal componente da névoa fotoquímica.	Pode causar irritação nos olhos e no trato respiratório, induz tosse intensa, falta de ar e irritação nos pulmões, levando a uma maior suscetibilidade a doenças respiratórias, além de exacerbar crises de asma
Dióxido de Enxofre (SO ₂)	com forte odor, semelhante ao gás produzido na queima de palitos de fósforos	É um irritante respiratório, pode agravar doenças respiratórias existentes, aumenta os sintomas respiratórios dos adultos, como tosse e altera a função pulmonar das crianças
Monóxido de Carbono (CO)	Gás incolor, inodoro e insípido.	Se liga ao local de transporte de oxigênio na hemoglobina, o que reduz o transporte de O ₂ no corpo, em altas concentrações é muito tóxico, causando dores de cabeça, náuseas, redução da capacidade de pensar e até morte

Compostos Orgânicos Voláteis (COVs)	São gases e vapores resultantes da queima incompleta e evaporação de combustíveis e de outros produtos orgânicos. Dentre os compostos orgânicos voláteis presentes nas atmosferas urbanas estão os compostos aromáticos, em particular: benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos.	Dependendo de seu composto químico, eles têm vários efeitos e podem estar associados ao câncer, além de efeitos adversos neurológicos, reprodutivos e de desenvolvimento
Óxidos de Nitrogênio (NOx)	Gás marrom avermelhado, com odor forte e muito irritante. Pode levar à formação de ácido nítrico, nitratos (os quais contribuem para o aumento das partículas inaláveis na atmosfera) e compostos orgânicos tóxicos.	É um irritante respiratório, pode piorar a doença respiratória existente, pode levar a hiperresponsividade brônquica e diminuição da função pulmonar em indivíduos asmáticos.

Fonte: Adaptado de Cetesb (2021)(19) e Pénard-Morand e Annesi-Maesano (2004)(16).

Os componentes da poluição atmosférica podem entrar no organismo humano por meio da ingestão, contato com a pele ou mais comumente, pelo trato respiratório (16). Os possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos cardiorrespiratórios da poluição atmosférica incluem inflamação e estresse oxidativo, quando espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON), geradas por poluentes inalados, superam as defesas antioxidantes dos tecidos (13). Os mecanismos de neurotoxicidade das partículas do ar não estão totalmente esclarecidos, mas a inflamação sistêmica e o estresse oxidativo cerebral parecem desempenhar um papel importante nas alterações estruturais e funcionais do sistema nervoso central (14).

A exposição aos poluentes como MP, NO₂, O₃ e CO, bem como à poluição do ar relacionada ao tráfego de veículos, estão associadas a um maior número de exacerbações, hospitalizações e mortes em pacientes com asma, além de aumento da incidência e exacerbação da rinite (13). Além disso, a exposição à poluição aumenta o risco de câncer de pulmão, pois pode induzir efeitos genotóxicos nas células, que incluem a formação de adutos de DNA, quebras nas duplas fitas e danos às bases do DNA, devido à oxidação, mutações genéticas, danos cromossômicos às células somáticas, mutações nos gametas e transformação oncogênica (20).

A inalação do PM da poluição atmosférica parece exercer um papel importante no risco de desenvolvimento de câncer de pulmão, principalmente devido a outras substâncias adsorvidas no PM (15, 20). O PM tem uma composição complexa – contém metais, carbono elementar e carbono orgânico (tanto em hidrocarbonetos, quanto em peptídeos), sulfatos e nitratos, além de outros constituintes. A composição do PM varia de acordo com o espaço geográfico, sendo influenciada pelas condições meteorológicas do local e pela fonte de emissão (21).

Devido à maior entrada de motores a diesel no mercado em muitos países industrializados e ao fato de que eles geram até 100 vezes mais partículas do que motores a gasolina, as partículas de exaustão de diesel (DEP) acabam contribuindo significativamente com o PM urbano em muitas das maiores cidades do mundo (22). Segundo o relatório da Cetesb de 2021 (19), quase 40% do PM10 liberado na região metropolitana de São Paulo vem de motores movidos à diesel (Figura 1). Já a fonte do PM2,5 é principalmente o aerossol secundário, resultante de reações químicas envolvendo compostos orgânicos voláteis, óxidos de nitrogênio e dióxido de enxofre.

Figura 1: Principais fontes de poluentes da região metropolitana de São Paulo

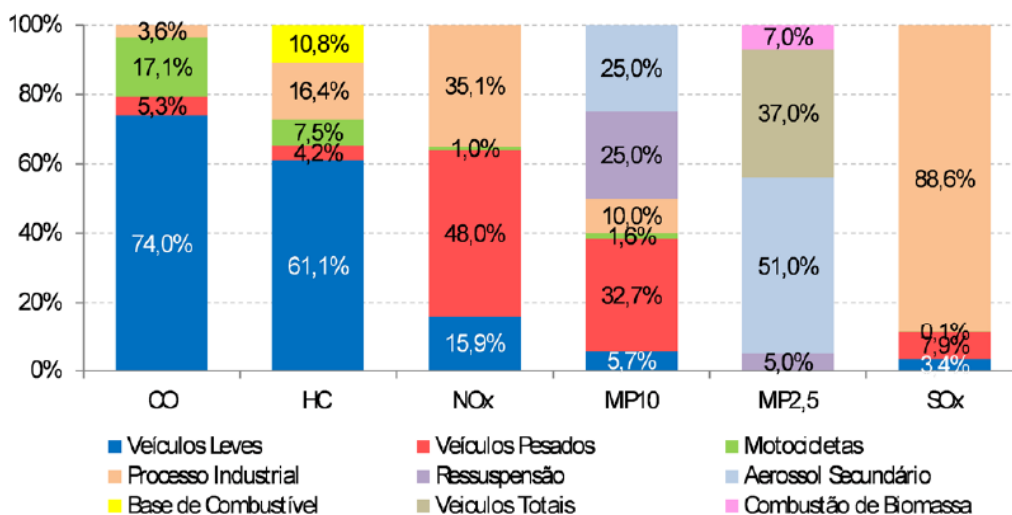


Figura 1. Principais fontes de poluentes e a porcentagem da participação de cada um, segundo relatório de qualidade do ar da Cetesb (2021).

Um dos componentes mais nocivos do PM são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). Eles podem ser encontrados tanto no PM ambiental (externo), quanto no doméstico (interno), o que torna a sua inalação um risco para o desenvolvimento/ agravamento de doenças respiratórias e risco de câncer de pulmão (7). A fração orgânica das partículas da exaustão de diesel (DEP) consiste

majoritariamente em HPAs, moléculas hidrofóbicas que se difundem facilmente através das membranas celulares. As partículas induzem a geração de radicais livres, que podem levar a um aumento do estresse oxidativo nas células, causando danos oxidativos a macromoléculas biológicas, como DNA, lipídios e proteínas, provocando a exacerbação de alguns sintomas respiratórios (23).

2.1.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são definidos como um grupo de substâncias químicas contendo 2 ou mais anéis de benzeno fundidos, mas sem heteroátomos (átomos diferentes de carbono e hidrogênio). Em geral, os HPA são compostos lipofílicos que podem atravessar facilmente as membranas celulares por difusão passiva (7). Eles podem ser divididos em duas categorias: compostos de baixo peso molecular, que consistem em menos de quatro anéis; e compostos de alto peso molecular de quatro ou mais anéis. Embora os HPAs de baixo peso molecular sejam encontrados mais comumente como vapor na troposfera, eles também podem se condensar após a emissão e permanecer na fase particulada. Por sua vez, os HPAs de alto peso molecular são predominantemente encontrados na fase particulada (24).

A ampla ocorrência de HPAs se deve à sua produção por praticamente todos os tipos de combustão de materiais orgânicos. Os HPAs podem ser emitidos no ambiente através da combustão incompleta de combustíveis contendo carbono de fontes naturais, industriais, comerciais, veiculares e residenciais. A principal via de exposição aos HPAs na população em geral é o ar ambiente (externo e interno), alimentos que contenham HPAs, fumaça de cigarros ou fumaça de lareiras abertas (24).

Os HPAs estão amplamente distribuídos na atmosfera e foram um dos primeiros poluentes atmosféricos designados como suspeitos de serem cancerígenos (24), sendo considerados os carcinógenos mais importantes nas misturas complexas envolvendo fumaça de tabaco, queima doméstica de biomassa, queima incompleta de combustíveis e poluição atmosférica. (7, 24). A carcinogenicidade dos HPAs está associada à complexidade da molécula, uma vez que à medida que o peso molecular aumenta, a carcinogenicidade dos HPAs também aumenta (24).

A Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) (20) lista os seguintes HPAs (Tabela 2) como carcinógenos humanos ou carcinógenos potenciais:

Tabela 2: HPAs potencialmente carcinogênicos segundo a IARC

Composto	Estrutura	Composto	Estrutura
benzo[a]antraceno		dibenzo[a,i]pireno	
benzo[b]fluoranteno		indeno[1,2,3-cd]pireno	
benzo[j]fluoranteno		benzo[k]fluoranteno	
benzo[a]pireno		dibenzo[a,e]pireno	
dibenzo[a,h]antraceno		dibenzo[a,l]pireno	
7H-dibenzo[c,g]carbazol		5-metilcriseno	
dibenzo[a,h]pireno			

Fonte: IARC (2012) (20)

Alguns HPAs tornaram-se uma das principais preocupações de saúde devido ao seu potencial de se ligar a proteínas celulares e DNA. A interferência dos HPAs na estrutura bioquímica dessas moléculas pode resultar em dano celular, mutações, malformações de biomoléculas e alteração de ciclo celular, aumentando o risco de aparecimento de tumores (24).

Devido aos seus conhecidos efeitos carcinogênicos, o benzo[a]pireno (BaP) tem sido usado frequentemente como referência para a carcinogenicidade dos HPAs. Estudos realizados em modelos *in vitro*, com cultura de células de via aérea, demonstraram o efeito genotóxico/carcinogênico do BaP, como alteração na expressão gênica de linhagem de células de adenocarcinoma de pulmão (A549) (25), proliferação celular tanto na via de sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (26), quanto na via do receptor aril-hidrocarboneto (AhR) (27). No entanto, é importante destacar que outros HPAs também precisam ser estudados, pois além do BaP, os benzo[a]antraceno e dibenzo[ah]antraceno foram identificados como potentes carcinógenos (24).

As moléculas de HPA que entram nas células pulmonares são consideradas pró-carcinogênicas, porque a transformação delas em metabólitos carcinogênicos contribuem para a origem do câncer. A transformação destes compostos envolve

múltiplas enzimas metabólicas e as vias mais conhecidas são a via CYP1A1/1B1 e epóxido hidrolase (7).

Em geral, os HPAs são metabolizados pelas enzimas da família do citocromo P450 (CYPs), em conjunto com outras enzimas metabólicas, em fenóis, catecóis e quinonas, resultando na formação de diolepóxidos, cátions radicais ou o-quinonas reativas e redox-ativas. Esses metabólitos podem reagir com o DNA para produzir adutos de DNA, como por exemplo, as quinonas que reagem com o N-7 da guanina e N-3 da adenina do DNA. Essa formação de adutos de DNA pode causar incompatibilidade na replicação, bem como alteração da metilação de regiões promotoras, levando a uma mutação de DNA ou expressão gênica anormal, contribuindo para o risco de tumorigênese no tecido (7).

As enzimas do citocromo P450 são induzidas pelo receptor aril-hidrocarboneto (AhR). O mecanismo pelo qual os HPAs induzem o AhR é bem compreendido: de maneira simplificada, o AhR é um fator de transcrição normalmente envolto em um complexo proteico inativo no citosol; a ligação do HPA ao receptor o libera, resultando na sua translocação para o núcleo, onde é então capaz de reconhecer elementos de resposta a AhR em regiões promotoras de genes de resposta a xenobióticos (Figura 2). O AhR regula a transcrição para alterar os níveis de expressão de uma bateria de genes, incluindo isoformas CYP1 (7, 21).

A ativação do AhR tem uma variedade de outros efeitos que incluem a formação de adutos de DNA (via ativação metabólica dependente de CYP1A/1B1), tumorigênese, inflamação, proliferação celular e perda de adesão celular (7). Estudos com células de brônquios humanos normais imortalizadas (linhagem e BEAS-2B) e transformadas (linhagem BEP2D) expostas a BaP e a concentrações crescentes de resveratrol (um potente inibidor das enzimas do CYP), resultaram em uma inibição dependente da dose e do tempo da formação de adutos de DNA (28). Devido ao seu alto nível de expressão em células epiteliais brônquicas humanas, o AhR tem muitas consequências fisiológicas no pulmão, como seus efeitos na proliferação e diferenciação celular, interação de adesão célula-célula, expressão de citocinas, produção de mucina e metabolismo de xenobióticos (7).

Figura 2: Exemplo de ativação do receptor aril - hidrocarboneto

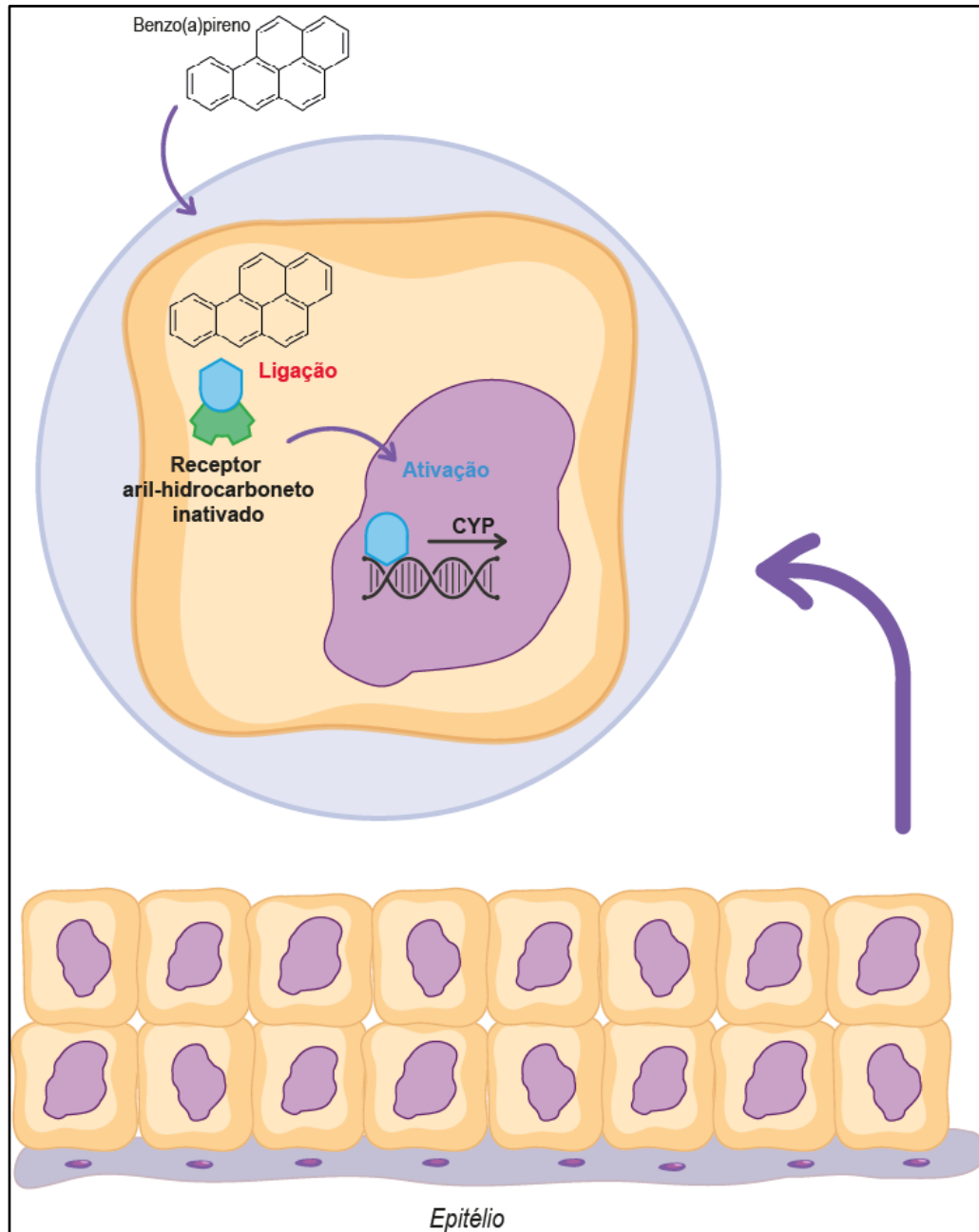


Figura 2. Ativação do receptor aril-hidrocarboneto. Na imagem, Benzo(a)pireno (BaP) (exemplo) passa pela membrana da célula e encontra o receptor aril inativado, envolto em um complexo proteico. A ligação do BaP com o receptor o libera do complexo e resulta na sua translocação para o núcleo, onde regula elementos de resposta ao AhR, como as enzimas da família CYP (exemplo).

2.1.2 Câncer de pulmão

Do ponto de vista patológico e biológico, as células que constituem o sistema respiratório são diversas e quando se transformam em células cancerígenas também apresentam vários tipos de neoplasias fenotipicamente diversas e regionalmente distintas. Pode ser classificado em dois grandes grupos histopatológicos: câncer de

pulmão de células não pequenas (CPNPC) e câncer de pulmão de pequenas células (CPPC). CPNPC são divididos em três tipos principais: carcinoma de células escamosas (SCC); adenocarcinoma e carcinomas de células grandes (29-31). Como os carcinomas de grandes células podem representar formas indiferenciadas dos outros tipos de câncer, é um tipo vagamente definido e os critérios para seu diagnóstico variam (31).

A maioria dos SCC surgem do epitélio das vias aéreas geralmente em um brônquio principal ou lobar, enquanto o CPPC é comumente localizado centralmente no pulmão e os adenocarcinomas surgem principalmente dos bronquíolos e alvéolos distais. SCCs podem ter sua origem na célula basal, enquanto os adenocarcinomas muito provavelmente tem sua origem nas células exócrinas e no pneumócito tipo II (Figura 3) (31), (29, 32, 33).

Figura 3: Regiões características de cada subtipo de tumor

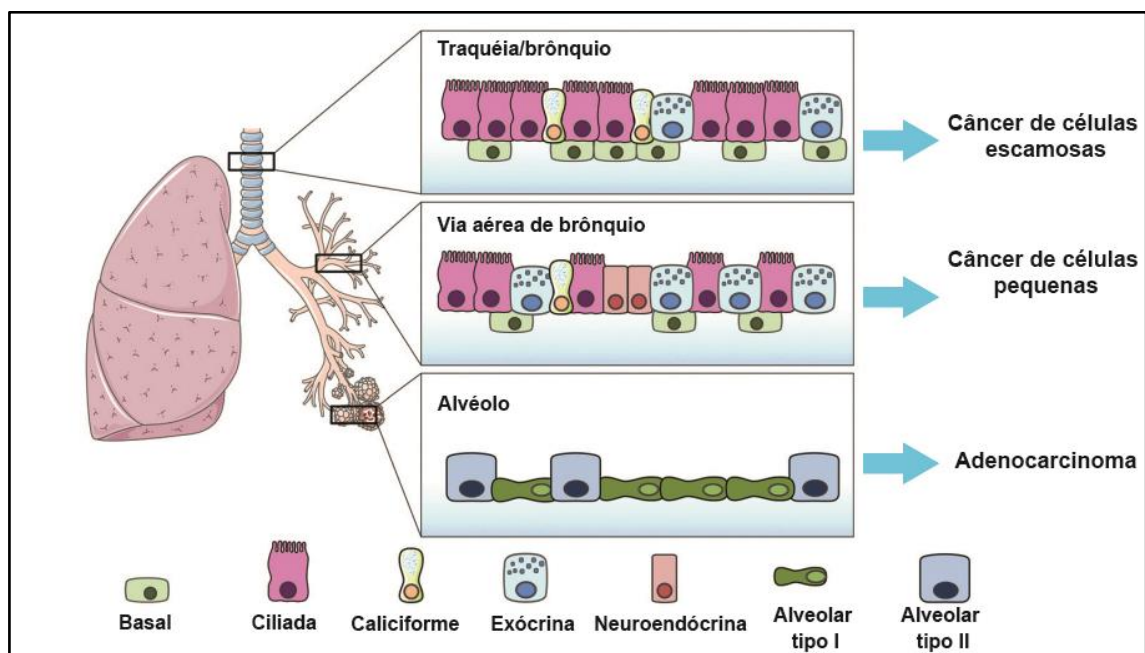


Figura 3: Tipos celulares do sistema respiratório e o subtipo de tumor característico de cada região. Fonte: Adaptado de Bonastre et al. (2016).

O câncer de pulmão também é etiologicamente heterogêneo; embora o tabagismo seja responsável por mais de 80% dos casos, o risco de câncer de pulmão entre não fumantes está aumentando constantemente, sendo que a maioria dos cânceres de pulmão em não fumantes são adenocarcinomas. Uma observação global consistente é que o câncer de pulmão em não fumantes ocorre com mais frequência em mulheres do que em homens. (29, 31, 33).

Estudos epidemiológicos identificaram vários fatores ambientais, genéticos e hormonais associados ao risco de câncer de pulmão (31). Entre os fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de pulmão em nunca-fumantes, destaca-se (31, 32):

- Fumante passivo: embora a dose de carcinógenos seja muito menor do que a do fumante, devido à sua diluição no ar, metabólitos de carcinógenos específicos do tabaco são detectáveis em não-fumantes expostos.
- Fatores hormonais: a predominância do sexo feminino entre os pacientes não fumantes também implica um papel potencial para os hormônios sexuais. Os receptores de estrogênio são expressos tanto no tecido pulmonar normal quanto nos tumores pulmonares.
- Radônio: o radônio é um gás radioativo produzido a partir da decomposição do urânio natural em rochas e solo. Embora quimicamente inerte, o radônio se decompõe em produtos ativos que se ligam ao material particulado no ar e são inalados, onde aderem ao epitélio respiratório.
- Suscetibilidade ao câncer de pulmão herdada: estudos identificaram alguns loci e polimorfismo de nucleotídeo único dentro de algumas regiões cromossômicas que contribuem para o risco de câncer de pulmão (histórico familiar de câncer de pulmão).
- Vapores de óleo de cozinha e queima interna de carvão: as altas taxas de câncer de pulmão entre mulheres que nunca fumaram na China levaram a estudos avaliando o papel potencial de fatores ambientais, como exposição a vapores de óleo de cozinha e queima de carvão em ambientes fechados. Substâncias voláteis geradas a partir de óleos de cozinha demonstraram ser mutagênicas e contêm HPAs.
- Resposta inflamatória: é relatado que a inflamação crônica desempenha um papel na iniciação e promoção do tumor.
- Metabolismo cancerígeno: polimorfismos para genes que codificam as enzimas implicadas no metabolismo cancerígeno podem contribuir para a variabilidade na suscetibilidade individual ao câncer.
- Genes de reparo de DNA: polimorfismos de genes envolvidos em mecanismos de reparo de DNA também foram estudados como fatores de risco para câncer de pulmão em nunca fumantes.

Evidências de associação entre exposição à poluição atmosférica e câncer de pulmão têm sido frequentemente relatadas na literatura. Raaschou-Nielsen et al. (2013) (34) analisaram 17 coortes de 9 países europeus (Áustria, Itália, Espanha, Grécia, Reino Unido, Suécia, Dinamarca, Países Baixos e Noruega) a fim de verificar a associação entre a exposição residencial ao material particulado da poluição do ar e o risco de câncer de pulmão. As associações foram mais fortes para adenocarcinomas de pulmão nos participantes que permaneceram vivendo em grandes centros urbanos durante o acompanhamento. De acordo com os autores, dos principais subtipos histológicos de câncer de pulmão, o adenocarcinoma é o único que também se desenvolve em número substancial de não-fumantes, sendo geralmente associado a exposição a grupos de poluentes atmosféricos cancerígenos, como HPAs e compostos N-nitrosos, como as nitrosaminas.

Em estudo com células de linhagem imortalizada de adenocarcinoma de pulmão (A549) expostas Benzo(a)pireno (BaP), foi encontrada atividade proliferativa aumentada via fosforilação de EGFR, Akt e ERK e alteração do perfil de expressão gênica, sugerindo que BaP pode atuar, potencialmente, tanto como um carcinógeno, quanto de tumor no câncer de pulmão, ativando a via de sinalização do EGFR (26).

O risco de desenvolvimento de tumores depende da alteração na atividade de um grupo de genes críticos para o câncer, em que suas atividades podem ser aumentadas ou diminuídas. Várias anormalidades moleculares adquiridas têm sido observadas no câncer de pulmão que contribuem para a gênese do tumor e podem ser necessárias para a manutenção do tumor (32). O câncer de pulmão em não fumantes parece ser uma doença distinta com caminhos genéticos separados que são causados por mutações discretas em genes promotores de tumores, ao contrário das alterações genéticas observadas no câncer de pulmão em fumantes (33).

Para três genes principais envolvidos na patogênese dos cânceres de pulmão, EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico), KRAS (kirsten rat sarcoma) e TP53 (gene de reparo do DNA), diferenças marcantes nas alterações moleculares foram encontradas em cânceres de pulmão em não e em fumantes, fornecendo evidências de que esses cânceres surgem por meio de mecanismos moleculares distintos (31). Por exemplo, em adenocarcinomas de não-fumantes a mutação de EGFR é mais frequente; mutações de KRAS são mais encontradas em

adenocarcinomas de fumantes; mutações TP53 são frequentes em ambos, mas são mais comuns em CPNPCs em fumantes (31).

2.1.2.1 Marcadores de câncer de pulmão

Devido às possíveis diferenças na etiologia do câncer de pulmão de fumantes e não fumantes, sendo estes últimos associados à inalação de fuligem, fumaça e particulado urbano, foi feita uma pesquisa sobre os principais marcadores de câncer de pulmão de células não pequenas (CPNPC), em atenção especial aos subgrupos adenocarcinoma e células escamosas (SCC).

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é um membro do receptor de tirosina cinase da família ERBB. Quando o ligante extracelular ativa o EGFR, ocorre homo ou heterodimerização desse receptor, levando à fosforilação de sítios na tirosina cinase citoplasmática e ativação de várias vias intracelulares, como fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K)/AKT/mTOR (mTOR = alvo mamífero da rapamicina) e RAS/RAF/MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno), que levam à proliferação celular, metástase e prevenção de apoptose (30, 31). A superexpressão de EGFR em CPNPCs tem sido associada a mau prognóstico. Mutações de EGFR são encontradas mais frequentemente em adenocarcinomas de mulheres que nunca fumaram (30). As mutações do EGFR são a primeira mutação genética específica associada aos pacientes não fumantes, e o aumento da exposição ao fumo está negativamente correlacionado com a mutação (29).

PI3Ks são cinases lipídicas heterodiméricas compostas por subunidades catalíticas e regulatórias e fazem parte de várias vias envolvidas no crescimento celular, transformação, adesão, apoptose, sobrevivência e motilidade. Amplificações, deleções e mutações somáticas de sentido errado de PIK3CA foram relatadas em muitos tumores, incluindo câncer de pulmão. Na verdade, PIK3CA é um dos oncogenes mais comumente mutados, foram relatadas com mais frequência no SCC em comparação com o adenocarcinoma (6,5% vs 1,5%) (30).

O gene PTEN (homólogo de fosfatase e tensina) codifica uma proteína que desfosforila o fosfoinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) em fosfoinosítideo-4,5-bifosfato (PIP2), e assim neutraliza a ação de PI3K. Anormalidades genéticas que levam à inativação de PTEN são características comuns em câncer de pulmão, preferencialmente em SCC e CPNPC, onde este gene é inativado em cerca de 20%

desses tipos de câncer. Ao aumentar os níveis de PIP2, o PTEN regula negativamente as funções controladas pelo eixo AKT/mTOR, como progressão do ciclo celular, enquanto a perda de PTEN parece induzir a aumento da migração e invasão celular dos tumores (29).

O supressor tumoral p53 (codificado por TP53) possui múltiplas funções, como a regulação de apoptose e respostas a danos no DNA. Mutações em TP53 são uma das alterações mais frequentes identificadas em células tumorais humanas, e as mutações comuns levam à geração de formas mutantes com sequências de aminoácidos alteradas que não possuem atividade de ligação ao DNA. Embora as mutações TP53 ocorram em cânceres de pulmão que surgem em fumantes e em não fumantes, elas ocorrem com menos frequência em tumores em não fumantes (29).

Diante das mutações mais frequentes dos tipos de câncer mais fortemente associados aos não fumantes, foi decidido que os marcadores de câncer escolhidos para este trabalho seriam: KRAS, EGFR, PIK3CA, PTEN e TP53. Apesar do fato de que as vias de KRAS e EGFR são redundantes na gênese de tumor pulmonar (29, 30, 32), ambos serão investigados, pois nosso modelo neste estudo é uma linhagem de células de brônquios normais, enquanto a célula controle é uma linhagem de adenocarcinoma KRAS mutada (A549) (35).

2.2 Defesas do Sistema Respiratório

O tecido do sistema respiratório é composto por diferentes tipos celulares que formam a interface entre o lúmen e o parênquima, desde a passagem nasal até os alvéolos. É o local de contato de todas as substâncias que entram pela inalação e, portanto, atua como uma barreira física e imunológica que protege o organismo de substâncias exógenas (35).

Com base nas características anatômicas e funcionais, o pulmão pode ser dividido em três domínios epiteliais com composição distinta de tipos de células epiteliais: a via aérea cartilaginosa proximal (traqueia e brônquios), bronquíolos distais (bronquíolos, bronquíolos terminais e bronquíolos respiratórios) e espaços aéreos de troca gasosa (alvéolos) (36).

Na zona condutora, a via aérea proximal é revestida por células epiteliais colunares pseudoestratificadas, predominantemente, incluindo células basais, exócrinas, ciliadas e caliciformes e intercaladas com glândulas submucosas abaixo

do epitélio superficial. Nas vias aéreas distais (bronquíolos), células secretoras, células ciliadas, neuroendócrinas e calciformes são as principais populações celulares. Na zona respiratória, o epitélio alveolar é revestido por pneumócitos alveolares cuboidais tipo II, produtores de surfactante, e pneumócitos alveolares escamosos tipo I, de troca gasosa (Figura 4) (36, 37).

Figura 4: Representação do epitélio das vias aéreas

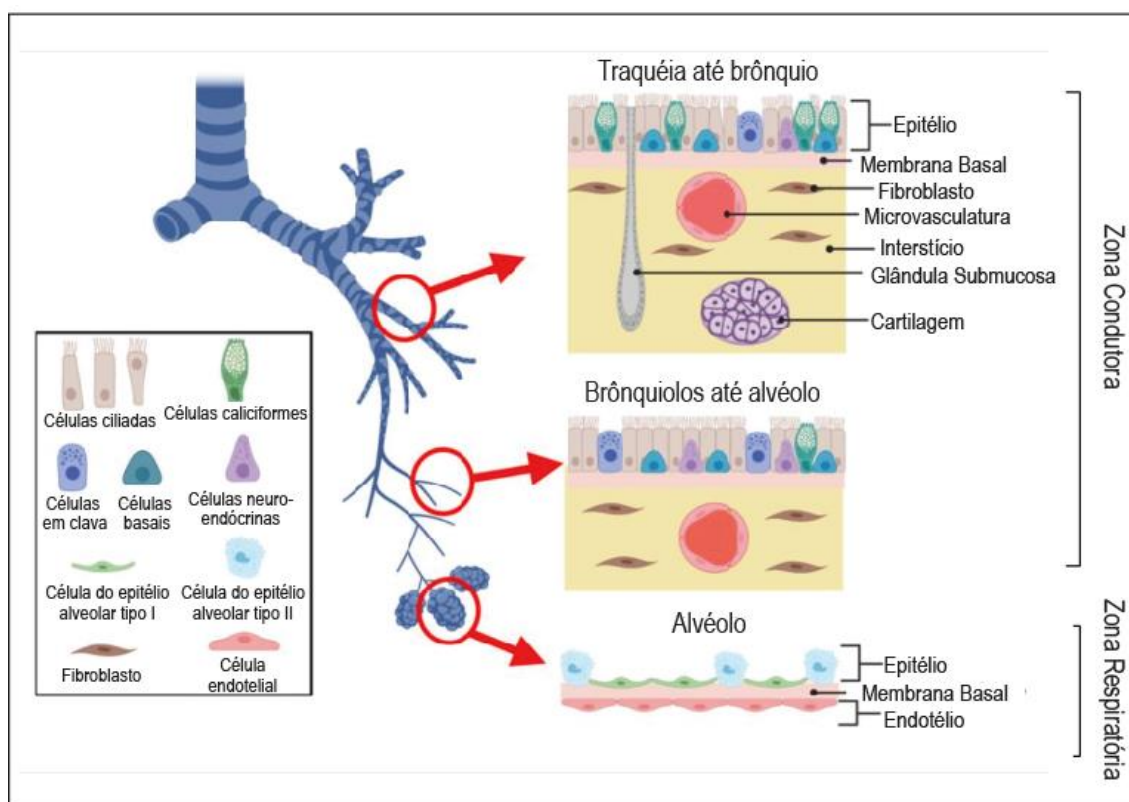


Figura 4. Representação esquemática do epitélio das vias aéreas, desde a traquéia até os alvéolos. Fonte: Adaptado de Bennet et al. (2021) (38)

A extensa superfície epitelial do trato respiratório entre o nariz e os alvéolos é exposta diariamente a patógenos virais e bacterianos, partículas e material gasoso com efeitos potencialmente nocivos. Em resposta, o organismo desenvolveu uma série de mecanismos de defesa para proteger as vias aéreas, mantendo os pulmões em uma condição quase estéril. A defesa pulmonar envolve tosse, barreiras epiteliais, produção de mucina e proteínas bactericidas e mecanismos imunológicos (35, 39). Toxinas inaladas, como fumaça de cigarro, danificam as junções que mantêm as células epiteliais unidas, resultando em um epitélio permeável, hiperproliferativo e anormalmente diferenciado (35).

O mecanismo de defesa primário das vias aéreas é o transporte mucociliar. As células epiteliais têm cílios bem desenvolvidos e produzem muco composto principalmente de glicoproteínas, como a mucina. Corpos estranhos que ficam presos na camada de muco são levados em direção à boca pelo movimento ciliar, onde podem ser deglutidos ou expelidos pela tosse ou pelo espirro (39, 40). Algumas mucinas estão associadas às células e são necessárias para manter a homeostase de hidratação das vias aéreas para a motilidade ciliar normal, enquanto as mucinas secretadas para formar uma fase de gel, liberadas pelas glândulas submucosas e células caliciformes, são fundamentais para a limpeza de microorganismos e poluentes das vias aéreas, via aparelho mucociliar (41).

As partículas do PM maiores que 10 μm geralmente ficam presas no nariz e na garganta e não chegam nos pulmões. Partículas menores que 10 μm , mas maiores que 2 μm , se depositam na árvore traqueobrônquica e são eliminadas pelo transporte mucociliar. Partículas menores ainda, ultrafinas, podem atravessar as vias aéreas e se depositar na região alveolar (23), sendo necessária a presença do sistema de defesa imunológica nas vias aéreas (40). Nesta região, células fagocitárias, incluindo neutrófilos e macrófagos, são recrutadas por citocinas e quimiocinas e engolfam essas partículas por fagocitose. O transporte mucociliar então transporta neutrófilos e macrófagos carregados de partículas (23, 40). Defeitos neste mecanismo podem levar a infecções recorrentes, como visto em pacientes com fibrose cística, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e discinesia ciliar (35).

A homeostase imune pulmonar é mantida tanto pelos leucócitos locais e recrutados, quanto pelas próprias células epiteliais pulmonares, que são imunologicamente ativas e capazes de secretar citocinas que influenciam os leucócitos vizinhos (42). Estudos de cultura de células mostraram que células epiteliais brônquicas humanas estimuladas com extratos de poluentes produzem quantidades aumentadas de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e GM-CSF (21).

Além das células epiteliais brônquicas, a mucosa respiratória consiste em células imunes residentes, como macrófagos alveolares, células dendríticas, granulócitos, como os neutrófilos, e células da imunidade adaptativa, como linfócitos T e B (21). As células dendríticas são uma população de células apresentadoras de antígeno, altamente especializadas, capazes de apresentar peptídeos ligados às

proteínas do MHC (complexo de imuno-histocompatibilidade) da sua superfície e são as células imunes mais importantes para a ativação de linfócitos T, representando uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa (21, 43).

No pulmão humano, os linfócitos são organizados em tecidos linfóides secundários e terciários. Após a ativação antigênica, os linfócitos T pulmonares adquirem a capacidade de produzir um amplo repertório de citocinas. Essas moléculas atuam como mediadores críticos das funções celulares e das comunicações célula-célula, influenciando muitas propriedades fisiológicas do tecido, incluindo proliferação, diferenciação e ativação de outras células imunocompetentes (44).

As células T produtoras de citocinas podem ser subdivididas em tipos de células, com base no padrão de produção de citocinas. Os linfócitos TH1 secretam IL-2, IL-12, IFN γ e TNF α , enquanto os linfócitos TH2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-10. Ambos os tipos de células produzem GM-CSF e IL-3 (44). Além desses, as subpopulações de células TH17 produzem IL-17, IL-21 e IL-22 e são capazes de mediar a inflamação crônica, enquanto os linfócitos T reguladores (Treg) tem função de suprimir respostas imunes superreativas/ autoimunes e podem induzir a produção de IL-10, por exemplo (45).

Contudo, as células imunes de “primeira resposta” nos pulmões são as células imunes inatas nas vias aéreas, como macrófagos alveolares e neutrófilos, que podem responder rapidamente a patógenos inalados (21). Os neutrófilos desempenham uma ampla gama de funções, desde eliminação bacteriana a reparação tecidual, e apesar de serem considerados células imunes de curta duração, no contexto de inflamação e doenças pulmonares crônicas a sua vida útil é prolongada devido à resistência à apoptose (46). Além disso, neutrófilos produzem proteases inflamatórias, como a elastase, que está envolvida em mecanismos pró-inflamatórios, facilita a transmigração de leucócitos e regula a expressão de mucinas (41).

O pulmão contém dois subconjuntos de macrófagos diferentes, com base na posição e função anatômicas: macrófagos intersticiais e macrófagos alveolares. As subpopulações e características fisiológicas dos macrófagos intersticiais estão sendo gradualmente elucidadas, enquanto os macrófagos alveolares já são mais conhecidos. Os macrófagos alveolares, por sua vez, possuem duas subpopulações distintas: macrófagos alveolares residentes em tecido e macrófagos alveolares derivados de monócitos (47).

Embora a plasticidade dos macrófagos envolva mecanismos complexos e dependentes do ambiente em que eles se desenvolvem, os macrófagos geralmente são distribuídos em dois fenótipos distintos: “M1”, pró-inflamatório, em resposta a estimuladores como IFN- γ , GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) e LPS (lipopolissacarídeos), apresentando atividade bactericida e tumoricida, gerando espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico e produzindo alto nível de citocinas pro-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, configurando assim uma resposta do tipo TH1; e “M2”, anti-inflamatório, em resposta ao M-CSF (fator estimulante de colônia de macrófago) e citocinas anti-inflamatórias como IL-13 e IL-4, tendo papel central na reparação do tecido, remodelamento e cicatrização, promovendo uma resposta do tipo TH2 (10, 48, 49).

Quando ocorre infecção ou lesão, os monócitos migram para a cavidade alveolar e se diferenciam em macrófagos derivados de monócitos. Devido à sua origem, esses macrófagos são mais suscetíveis de assumirem diferentes fenótipos em resposta aos estímulos do microambiente do que os macrófagos alveolares residentes nos tecidos, que parecem ter menor capacidade de resposta e plasticidade limitada, sendo mais restritos a um fenótipo “M2”, anti-inflamatório (47).

A inflamação é um mecanismo de defesa natural do corpo para remover estímulos nocivos, como patógenos, substâncias irritantes e células danificadas e iniciar o processo de cicatrização. Inicialmente, a inflamação é um processo benéfico que ajuda a conter a região lesionada e permite que o resto do sistema imunológico se mobilize para curar as lesões. Por outro lado, o processo inflamatório a longo prazo se transforma em um problema e não em uma solução. Tecidos cronicamente inflamados normalmente recrutam células imunes da corrente sanguínea para amplificar a resposta inflamatória, mas sua permanência prolongada na região inflamada pode destruir tecidos saudáveis circundantes em uma tentativa fracassada de iniciar o processo de cicatrização (50).

A inflamação das vias aéreas geralmente é causada por patógenos ou pela exposição a toxinas, poluentes e alérgenos. A inalação de poluentes existentes no ambiente causa danos celulares no tecido pulmonar e contribui para o agravamento de doenças crônicas, como asma e DPOC (50).

2.2.1 Poluição atmosférica e defesa imune inata

As partículas da poluição atmosférica podem se depositar no epitélio das vias aéreas e interagir tanto com o epitélio, quanto com os leucócitos residentes e desencadear respostas imunes (Figura 5). Os componentes da poluição estimulam as células através de uma variedade de mecanismos de detecção celular, incluindo Toll-Like Receptors (TLRs), vias de detecção de ERONs e vias de detecção de HPAs, como o receptor de aril. Estes, por sua vez, ativam cascatas de sinalização intracelular pró-inflamatórias, como a via NFkB e MAPK (21).

Figura 5: Exemplo de atuação do PM nas vias aéreas

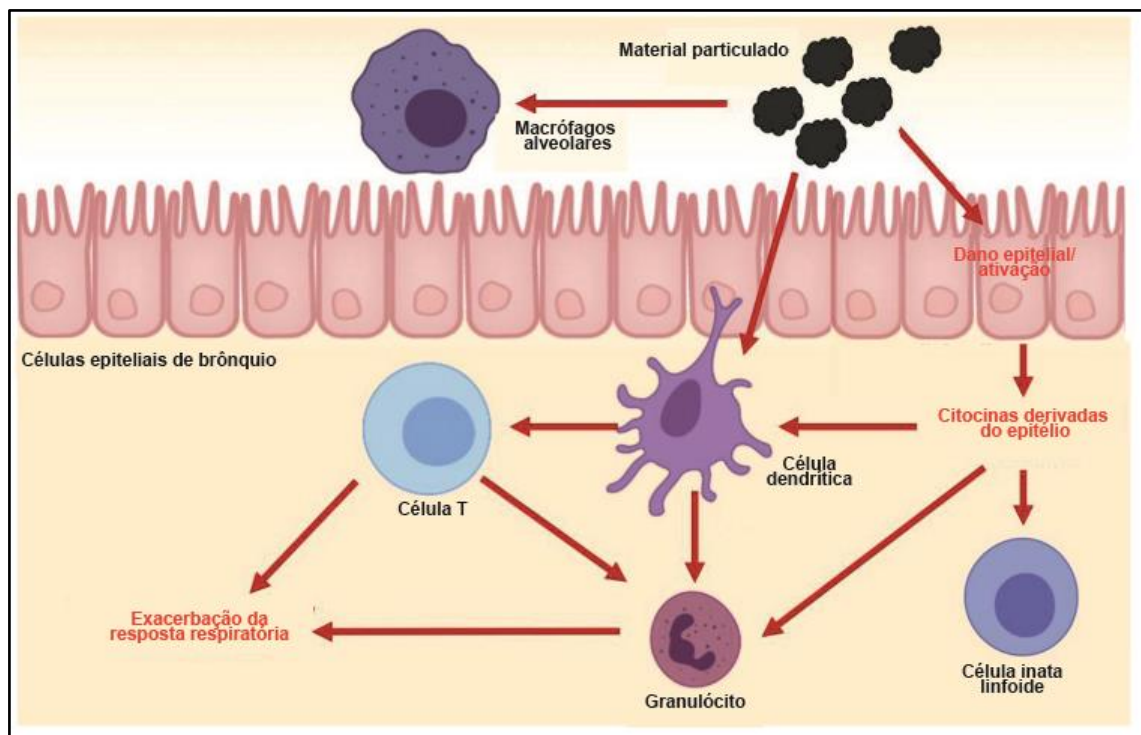


Figura 5: Atuação do PM no epitélio das vias aéreas. O PM pode sensibilizar diretamente as células do próprio epitélio das vias aéreas, as células dendríticas e os macrófagos. A comunicação entre as células que primeiro foram sensibilizadas vai ativar novas células e iniciar a resposta imune, como as células linfóides inatas e as células T. Fonte: Adaptado de Glencross et al. (2020).

O PM pode gerar espécies reativas oxidantes, sendo bem conhecido por causar estresse oxidativo e redução de antioxidantes endógenos. O estresse oxidativo pode induzir a sinalização de NFkB e AP-1, bem como transcrição de genes contendo o promotor do elemento de resposta antioxidante (ARE). Nrf2 é o principal fator de transcrição que atua nas sequências do promotor ARE para aumentar a expressão do genes antioxidantes (21, 51) e pode interagir com as vias de sinalização NFkB e MAPK (21).

Os HPAs na poluição do ar, principalmente em DEP, podem se ligar ao AhR e alterar a homeostase imune pulmonar, já que o receptor possui sinalização cruzada com vários fatores de transcrição inflamatórios e antioxidantes, como ROR γ t, STAT1, Nrf2 e NF κ B (21). Estudos com BEAS-2B expostas ao DEP indicam que essas partículas foram capazes de gerar resposta imune no modelo de células de vias aéreas, indicando que elas podem acionar as defesas imunológicas do sistema respiratório. Foi encontrado aumento na produção de IL-6 e IL-8 (11 e 4 vezes, respectivamente) após 24 ou 48 h de exposição ao DEP (52).

Existe ainda a possibilidade de que o AhR participe da formação da barreira de mucina no pulmão tanto durante a homeostase, quanto durante a infecção, por influência de ligantes endógenos (53). Sendo o AhR um regulador de uma das principais vias de metabolismo de HPAs, pode-se dizer que o AhR possui uma possível função imunomodulatória no sistema respiratório quando exposto aos HPAs da poluição atmosférica.

A inalação constante de PM pode causar um desajuste no funcionamento do aparelho mucociliar e exacerbação das defesas imunes no pulmão. A antracose pulmonar é caracterizada pela formação de pigmentação preta na mucosa brônquica, resultado de partículas inaladas que não foram removidas pelas defesas do sistema respiratório (54, 55).

2.3 Fisiopatologia da antracose

Antracose é o termo usado para descrever a pigmentação preta dos pulmões e árvore traqueobrônquica causada pelo depósito de partículas de carbono inaladas. Se trata de uma lesão pulmonar caracterizada por pigmentação das células por partículas de carvão endocitadas e tem sido encontrada tanto em pulmões quanto em linfonodos (1, 47, 55). Em termos fisiológicos, não há alteração diretamente relacionada à antracose, mas geralmente está associada à proliferação da mucosa, causando obstrução (antracofibrose), sendo tosse e dispneia os principais sintomas dessa condição (1, 55).

Geralmente a antracose está relacionada à exposição ocupacional de carvoeiros e mineradores e exposição doméstica em áreas rurais de países em desenvolvimento (1, 55), de pessoas com histórico de tabagismo (47), em trabalhadores de mineração, populações de grandes centros urbanos ou em áreas

com altos índices de poluentes atmosféricos, (4, 56, 57). A poeira de carvão pode conter sílica livre, que pode desencadear inflamação nos alvéolos, proliferação de fibroblastos, deposição de matriz extracelular e eventualmente resultar em fibrose pulmonar difusa (58, 59).

Contudo, outros elementos como ferro, cádmio, chumbo, sílica, fenol, hidrocarbonetos e outras substâncias orgânicas e inorgânicas derivadas da poluição atmosférica também podem causar essa pigmentação. A inalação de poeira gerada pela mineração de carvão pode levar ao desenvolvimento de doenças pulmonares, como bronquite crônica, enfisema, fibrose difusa relacionada à poeira, além da pneumoconiose clássica dos trabalhadores de carvão. A exposição à poeira também pode afetar a função pulmonar de mineiros em um padrão semelhante ao da DPOC, principalmente para aqueles que são fumantes (60-63).

A doença pulmonar de mineradores de carvão e outros trabalhadores expostos a poeiras de minas demonstra o acúmulo inicial de partículas de poeira, macrófagos e outras células inflamatórias. Amoli et al. (2009) (5) reportaram 102 casos de mudanças crônicas das vias aéreas com depósitos antracóticos significativos, em que as mulheres (n = 60) foram expostas à inalação de fumaça interna a longo prazo, devido a queima de carvão advinda da exposição durante o cozimento de pão caseiro, e os homens (n = 42) tinham uma variedade de atividades que envolviam inalação ocupacional de fumaça. A histopatologia do tecido pulmonar mostrou partículas semelhantes a carbono dentro do citoplasma dos macrófagos na parede brônquica e partículas livres nos linfonodos mediastinais.

Em 1963, Zeidberg e Prindle (64) sugeriram que a antracose pleural poderia servir como um índice de exposição à poluição do ar e concluiu que o valor depositado nos pulmões teve associação positiva com o tempo de exposição (tempo de vida na cidade), com a ressalva de que o tabagismo não foi considerado. A exposição à poluição atmosférica dos centros urbanos, associada ou não ao uso do tabaco, tem sido indicada como uma das causas da antracose nos indivíduos. Por exemplo, um estudo feito por Souza et al. (1998)(6), constatou que moradores não-fumantes de Guarulhos, região metropolitana de São Paulo, que vivem em ambiente poluído, apresentaram maior quantidade de pigmento de carbono em sua parede traqueobrônquica, quando comparados a moradores não-fumantes de regiões menos

expostas à poluição, em Ribeirão Preto e Ourinhos, sugerindo que a antracose pode representar um marcador de exposição à poluição atmosférica.

A quantidade de carbono negro acumulado nos macrófagos das vias aéreas está associada a variações regionais de concentração de partículas de poluição ambiental em crianças (65) e adultos (66) e, portanto, a antracose pode ser considerada como uma variável de longo-termo de acúmulo de carbono negro no parênquima pulmonar (3).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa realizou um estudo baseado em autópsia, com moradores da cidade de São Paulo, para verificar se a exposição à poluição atmosférica urbana está associada ao grau de antracose pulmonar. Os resultados indicam que a proporção de antracose na superfície pleural dos pulmões está positivamente associada à idade e à exposição ao ar poluído derivado do tráfego, sugerindo um padrão dependente do tempo (Figura 6). (3).

Figura 6 – Histoquímica microscópica representativa de antracose

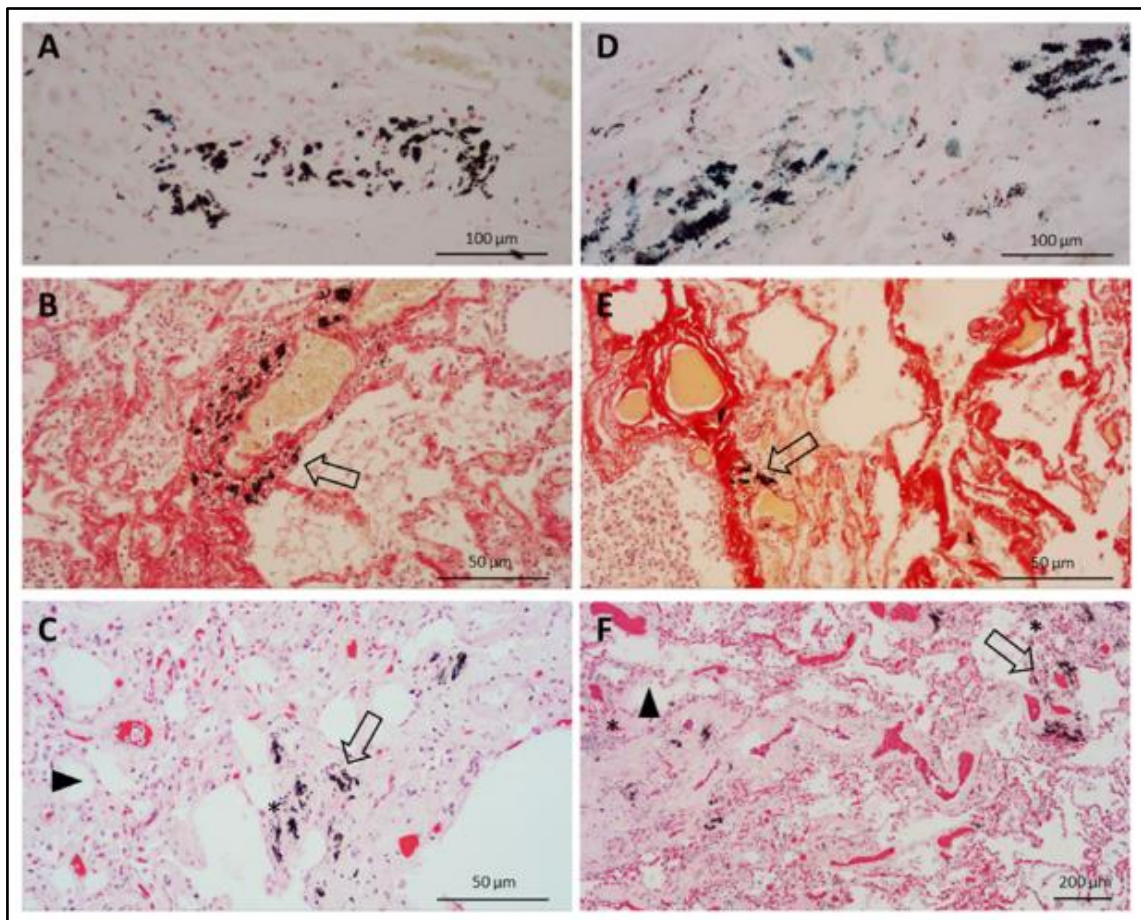


Figura 6: Histoquímica microscópica representativa de antracose (manchas pretas) no lobo pulmonar superior. A, B e C são imagens do lobo superior de uma mulher de 78 anos (sempre residindo em São

Paulo), não fumante, dona de casa e falecida por infarto do miocárdio. Os painéis D, E e F representam imagens do lobo superior de uma mulher de 67 anos (com apenas 1 ano de residência em São Paulo), tabagista com 1,5 maços-ano, dona de casa e falecida por tromboembolismo pulmonar. Fonte: Takano et al. (2019).

Lesões malignas associadas à antracose foram relatadas esparsamente, apesar de não haver associação epidemiológica ou etiológica entre antracose e câncer de pulmão (1) Jamaati et al. (2017)(54) avaliaram o nível de expressão do gene LUNX, marcador tumoral em câncer de pulmão, e dos genes supressores de tumor P16 e CDH1 em lesões antracóticas e tecidos saudáveis adjacentes, para avaliar a correlação da antracose com câncer de pulmão de células não pequenas. Os autores encontraram diminuição da expressão de P16 e CDH1 e o aumento da expressão de LUNX no centro das lesões antracóticas, em comparação com as margens.

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Elucidar os mecanismos moleculares que ocorrem nas células do pulmão e macrófagos na antracose é de extrema importância para ajudar a esclarecer a fisiopatologia das doenças respiratórias causadas pela inalação de xenobióticos. Diante do que foi exposto nesta revisão bibliográfica, há diversos estudos que relacionam a exposição à poluição atmosférica a casos de câncer de pulmão, ou modificações genômicas que podem aumentar o risco de desenvolvimento de câncer. Entretanto, apesar de existir uma relação entre exposição ao PM/ lesões antracóticas/ expressão de genes tumorais (54), ainda não há estudos que mostram o efeito do extrato de antracose diretamente na expressão de oncogenes em co-cultura de células de epitélio respiratório e macrófagos. Uma vez que esses compostos já foram metabolizados, mas permanecem no epitélio pulmonar por muito tempo, a hipótese desta pesquisa é que o material proveniente da antracose ainda pode conter substâncias que danificam as células, podendo promover alterações nas cadeias de DNA de células saudáveis, não representando apenas um “imprinting” do PM metabolizado.

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial tóxico do material antracótico total extraído de pulmão acessando a expressão de oncogenes clássicos e o perfil de citocinas em co-cultura de células de via aérea (BEAS-2B e A549) e macrófagos.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar a composição de HPAs do Material Particulado da Antracose.
- Verificar a citotoxicidade das partículas, analisando o metabolismo e viabilidade celular das linhagens pulmonares e dos macrófagos;
- Avaliar a expressão dos oncogenes TP53, PTEN, EGFR e PIK3CA em linhagens de células pulmonares em co-cultura com macrófagos após a exposição ao material particulado da antracose;
- Avaliar a expressão dos genes CYP1A1 e CYP1B1, relacionados ao receptor Aril, principal via de metabolismo de xenobiótico dos HPA;
- Verificar a polarização dos macrófagos em anti-inflamatório (M2) ou inflamatório (M1) após a exposição às partículas;
- Avaliar a produção de citocinas nas co-culturas, pesquisando também perfil inflamatório e anti-inflamatório.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das partículas

Para este trabalho foram utilizados dois tipos de partículas: o material particulado da antracose, principal foco do estudo, e material particulado de diesel, utilizado como um controle positivo para antracose.

4.1.1 Material Particulado do Diesel (DEP)

O Material Particulado de Diesel (DEP) foi escolhido como um controle positivo para este estudo, por se tratar de uma partícula ambiental. O DEP foi coletado em 2015 a partir de um motor a diesel, com o auxílio de um retentor de partículas acoplado ao escapamento do veículo. O retentor de partículas consiste de um filtro bi-metálico que cria um campo capaz de reter o MP emitido a partir do escapamento. O aparelho foi desenvolvido pelo Prof. Paulo Roberto da Conceição.

O veículo escolhido era um ônibus Volkswagen, ano 2004, motor MWM x-10, 6 cilindros. Trata-se de um ônibus de uma companhia privada, que circula no bairro Campo Belo, região sul da cidade de São Paulo. O ônibus circula cerca de 100 a 150 km/dia e o retentor de partículas ficou acoplado ao escapamento por 1 semana.

A caracterização deste material está publicada (51), pois foi realizada durante o trabalho de meu mestrado.

4.1.2 Material Particulado da Antracose (MPA)

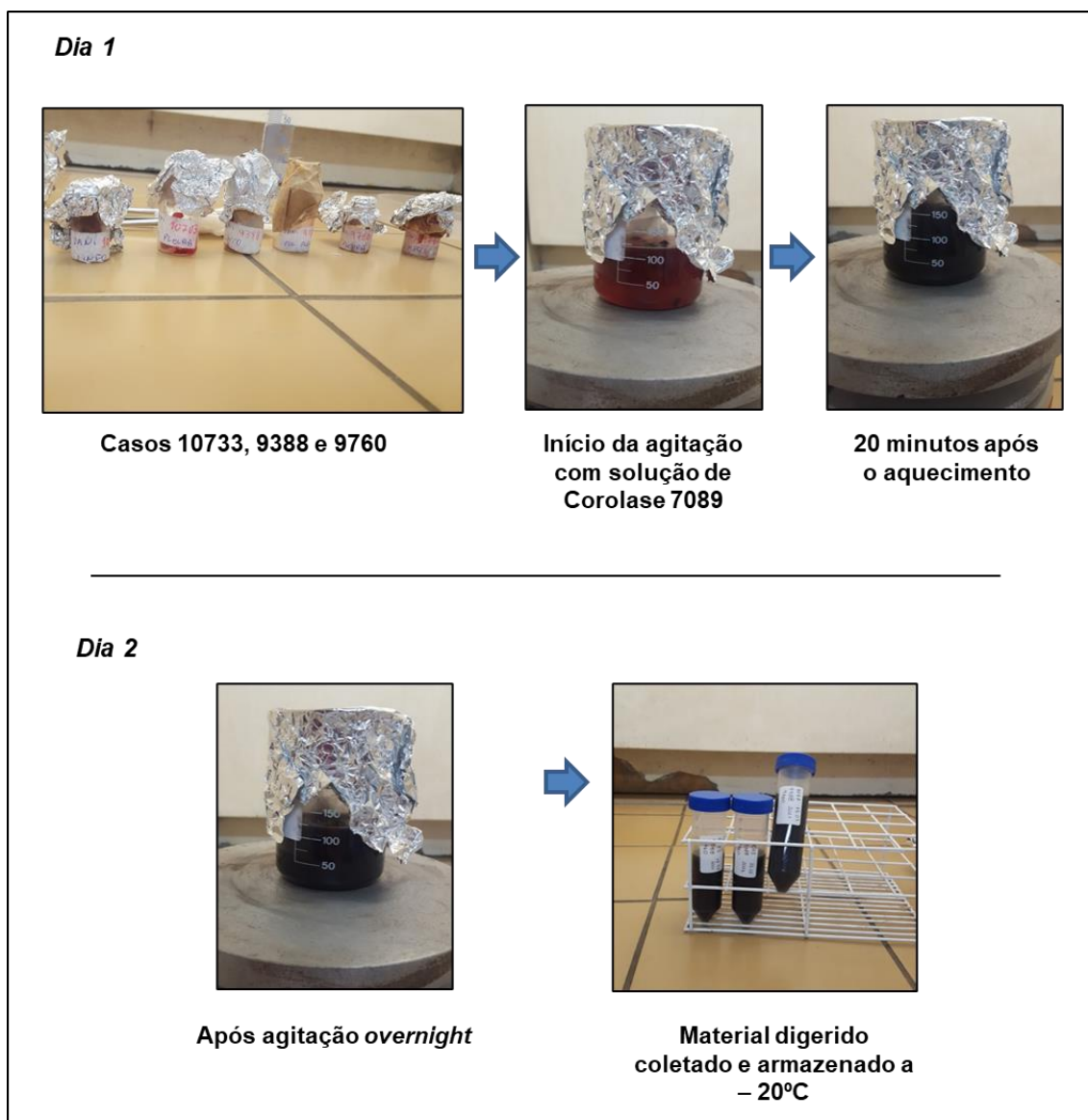
O material particulado da antracose utilizado nesse estudo foi coletado a partir de pulmão de pacientes que foram a óbito e foram encaminhados ao Serviço de Verificação de Óbito da Capital (SVO), na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os indivíduos escolhidos foram adultos, não fumantes e que residiam na cidade de São Paulo há pelo menos 5 anos. No período de agosto de 2019 até outubro de 2019, foram coletadas amostras de tecido pulmonar e linfonodos de 36 casos do SVO.

4.2 Extração do MPA

4.2.1 Digestão dos pulmões

O protocolo para extração do material particulado de antracose (MPA) foi adaptado de Catarino et al. (2017)(67). Por se tratar de um protocolo novo, é inevitável que alguns padrões sejam definidos empiricamente, por isso, alguns casos foram perdidos no início da padronização, restando um total de 33 casos para serem processados. Os fragmentos de linfonodo e pulmão foram pesados, picotados e permaneceram sob agitação “overnight” em uma solução de 1,5 mL de Corolase 7089 em 100 mL de água MiliQ. O sistema foi aquecido a 60°C por 24 horas (Figura 7).

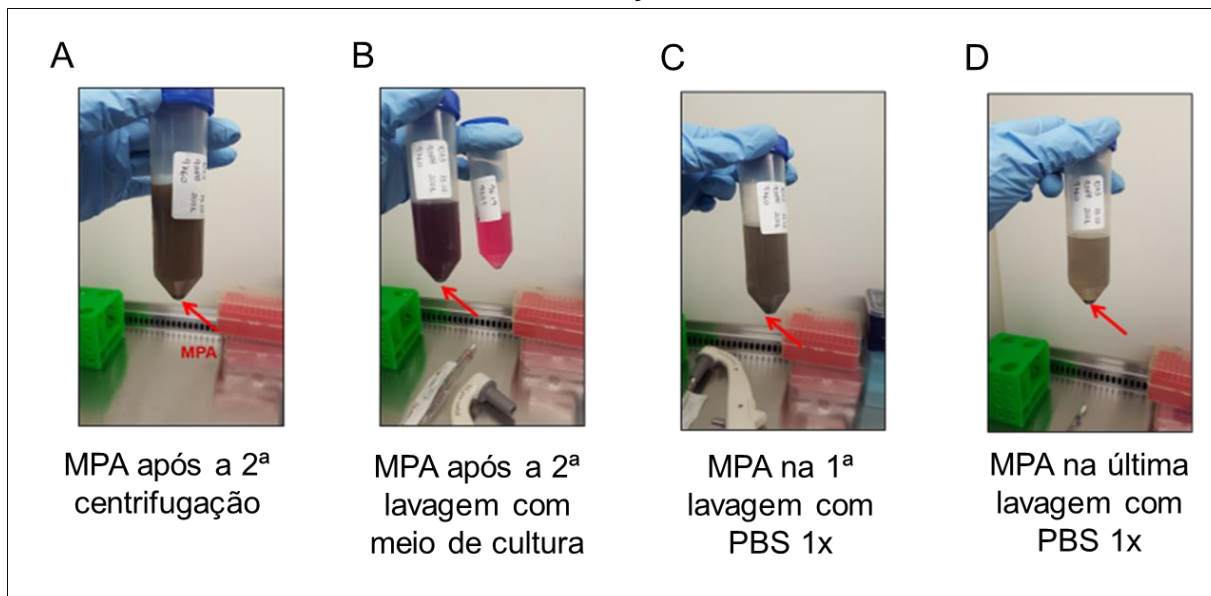
Figura 7 – Etapas de extração do material particulado da antracose



4.2.2 Lavagem, liofilização e esterilização do MPA

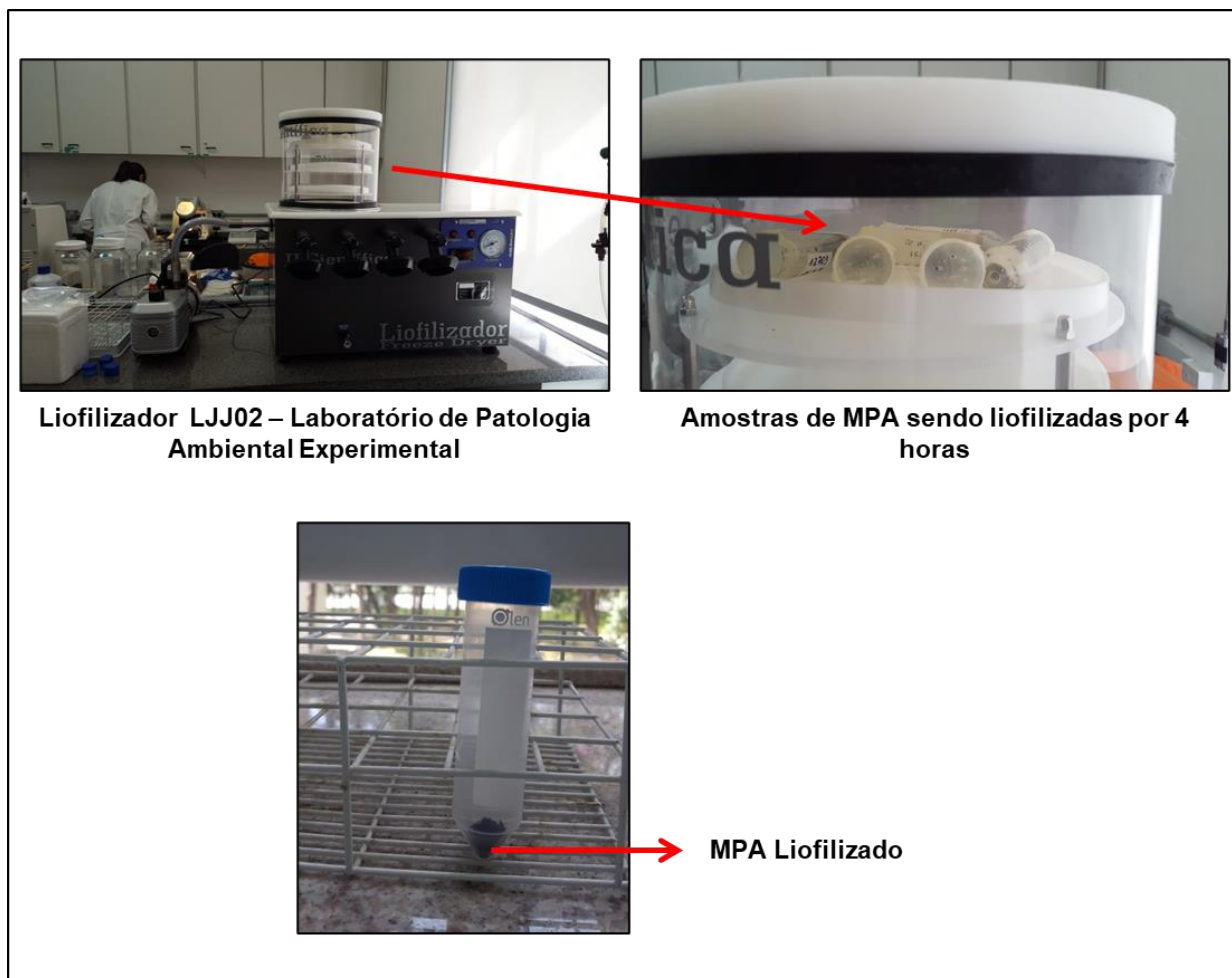
Após a digestão do material biológico, a fase líquida resultante foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos (2x), resultando em um precipitado preto (MPA). Para retirar resíduos de Corolase, o particulado preto foi lavado 2 vezes com meio de cultura e 2 vezes com PBS 1X (Figura 8), por meio de centrifugação (5000 rpm, 5 minutos).

Figura 8 – Lavagem do MPA. O pellet foi armazenado a -20°C para processo de liofilização.



O MPA lavado foi armazenado a -20° C e posteriormente congelado em nitrogênio líquido por alguns segundos, como preparo para liofilização. Após 4 horas no liofilizador (Figura 9), as amostras estavam em forma de pó e foram armazenadas no dessecador. O peso total dos fragmentos de pulmão e linfonodo coletado foi de 141,55 g e o peso de pó preto obtido ao final da digestão foi de 797,3 mg.

Figura 9 – Liofilização do MPA



O MPA, assim como o DEP, não é considerado um material estéril para exposição em cultura de células, por isso foi realizada descontaminação por irradiação gama no aparelho GAMMACELL (IPEN-USP), com dose de 25 KiloGrays por 60 horas, a mesma usada para irradiação na indústria alimentícia, que permite a eliminação de populações de microrganismos que promovem deterioração dos alimentos (esterilização industrial para carne de vaca e de frango, frutos do mar e dietas hospitalares) (68, 69).

4.3 Caracterização das partículas

Após o processo de descontaminação do MPA e do DEP, as partículas foram caracterizadas quimicamente, com controle antes e depois do processo no IPEN.

4.3.1 Compostos orgânicos

A determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) foi realizada

no Laboratório de Química e Manufaturados/Bionanomanufatura do Instituto de Pesquisas Tecnológicas - IPT.

Cerca de 100 mg de amostra foi pesada em um frasco e adicionada uma alíquota da solução de recuperação (contendo Terfenil-D14 na concentração de 1 µg/mL). A amostra foi extraída com duas porções distintas de 10 mL de diclorometano por 30 minutos em banho de ultrassom e o extrato foi concentrado em evaporador rotativo até 1 mL. Em seguida, foi adicionado uma alíquota da solução de padrão interno (contendo naftaleno-D8, fenantreno-D10, criseno-D12 e perileno-D12 na concentração de 1 µg/mL). O extrato foi então analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Para certificar de que a irradiação não altera a natureza dos compostos, tanto o DEP quanto o MPA foram analisados com e sem a dose de irradiação supracitada.

4.4 Grupos de estudo

A tabela 3 resume os grupos de estudo considerados para este trabalho:

Tabela 3 - Grupos de estudo

Grupos	Descrição
BEAS-2B	Cultura de células BEAS-2B apenas com meio de cultura
CCM1B	Co-cultura de células BEAS-2B e macrófago tipo 1 apenas com meio de cultura
CCM2B	Co-cultura de células BEAS-2B e macrófago tipo 2 apenas com meio de cultura
BEAS-2B MPA	Cultura de células BEAS-2B expostas ao MPA
CCM1B MPA	Co-cultura de células BEAS-2B e macrófago tipo 1 expostas ao MPA
CCM2B MPA	Co-cultura de células BEAS-2B e macrófago tipo 2 expostas ao MPA
BEAS-2B DEP	Cultura de células BEAS-2B expostas ao DEP
CCM1B DEP	Co-cultura de células BEAS-2B e macrófago tipo 1 expostas ao DEP
CCM2B DEP	Co-cultura de células BEAS-2B e macrófago tipo 2 expostas ao DEP
A549	Cultura de células A549 apenas com meio de cultura
CCM1A	Co-cultura de células A549 e macrófago tipo 1 apenas com meio de cultura

CCM2A	Co-cultura de células A549 e macrófago tipo 2 apenas com meio de cultura
A549 MPA	Cultura de células A549 expostas ao MPA
CCM1A MPA	Co-cultura de células A549 e macrófago tipo 1 expostas ao MPA
CCM2A MPA	Co-cultura de células A549 e macrófago tipo 2 expostas ao MPA
A549 DEP	Cultura de células A549 expostas ao DEP
CCM1A DEP	Co-cultura de células A549 e macrófago tipo 1 expostas ao DEP
CCM2A DEP	Co-cultura de células A549 e macrófago tipo 2 expostas ao DEP

4.5 Cultura de células

4.5.1 Cultivo e manutenção de BEAS-2B

As BEAS-2B (Sigma Aldrich) foram cultivadas em frasco de cultura de 25 cm² contendo meio de cultura LHC-9 (Gibco, Life Technologies), em câmara úmida a 37°C com 5% de CO₂. Para expandir a linhagem celular, uma vez atingida a confluência de 80- 90% no frasco de cultura, foi feita a passagem das células para um frasco novo. As células foram lavadas com PBS e incubadas com tripsina - EDTA 0,5% (Gibco-BRL, USA) a 37°C até se destacarem do frasco. Para inativar a ação da tripsina foi adicionado soro fetal bovino (SFB) na mesma proporção. As células foram então centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos, em seguida o sobrenadante foi removido e o pellet ressuspendido em meio de cultura. O meio contendo as células em suspensão foi distribuído para 2 novos frascos de cultura de 75 cm². Ao atingir a 4ª passagem, as células foram congeladas em tubos criogênicos, utilizando meio congelante (50% SFB; 40% LHC-9; 10% DMSO). Os tubos foram mantidos por 24h a -80° C e depois foram transferidos para nitrogênio líquido. A linhagem expandida foi utilizada para os estudos, ou seja, todas as células proviam da mesma expansão original.

4.5.2 Cultivo e manutenção de A549

As células de adenocarcinoma pulmonar foram gentilmente doadas pelos pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular do Câncer (LBMC), do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química – USP. As A549 foram cultivadas em frasco de cultura de 75 cm² contendo meio de cultura RPMI (Lonza) suplementado

com 10% de soro fetal bovino (SFB), em câmara úmida a 37°C com 5% de CO₂. Também para expandir a linhagem, as células em passagem 11 foram cultivadas nos frascos até atingirem 80-90% de confluência. As células foram recuperadas usando tripsina, posteriormente inativadas com soro fetal bovino, centrifugadas e semeadas para frascos novos, até o momento do congelamento na passagem 15.

As células A549 foram utilizadas neste estudo porque são células transformadas e podem fornecer uma via de comparação com as células de brônquios normais.

4.5.3 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico

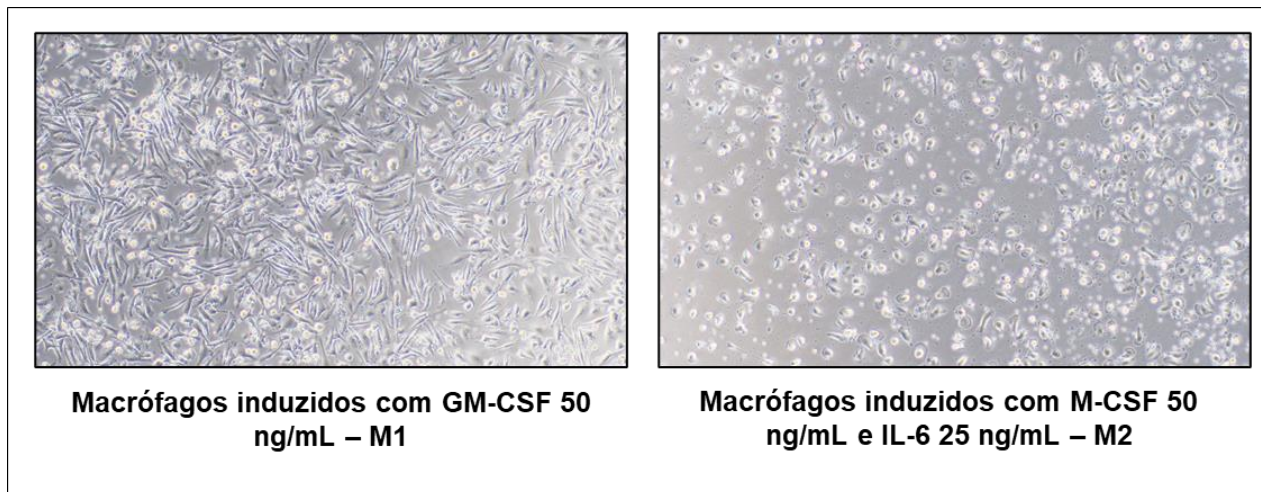
O sangue foi coletado de indivíduos saudáveis e sem histórico de tabagismo, em 7 tubos de heparina sódica de 9 mL. Os indivíduos escolhidos foram membros do grupo de pesquisa, alunos de iniciação científica e alunos de pós-graduação do departamento. As PBMCs foram separadas por densidade com HISTOPAQUE-1077 (d-1,077, Sigma Aldrich) na razão de 1:1. Após a centrifugação a 1000 g por 20 minutos, as PBMC foram coletadas e lavadas em PBS gelado três vezes, em duas velocidades decrescentes de centrifugação (1x 600 g por 10 minutos e 250g duas vezes por 10 minutos) para remoção das plaquetas e do ficoll residual. Em seguida, a concentração e viabilidade foi determinada pela contagem em hemocitômetro com corante Trypan Blue. As células foram distribuídas de forma homogênea nas placas, com RPMI sem SFB e após o período de 1:30 h, o meio de cultura foi trocado para remoção das células não aderidas. Cada experimento foi realizado individualmente para cada voluntário.

4.5.3.1 Cultivo e manutenção de macrófagos derivados de monócitos

Após os procedimentos descritos acima, as células ficaram por 72 horas com meio condicionado, em câmara úmida a 37°C com 5% de CO₂. Para a diferenciação para macrófagos, os monócitos foram incubados em RPMI 10% SFB suplementado com M-CSF (50 ng/mL, Peprotech, USA) e IL-6 (25 ng/mL, Peprotech, USA) para a polarização ao perfil M2 ou GM-CSF (50 ng/mL, Peprotech, USA), para a polarização ao perfil M1. No terceiro dia de cultivo, novamente o meio foi trocado e foi realizado um reforço das citocinas, trocando metade da quantidade de meio por meio fresco +

citocinas. Após 5 dias de cultivo, as células estavam prontas para os procedimentos experimentais (Figura 10).

Figura 10: Macrófagos derivados de monócitos em cultura



Aumento 200X

Os macrófagos são células que apresentam plasticidade, portanto, é natural que as populações apresentem fenótipos mistos. Portanto, neste trabalho os macrófagos pré-induzidos com GM-CSF serão denominados M1 e os pré-induzidos com M-CSF e IL-6 serão denominados M2, por convenção.

4.5.4 Estabelecimento das co-culturas

Para a co-cultura, as células BEAS-2B foram semeadas nas placas em que os macrófagos já estavam sendo cultivados por 5 dias. A proporção utilizada foi de 2:3, sendo aproximadamente 2×10^5 de macrófagos para 3×10^5 de BEAS-2B, totalizando em torno de 5×10^5 células em cada poço, da placa de 12 poços. A co-cultura foi mantida por 24 horas com LHC-9 antes das exposições.

O procedimento para co-cultura de A549 é basicamente o mesmo das BEAS-2B, com exceção de que não há substituição do meio de cultura utilizado, pois ambos os tipos celulares se mantêm em RPMI 10% SFB.

4.5.5 Exposição das células e co-culturas às partículas

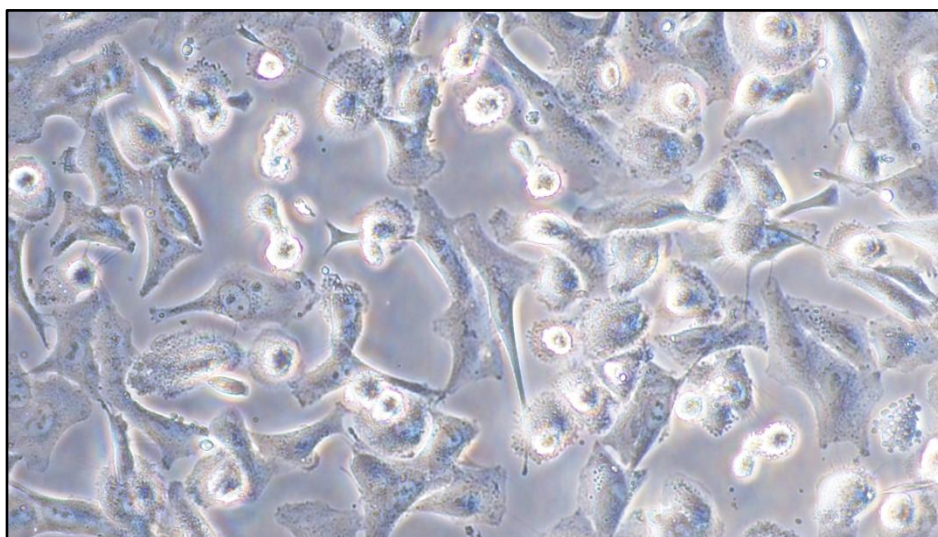
Após 24 horas de co-cultura, as células foram expostas a MPA e DEP na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ por 24 horas. Ao final da exposição, o sobrenadante de cada grupo foi coletado, centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos e armazenado a -80°

C, para futuras análises. As células foram tratadas com reagente TRIzol® (Thermo Scientific) e seguiu-se para os procedimentos de coleta de RNA.

4.6 Testes de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados nas linhagens celulares individualmente, ou seja, não foram realizados em co-culturas, uma vez que as células em cultura são muito parecidas e dificilmente percebidas ao microscópio (Figura 11), o que poderia gerar confusão caso houvesse morte ou metabolismo diferenciado de apenas um tipo celular.

Figura 11: Co-cultura de macrófagos com A549



Aumento 400x.

4.6.1 Ensaio MTT

Para avaliar se as partículas MPA e DEP são capazes de causar algum efeito no metabolismo das células BEAS-2B, foi realizado o teste do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]), um ensaio colorimétrico que avalia a capacidade das enzimas dependentes de NAD(P)H de converter o corante MTT em formazan, um composto arroxeadado.

As células foram cultivadas em meio LHC-9 (BEAS2-B) ou RPMI 10% SFB (A549) e plaqueadas em confluência mínima de 80%, em placas de 24 poços. As exposições ocorreram nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL, por 24 horas. Após as exposições, as células foram submetidas à 0,5 mL de meio de cultura contendo 20% de MTT 2,5 mg/mL. Depois de 4 horas de reação, a solução de MTT foi descartada e foram adicionados 0,5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO), para solubilizar

os cristais de formazan. A placa ficou sob agitação por 10 minutos e depois os sobrenadantes foram centrifugados por 10 minutos a 14000 rpm, para remoção de partículas remanescentes no sobrenadante. Em nova placa de 96 poços, a leitura dos ensaios foi realizada no aparelho ELISA-Spectra Max, nos comprimentos de onda de 570 e 690 nm.

Foram realizados 3 experimentos independentes para as linhagens imortalizadas (BEAS-2B e A549).

4.6.2 Ensaio LDH

Este teste colorimétrico tem base na medida da atividade da lactato desidrogenase (LDH) liberada do citosol de células danificadas no sobrenadante. Para tanto, as células BEAS-2B e A549 foram cultivadas em meio de cultura próprio e expostas às partículas pelos tempos de 2, 4, 8, 12 e 24 horas, na concentração de 50 µg/mL, sendo que em 24 horas, também foi feita à concentração de 100 µg/mL. O teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (Cytotoxicity Detection Kit – LDH – Sigma Aldrich).

As células foram expostas às partículas e o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 250 g por 10 minutos, para remoção do particulado preto. Para o teste, 100 µL do sobrenadante de cada grupo/duplicata foi transferido para uma placa de 96 poços, onde foi adicionado 100 µL de reagente em cada amostra e a placa ficou incubada, protegida da luz, a temperatura ambiente, por 30 minutos. Como sugestão de controle do fabricante, foi adicionado um grupo a mais, com células tratadas com a substância TRITON X, como parâmetro da liberação máxima de LDH. A absorbância das amostras foi medida no comprimento de onda 490 nm, com 600 nm de referência.

A porcentagem de células vivas foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\text{Citotoxicidade (\%)} = \frac{\text{amostra} - \text{grupo não exposto}}{\text{TRITON X} - \text{grupo não exposto}} \times 100$$

Foram realizados 3 experimentos independentes para as linhagens imortalizadas (BEAS-2B e A549).

4.6.3 Análise estatística

A análise estatística dos experimentos de MTT foi realizada no software Sigma Plot. Os valores relativos (controle não tratado = 1) foram analisados usando o teste

de variância One Way ANOVA para dados paramétricos e Kruskal Wallis para dados não paramétricos (nível de significância $p < 0.05$), e, quando demonstrada diferença, foi realizado o teste de Dunnett para pareamento dos grupos MPA e DEP versus o controle não tratado. Para o ensaio de LDH, foi escolhido o teste Two Way ANOVA para dados paramétricos (nível de significância $p < 0.05$), considerando os fatores tempo e tratamento. Quando demonstrada diferença, foi realizado o teste de Holm-Sidak pareamento dos grupos.

4.7 Citometria de fluxo

4.7.1 Co-cultura

Após os 5 dias de indução por citocina, os macrófagos M1 ou M2 plaqueados foram reunidos com as células pulmonares para formação da co-cultura considerando os grupos:

- CCM1B: BEAS 2B + M1 em meio de cultura LHC-9;
- CCM1B MPA: BEAS 2B + M1 em meio de cultura LHC-9 exposta a MPA 50 $\mu\text{g/mL}$;
- CCM2B: BEAS 2B + M2 em meio de cultura LHC-9;
- CCM2B MPA: BEAS 2B + M2 em meio de cultura LHC-9 exposta a MPA 50 $\mu\text{g/mL}$.

O DEP não foi incluído nessa etapa devido à ensaios preliminares que mostraram o risco da partícula de entupir o citômetro de fluxo. Esses experimentos de padronização da citometria de fluxo foram conduzidos no laboratório de imunofarmacologia da professora Sônia Jancar, com o auxílio dos alunos da mesma.

Foram realizados 3 experimentos independentes

4.7.2 Imunofenotipagem de macrófagos expostos ao MPA

Além das células em co-cultura, macrófagos isolados também foram submetidos ao MPA e realizada citometria. Para estes grupos, foi adicionado extrato de ácaro da poeira doméstica (HDM), gentilmente fornecido pela Prof^a Dr^a Thais Mauad, como controle para a modulação do perfil inflamatório das células. Após as exposições dos macrófagos às citocinas de diferenciação (5 dias) e ao MPA ou HDM por 24 horas a 50 $\mu\text{g/mL}$, os macrófagos foram retirados da placa de 6 poços usando hipotermia e ação mecânica: a placa ficou em gelo por 40 minutos mantidos só em

tampão salina; após esse período, delicadamente, os macrófagos foram retirados dos poços usando um raspador de células. A viabilidade foi verificada durante a citometria com o reagente Live and Dead (LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Sampler Kit – Thermo Fischer). Os marcadores utilizados foram:

- CD14 = marcador comum de macrófago;
- HLA-DR = marcador de perfil M1;
- CD163 = marcador de perfil M2.

Os marcadores, em suas respectivas diluições:

- Pe-Cy7 (fluoróforo) = HLA-DR 1:200 μ L;
- Alexa 647 (fluoróforo) = CD163 1:200 μ L;
- QD 605 (fluoróforo) = CD14 1:200 μ L;
- FITC (fluoróforo) = Live and Dead 0,25 μ L/mL

Para marcação, as células foram centrifugadas a 400 x g por 5 min a 4°C, ressuspendidas em tampão de coloração (PBS 0,1% BSA) e então separadas em:

- UN: um tubo com um mix de amostras não marcadas;
- M1 CTR: macrófagos M1 não expostos;
- M1 MPA: macrófagos M1 expostos a 50 μ g/mL MPA;
- M2 CTR: macrófagos M2 não expostos;
- M2 MPA: macrófagos M2 expostos a 50 μ g/mL MPA;

Cada tubo foi incubado com seu respectivo anticorpo (single color), mix de anticorpos (amostras) ou apenas PBS, (UN), por 30 min a 4°C. Depois da incubação, foi adicionado 3 mL de tampão de coloração gelado para lavar e os tubos foram centrifugados a 400 x g por 5 min a 4°C. Depois da lavagem, as células foram ressuspendidas em 200 μ l de PBS para aquisição no citômetro.

Para cada anticorpo do painel (chamados de Single Color), foram utilizadas beads humanas (BD Biosciences™) para fazer a compensação dos fluoróforos do painel no citômetro.

As amostras foram analisadas no citômetro Fortessa localizado no IMT - Instituto de Medicina Tropical, coletando 500.000 eventos em cada leitura. A estatística apresentada foi a fornecida pelo software de análise de citometria FLOREADA.IO. Foram realizados 3 experimentos independentes.

4.7.3 Análise estatística

A porcentagem de células positivas para HLADR e/ou CD163 foi submetida à análise estatística realizada no software Sigma Plot. Os parâmetros considerados foram o tratamento e a porcentagem de células dentro de cada marcador. Foi utilizado o teste TwoWay ANOVA para dados paramétricos (nível de significância $p < 0.05$), e quando demonstrada diferença foi realizado o teste de Tukey para pareamento dos grupos.

4.8 Expressão gênica

A expressão do RNA mensageiro dos genes CYP1A1, CYP1B1, AGR2, TP53, PTEN, PIK3CA, e EGFR foi realizada para os grupos de células imortalizadas BEAS-2B e A549 e suas respectivas co-culturas CCM1 e CCM2, após exposição a MPA ou DEP a 50 $\mu\text{g/mL}$ por 24 horas.

4.8.1 PCR em tempo real – RT-PCR

Para obtenção de RNA total foi utilizado o kit TRIzol™ Plus RNA Purification Kit (Invitrogen™). O kit extrai RNA com coluna de sílica, além de acompanhar um tratamento com DNase para evitar contaminação por DNA genômico (PureLink™ DNase Set - Invitrogen™). A quantidade e integridade das amostras de RNA foram verificadas no espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Para estabilidade das amostras, o RNA total foi convertido em DNA complementar (cDNA), utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™) e armazenado a -20°C .

Para detecção dos produtos da PCR em tempo real, foi utilizada a tecnologia de sonda Taqman. Para tanto, as sondas pré-desenhadas (Tabela 4) TaqMan™ Gene Expression Assay (Applied Biosystems™) foram incubadas com o reagente TaqMan™ Fast Advanced Master Mix for qPCR (Applied Biosystems™) em placa de 96 poços e lidas no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™).

Tabela 4 - Sondas utilizadas na reação de PCR em tempo real

GENE	CÓDIGO
TP53	Hs01034249_m1
PTEN	Hs02621230_s1
EGFR	Hs01076090_m1
PIK3CA	Hs00907957_m1
AGR2	Hs00356521_m1
CYP1A1	Hs01054796_g1
CYP1B1	Hs00164383_m1
RPL3a	Hs04194366_g1
β 2M	Hs00187842_m1

4.8.2 Padronização de genes endógenos

Após pesquisa em literatura, foi decidido testar 2 genes endógenos clássicos para padronização da PCR em tempo real: RPL13a (51), uma proteína ribossomal, e β 2M (70) uma proteína da classe MHC. Os genes endógenos foram testados utilizando amostras de cDNA de cada grupo, para cada exposição.

4.8.3 Análise estatística

O resultado da análise de RT-PCR foi obtida através do método Pfaffl (71), em que a expressão do gene alvo é normalizada por uma amostra de referência (controle não exposto), derivando um resultado relativo. Os valores relativos (controle não exposto = 1) foram analisados usando o teste de variância One Way ANOVA para dados paramétricos e Kruskal Wallis para dados não paramétricos (nível de significância $p < 0.05$), e, quando demonstrada diferença, foi realizado o teste Tukey para parear os grupos.

4.9 Análise de citocinas

O sobrenadante das culturas e co-culturas expostas a 50 μ g/mL de MPA ou DEP foi coletado, centrifugado a 14000 RPM por 10 minutos e armazenado a -80°C , para posterior análise das citocinas IFN γ , IL-10, IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α . As citocinas foram analisadas utilizando o ensaio multiplex MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel - Immunology Multiplex Assay (Merck™),

acoplado à plataforma Luminex® xMAP® em formato *beads* magnéticas. Os grupos analisados foram os da tabela 3, incluindo:

- M1 CTR;
- M1 HDM;
- M1 MPA;
- M2 CTR;
- M2 HDM;
- M2 MPA.

4.9.1 Análise estatística

Os valores da dosagem de citocinas em pg/mL foram analisados usando o teste de variância One Way ANOVA para dados paramétricos e Kruskal Wallis, para dados não paramétricos (nível de significância $p < 0.05$), e, quando demonstrada diferença, foi realizado o teste Tukey para parear os grupos.

5. RESULTADOS

5.1 Compostos orgânicos - HPA

De acordo com os resultados apresentados pelo IPT, não houve alteração na composição ou estrutura das partículas após irradiação com 25 Kgy por 48 horas. As tabelas 5 e 6 mostram a identificação dos HPAs presentes nas amostras de MPA e DEP, comparando amostras irradiadas e não irradiadas e as figuras 12 e 13 mostram a caracterização dos HPAs em MPA e DEP, partículas irradiadas *versus* não irradiadas:

Tabela 5 – Teor de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostra de antracose (HPA)

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)	CAS	Quantidade (µg/g)			
		MPA irradiado	MPA não irradiado	Limite de Detecção (DL)	Limite de Quantificação (QL)
Naftaleno (C ₁₀ H ₈)	91-20-3	2.44 ± 0.38	2.46 ± 0.09	0.01	0.1
Acenaftileno (C ₁₂ H ₈)	208-96-8	0.47 ± 0.06	0.33 ± 0.03	0.01	0.1

Acenafteno (C12H10)	83-32-9	ND	ND	0.01	0.1
Fluoreno (C13H10)	86-73-7	0.54 ± 0.23	0.23 ± 0.01	0.01	0.1
Fenantreno (C14H10)	85-01-8	0.53 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.01	0.1
Antraceno (C14H10)	120-12-7	< 0.1	< 0.1	0.01	0.1
Fluoranteno (C16H10)	206-44-0	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.01	0.1
Pireno (C16H10)	129-00-0	0.27 ± 0.01	0.56 ± 0.02	0.01	0.1
Benzo[a]antraceno (C18H12)	56-55-3	< 0.1	0.11 ± 0.01	0.01	0.1
Criseno (C18H12)	218-01-9	< 0.1	0.17 ± 0.05	0.01	0.1
Benzo[k]fluoranteno (C20H12)	207-08-9	ND	ND	0.01	0.1
Benzo[b]fluoranteno (C20H12)	205-99-2	ND	ND	0.01	0.1
Benzo[j]fluoranteno (C20H12)	205-82-3	ND	ND	0.01	0.1
Benzo[e]pireno (C20H12)	192-97-2	ND	< 0.1	0.01	0.1
Benzo[a]pireno (C20H12)	50-32-8	ND	< 0.1	0.01	0.1
Indeno[1,2,3-cd]pireno (C22H12)	193-39-5	ND	ND	0.01	0.1
Dibenzo[a,h]antraceno (C22H14)	53-70-3	ND	ND	0.01	0.1
Benzo[g,h,i]perileno (C23H14)	191-24-2	ND	ND	0.01	0.1
Total HPAs	-	4.39	4.48	-	-
Recuperação Média (%)	-	93	107	-	-

ND = não detectado

Tabela 6 – Teor de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostra de DEP.

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)	CAS	Quantidade (µg/g)			
		DEP irradiado	DEP não irradiado	Limite de Detecção (DL)	Limite de Quantificação (QL)
Naftaleno (C10H8)	91-20-3	5.17 ± 0.03	8.63 ± 0.04	0.01	0.1

Acenaftileno (C ₁₂ H ₈)	208-96-8	ND	ND	0.01	0.1
Acenafteno (C ₁₂ H ₁₀)	83-32-9	0.47 ± 0.01	0.69 ± 0.04	0.01	0.1
Fluoreno (C ₁₃ H ₁₀)	86-73-7	0.28 ± 0.01	0.44 ± 0.02	0.01	0.1
Fenantreno (C ₁₄ H ₁₀)	85-01-8	6.69 ± 0.02	9.22 ± 0.02	0.01	0.1
Antraceno (C ₁₄ H ₁₀)	0120-12-7	ND	ND	0.01	0.1
Fluoranteno (C ₁₆ H ₁₀)	206-44-0	3.12 ± 0.07	4.28 ± 0.03	0.01	0.1
Pireno (C ₁₆ H ₁₀)	129-00-0	3.09 ± 0.06	4.52 ± 0.04	0.01	0.1
Benzo[a]antraceno (C ₁₈ H ₁₂)	56-55-3	0.88 ± 0.01	1.22 ± 0.04	0.01	0.1
Criseno (C ₁₈ H ₁₂)	0218-01-09	0.81 ± 0.03	0.86 ± 0.05	0.01	0.1
Benzo[k]fluoranteno (C ₂₀ H ₁₂)	0207-08-09	0.76 ± 0.03	0.82 ± 0.01	0.01	0.1
Benzo[b]fluoranteno (C ₂₀ H ₁₂)	205-99-2	< 0.1	< 0.1	0.01	0.1
Benzo[j]fluoranteno (C ₂₀ H ₁₂)	205-82-3	< 0.1	< 0.1	0.01	0.1
Benzo[e]pireno (C ₂₀ H ₁₂)	192-97-2	0.55 ± 0.05	0.48 ± 0.02	0.01	0.1
Benzo[a]pireno (C ₂₀ H ₁₂)	50-32-8	1.21 ± 0.09	1.12 ± 0.05	0.01	0.1
Indeno[1,2,3-cd]pireno (C ₂₂ H ₁₂)	193-39-5	< 0.1	< 0.1	0.01	0.1
Dibenzo[a,h]antraceno (C ₂₂ H ₁₄)	53-70-3	< 0.1	< 0.1	0.01	0.1
Benzo[g,h,i]perileno (C ₂₃ H ₁₄)	191-24-2	< 0.1	< 0.1	0.01	0.1
Total HPAs	-	23.18	32.46	-	-
Recuperação Média (%)	-	110	109	-	-

ND = não detectado

É possível observar pela tabela 5 que não houve diferença significativa na quantidade, nem na natureza do MPA antes e após a irradiação, o que significa que a dose usada para descontaminação não interfere nas características químicas das partículas. Quanto às amostras de DEP (tabela 6), coletadas em 2015 conforme descrito por Frias et al. (2020)(51), não sofreram alterações na sua estrutura ou composição após a irradiação de 25 KyG. Em ambas, as quantidades dos demais

componentes permanecem muito próximas, confirmando que a irradiação não é a responsável por nenhuma mudança na constituição das amostras. Lembrando que a dose de 25 KyG é a mesma usada para irradiação na indústria alimentícia, que permite a eliminação de populações de microrganismos que promovem decomposição dos alimentos (descontaminação industrial para carne de vaca e de frango, frutos do mar e dietas hospitalares) (68, 69).

Figura 12 – Porcentagem dos tipos de HPA quanto ao número de anéis em amostra irradiada e não irradiada

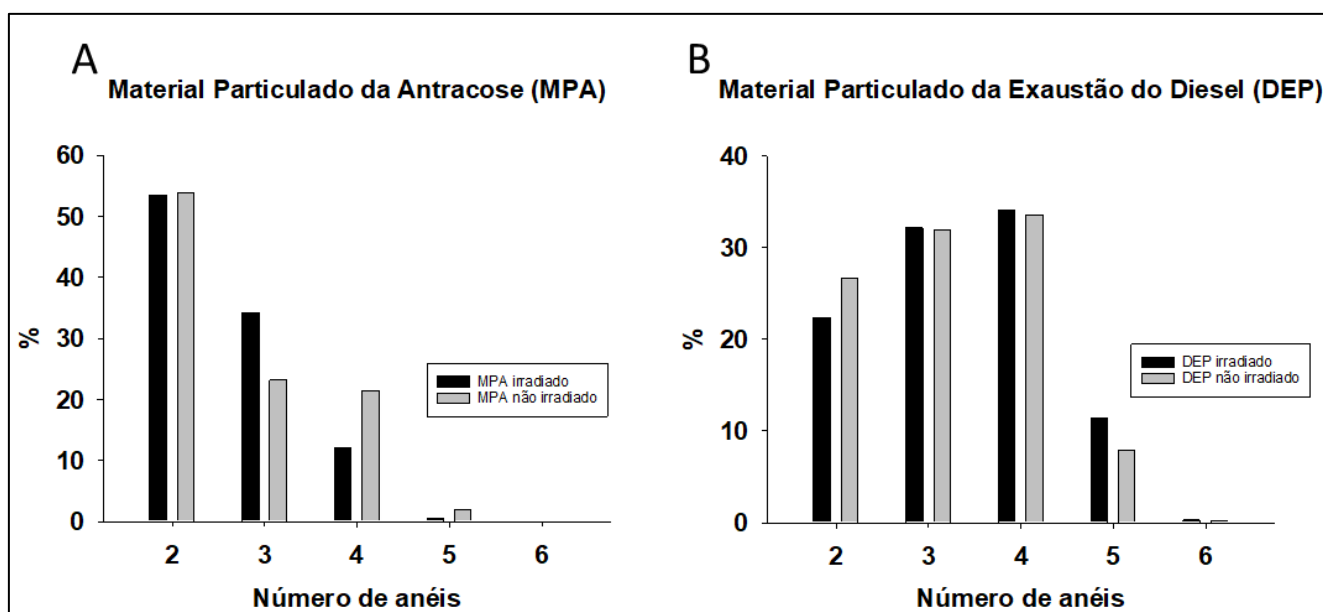


Figura 12: A) Porcentagem de HPAs de acordo com o número de anéis em MPA B) Porcentagem de HPAs de acordo com o número de anéis em DEP.

De acordo com a Figura 12 não houve diferença no perfil dos HPAs com ou sem o procedimento da irradiação. Contudo, é possível observar que DEP possui HPAs com uma variedade maior de anéis, apresentando espécimes com até 5 anéis de carbono, enquanto MPA possui a maioria com 2 ou 3 anéis.

Figura 13 – Relação dos HPAs de acordo com o peso molecular em amostra irradiada e não irradiada

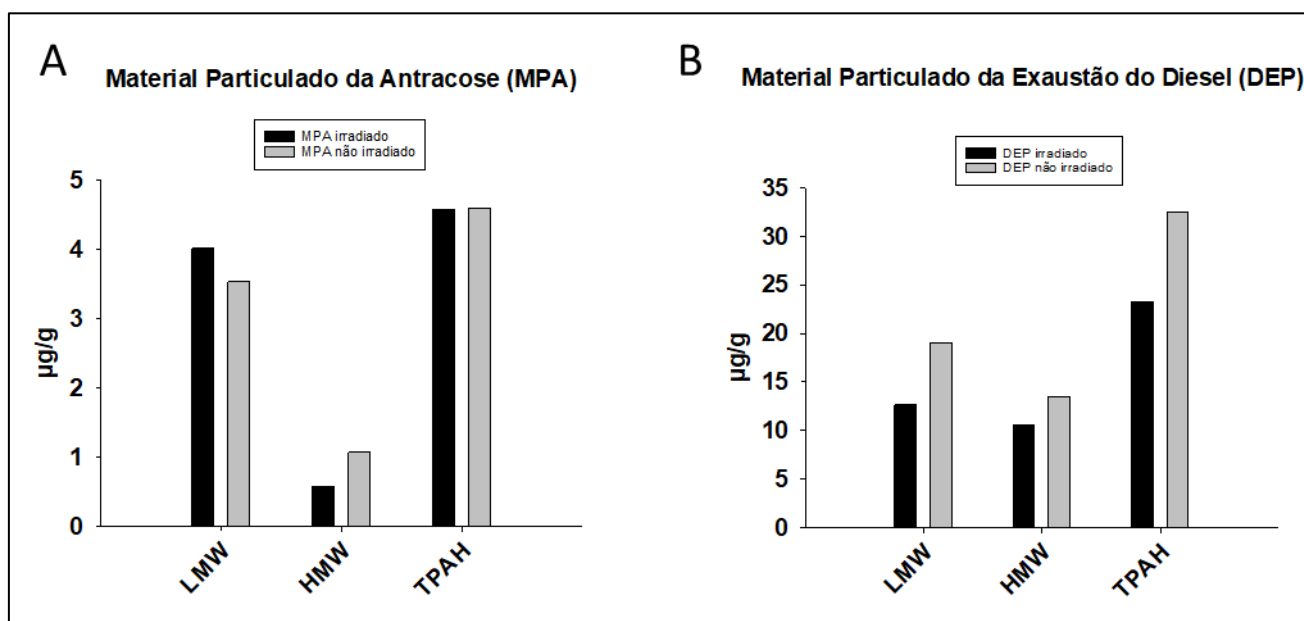


Figura 13: Relação entre HPAs de baixo peso molecular (LMW) e alto peso molecular (HMW) para o teor total na amostra A) MPA irradiado e não irradiado B) DEP irradiado e não irradiado. TPAHs = total de HPA

De acordo com a figura 13, a tendência de contribuição de HPA de baixo peso molecular se manteve após a irradiação, evidenciando pouco decaimento na amostra.

5.2 Citotoxicidade

5.2.1 MTT

Como é possível perceber na figura 20, as células BEAS-2B e A549 reagiram de maneiras diferentes às exposições a MPA e DEP nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 14: Resultado de MTT para BEAS-2B e A549

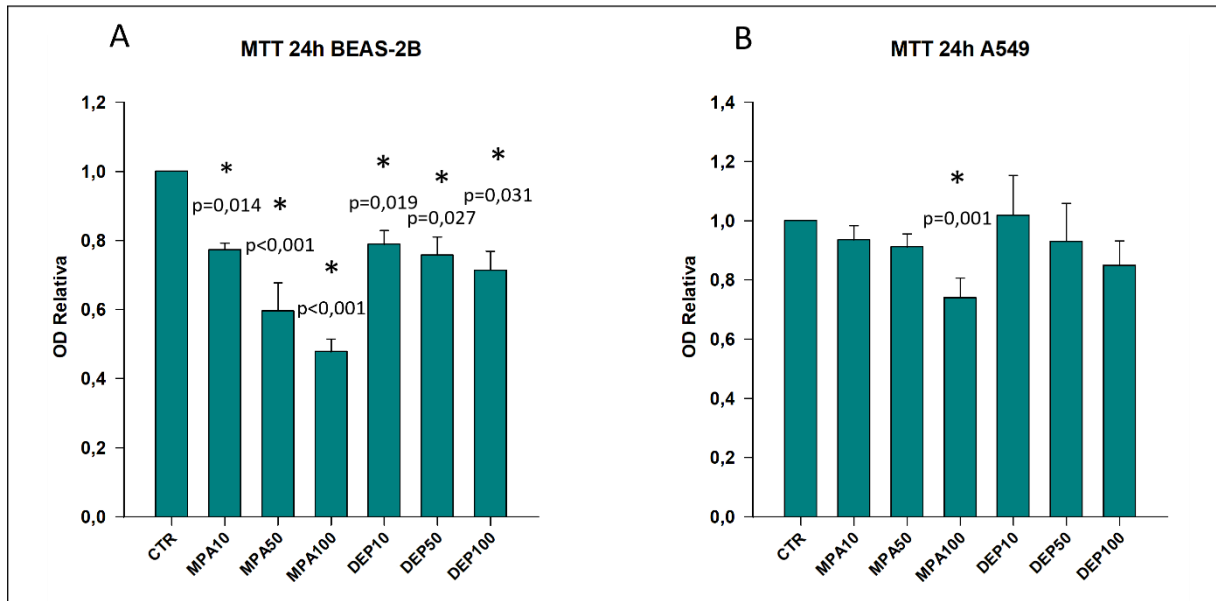


Figura 1420: Metabolismo celular de BEAS-2B e A549 após exposição a MPA e DEP por 24 horas. Os gráficos mostram a média dos valores relativos de OD. A) BEAS-2B expostas ao MPA e ao DEP nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL. B) A549 expostas ao material MPA ao DEP nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL.

As células de BEAS-2B apresentaram diminuição significativa do metabolismo em relação ao controle não exposto após as exposições a MPA e DEP, em todas as concentrações. Já os resultados para A549, apesar de mostrar uma tendência à diminuição do metabolismo na exposição ao DEP 100 µg/mL, não apresentou significância estatística. A exposição a MPA 100 µg/mL para a A549 foi o único a ter um efeito significativo no metabolismo da linhagem cancerígena.

5.2.2 LDH

As figuras 21 e 22 a seguir mostram os resultados do teste de viabilidade LDH em BEAS-2B e A549, em que foi medida a citotoxicidade relativa das células em cada grupo de exposição:

Figura 15: Resultado LDH para BEAS-2B

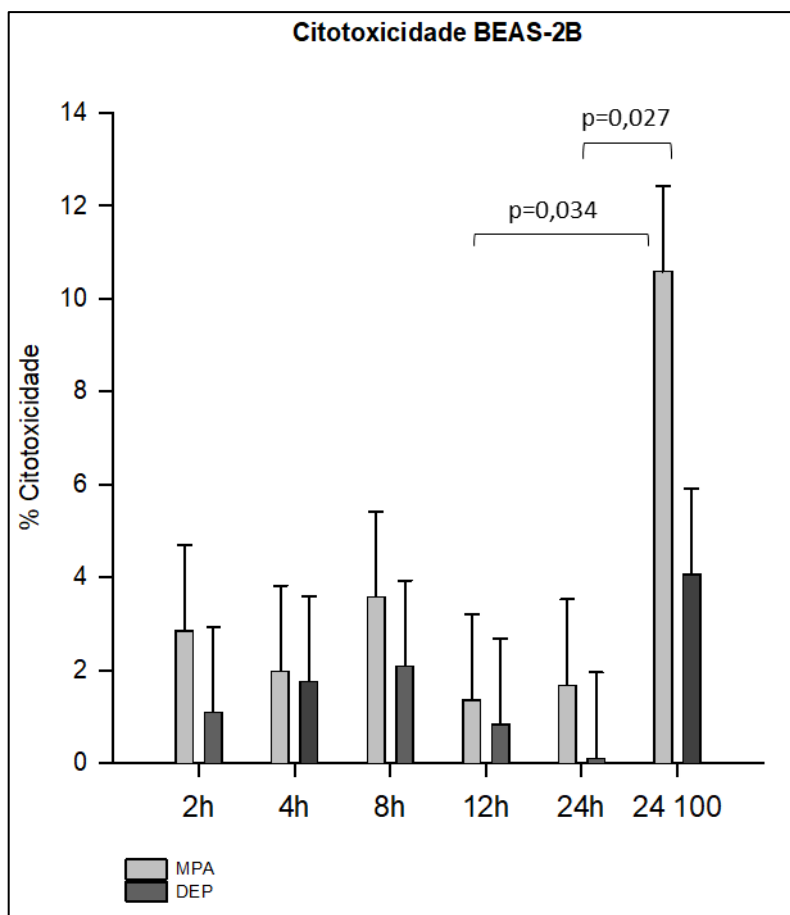


Figura 15: Resultados da citotoxicidade relativa após 2 horas, 4 horas, 8 horas e 12 horas a 50 µg/mL de MPA e DEP e 24 horas de exposição a 50 e 100 µg/mL.

Como mostrado na figura 21, na concentração de 50 µg/mL tanto as exposições curtas quanto as longas não causaram redução significativa da viabilidade, inferindo-se que não há citotoxicidade aguda provocada pelas partículas nessa concentração. As células expostas às partículas na concentração de 100 µg/mL, de MPA apresentaram citotoxicidade significativa em torno de 10%, no período de 24 horas.

A figura 16 mostra o resultado da citotoxicidade nas células A549.

Figura 16: Resultado LDH para A549

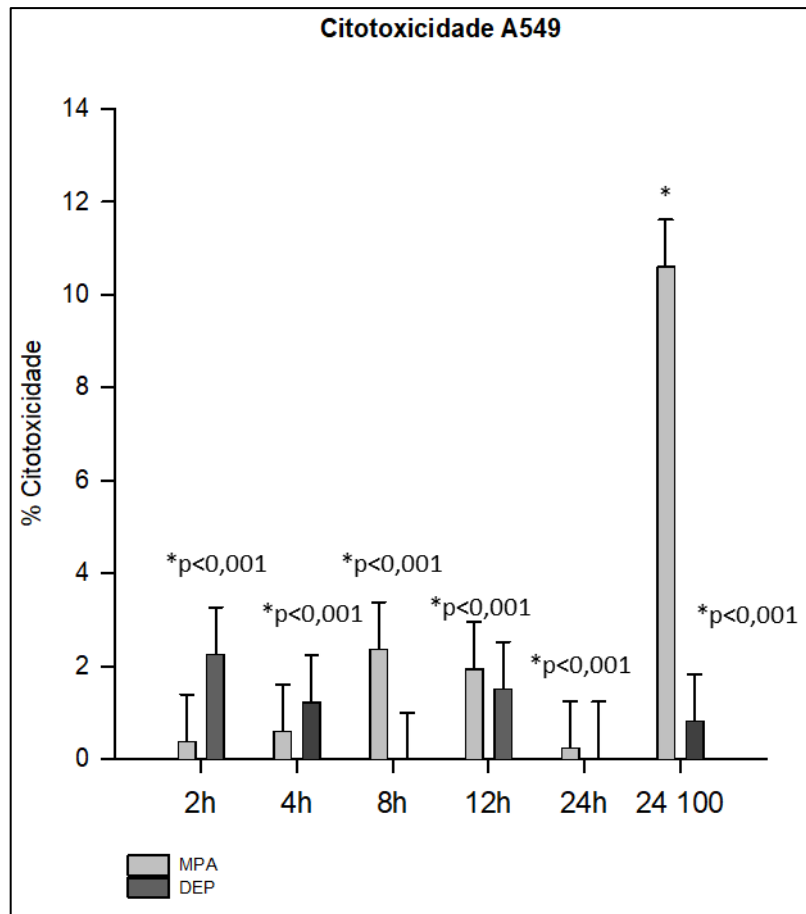


Figura 16: Resultados da citotoxicidade relativa após 2 horas, 4 horas, 8 horas e 12 horas a 50 µg/mL de MPA e DEP e 24 horas de exposição a 50 e 100 µg/mL. Houve diferença entre o grupo MPA 100 µg/mL exposto por 24 horas em relação aos demais(houve diferença entre o MPA e DEP ou entre o CTR e MPA ou DEP).

Assim como em BEAS-2B, não houve redução significativa na viabilidade das amostras expostas tanto ao MPA quanto ao DEP na concentração de 50 µg/mL. Contudo, a exposição a 100 µg/mL de MPA apresentou uma diferença significativa após 24 horas de exposição.

5.3 Citometria

5.3.1 Macrófagos

A Figura 17 representa o resultado do marcador de viabilidade celular “Live and Dead”, para macrófagos M1 e M2 tratados com meio de cultura (CTR), ácaro da poeira doméstica (HDM) ou particulado da antracose (MPA).

Figura 17 – Resultado do ensaio “Live and Dead” para macrófagos M1 e M2

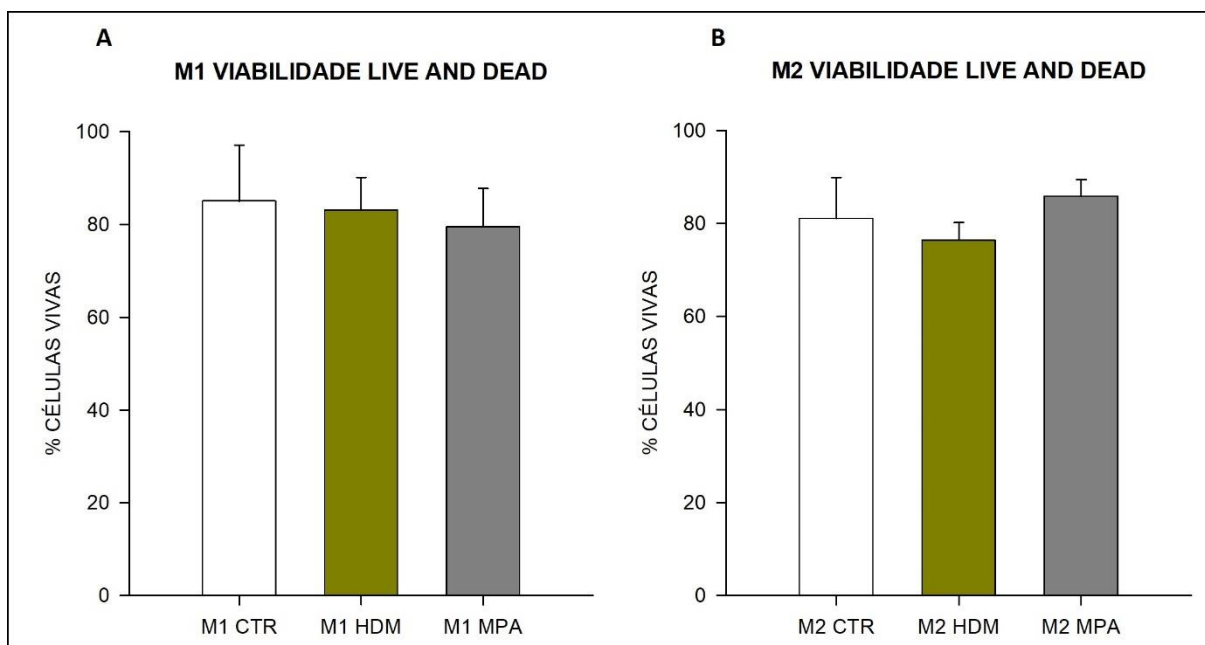


Figura 17: A) Viabilidade macrófago M1. B) Viabilidade macrófago M2. As culturas foram tratadas com MPA e HDM a 50 µg/mL por 24 horas.

As exposições não promoveram diminuição significativa na viabilidade celular, permanecendo em torno de 80% de células vivas para cada ensaio.

A imunofenotipagem dos macrófagos está representada nas figuras 18 e 19.

Figura 18 – Representação de um experimento de citometria para macrófago

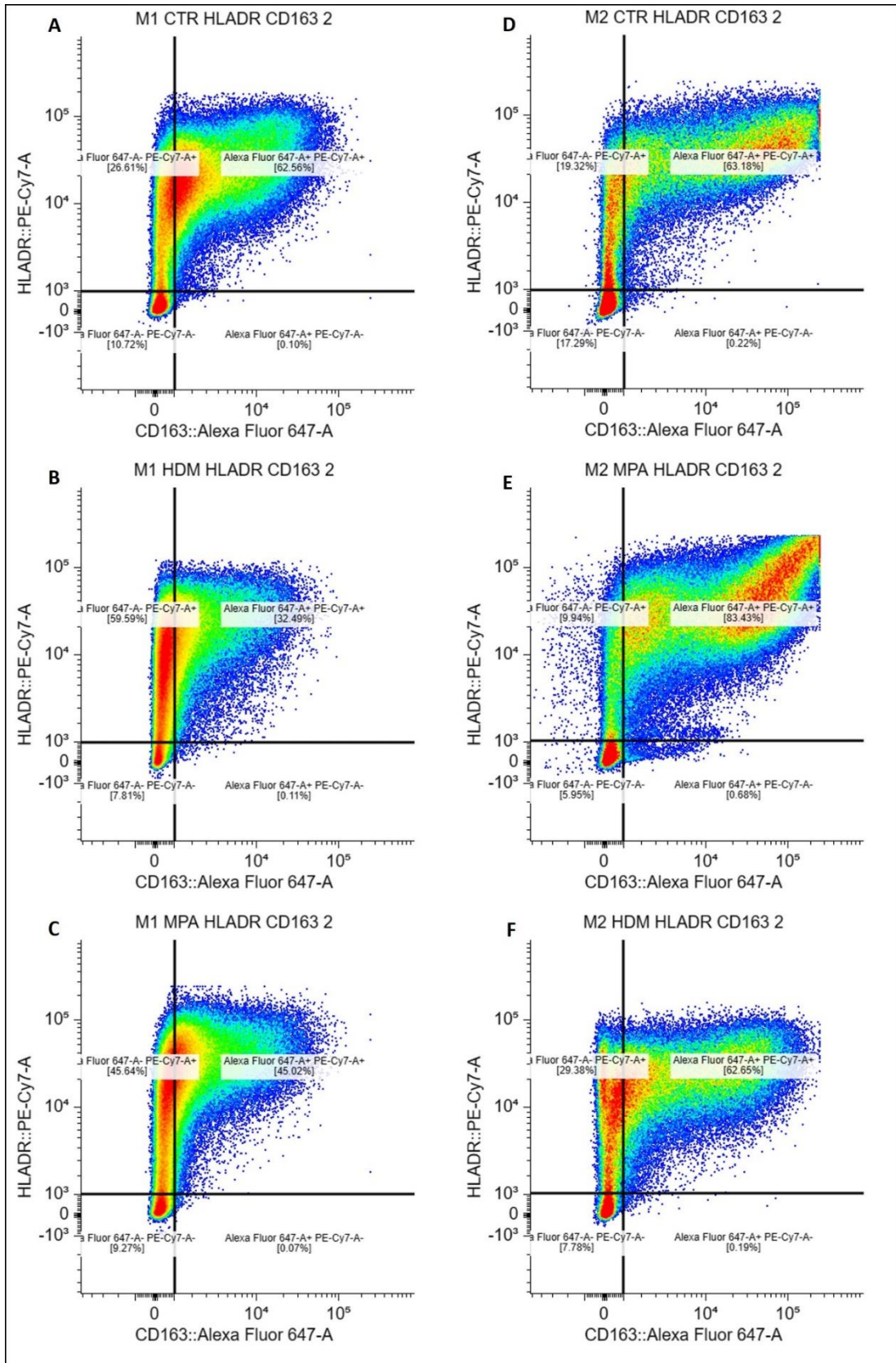


Figura 18: À esquerda, macrófagos M1 expostos a apenas meio de cultura (A), HDM (B) ou MPA 50 µg/mL (C). À direita, macrófagos M2 expostos a apenas meio de cultura (D), HDM (E) ou MPA 50 µg/mL (F). Todas as exposições ocorreram por 24 horas.

Em M1 é possível observar uma população HLADR+ (marcador M1) e uma população mista, apresentando tanto HLADR quanto CD163 (marcador M2). Nos macrófagos M2, tanto em CTR quanto em HDM as populações são majoritariamente mistas (HLADR+ e CD163+), enquanto o tratamento com MPA parece induzir os macrófagos a aumentar a expressão de HLADR (Fig. 23F).

A porcentagem de células expressando cada um dos marcadores está representada na Figura 19:

Figura 19 – Resultado marcadores HLADR e CD163 em macrófagos

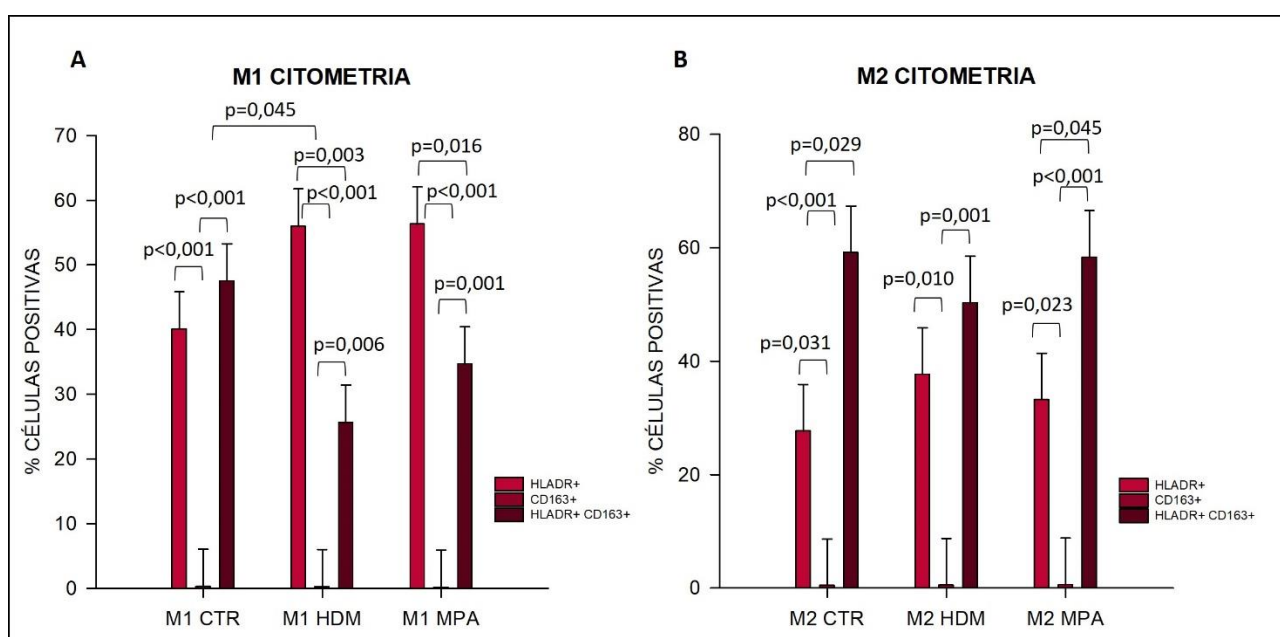


Figura 19: A) Porcentagem de macrófagos M1 positivos para HLADR, CD163 e HLADR/CD163 expostos ao MPA ou HDL 50 µg/mL. B) Porcentagem de macrófagos M2 positivos para HLADR, CD163 e HLADR/CD163 expostos ao MPA ou HDL 50 µg/mL.

De acordo com os resultados do teste TWO WAY Anova dos 3 experimentos independentes, para as células M1 houve diferença entre os grupos HDM e CTR ($p=0,045$). O grupo MPA não apresentou diferença significativa em relação a CTR, mas é possível observar que sua população duplo positiva é quase da mesma magnitude que HDM. Entre os marcadores a maioria era HLADR+ e a minoria eram células expressando apenas CD163 (Fig. 19A). Os resultados para M2 não apresentaram diferença entre os grupos de exposição, mas apresentaram diferença significativa entre os marcadores, indicando que a população duplo positiva era maior em comparação às populações apenas HLADR+ ou CD163+ (19B). Além disso, é

possível observar um aumento discreto na população HLADR+ nos grupos expostos a HDM e MPA em relação ao controle não exposto.

5.3.2 Co-cultura macrófagos e BEAS-2B

Além dos macrófagos isolados, os macrófagos submetidos à co-cultura com células BEAS-2B também foram caracterizados e a viabilidade da co-cultura após exposição a MPA também foi determinada (Figuras 20 a 22).

Figura 20 – Resultado do ensaio Live and Dead para CCM1B e CCM2B

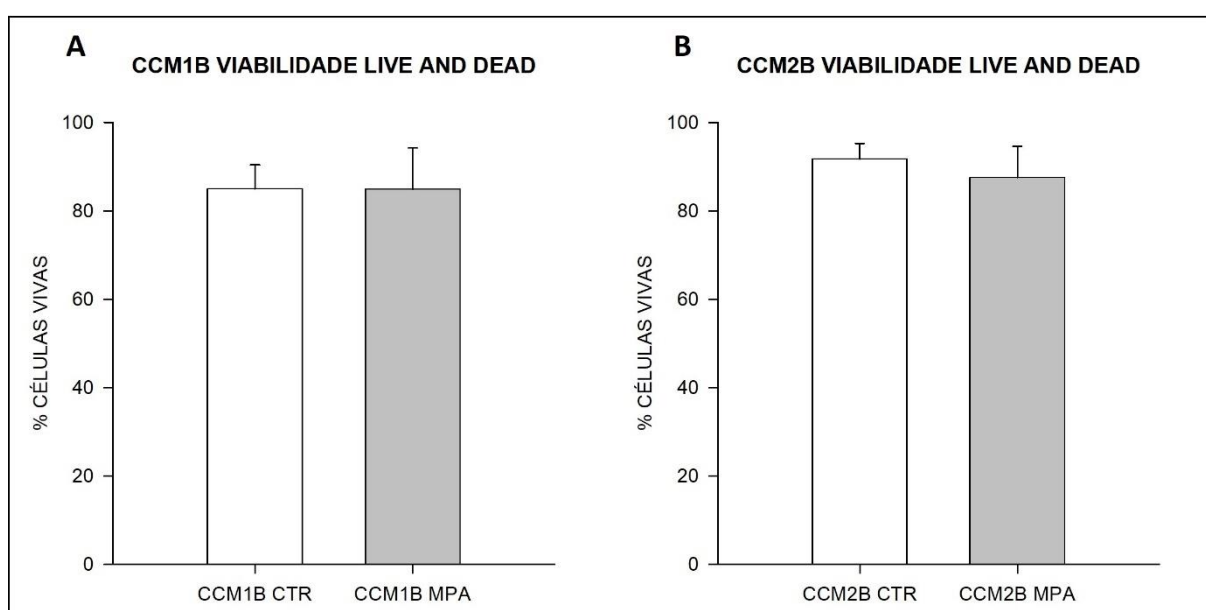


Figura 20: A) Células vivas em CCM1B após exposição a MPA expostos ao MPA ou HDL 50 µg/mL. B) Células vivas em CCM2B após exposição a MPA expostos ao MPA ou HDL 50 µg/mL.

Assim como em macrófagos, não houve diminuição significativa da viabilidade celular em co-cultura após exposição a 50 µg/mL de MPA.

A Figura 21 representa um dos resultados da citometria para as co-culturas, considerando apenas marcadores de macrófagos, ou seja, sem BEAS-2B.

Figura 21 – Imunofenotipagem dos macrófagos em CCM1B e CCM2B

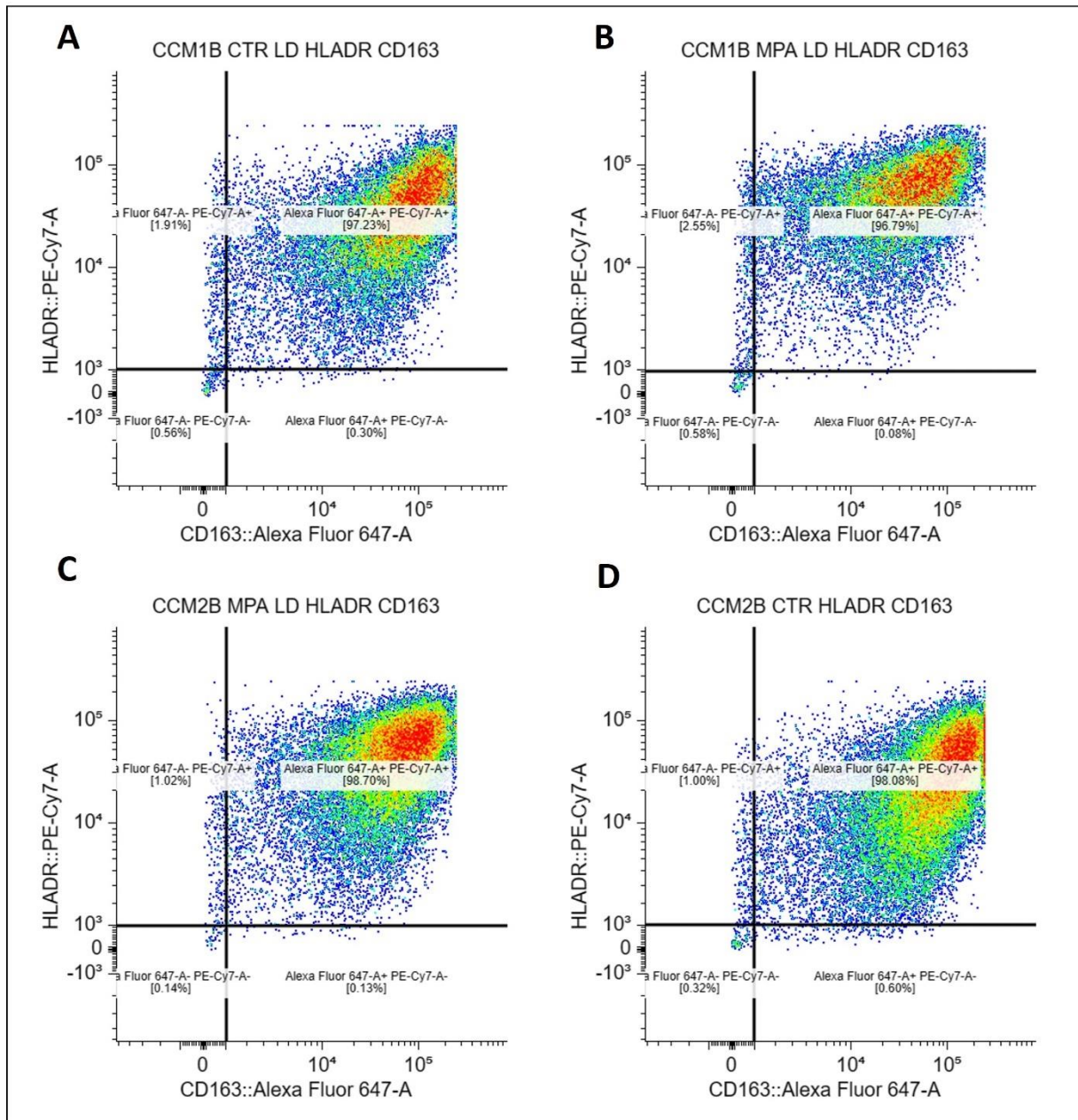


Figura 21: Resultado da expressão dos marcadores HLADR e CD163 para co-culturas A) CCM1B sem exposição; B) CCM1B exposta a MPA 50 µg/mL; C) CCM2B sem exposição e D) CCM2B exposta a MPA 50 µg/mL. Todas as exposições ocorreram por 24 horas.

A Figura 22 representa o resultado do teste TWO WAY Anova para os marcadores HLADR e CD163 e para os grupos CTR e MPA em CCM1B e CCM2B.

Figura 22 – Resultado dos marcadores HLADR e CD163 em co-cultura

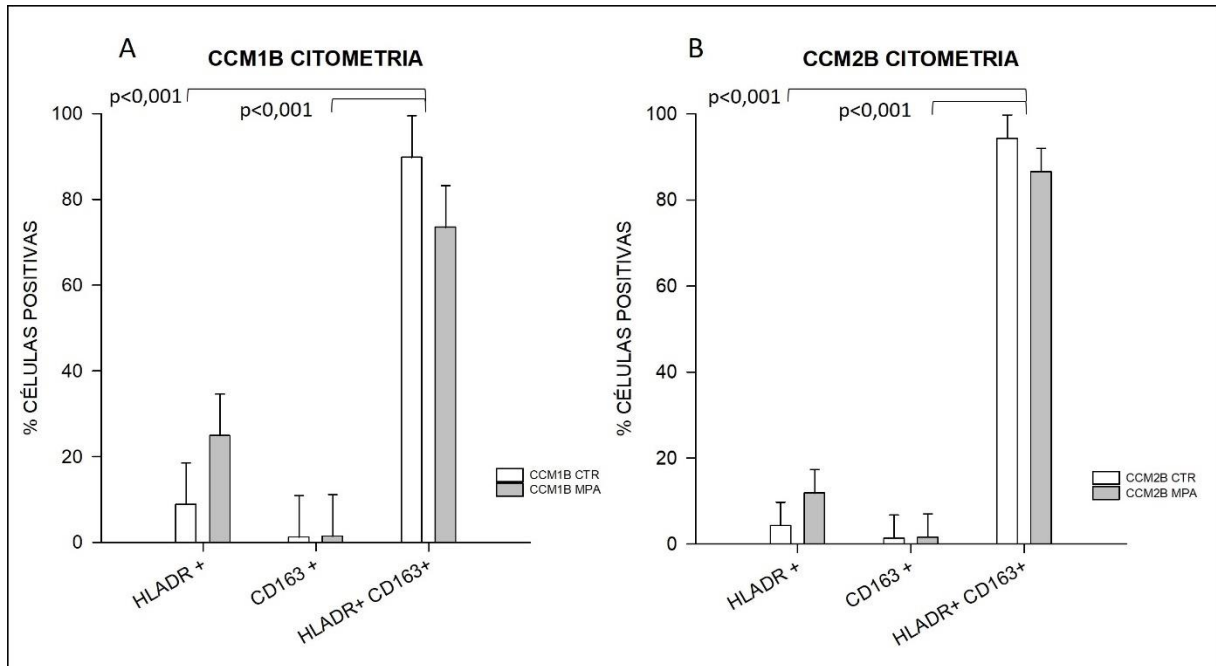


Figura 22: A) Porcentagem de macrófagos positivos para os marcadores em CCM1B. B) Porcentagem de macrófagos positivos para os marcadores em CCM2B.

Não houve diferença significativa entre as exposições, mas houve entre os marcadores, sendo que a maioria dos macrófagos em co-cultura era significativamente duplo positiva, tanto em CCM1B, quanto em CCM2B.

5.4 Expressão gênica por RT-PCR

Para avaliação da expressão gênica do metabolismo de xenobióticos (CYP1A1 e CYP1B1), controle e reparo celular (TP53 e AGR2) e crescimento celular (PIK3CA, PTEN e EGFR) foram utilizados os grupos da Tabela 3, em que as células A549 representam um controle para os oncogenes, uma vez que se trata de uma célula de adenocarcinoma.

As Figuras de 23 a 25 representam os resultados da quantificação do RNAm dos grupos BEAS-2B, CCM1B e CCM2B.

Figura 23 – RT-PCR para BEAS-2B

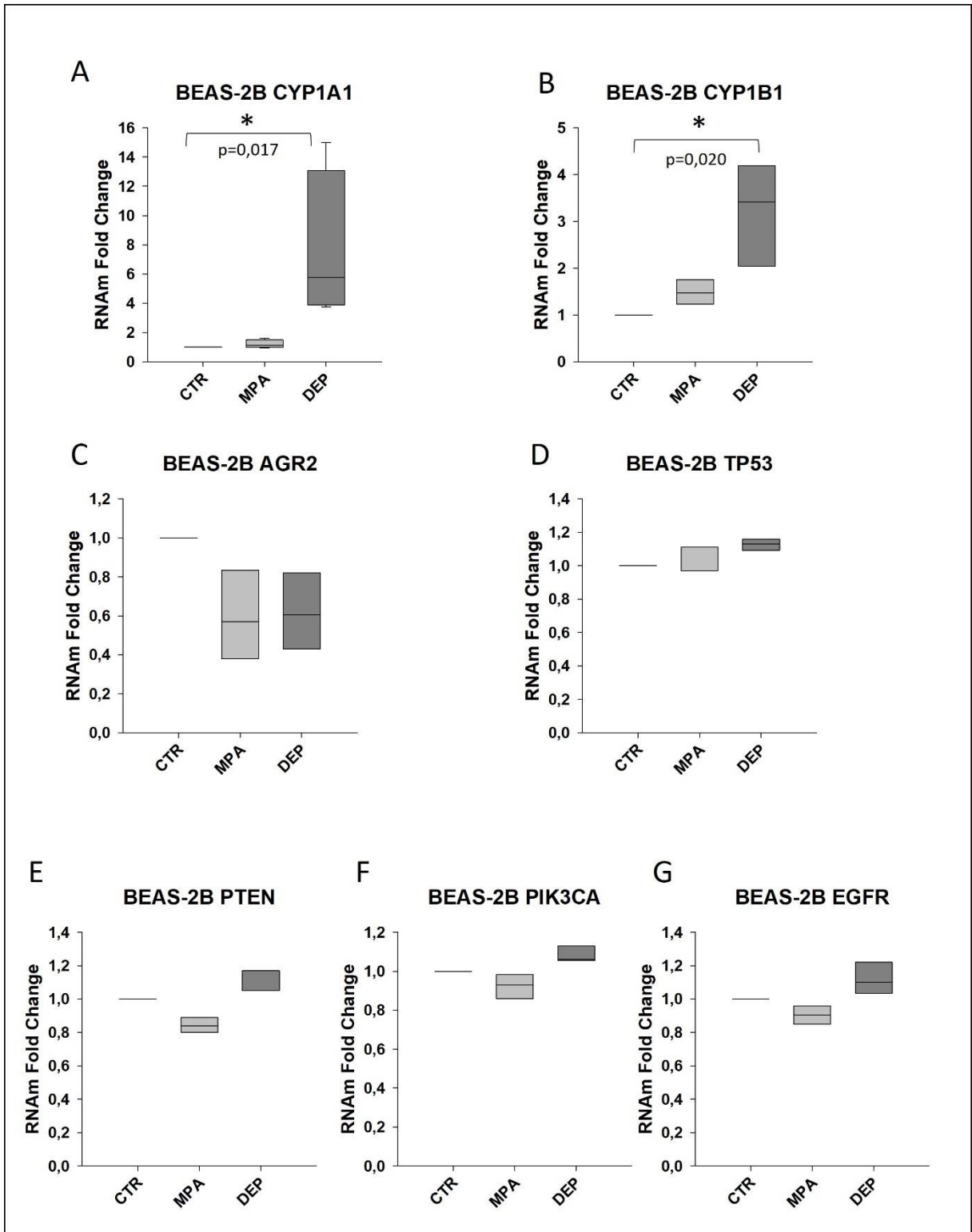


Figura 23: Resultado da expressão gênica de 4 (A) ou 3 (B-G) experimentos independentes para as exposições a 50 µg/mL de MPA ou DEP por 24 horas.

Nos resultados de expressão gênica para BEAS-2B (Figura 23), há aumento significativo na expressão de CYP1A1 e CYP1B1 após a exposição a DEP por 24 horas na concentração de 50 µg/mL.

Figura 24 – RT-PCR para CCM1B

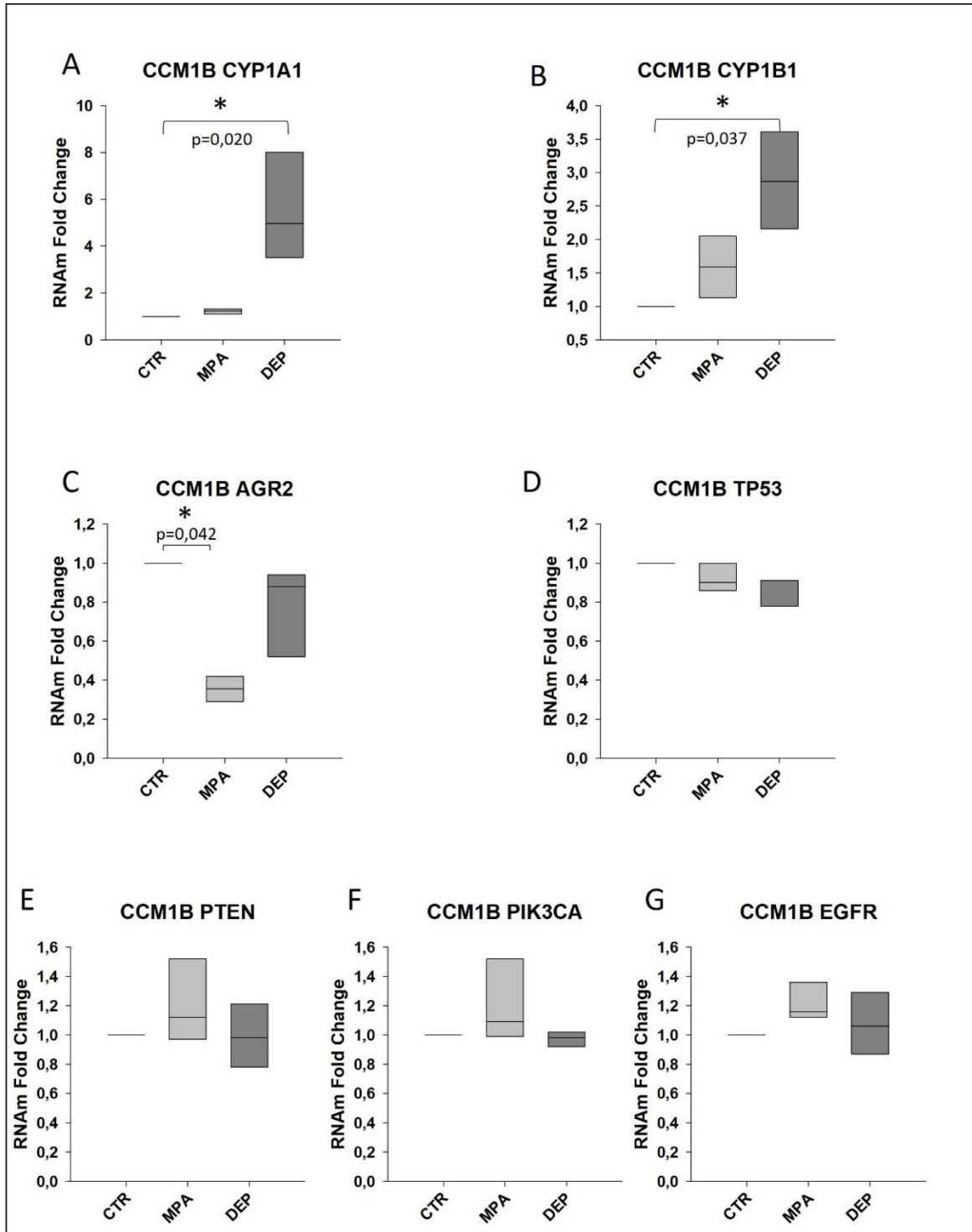


Figura 24: Resultado da expressão gênica de 3 experimentos independentes para as exposições a 50 µg/mL de MPA ou DEP por 24 horas.

As co-culturas de BEAS-2B com macrófagos M1 apresentaram aumento significativo de CYP1A1 e CYP1B1 após exposição ao DEP, o que já era um comportamento esperado, devido à já conhecida relação entre as enzimas do CYP450 e a poluição atmosférica (7). Em relação à exposição ao MPA, houve diminuição significativa da chaperona AGR2 em relação ao grupo CTR (Fig. 24C).

Assim como em CCM1B, apenas as co-culturas CCM2B expostas ao DEP apresentaram alteração na expressão gênica dos genes CYP1A1 (Fig. 25A) e CYP1B1 (Fig. 25B). A chaperona AGR2 apresentou diminuição da sua expressão, mas discreta, sem significância estatística. Nenhum dos genes relacionados ao controle do ciclo celular ou crescimento e divisão apresentaram alterações na expressão gênica, tanto em BEAS-2B (Fig. 23) quanto nas co-culturas (Fig 24 e Fig. 25).

Figura 25 – RT-PCR para CCM2B

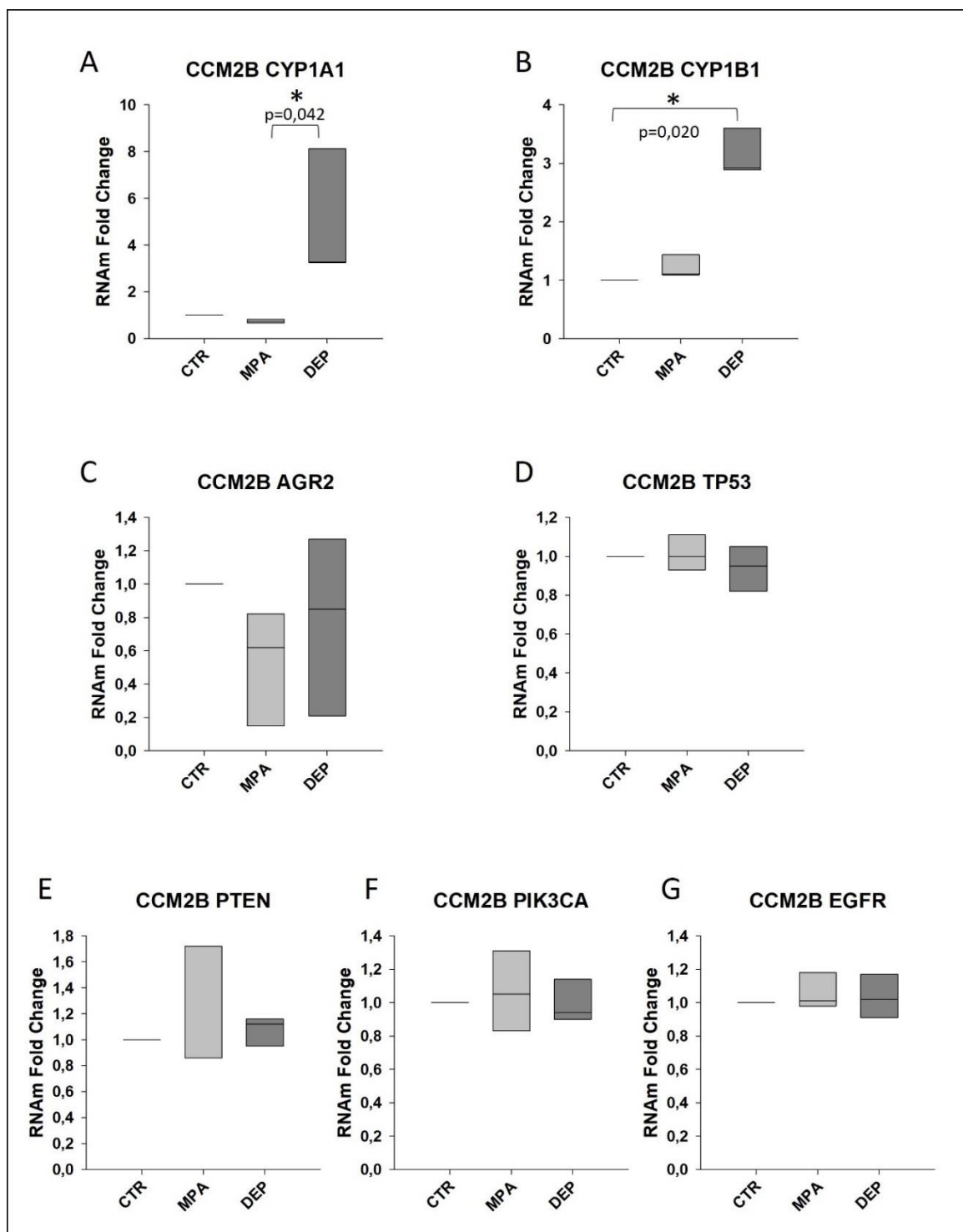


Figura 25: Resultado da expressão gênica de 3 experimentos independentes para as exposições a 50 µg/mL de MPA ou DEP por 24 horas.

As figuras de 26 a 28 apresentam os resultados para os grupos A549 sozinhas ou em co-cultura com macrófagos M1 ou M2.

Figura 26 – RT-PCR para A549

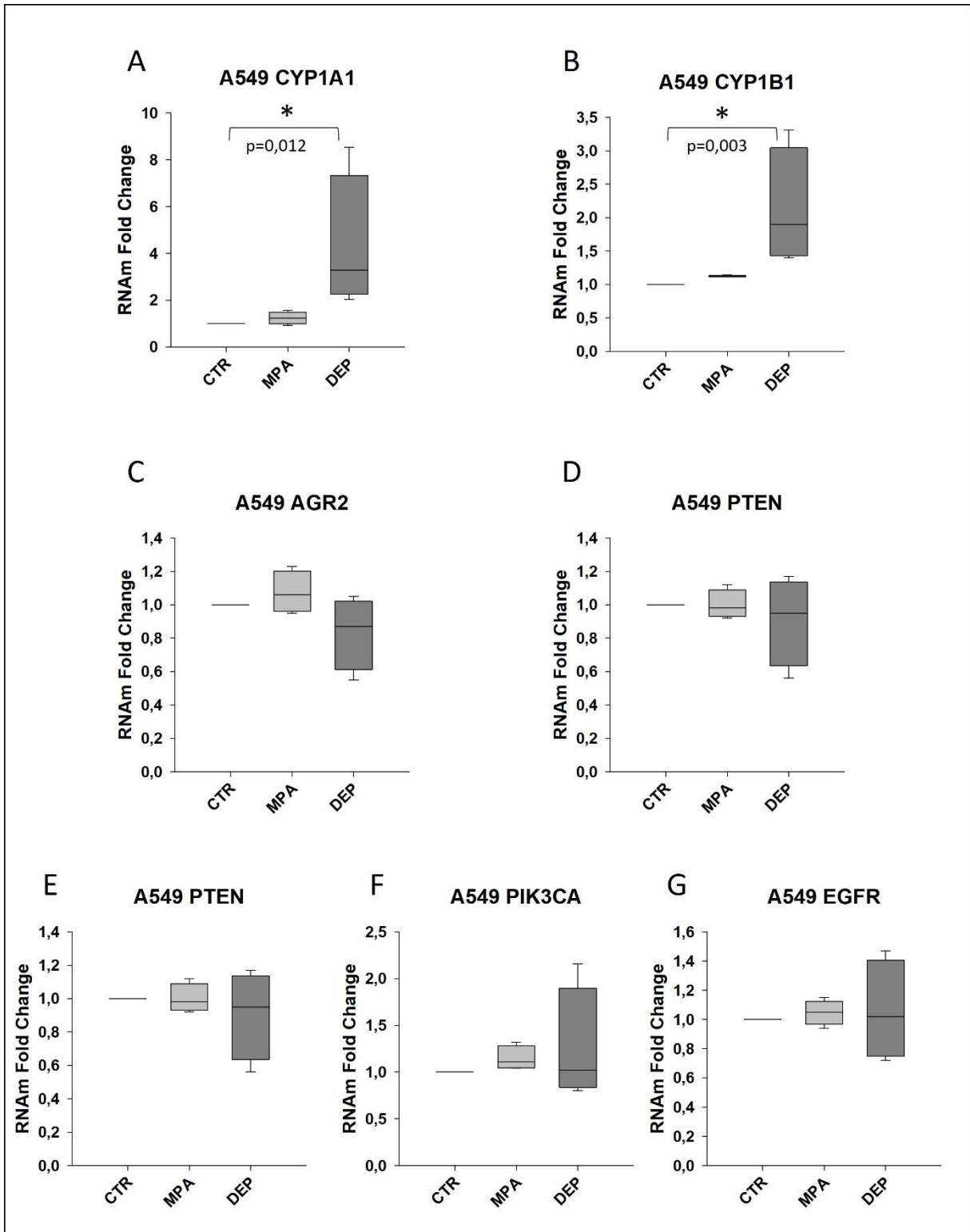


Figura 26: Resultado da expressão gênica de 4 experimentos independentes para as exposições a 50 µg/mL de MPA ou DEP por 24 horas.

O resultado da expressão gênica para os grupos A549 não apresentou alterações nos oncogenes (TP53, PTEN, PIK3CA e EGFR) após a exposição ao DEP

e ao MPA. Apenas as enzimas do citocromo P450 apresentaram alterações significativas após exposição ao controle positivo DEP (Fig. 26 A e B).

Figura 27 – RT-PCR para CCM1A

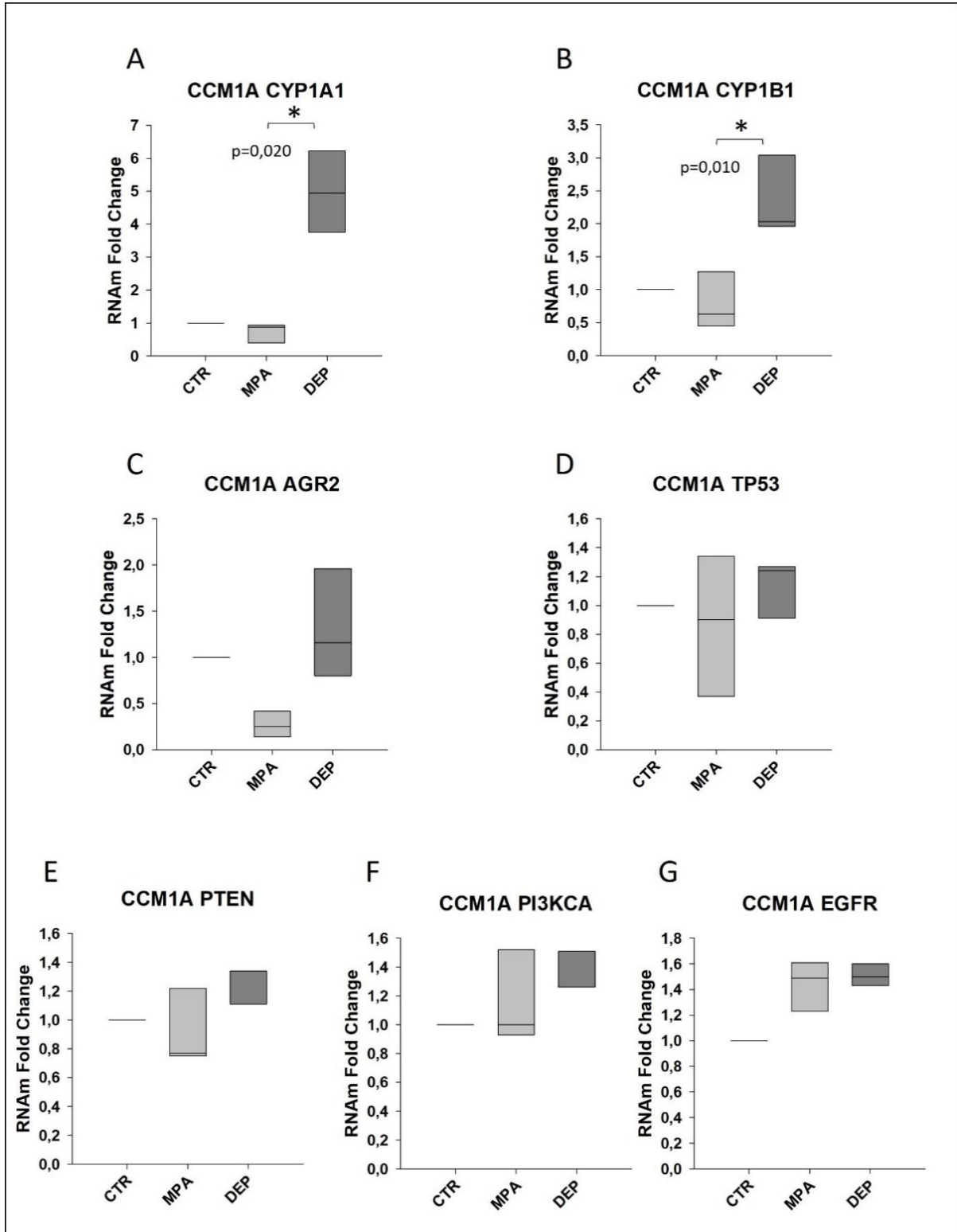


Figura 27: Resultado da expressão gênica de 4 experimentos independentes para as exposições a 50 µg/mL de MPA ou DEP por 24 horas.

Os resultados para os grupos CCM1A não ficaram diferentes dos resultados para A549, sendo a exposição ao DEP a responsável pelo aumento das enzimas do citocromo P450 (Fig. 27 A e B).

Figura 28 – RT-PCR para CCM2A

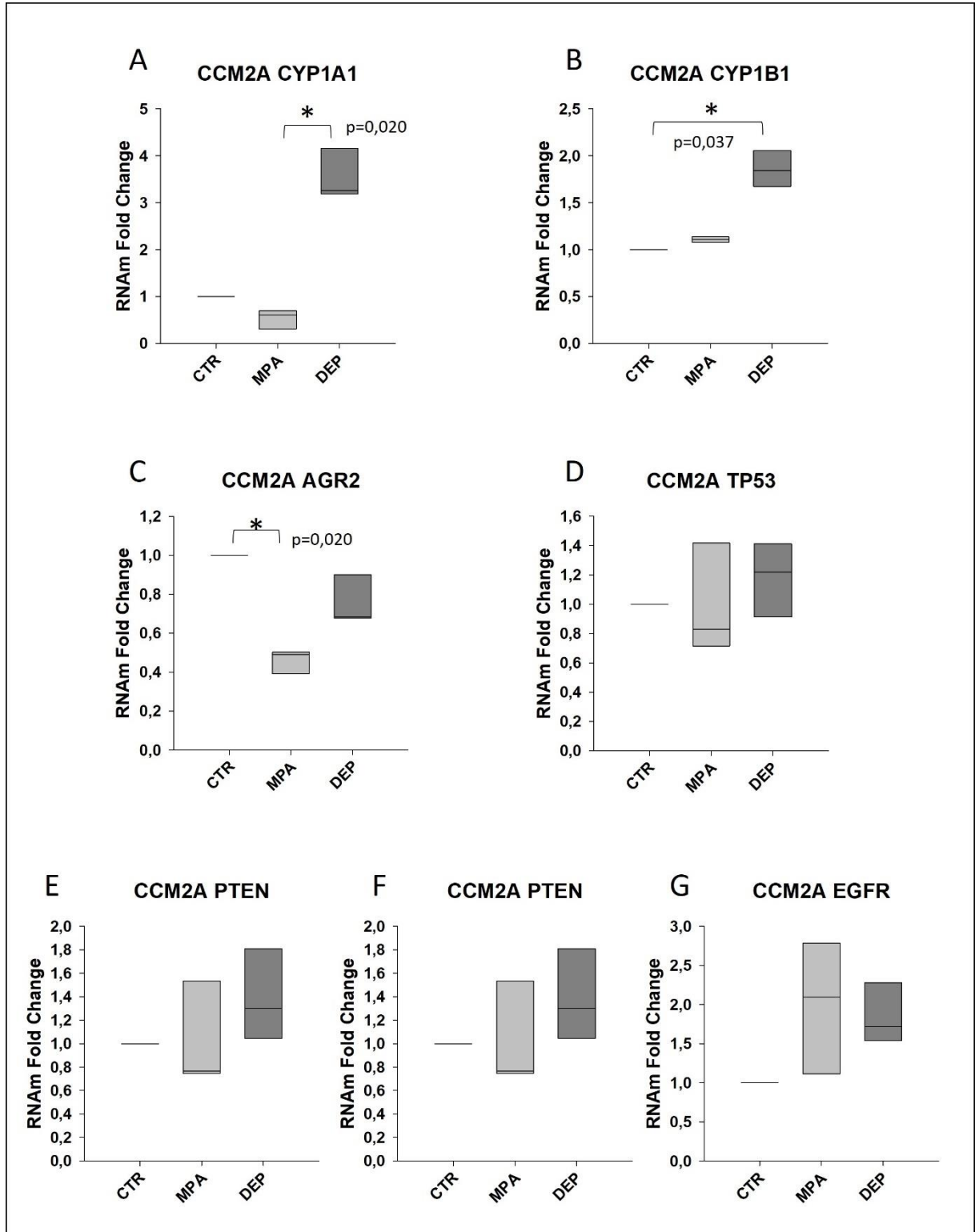


Figura 28: Resultado da expressão gênica de 3 experimentos independentes para as exposições a 50 µg/mL de MPA ou DEP por 24 horas.

O resultado de CCM2A também apresentou alterações significativas em CYP1A1 e CYP1B1 após exposição ao DEP. A chaperona AGR2 apresentou uma diminuição significativa da expressão em relação a CTR após exposição ao MPA.

5.5 Quantificação de citocinas

Para quantificação de citocinas no sobrenadante das culturas foram utilizados todos os grupos de estudo desta pesquisa, ou seja, aqueles previamente descritos na Tabela 3 de MATERIAL E MÉTODOS, incluindo os grupos de macrófagos: M1 CTR, M1 HDM, M1 MPA, M2 CTR, M2 HDM e M2 MPA. As citocinas analisadas foram IFN γ , IL-10, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α .

As figuras de 29 e 30 mostram a dosagem dessas citocinas para os grupos de BEAS-2B e co-culturas de macrófagos M1 ou M2 com BEAS-2B.

Figura 29 – Dosagem de citocinas para os grupos BEAS-2B

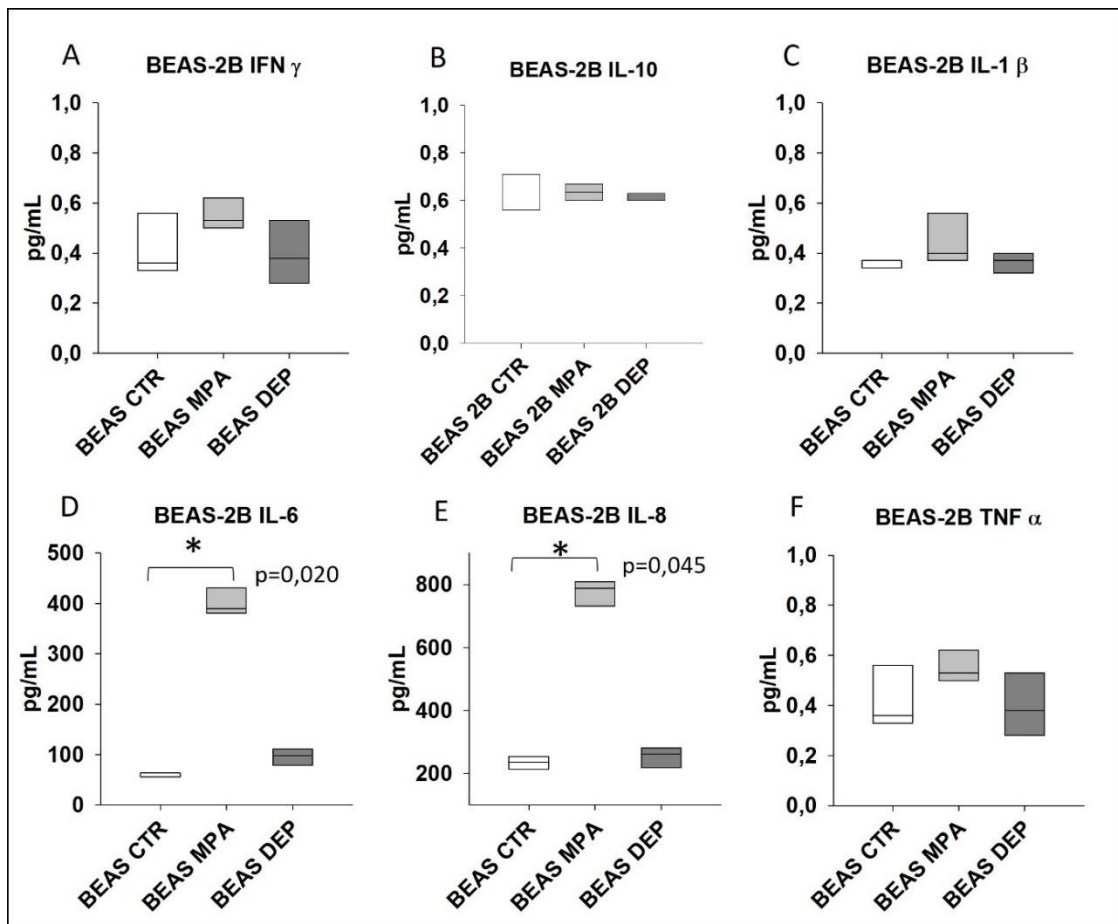


Figura 29: Representação de um experimento da quantificação de citocinas no sobrenadante de BEAS-2B expostas a MPA ou DEP a 50 μ g/mL por 24 horas.

Figura 30 – Dosagem de citocinas para co-culturas CCM1B e CCM2B

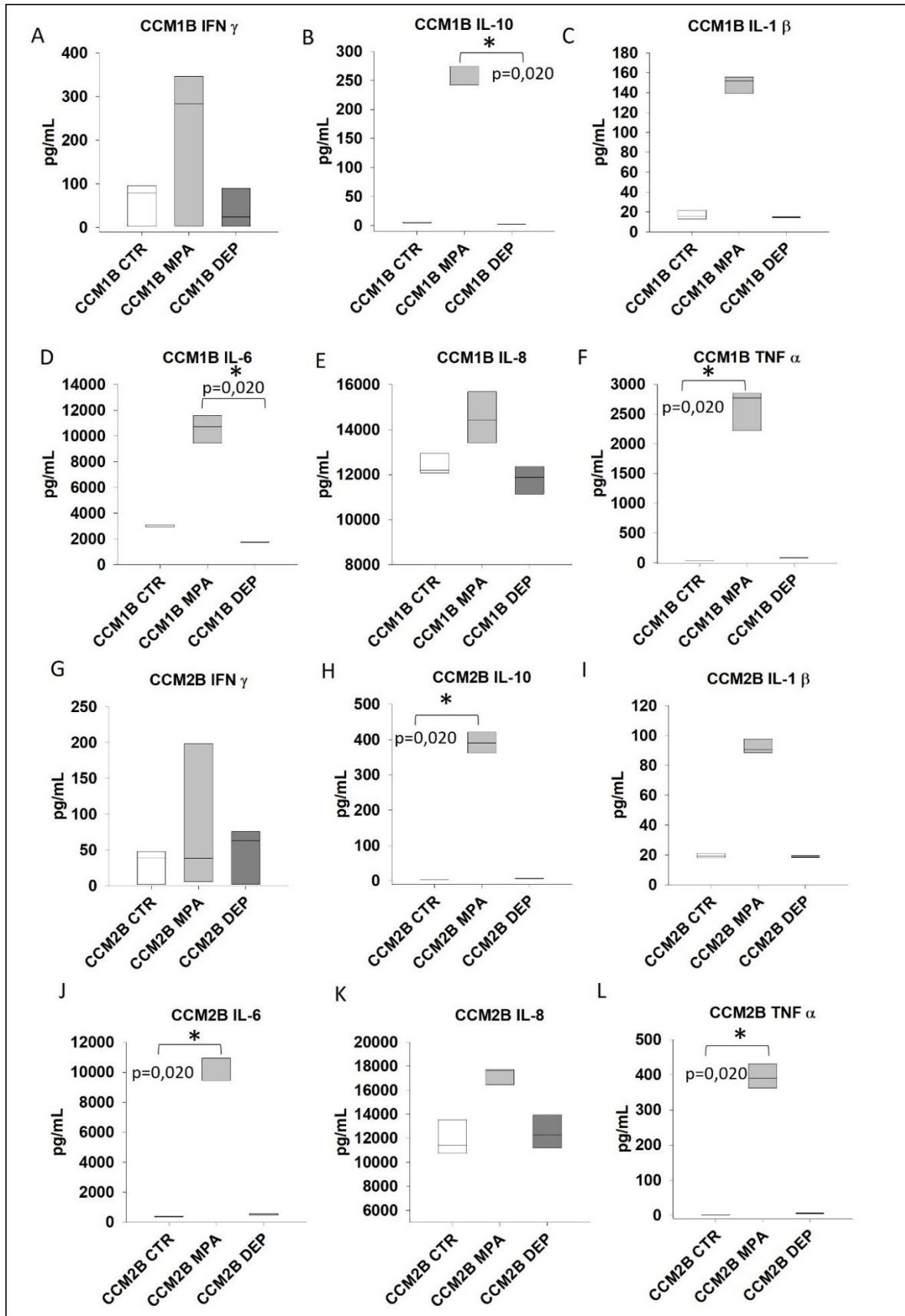


Figura 30: Representação de um experimento da quantificação de citocinas no sobrenadante de co-culturas CCM1B e CCM2B expostas a MPA ou DEP a 50 µg/mL por 24 horas.

Os sobrenadantes das culturas de BEAS-2B apresentaram aumento significativo em IL-6 e IL-8 nos grupos expostos a MPA (Fig. 29 D e E). Para as co-cultura de BEAS-2B com CCM1B e co-cultura de BEAS-2B com CCM2B tiveram aumento significativo das citocinas IL-10, IL-6 e TNF α (Fig. 30 B, D, F, H, J e L). Embora não significativa, é possível observar um aumento na produção de IL-1 β e IL-8 após exposição ao MPA nas co-culturas de CCM1B (Fig. 30 C e E) e CCM2B (Fig. 30 I e K).

As figuras 31 e 32 apresentam os resultados das mesmas citocinas para os grupos A549 e co-culturas de A549 com macrófagos M1 ou M2.

Figura 31 – Dosagem de citocinas para os grupos A549

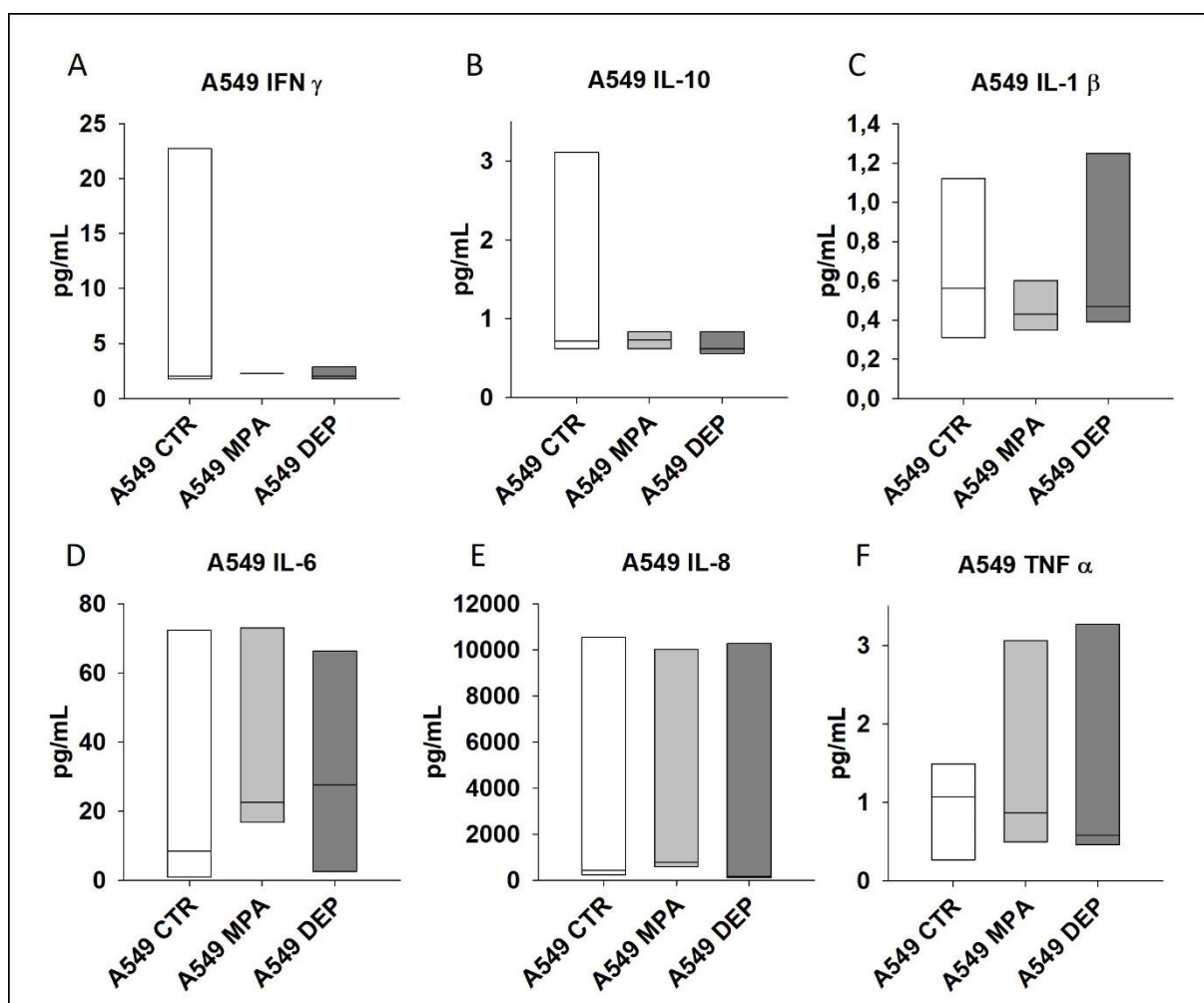


Figura 31: Representação de um experimento da quantificação de citocinas no sobrenadante de A549 expostas a MPA ou DEP a 50 µg/mL por 24 horas.

Figura 32 – Dosagem de citocinas para os grupos CCM1A e CCM2A

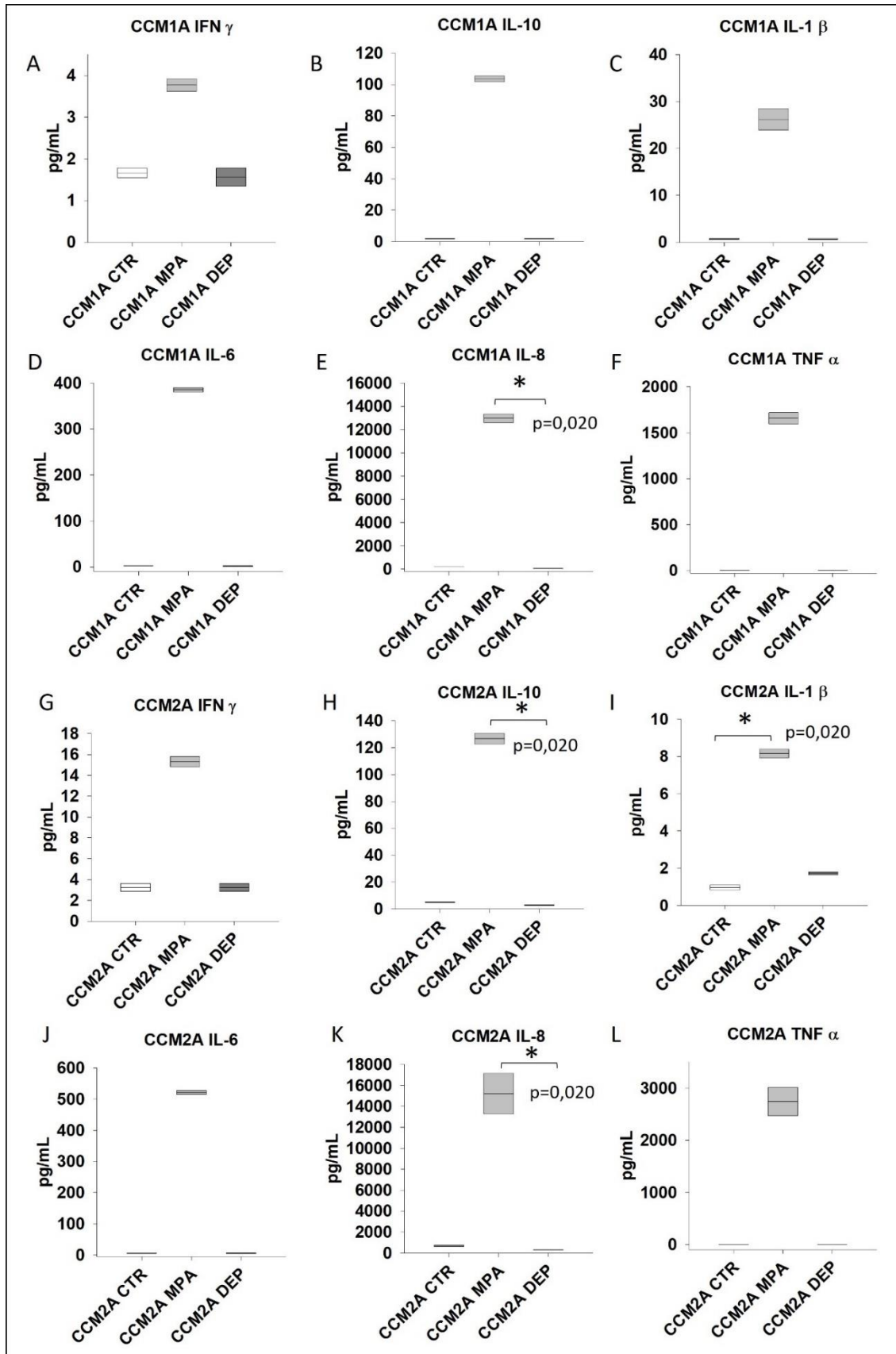


Figura 32: Representação de um experimento da quantificação de citocinas no sobrenadante de co-culturas CCM1A e CCM2A expostas a MPA ou DEP a 50 $\mu\text{g/mL}$ por 24 horas.

Não houve alteração significativa e as citocinas variaram entre os experimentos com A549. No geral, apenas IL-8 e IL-6 tiveram alguma produção expressiva, mas sem significância ou diferença entre os grupos experimentais.

No caso das co-culturas com macrófagos A549 e CCM1A apresentou aumento significativo da citocina IL-8 após exposição ao MPA (Fig. 32 E). Contudo, é possível observar um aumento discreto de outras citocinas após exposição ao MPA, mas não estatisticamente significante, como IL-10, IL-1 β , IL-6 e TNF α (Fig. 32 B, C, D e F). Já nos grupos de A549 e CCM2A houve produção significativa de IL-10, IL-1 β e IL-8 (Fig. 32 H, I e K), enquanto IFN γ , IL-6 e TNF α apresentaram uma tendência, mas não significante (Fig. 32 G, J e L).

A figura 33 apresenta os resultados dessas citocinas para os grupos de macrófagos expostos a MPA e ao controle positivo HDM.

Figura 339 – Dosagem de citocinas para macrófagos M1 e M2

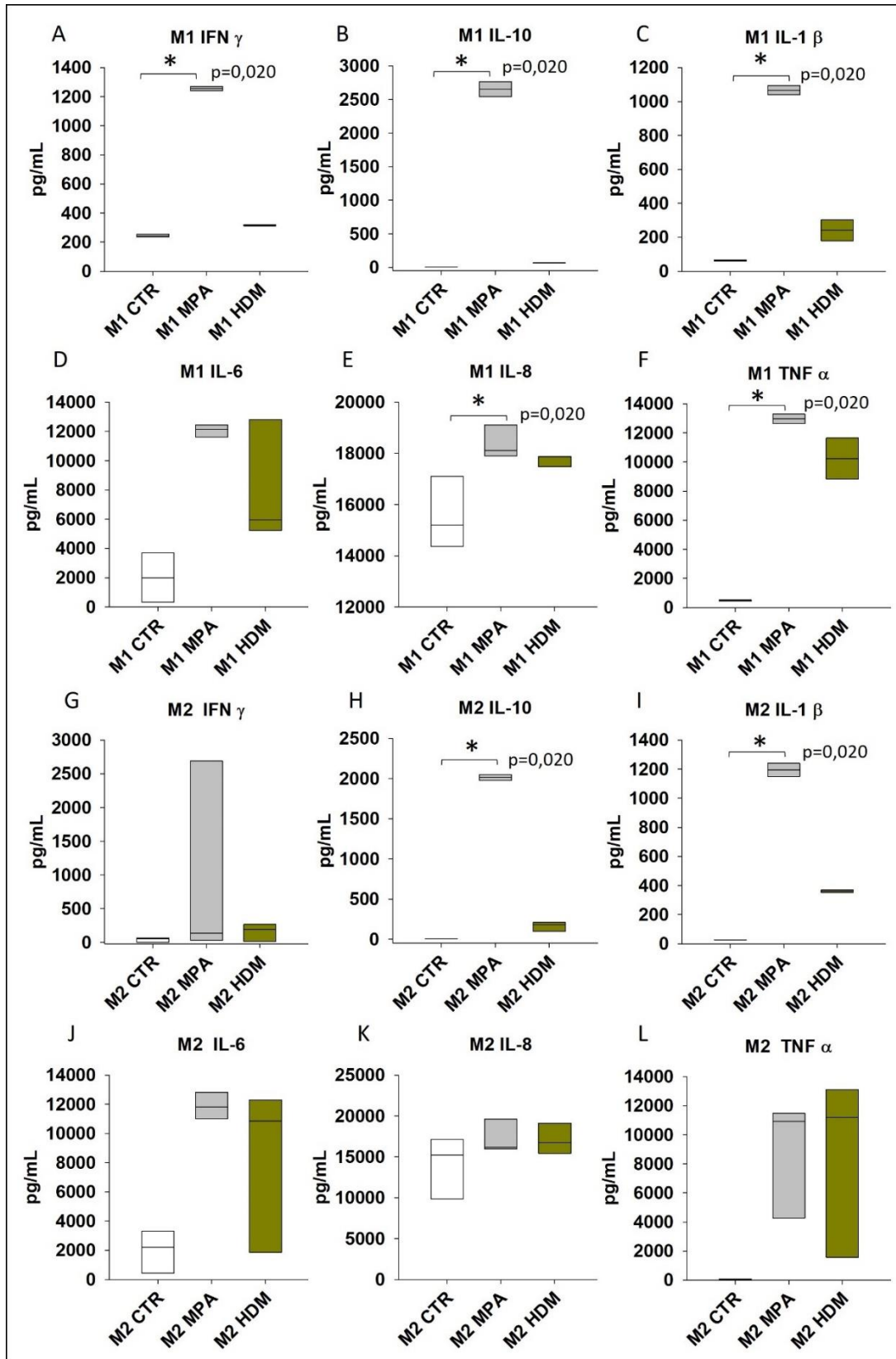


Figura 33: Representação de um experimento da quantificação de citocinas no sobrenadante de culturas de macrófagos previamente induzidos a M1 ou M2 expostas a MPA ou DEP a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 horas.

De acordo com os resultados da Figura 33, os macrófagos M1 apresentaram alteração na produção das citocinas após exposição ao MPA, com exceção de IL-6 (Fig. 33 A-F). Já para os macrófagos M2, houve mais variação entre os experimentos e as citocinas IL-10 e IL-1 β (Fig. 33 H e I) e apresentaram diferença significativa em relação ao CTR.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, a caracterização química do material particulado da antracose revelou que essas partículas possuem HPAs em sua estrutura, embora de baixa complexidade. Ainda assim, o MPA foi capaz de provocar alterações no metabolismo celular e induzir aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias na cultura de macrófagos e nas co-culturas com células pulmonares, evidenciando que, apesar de se tratar de um material metabolizado no organismo, o MPA pode não ser uma substância inerte apenas depositada no aparelho respiratório. A figura 34 resume os principais achados deste trabalho.

Figura 34 – Principais resultados da pesquisa

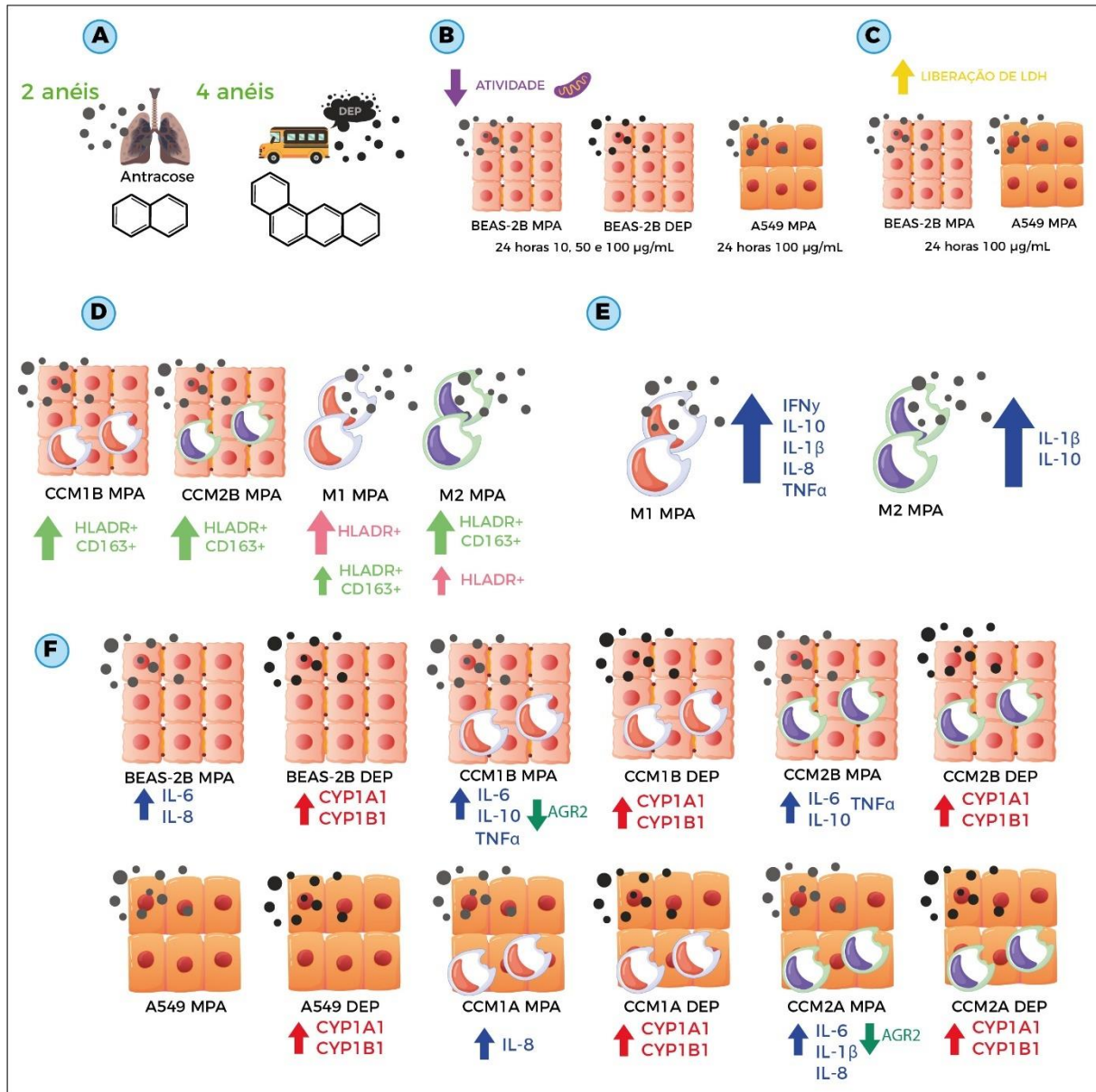


Figura 34: Considera-se apenas os resultados estatisticamente significativos. A) Caracterização química das partículas para HPAs. B) Metabolismo celular, teste MTT. C) Lipoperoxidação, teste de liberação de LDH). D) Citometria de fluxo para imunofenotipagem de macrófagos sozinhos ou em co-cultura. E) Dosagem de citocinas no sobrenadante de macrófagos. F) Compilado dos resultados de expressão de RNAm e dosagem de citocinas para as culturas de células de brônquios normais BEAS-2B e suas respectivas co-culturas com M1 ou M2 e células de adenocarcinoma pulmonar A549 e suas respectivas co-culturas com M1 ou M2.

Os resultados da caracterização química no MPA revelaram a presença de HPAs em sua maioria contendo 2 anéis de benzeno e baixo peso molecular (Figs. 12A e 13A), enquanto o controle positivo DEP apresentou estruturas mais complexas, a maioria apresentando 4 anéis e algumas com até 5 anéis (Fig. 12B). Além disso, a descontaminação não causou mudanças drásticas nas partículas e se mostrou

eficiente para evitar crescimento de microrganismos nas culturas e co-culturas (Tabelas 5 e 6). Comparando os resultados das tabelas 5 e 6, também é possível observar que a quantidade de HPA na amostra de antracose é menor que na amostra de DEP, sendo o total de HPA de MPA = 4,39 µg/g e de DEP = 23,18 µg/g, i.e. o DEP possui 5,28 vezes mais HPA que o MPA. Claramente, a partícula ambiental possui maior quantidade de HPA, enquanto, que o MPA, uma partícula que parece já ser processada dentro do organismo, apresenta uma diminuição da quantidade e da complexidade dos HPAs.

Os testes de viabilidade MTT, apontaram diminuição do metabolismo (Fig. 14) após 24 horas de exposição a MPA e DEP, nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL em BEAS-2B, enquanto em A549 apenas a concentração de 100 µg/mL de MPA apresentou alterações. A diminuição do metabolismo nas células pode estar relacionada à morte celular, principalmente levando em consideração que o teste do MTT avalia o metabolismo mitocondrial, que está diretamente envolvido no mecanismo de morte celular por exposição ao PM (72).

Um dos mais conhecidos efeitos da exposição à poluição atmosférica é o estresse oxidativo e a lipoperoxidação (73). O teste de liberação de LDH é utilizado como um meio de determinar a integridade da membrana plasmática, uma vez que o aumento das espécies reativas de oxigênio pode induzir morte celular, resultando em ruptura da membrana plasmática e liberação de LDH para o meio extracelular. As figuras 15 e 16 mostram que houve um aumento de LDH após 24 horas de exposição ao MPA, na concentração de 100 µg/mL. Já no trabalho de Chew et al. (2020)(74), mostraram que em cultura de células primárias da mucosa nasal a diferentes concentrações de PM houve redução aproximada de 30% na atividade metabólica medida através da redução do MTT na concentração de 50 µg/mL, mas, sem citotoxicidade evidente, pois não houve diferença na liberação de LDH, após incubação de 24 horas de PM de diferentes tamanhos, sugerindo que houve recuperação ao dano causado pelo PM.

O interesse deste trabalho foi analisar as respostas celulares mantendo a viabilidade, para que a célula responda ao estímulo da partícula sem entrar em processo de morte e desintegração de membrana. Por isso, a concentração de 50 µg/mL por 24 horas de exposição foi escolhida para ser utilizada nos demais testes, pois se mostrou suficiente para provocar a célula no microambiente da cultura sem

comprometer a qualidade dos experimentos. A viabilidade foi posteriormente comprovada nos testes de citometria usando o corante “Live and Dead”, como apresentado nas Figuras 17 e 20.

Os resultados de citometria evidenciaram a plasticidade natural dos macrófagos (Fig. 18), exibindo marcadores geralmente relacionados ao perfil M1 (HLADR) ao mesmo tempo que marcadores comumente associados ao perfil M2 (CD163) (75-78). A exposição ao MPA não provocou diferença na expressão desses marcadores em relação às células não expostas (CTR) ou ao controle positivo (HDM), embora para as células então designadas como M1 a presença do marcador HLADR foi significativamente maior em comparação com a quantidade de células duplo positivas ou apresentando apenas CD163 (Fig. 19). A maioria das células M2 expressou os dois marcadores concomitantemente, apresentando um leve aumento no marcador HLADR após exposição a MPA e HDM, sem significância estatística.

Apesar da imunofenotipagem não apontar diferença na expressão dos marcadores, os resultados da expressão significativa de citocinas inflamatórias após a exposição ao MPA evidenciaram que os macrófagos apresentaram uma tendência pró-inflamatória (Fig. 33). Ao parear os resultados da citometria com os resultados da dosagem de citocinas, é possível perceber que as células M1 apresentaram aumento significativo na produção de citocinas como IFN γ , IL-1 β , IL-8 e TNF α , após exposição ao MPA, mas não ao HDM (Fig. 33 A, C, E e F), sugerindo que a partícula é capaz de gerar resposta pró-inflamatória na cultura de macrófagos. Assim também, as células M2 apresentaram aumento da expressão de IL-1 β (Fig. 33I). Tanto nos macrófagos sozinhos, quanto em alguns grupos de co-culturas houve aumento significativo de IL-10 (Figs. 30 B e H; 32H e 33 B e H), citocina geralmente relacionada ao perfil anti-inflamatório (79). Contudo, analisando contextualmente com o resultado da citometria, a liberação significativa de IL-10 comprova que as células formaram uma população heterogênea entre M1 e M2 após a exposição ao MPA, mas a produção de IL-10 não implica que houve necessariamente diminuição ou inibição da resposta inflamatória. Pettersen et al. (2011) (78) caracterizaram a população de macrófagos em câncer de células escamosas e encontraram uma população heterogênea, exibindo marcadores tanto para M1, quanto para M2. Além disso, os macrófagos apresentavam funções mistas, expressando STAT6 fosforilada (importante nas vias de sinalização que levam à diferenciação das células Th2) e genes de macrófagos M1, como STAT1 e IL-12/IL-

23p40. Por fim, os autores demonstraram que os macrófagos no ambiente do câncer de células escamosas expressavam CD163, STAT6 e STAT1, simultaneamente. (78)

Os macrófagos reunidos em torno do microambiente tumoral (TME) são chamados macrófagos associados a tumores (TAMs). Os TAMs podem ser divididos em macrófagos classicamente ativados, denominados M1 e alternativamente ativados, denominados M2 (80). Macrófagos M1 no TME matam e removem células tumorais ativando citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa, TNF- α , ativando citocinas como IFN γ e IL-12 para infiltrar células efetoras imunes no TME. Ao contrário, os macrófagos M2 liberam citocinas como IL-10, IL-13, CCL9 e fatores de transformação de crescimento para destruir a membrana basal, promovendo a angiogênese e recrutando células imunossupressoras para facilitar o desenvolvimento do tumor primário e metástase (81, 82).

Nos últimos anos, os cientistas têm discutido e questionado a dicotomia M1/M2, principalmente porque em circunstâncias patológicas os macrófagos apresentam plasticidade, modificando o seu perfil de expressão em resposta a estímulos ambientais ao longo de um espectro contínuo, tendo os fenótipos M1 e M2 como extremos (77, 79, 83). Mesmo neste trabalho, esse modelo clássico de ativação foi utilizado e um tratamento prévio com citocinas buscou induzir o perfil dos macrófagos antes da exposição ao MPA ou ao DEP. Contudo, é necessário considerar o espectro de ativação desses fagócitos, que se mostra muito mais amplo que apenas M1/M2 e dependente dos estímulos do microambiente nos quais eles estão inseridos (84). Sendo assim, os resultados de citometria (Fig. 18, 19, 21 e 22) refletindo populações mistas e não dicotômicas é coerente com o esperado de uma célula capaz de produzir populações heterogêneas dependendo dos estímulos aos quais é submetida.

Além disso, embora não testado e estudado profundamente, foi possível verificar a fagocitose das partículas pelos macrófagos em co-cultura no microscópio óptico invertido (Figura 35), mas futuros experimentos são necessários para verificar a atividade fagocítica das células durante a exposição ao MPA e ao DEP, para inferir se há algum desequilíbrio na fagocitose e se existe alguma sinalização relacionada influenciando o perfil dos macrófagos. Rylance et al. (2015)(85) expuseram macrófagos alveolares humanos e macrófagos derivados de monócitos de voluntários saudáveis ao PM de queima de biomassa. Os pesquisadores verificaram aumento na produção de citocinas inflamatórias IL-8 e IL-6 e alteração na taxa de fagocitose de

microrganismos pelos macrófagos, sugerindo aumento na suscetibilidade a infecções após exposição ao PM.

Figura 35 – Atividade fagocítica observada nos macrófagos expostos às partículas

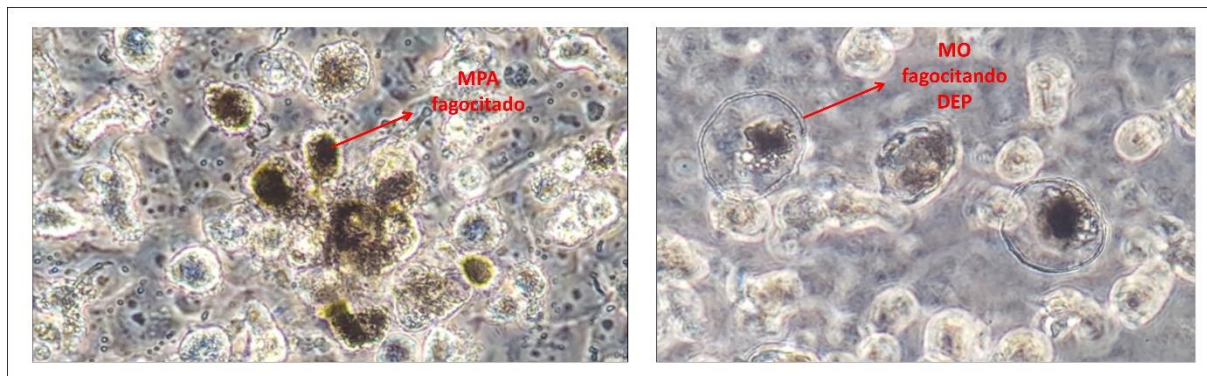


Figura 35: Aumento 400X.

Era esperado que o HDM aumentasse a expressão de citocinas inflamatórias como um controle positivo, contudo, por se tratar de uma cultura primária derivada do sangue periférico de doadores, a resposta dos macrófagos ao HDM pode ter refletido uma variabilidade natural entre os voluntários desta pesquisa, como evidenciado na variação dos dados em *box plot* na Figura [3339](#), principalmente em relação às citocinas IL-6, IL-8 e TNF α (Fig. 39 D, E, F, J, K e L). Tolerância a endotoxinas é um fenômeno no qual células ou organismos expostos a baixas concentrações de endotoxina (por exemplo, LPS) entram em um estado transitório de falta de resposta (86). Não há evidência suficiente para afirmar que esse fenômeno está ocorrendo nestas condições experimentais dos macrófagos com HDM, porém, como é uma partícula derivada de microrganismo (ácaros da poeira doméstica), essa possibilidade pode ser considerada.

As co-culturas de BEAS-2B com macrófago M1 ou M2 não apresentaram diferença na expressão dos marcadores HLADR e CD163 após a exposição ao MPA, ambos os modelos CCM1B e CCM2B apresentaram populações duplo positivas (Figs. 21 e 22). No entanto, a dosagem de citocinas revelou também tendência pró-inflamatória nas co-culturas, com aumento significativo de IL-6 e TNF α , além de aumento discreto em IL-8 e IL-1 β após exposição ao MPA, mas não ao DEP (Fig. 30).

Diversos autores demonstraram que o PM da poluição atmosférica é capaz de provocar resposta inflamatória tanto em modelos animais, quanto em cultura celular (87). A exposição ao extrato solúvel de PM_{2,5} reduziu a viabilidade nas linhagens

BEAS-2B e A549, aumento de ERO intracelular, secreção de citocinas GM-CSF, IL-6, IL-1 e CXCL8 em BEAS-2B, além de quimiotaxia em macrófagos em resposta às quimiocinas liberadas pelas células epiteliais de via aérea (88). Células da linhagem imortalizada de monócitos leucêmicos (THP-1) expostas a PM derivado de região industrial, na concentração de 50 µg/mL, mostraram aumento do RNAm e da liberação de IL-8 e IL-1β após 6 e 48 horas, respectivamente. No mesmo estudo, monócitos derivados do sangue periférico também foram expostos a 12,5 µg/mL de PM e o sobrenadante das culturas foi adicionado ao meio de células BEAS-2B por 48 horas, para estudar a interação das vesículas extracelulares liberadas pelos monócitos nas células epiteliais de via aérea. Nessas condições houve aumento de IL-6 e TNFα, mas redução de IL-8 (89).

Em outro estudo, macrófagos da linhagem de camundongo RAW 264.7 foram expostos a 250 µg/mL de PM_{2,5} por 24, 48 e 72 horas. A liberação de citocinas inflamatórias diminuiu com o tempo de exposição, enquanto a taxa de morte celular chegou ao máximo após 72 horas. Os resultados mostraram que após o tratamento com PM_{2,5} por 24 horas houve aumento na expressão de iNOS e TNFα, indicando que os macrófagos reconheceram partículas PM_{2,5} e liberaram citocinas para induzir a polarização M1 (90).

Modelos de co-cultura de células pulmonares com células do sistema imune também foram utilizados para verificar a resposta inflamatória após a exposição à poluição atmosférica. Kocbach et al. (2008) (91) expuseram co-culturas de monócitos com pneumócitos por diferentes tempos a PM derivado do tráfego ou PM derivado da queima de biomassa, em concentrações de 10 a 40 µg/cm². Os resultados mostraram maior diferença no efeito da exposição às partículas conforme o aumento do tempo e da concentração, provocando liberação de TNF-α, IL-6 e IL-8 após 12 horas de exposição.

Co-cultura de células primárias de brônquios humanos e macrófagos alveolares, expostas a PM₁₀ a 100 µg/mL por 24 horas, apresentaram aumento significativo na produção de GM-CSF, IL-6, MIP-1β e M-CSF, sendo que os níveis de GM-CSF, IL-6 e MIP-1β produzidos pelas co-culturas foram maiores do que a soma desses mediadores dosados nas respectivas monoculturas, sugerindo um efeito sinérgico (92). Em outro estudo semelhante, células primárias de brônquios em co-cultura com macrófagos alveolares também aumentaram a expressão de TNFα, GM-

CSF, IL-1 β e IL-8 após exposição ao PM₁₀ a 100 μ g/mL por 24 horas e houve um efeito sinérgico significativo na expressão de IL-6 e GM-CSF em comparação às monoculturas (93).

Os resultados da dosagem de citocinas das co-culturas (Figuras 30 e 32) em comparação à monocultura de macrófagos (Figura 33) não mostrou efeito sinérgico, ao contrário, os macrófagos produziram quantidade parecida de citocinas em pg/mL, ou mais que o dobro quando comparado com as co-culturas, como no caso da TNF α (Figuras 30 F e L; 32 F e L e 33 F e L). É possível inferir que a) a origem das células pode ter influenciado na resposta, uma vez que os macrófagos deste trabalho são derivados de monócitos de sangue periférico (não alveolares) e as células de brônquios são imortalizadas (não primárias) b) a influência da quantidade de células, pois, se tratando de um modelo com dois tipos celulares em contato direto, há uma certa imprecisão da quantidade de cada tipo celular na co-cultura, e mesmo nos trabalhos citados na discussão dos experimentos feitos neste estudo, essa informação não é precisa c) a própria natureza química do MPA, menos complexa que a partícula ambiental, pode ter produzido um resultado diferente daquele observado em co-culturas expostas ao PM, embora este estudo tenha usado DEP (que é fração do PM da poluição urbana) e mesmo assim, não ocorreu o sinergismo. Não foram encontrados estudos de exposição *in vitro* na literatura com material particulado da antracose, sendo necessário mais estudos para investigar a razão desses resultados após exposição ao MPA.

Neste trabalho, a expressão do RNAm para os genes relacionados ao metabolismo do câncer não apresentou diferença após a exposição ao MPA ou ao DEP tanto nas culturas de células pulmonares BEAS-2B e A549, quanto nos grupos de co-culturas dessas células com macrófagos CCM1B, CCM2B, CCM1A e CCM2A (Figuras 23 a 28). Os genes relacionados ao controle e crescimento celular como EGFR, TP53, PTEN e PIK3CA permaneceram inalterados após a exposição às partículas, até nos grupos A549 e as respectivas co-culturas.

Mais recente, Hill et al. (2023)(94) exploraram os mecanismos com os quais a poluição atmosférica pode promover a progressão do câncer de pulmão. Em uma das etapas, os autores fizeram co-cultura de células alveolares tipo 2 (AT2) de camundongos EGFR-mutante super-expresso com macrófagos expostos a PM ou solução salina (PBS), obtendo aumento na eficiência de formação de organoides

(modelo de cultura celular 3D, que pode exibir organização espacial semelhante a um órgão) nas co-culturas com macrófagos expostos a PM, sugerindo que o microambiente promovido pelos fagócitos pode ser um fator chave na promoção do câncer. Em outra etapa, os autores testaram se IL-1 β poderia ser um mediador molecular da promoção tumoral, pois houve aumento na liberação dessa citocina em pulmões de camundongos EGFR-mutante expostos a PM. A equipe tratou células AT2 desses camundongos com IL-1 β *in vitro*, o que provocou aumento da taxa formação de organoides, nos camundongos já o anticorpo inibidor da IL-1 β foi suficiente para atenuar a formação de adenocarcinoma pulmonar induzida por EGFR em camundongos mutantes expostos ao PM. Os pesquisadores inferiram que os macrófagos expostos ao PM são uma fonte de IL-1 β , cuja sinalização poderia ser a chave para a promoção adenocarcinoma de pulmão em camundongos EGFR mutante.

Os macrófagos utilizados neste estudo permaneceram viáveis nas condições de cultura até 7 dias após o isolamento, contando que desses, 5 dias foram destinados ao tratamento com citocinas. O mecanismo de desenvolvimento do câncer é complexo e longo, sendo necessário inúmeros eventos entre mutações e proliferação celular para o estabelecimento do tumor. Os oncogenes estudados não apresentaram alteração na expressão do RNAm após 24 horas de exposição, o que não é incomum, uma vez que 24 horas pode não ser tempo suficiente para induzir super-expressão em um modelo *in vitro*. Como citado acima, Hill et al. (2023) (94) utilizaram camundongos e cultura de células desses animais para estudar a promoção do câncer por exposição ao PM e os resultados sugerem que os poluentes não estão associados à frequência de ativação de mutações oncogênicas, mas sim à expansão de clones já mutantes de EGFR. Alinhado com essa hipótese Riva et al. (2020)(95) estudaram 20 possíveis carcinógenos humanos, incluindo alguns poluentes atmosféricos como isobutil nitrito, cobalto, óxido de níquel, entre outros, e apenas 3 deles (1,2,3-tricloropropano, cloreto de vinilideno e cobalto) induziram mutações em camundongos, indicando que as outras 17 substâncias promovem crescimento tumoral a partir de mutações endógenas já estabelecidas nos tecidos. A hipótese dos autores é que a inflamação seja um fator chave para esse processo.

Mesmo o modelo de células transformadas da linhagem A549 não apresentou alterações na expressão de oncogenes após tratamento com as partículas (Figs. 26 a

28). Os marcadores utilizados neste trabalho se limitaram a vias de crescimento celular e controle do ciclo, contudo, outros mecanismos de promoção tumoral podem estar ocorrendo que não foram acessados nesta pesquisa, embora a célula A549 foi escolhida como uma via de comparação com as células de brônquio normais BEAS-2B. Santibáñez-Andrade et al. (2022)(96) expuseram células A549 a PM10 por 24 horas e estudaram as proteínas relacionadas à formação do fuso mitótico. Segundo os autores, a exposição altera a expressão e os níveis de proteína dos principais reguladores mitóticos, resultando em formação defeituosa do fuso mitótico, aneuploidia e instabilidade cromossômica, que têm sido consideradas biomarcadores do desenvolvimento do câncer.

O gene da chaperona AGR2 apareceu significativamente sub-expresso em alguns grupos como CCM1BMPA e CCM2A MPA (Figuras 23C e 28C). A proteína AGR2 foi relacionada ao mecanismo de promoção tumoral, pois as células cancerígenas possuem demandas elevadas na produção de proteínas mutantes e na síntese de proteínas do câncer, fazendo com que o aumento de AGR2 por meio do estresse do retículo endoplasmático facilite a maturação de receptores, que estimulam o controle do crescimento celular (97). Além disso, AGR2 ainda é capaz de responder a hormônios estrogênio em câncer de mama (97), inibir o supressor de tumor p21 em células no microambiente tumoral do câncer de pulmão (98) e desregular a função de p53 em câncer de células escamosas (99) e câncer de pulmão (98).

A super-expressão desse gene está relacionada a progressão tumoral e metástase de adenocarcinoma de pulmão (100, 101), enquanto a inibição da expressão de AGR2 está relacionada à redução do tumor e índices normais de expressão dos supressores p21 e p53 (98). Após exposição ao MPA e ao DEP, além da inibição de AGR2, os índices de expressão de TP53 (p53) e EGFR permaneceram inalterados nas células pulmonares e em co-cultura, sugerindo que não há promoção do crescimento celular, nem alterações no controle de qualidade do ciclo após exposição às partículas. No entanto, a nível basal as células A549 super-expressam AGR2 em relação a BEAS-2B, com uma diferença de até 10 ciclos no RT-PCR entre os basais das duas células (dados não mostrados), o que corrobora com o comportamento de AGR2 em células de adenocarcinoma descrito na literatura. O microambiente da co-cultura é complexo e as células de via aérea e macrófagos podem se comunicar via vesículas secretadas e mensageiros moleculares (98),

inclusive para modular a polarização de macrófagos (12, 102). Sendo assim, novos experimentos precisam ser realizados para explorar a sub-expressão de AGR2 nos grupos CCM1B MPA e CCM2A MPA.

Os genes do citocromo P450 CYP1A1 e CYP1B1, sabidamente envolvidos na metabolização de HPAs nas células, se apresentaram significativamente super-expressos em todos os grupos expostos ao DEP, mas não ao MPA. Comparando este resultado com a caracterização química das partículas é coerente que o DEP apresente aumento da expressão dessas enzimas, uma vez que possui praticamente 5 vezes mais HPAs em $\mu\text{g/g}$ de material que o MPA utilizado nos experimentos.

Contudo, é interessante notar que o DEP provocou aumento na expressão de CYP (Figuras 23 a 28), mas não aumentou a expressão de citocinas inflamatórias (Figuras 29 a 33), enquanto MPA atuou de forma contrária, induzindo expressão significativa de citocinas inflamatórias, mas não de CYP, como didaticamente evidenciado na Figura 34 F. Esses resultados corroboram com os de Jaguin et al. (2015)(103), em que macrófagos humanos derivados de monócitos do sangue periférico previamente ou não induzidos a M1 ou M2 foram tratados com DEP por 24 horas a $10 \mu\text{g/mL}$ apresentaram aumento na expressão de CYP1B1, diminuição da aquisição de vários marcadores M1 e M2 e diminuição da resposta de M1 ao LPS, monitorada pela redução da secreção de IL-12p40 e IL-6. Os autores demonstraram ainda que AhR e Nrf2 estão envolvidos na supressão da resposta inflamatória ao LPS, concluindo que os efeitos do DEP são gene-específicos, ou seja, não estão restritos a um tipo de macrófago, mas sua resposta é capaz de produzir uma população heterogênea dessas células, aumentando a suscetibilidade a infecções em indivíduos expostos a esses poluentes.

A relação entre as enzimas do citocromo P450 e a liberação de citocinas é complexa e há estudos relatando uma relação inversa entre a expressão de CYPs e o nível sérico de TNF e IL-6 em pacientes com insuficiência cardíaca (104). Algumas citocinas que são liberadas no microambiente tumoral (por exemplo, IL-1, IL-6 e TNF- α) podem diminuir a expressão dos genes CYP, especialmente das famílias CYP1, CYP2, CYP3 e CYP4 (105). No fígado, citocinas inflamatórias causam a indução do gene NOS2, o que leva a um aumento na produção de NO no fígado, que pode se ligar às enzimas P450, levando à inibição (106). Hepatócitos tratados com TCDD, indutor de AhR, exibiram expressão aumentada de CYP1A1 e CYP1A2 após 12 horas,

enquanto hepatócitos mantidos em meio condicionado de monócitos humanos exibiram supressão desses genes, via sinalização das citocinas IL-1 β e TNF α (107).

A expressão de AhR no pulmão é comparável à encontrada em órgãos conhecidos por expressarem constitutivamente o AhR, como o fígado. O alto nível de expressão de AhR observado no pulmão resulta na expressão basal significativa de vários membros das enzimas do citocromo P450, sendo CYP1A e CYP1B1 os mais proeminentes (53). O receptor Aril também é conhecido por modular a resposta inflamatória, tanto para promoção da inflamação, quanto para indução de vias anti-inflamatórias, dependendo especificamente do ligante, do tecido afetado e do tipo celular estudado (108). Os macrófagos de camundongos tratados com LPS apresentaram ativação de AhR e produção de citocinas inflamatórias como IL-6, TNF α , IL-12p40, enquanto camundongos *knock out* para AhR apresentaram maior suscetibilidade ao LPS, aumentando ainda mais a produção de IL-6 quando comparado ao camundongo selvagem, sugerindo que AhR possui algum nível de controle fino sobre a liberação dessa citocina (109).

Como discutido nesta seção, a poluição atmosférica ambiental é um conhecido fator de indução à resposta inflamatória e os genes do AhR podem estar relacionados ao controle dessa resposta (21, 110). Contudo, os estudos sobre esses mecanismos em tecido antracótico são escassos, fazendo com que os achados deste trabalho sejam inéditos por promover pela primeira vez a exposição de células *in vitro* ao material particulado da antracose.

Por fim, os resultados deste trabalho sugerem que MPA e DEP induzem a resposta de células pulmonares e macrófagos de maneiras diferentes, uma vez que MPA, uma partícula com HPAs de menor complexibilidade, induziu a liberação de citocinas pró-inflamatórias, mas não aumentou o metabolismo de xenobióticos, enquanto DEP, partícula ambiental com HPAs mais pesados, aumentou o metabolismo de xenobióticos, mas não promoveu aumento na liberação de citocinas. A composição química das partículas e a complexa via de modulação da imunidade por AhR, podem ser as peças-chave que explicam a diferença entre as respostas nas monoculturas e nas co-culturas.

7. CONCLUSÃO

- A extração do material particulado da antracose do pulmão de pacientes que foram a óbitos e submetidos à autopsia foi bem-sucedida, proporcionando a exposição direta de células *in vitro* a essas partículas.
- O material particulado da antracose é quimicamente mais simples que o material particulado de diesel, apresentando HPAs de até 2 anéis, baixo peso molecular e cerca de 5 vezes menos $\mu\text{g/g}$ de HPAs que o DEP.
- Tanto o MPA quanto o DEP são capazes de provocar diminuição do metabolismo de células pulmonares BEAS-2B e A549 numa concentração de $50 \mu\text{g/mL}$, sem provocar citotoxicidade severa.
- A exposição a MPA e DEP induziu populações heterogêneas em macrófagos em co-cultura e monocultura, apresentando marcadores relacionados ao perfil M1 e M2 ao mesmo tempo. No entanto, o perfil de citocinas demonstrou tendência pró-inflamatória dessas culturas, principalmente em macrófagos pré-induzidos a M1, embora houvesse um aumento da IL-10 nas monoculturas e nas co-culturas.
- A expressão gênica dos oncogenes se manteve inalterada após 24 horas de exposição a $50 \mu\text{g/mL}$ de MPA ou DEP, tanto em monocultura quanto em co-cultura.
- A expressão de genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos aumentaram apenas em monoculturas pulmonares e co-culturas expostas ao DEP, enquanto a produção de citocinas inflamatórias aumentou apenas em grupos expostos ao MPA.
- O aumento de CYP ocorreu nas células tratadas com o DEP enquanto o aumento de citocinas pró-inflamatórias ocorreu apenas nas células tratadas com MPA. Uma hipótese sugerida é que a característica química do MPA e do DEP influenciou nas respostas, uma vez que a partícula ambiental parece ter provocado uma resposta primária de metabolismo de xenobióticos, enquanto a partícula metabolizada induziu resposta inflamatória. Contudo, são necessários mais experimentos para investigar a causa desse comportamento das culturas.

REFERÊNCIAS

1. Mirsadraee M. Anthracosis of the lungs: etiology, clinical manifestations and diagnosis: a review. *Tanaffos*. 2014;13(4):1-13.
2. Qorbani M, Yunesian M, Baradaran HR. Indoor smoke exposure and risk of anthracosis. *Iran J Med Sci*. 2014;39(6):571-6.
3. Takano APC, Justo LT, Dos Santos NV, Marquezini MV, de André PA, da Rocha FMM, et al. Pleural anthracosis as an indicator of lifetime exposure to urban air pollution: An autopsy-based study in Sao Paulo. *Environ Res*. 2019;173:23-32.
4. Kim YJ, Jung CY, Shin HW, Lee BK. Biomass smoke induced bronchial anthracofibrosis: Presenting features and clinical course. *Respiratory Medicine*. 2009;103(5):757-65.
5. Amoli K. Anthracotic airways disease: report of 102 cases. *Tanaffos: Journal of Respiratory Disease, Thoracic Surgery, Intensive Care and Tuberculosis*. 2009;8:14-22.
6. Souza MB, Saldiva PH, Pope CA, 3rd, Capelozzi VL. Respiratory changes due to long-term exposure to urban levels of air pollution: a histopathologic study in humans. *Chest*. 1998;113(5):1312-8.
7. Moorthy B, Chu C, Carlin DJ. Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. *Toxicol Sci*. 2015;145(1):5-15.
8. Hu X, Li Q, Shao S, Zeng Q, Jiang S, Wu Q, et al. Potential lung carcinogenicity induced by chronic exposure to PM(2.5) in the rat. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017;24(23):18991-9000.
9. Cui Y, Huang L, Huo T, Dong F, Wang G, Zhang Q. Man-made mineral fiber effects on the expression of anti-oncogenes P53 and P16 and oncogenes C-JUN and C-FOS in the lung tissue of Wistar rats. *Toxicol Ind Health*. 2019;35(6):431-44.
10. Mehla K, Singh PK. Metabolic Regulation of Macrophage Polarization in Cancer. *Trends Cancer*. 2019;5(12):822-34.
11. Najafi M, Hashemi Goradel N, Farhood B, Salehi E, Nashtaei MS, Khanlarkhani N, et al. Macrophage polarity in cancer: A review. *J Cell Biochem*. 2019;120(3):2756-65.
12. Pritchard A, Tousif S, Wang Y, Hough K, Khan S, Strenkowski J, et al. Lung Tumor Cell-Derived Exosomes Promote M2 Macrophage Polarization. *Cells*. 2020;9(5).
13. Santos UP, Arbex MA, Braga ALF, Mizutani RF, Caçado JED, Terra-Filho M, et al. Environmental air pollution: respiratory effects. *J Bras Pneumol*. 2021;47(1):e20200267.
14. Buoli M, Grassi S, Caldiroli A, Carnevali GS, Mucci F, Iodice S, et al. Is there a link between air pollution and mental disorders? *Environ Int*. 2018;118:154-68.
15. Organization WH. Air Pollution https://www.who.int/health-topics/air-pollution#tab=tab_12022 [Available from: https://www.who.int/health-topics/air-pollution#tab=tab_1.
16. Pénard-Morand C, Annesi-Maesano I. Air pollution: from sources of emissions to health effects. *Breathe*. 2004;1(2):108.
17. Dapper SN, Spohr C, Zanini RR. Poluição do ar como fator de risco para a saúde: uma revisão sistemática no estado de São Paulo. *Estudos Avançados*. 2016;30(86):83-97.
18. Cetesb. Qualidade do ar: poluentes <https://cetesb.sp.gov.br/ar/poluentes/> [Available from: <https://cetesb.sp.gov.br/ar/poluentes/>.
19. Cetesb. Qualidade do Ar no Estado de São Paulo. São Paulo; 2021.
20. Humans. IWGotEoCRt. Personal habits and indoor combustions. Volume 100 E. A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2012;100(Pt E):1-538.
21. Glencross DA, Ho TR, Camiña N, Hawrylowicz CM, Pfeffer PE. Air pollution and its effects on the immune system. *Free Radic Biol Med*. 2020;151:56-68.
22. Kelly FJ, Fussell JC. Linking ambient particulate matter pollution effects with oxidative biology and immune responses. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1340:84-94.
23. Leikauf GD, Kim SH, Jang AS. Mechanisms of ultrafine particle-induced respiratory health effects. *Exp Mol Med*. 2020;52(3):329-37.

24. Kim KH, Jahan SA, Kabir E, Brown RJ. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ Int.* 2013;60:71-80.
25. Jimma Y, Jimma K, Yachi M, Hakata S, Habano W, Ozawa S, et al. Aryl hydrocarbon receptor mediates cell proliferation enhanced by benzo [a] pyrene in human lung cancer 3D spheroids. *Cancer investigation.* 2019;37(8):367-75.
26. Kometani T, Yoshino I, Miura N, Okazaki H, Ohba T, Takenaka T, et al. Benzo[a]pyrene promotes proliferation of human lung cancer cells by accelerating the epidermal growth factor receptor signaling pathway. *Cancer Lett.* 2009;278(1):27-33.
27. Yesol B, It, sup, gt, Hui-Joo J, Ji-Hye S, et al. Benzo[a]pyrene Alters the Expression of Genes in A549 Lung Cancer Cells and Cancer Stem Cells.
28. Berge G, Øvrebø S, Botnen IV, Hewer A, Phillips DH, Haugen A, et al. Resveratrol inhibits benzo[a]pyrene-DNA adduct formation in human bronchial epithelial cells. *British journal of cancer.* 2004;91(2):333-8.
29. Bonastre E, Brambilla E, Sanchez-Cespedes M. Cell adhesion and polarity in squamous cell carcinoma of the lung. *J Pathol.* 2016;238(5):606-16.
30. Villalobos P, Wistuba II. Lung Cancer Biomarkers. *Hematology/Oncology Clinics of North America.* 2017;31(1):13-29.
31. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(10):778-90.
32. Pallis AG, Syrigos KN. Lung cancer in never smokers: disease characteristics and risk factors. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013;88(3):494-503.
33. Chapman AM, Sun KY, Ruestow P, Cowan DM, Madl AK. Lung cancer mutation profile of EGFR, ALK, and KRAS: Meta-analysis and comparison of never and ever smokers. *Lung Cancer.* 2016;102:122-34.
34. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol.* 2013;14(9):813-22.
35. Brune K, Frank J, Schwingshackl A, Finigan J, Sidhaye VK. Pulmonary epithelial barrier function: some new players and mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;308(8):L731-45.
36. Li F, He J, Wei J, Cho WC, Liu X. Diversity of epithelial stem cell types in adult lung. *Stem Cells Int.* 2015;2015:728307.
37. Whitsett JA. Airway Epithelial Differentiation and Mucociliary Clearance. *Annals of the American Thoracic Society.* 2018;15(Suppl 3):S143-S8.
38. Bennet TJ, Randhawa A, Hua J, Cheung KC. Airway-On-A-Chip: Designs and Applications for Lung Repair and Disease. *Cells.* 2021;10(7).
39. Bustamante-Marin XM, Ostrowski LE. Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2017;9(4):a028241.
40. Sato S, Kiyono H. The mucosal immune system of the respiratory tract. *Curr Opin Virol.* 2012;2(3):225-32.
41. Voynow JA, Shinbashi M. Neutrophil Elastase and Chronic Lung Disease. *Biomolecules.* 2021;11(8).
42. Schneider JL, Rowe JH, Garcia-de-Alba C, Kim CF, Sharpe AH, Haigis MC. The aging lung: Physiology, disease, and immunity. *Cell.* 2021;184(8):1990-2019.
43. Peters M, Peters K, Bufe A. Regulation of lung immunity by dendritic cells: Implications for asthma, chronic obstructive pulmonary disease and infectious disease. *Innate immunity.* 2019;25(6):326-36.
44. Semenzato G, Bortolin M, Facco M, Tassinari C, Sancetta R, Agostini C. Lung lymphocytes: origin, biological functions, and laboratory techniques for their study in immune-mediated pulmonary disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1996;33(5):423-55.
45. Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev.* 2010;238(1):247-62.

46. Hughes MJ, Sapey E, Stockley R. Neutrophil phenotypes in chronic lung disease. *Expert Rev Respir Med.* 2019;13(10):951-67.
47. Hou F, Xiao K, Tang L, Xie L. Diversity of Macrophages in Lung Homeostasis and Diseases. *Front Immunol.* 2021;12:753940.
48. Boorsma CE, Draijer C, Melgert BN. Macrophage heterogeneity in respiratory diseases. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:769214.
49. Martinez FO, Helming L, Milde R, Varin A, Melgert BN, Draijer C, et al. Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood.* 2013;121(9):e57-69.
50. Aghasafari P, George U, Pidaparti R. A review of inflammatory mechanism in airway diseases. *Inflamm Res.* 2019;68(1):59-74.
51. Frias DP, Gomes RLN, Yoshizaki K, Carvalho-Oliveira R, Matsuda M, Junqueira MS, et al. Nrf2 positively regulates autophagy antioxidant response in human bronchial epithelial cells exposed to diesel exhaust particles. *Sci Rep.* 2020;10(1):3704.
52. Steerenberg PA, Zonnenberg JA, Dormans JA, Joon PN, Wouters IM, van Bree L, et al. Diesel exhaust particles induced release of interleukin 6 and 8 by (primed) human bronchial epithelial cells (BEAS 2B) in vitro. *Exp Lung Res.* 1998;24(1):85-100.
53. Stockinger B, Di Meglio P, Gialitakis M, Duarte JH. The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:403-32.
54. Jamaati H, Bahrami N, Tabarsi P, Khosravi A, Kiani A, Abedini A, et al. Multi-gene expression in anthracosis of the lungs as one of the risk factors for non-small cell lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(11):3129-33.
55. Jamaati H, Sharifi A, Mirenayat MS, Mirsadraee M, Amoli K, Heidarnazhad H, et al. What Do We Know about Anthracofibrosis? A Literature Review. *Tanaffos.* 2017;16(3):175-89.
56. Törün T, Güngör G, Ozmen İ, Maden E, Bolukbasi Y, Tahaoglu K. Bronchial Anthracostenosis in Patients Exposed to Biomass Smoke. *Turkish Respir J.* 2007;8:48-51.
57. Boonsarngsuk V, Suwatanapongched T, Rochanawutanon M. Bronchial anthracostenosis with mediastinal fibrosis associated with long-term wood-smoke exposure. *Respirology.* 2009;14(7):1060-3.
58. Hoo ZH, Whyte MK. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax.* 2012;67(8):742-6.
59. Margaritopoulos GA, Tsitoura E, Tzanakis N, Spandidos DA, Siafakas NM, Sourvinos G, et al. Self-eating: friend or foe? The emerging role of autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *Biomed Res Int.* 2013;2013:420497.
60. Petsonk EL, Rose C, Cohen R. Coal mine dust lung disease. New lessons from old exposure. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187(11):1178-85.
61. Go LH, Krefft SD, Cohen RA, Rose CS. Lung disease and coal mining: what pulmonologists need to know. *Curr Opin Pulm Med.* 2016;22(2):170-8.
62. Laney AS, Weissman DN. Respiratory diseases caused by coal mine dust. *Journal of occupational and environmental medicine.* 2014;56 Suppl 10(0 10):S18-S22.
63. Schreiber J, Koschel D, Kekow J, Waldburg N, Goette A, Merget R. Rheumatoid pneumoconiosis (Caplan's syndrome). *Eur J Intern Med.* 2010;21(3):168-72.
64. Zeidberg LD, Prindle RA. The Nashville air pollution study. II. Pulmonary anthracosis as an index of air pollution. *Am J Public Health Nations Health.* 1963;53(2):185-99.
65. Kulkarni N, Pierse N, Rushton L, Grigg J. Carbon in airway macrophages and lung function in children. *N Engl J Med.* 2006;355(1):21-30.
66. Bai Y, Bové H, Nawrot TS, Nemery B. Carbon load in airway macrophages as a biomarker of exposure to particulate air pollution; a longitudinal study of an international Panel. *Part Fibre Toxicol.* 2018;15(1):14.
67. Catarino AI, Thompson R, Sanderson W, Henry TB. Development and optimization of a standard method for extraction of microplastics in mussels by enzyme digestion of soft tissues. *Environ Toxicol Chem.* 2017;36(4):947-51.

68. Junior MF, Vital HdC. Tecnologia de Alimentos Agência Embrapa de Informação Tecnológica: EMBRAPA; 2021 [Available from: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fjlb22h02wyiv80sq98yq94hs31y.html].
69. Couto RR, Santiago AJ. RADIOATIVIDADE E IRRADIAÇÃO DE ALIMENTOS. Revista Ciências Exatas e Naturais Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO/PR, BRASIL; 2010. p. 193-215.
70. Rebouças EdL, Costa JdN, Passos MJ, Passos JRdS, Hurk Rvd, Silva JRV. Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2013;56(1):143-54.
71. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001;29(9):e45.
72. Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Cell biology. Metabolic control of cell death. Science. 2014;345(6203):1250256.
73. Ambroz A, Vlkova V, Rossner P, Jr., Rossnerova A, Svecova V, Milcova A, et al. Impact of air pollution on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in mothers and their newborns. Int J Hyg Environ Health. 2016;219(6):545-56.
74. Chew S, Lampinen R, Saveleva L, Korhonen P, Mikhailov N, Grubman A, et al. Urban air particulate matter induces mitochondrial dysfunction in human olfactory mucosal cells. Part Fibre Toxicol. 2020;17(1):18.
75. Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. Annu Rev Pathol. 2020;15:123-47.
76. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. Immunity. 2014;41(1):14-20.
77. Ruytinx P, Proost P, Van Damme J, Struyf S. Chemokine-Induced Macrophage Polarization in Inflammatory Conditions. Front Immunol. 2018;9:1930.
78. Pettersen JS, Fuentes-Duculan J, Suárez-Fariñas M, Pierson KC, Pitts-Kiefer A, Fan L, et al. Tumor-associated macrophages in the cutaneous SCC microenvironment are heterogeneously activated. J Invest Dermatol. 2011;131(6):1322-30.
79. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. F1000Prime Rep. 2014;6:13.
80. Shen Y, Chen JX, Li M, Xiang Z, Wu J, Wang YJ. Role of tumor-associated macrophages in common digestive system malignant tumors. World J Gastrointest Oncol. 2023;15(4):596-616.
81. Zhan C, Jin Y, Xu X, Shao J, Jin C. Antitumor therapy for breast cancer: Focus on tumor-associated macrophages and nanosized drug delivery systems. Cancer Med. 2023;12(10):11049-72.
82. Wang JX, Choi SYC, Niu X, Kang N, Xue H, Killam J, et al. Lactic Acid and an Acidic Tumor Microenvironment suppress Anticancer Immunity. Int J Mol Sci. 2020;21(21).
83. Vogel DY, Vereyken EJ, Glim JE, Heijnen PD, Moeton M, van der Valk P, et al. Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. J Neuroinflammation. 2013;10:35.
84. Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. Immunity. 2014;40(2):274-88.
85. Rylance J, Fullerton DG, Scriven J, Aljurayyan AN, Mzinza D, Barrett S, et al. Household air pollution causes dose-dependent inflammation and altered phagocytosis in human macrophages. Am J Respir Cell Mol Biol. 2015;52(5):584-93.
86. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. Trends Immunol. 2009;30(10):475-87.
87. Li CH, Tsai ML, Chiou HC, Lin YC, Liao WT, Hung CH. Role of Macrophages in Air Pollution Exposure Related Asthma. Int J Mol Sci. 2022;23(20).

88. Zhao C, Wang Y, Su Z, Pu W, Niu M, Song S, et al. Respiratory exposure to PM2.5 soluble extract disrupts mucosal barrier function and promotes the development of experimental asthma. *Sci Total Environ.* 2020;730:139145.
89. Martin PJ, Héliot A, Trémolet G, Landkocz Y, Dewaele D, Cazier F, et al. Cellular response and extracellular vesicles characterization of human macrophages exposed to fine atmospheric particulate matter. *Environmental Pollution.* 2019;254:112933.
90. Fu H, Liu X, Li W, Zu Y, Zhou F, Shou Q, et al. PM2.5 Exposure Induces Inflammatory Response in Macrophages via the TLR4/COX-2/NF- κ B Pathway. *Inflammation.* 2020;43(5):1948-58.
91. Kocbach A, Herseeth JI, Låg M, Refsnes M, Schwarze PE. Particles from wood smoke and traffic induce differential pro-inflammatory response patterns in co-cultures. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;232(2):317-26.
92. Ishii H, Hayashi S, Hogg JC, Fujii T, Goto Y, Sakamoto N, et al. Alveolar macrophage-epithelial cell interaction following exposure to atmospheric particles induces the release of mediators involved in monocyte mobilization and recruitment. *Respir Res.* 2005;6(1):87.
93. Fujii T, Hayashi S, Hogg JC, Mukae H, Suwa T, Goto Y, et al. Interaction of alveolar macrophages and airway epithelial cells following exposure to particulate matter produces mediators that stimulate the bone marrow. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;27(1):34-41.
94. Hill W, Lim EL, Weeden CE, Lee C, Augustine M, Chen K, et al. Lung adenocarcinoma promotion by air pollutants. *Nature.* 2023;616(7955):159-67.
95. Riva L, Pandiri AR, Li YR, Droop A, Hewinson J, Quail MA, et al. The mutational signature profile of known and suspected human carcinogens in mice. *Nat Genet.* 2020;52(11):1189-97.
96. Santibáñez-Andrade M, Sánchez-Pérez Y, Chirino YI, Morales-Bárceñas R, Quintana-Belmares R, García-Cuellar CM. Particulate matter (PM₁₀) destabilizes mitotic spindle through downregulation of SETD2 in A549 lung cancer cells. *Chemosphere.* 2022;295:133900.
97. Brychtova V, Mohtar A, Vojtesek B, Hupp TR. Mechanisms of anterior gradient-2 regulation and function in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2015;33:16-24.
98. Fessart D, de Barbeyrac C, Boutin I, Grenier T, Richard E, Begueret H, et al. Extracellular AGR2 triggers lung tumour cell proliferation through repression of p21(CIP1). *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2021;1868(3):118920.
99. Takabatake K, Konishi H, Arita T, Kataoka S, Shibamoto J, Furuke H, et al. Anterior gradient 2 regulates cancer progression in TP53-wild-type esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2021;46(6).
100. He J, Fu Y, Hu J, Chen J, Lou G. Hypomethylation-Mediated AGR2 Overexpression Facilitates Cell Proliferation, Migration, and Invasion of Lung Adenocarcinoma. *Cancer Manag Res.* 2021;13:5177-85.
101. Ci H, Wu L. Expression of KAI1 and AGR2 in lung adenocarcinoma and their clinicopathological significance. *Medicine (Baltimore).* 2022;101(51):e32498.
102. Chen J, Zhang K, Zhi Y, Wu Y, Chen B, Bai J, et al. Tumor-derived exosomal miR-19b-3p facilitates M2 macrophage polarization and exosomal LINC00273 secretion to promote lung adenocarcinoma metastasis via Hippo pathway. *Clin Transl Med.* 2021;11(9):e478.
103. Jaguin M, Fardel O, Lecreur V. Exposure to diesel exhaust particle extracts (DEPe) impairs some polarization markers and functions of human macrophages through activation of AhR and Nrf2. *PLoS One.* 2015;10(2):e0116560.
104. Frye RF, Schneider VM, Frye CS, Feldman AM. Plasma levels of TNF-alpha and IL-6 are inversely related to cytochrome P450-dependent drug metabolism in patients with congestive heart failure. *J Card Fail.* 2002;8(5):315-9.
105. Stipp MC, Acco A. Involvement of cytochrome P450 enzymes in inflammation and cancer: a review. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2021;87(3):295-309.
106. Morgan ET, Li-Masters T, Cheng PY. Mechanisms of cytochrome P450 regulation by inflammatory mediators. *Toxicology.* 2002;181-182:207-10.

107. Barker CW, Fagan JB, Pasco DS. Interleukin-1 beta suppresses the induction of P4501A1 and P4501A2 mRNAs in isolated hepatocytes. *J Biol Chem.* 1992;267(12):8050-5.
108. Rothhammer V, Quintana FJ. The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nature Reviews Immunology.* 2019;19(3):184-97.
109. Kimura A, Naka T Fau - Nakahama T, Nakahama T Fau - Chinen I, Chinen I Fau - Masuda K, Masuda K Fau - Nohara K, Nohara K Fau - Fujii-Kuriyama Y, et al. Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. (1540-9538 (Electronic)).
110. O'Driscoll CA, Mezrich JD. The Aryl Hydrocarbon Receptor as an Immune-Modulator of Atmospheric Particulate Matter-Mediated Autoimmunity. *Front Immunol.* 2018;9:2833.