

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES  
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE**

**CLEONILDE MARIA DO NASCIMENTO**

**POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA E POSSÍVEIS EFEITOS À POPULAÇÃO DE RECIFE:  
AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR, RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS E  
ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS PULMONARES EXPOSTAS A MATERIAL  
PARTICULADO**

**RECIFE**

**2020**

**CLEONILDE MARIA DO NASCIMENTO**

**POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA E POSSÍVEIS EFEITOS À POPULAÇÃO DE  
RECIFE: AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR, RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS  
E ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS PULMONARES EXPOSTAS A  
MATERIAL PARTICULADO**

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dra. Sheilla Andrade de Oliveira

Dr. Helotonio Carvalho

RECIFE

2020

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

N244p Nascimento, Cleonilde Maria do.  
Poluição atmosférica e possíveis efeitos à população de recife: avaliação de morte celular, respostas inflamatórias e estresse oxidativo em células pulmonares expostas a material particulado / Cleonilde Maria do Nascimento. - Recife: [s.n.], 2020.  
87p.: il., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

Orientadores: Sheilla Andrade de Oliveira, Helotonio Carvalho.

1. Poluição do ar. 2. Células alveolares. 3. Apoptose. 4. Estresse oxidativo. 5. Saúde pública. 6. Veículos automotores. I. Oliveira, Sheilla Andrade de. II. Carvalho, Helotonio. III. Título.

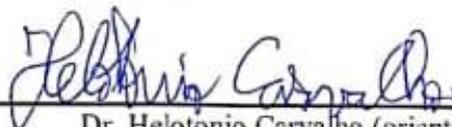
CLEONILDE MARIA DO NASCIMENTO

**POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA E POSSÍVEIS EFEITOS À POPULAÇÃO DE  
RECIFE: AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR, RESPOSTAS  
INFLAMATÓRIAS E ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS PULMONARES  
EXPOSTAS A MATERIAL PARTICULADO**

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 28/02/2020

BANCA EXAMINADORA



---

Dr. Helotônio Carvalho (orientador)

Centro de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Pernambuco



---

Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes Fonseca (Titular interno)

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr. Fábio Rocha Formiga (Titular externo)

Instituto de Ciências Biológicas/Universidade de Pernambuco

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as entidades espirituais e divinas que me guiaram e me deram força neste percurso.

A meus orientadores Helotonio Carvalho e Sheilla Andrade, por todo o acolhimento, paciência e ensinamento direcionados a mim. Pela disponibilidade, confiança e credibilidade no desenvolvimento deste projeto.

A toda a equipe do LIBM e amigos do laboratório Alex, Jéssica, Juliana, Cícero, Daniele, Veruska e Roni por terem me recebido tão bem no grupo. Pela companhia diária, conversas e risadas, pela compreensão, troca de aprendizado e todo o apoio nos dias bons e ruins. Por terem se tornado muito mais que simples colegas de bancada, mas amigos, para além das paredes da FIOCRUZ.

Às Dras. Maria Carolina e Valéria Pereira, bem como Marton Kaique, do grupo IMUNODIP, pela disponibilidade e auxílio nos ensaios com citometria de fluxo.

Ao Instituto Aggeu Magalhães e ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas, pelo espaço onde foram realizados os experimentos no desenvolvimento deste trabalho e pelo apoio financeiro concedido. Também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento deste projeto.

Agradeço imensamente a minha família: meus pais Marina e Moacir, por serem tão humildes, honestos e maravilhosos! Pela educação que proporcionaram a mim e minhas irmãs, nos ensinando os princípios que realmente têm valor nessa vida. A minhas irmãs Claudiane, Claudileide, Cleciane, Cleones, Claudineia e Kelly, por todo apoio, incentivo e inspiração em toda a minha vida acadêmica e pessoal. E a meus sobrinhos, minha fonte de restauração e alegria, mesmo na distância. Gratidão também a minha prima e amiga Ivonete, por toda a sua força e empatia. A todos, por serem tão presentes em minha vida, mesmo distantes fisicamente.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a mim, por ter acreditado no meu potencial e não ter desistido perante as pedras no meio do caminho.

*“Quando as ideias se tornam emocionalmente verdadeiras, passam a ter o poder de nos mudar.”*

*(Greg McKeown)*

NASCIMENTO, Cleonilde Maria. **Poluição atmosférica e possíveis efeitos à população de Recife: avaliação de morte celular, respostas inflamatórias e estresse oxidativo em células pulmonares expostas a material particulado.** 2020. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

## RESUMO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a poluição do ar é responsável por até sete milhões de mortes anualmente, causando ou agravando distúrbios cardiorrespiratórios e diversos tipos de câncer. Recife, com mais de 1,6 milhão de habitantes e frota de quase 700 mil veículos, apresentou elevação considerável no número de internações e mortes por doenças associadas à poluição do ar na última década, o que pode estar relacionado ao aumento da frota e maior formação de material particulado (MP). O MP é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) quando inalado e induzir inflamação. Este estudo determinou a concentração de MP<sub>2,5</sub> no ar de Recife (MP-Recife) e avaliou seus efeitos em células alveolares do tipo II humanas (A549), comparando com o MP derivado de diesel (MP-Diesel). Para isso, foram realizados ensaios de citotoxicidade, morte celular, níveis de citocinas inflamatórias, produção de EROs e de ativação transcricional de enzimas antioxidantes. Observou-se que a concentração do MP<sub>2,5</sub> no ar de Recife está de acordo com a resolução vigente no país, mas ultrapassa padrões da OMS. O MP-Diesel reduziu a viabilidade em 48 h ( $p < 0,0002$ ) e 72 h ( $p < 0,0001$ ) de exposição, afetando mais de 60% das células. Já o MP-Recife reduziu a viabilidade em quase 50% após 72 h ( $p < 0,03$ ). O MP-Diesel elevou os níveis de IL-6 em 48 h ( $p < 0,03$ ) e 72 h ( $p < 0,005$ ) de exposição e ambos os MPs elevaram IL-8 em 72 h ( $p < 0,02$ ). Ambos induziram apoptose e estresse oxidativo nas células A549 após 72 h ( $p < 0,02$ ), além de ativar a transcrição das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase, tioredoxina e ferredoxina reductase ( $p < 0,02$ ). Assim, concluiu-se que o MP-Recife, assim como o MP-Diesel, é tóxico para as células pulmonares, capaz de induzir apoptose, respostas inflamatórias, estresse oxidativo e alterar o sistema celular de antioxidantes. Esses resultados apontam a necessidade de mais estudos para compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese do MP-Recife.

**Palavras-chave:** Poluição do ar. Células alveolares. Apoptose. Estresse oxidativo. Saúde pública. Veículos automotores.

NASCIMENTO, Cleonilde Maria. **Air pollution and possible effects on the population of Recife: evaluation of cell death, inflammatory responses and oxidative stress in lung cells exposed to particulate matter**. 2020. Dissertation (Academic Master of Bioscience and Biotechnology for Health) – Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2020.

## ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), air pollution is responsible for up to seven million deaths annually, being a causative and aggravating agent of cardiorespiratory disorders and several types of cancer. Recife, with more than 1.6 million inhabitants and a fleet of almost 700.000 vehicles, showed a considerable increase in the number of hospitalizations and deaths from diseases associated with air pollution in the last decade, which may be related to the increase in the fleet and greater formation of particulate matter (PM). PM generates reactive oxygen species (ROS) and causes inflammation when inhaled. This study determined the concentration of PM<sub>2.5</sub> in Recife air (PM-Recife) and evaluated its effects on human type II alveolar cells (A549), comparing with the diesel-derived PM (PM-Diesel). For this, we analyzed cytotoxicity, cell death, levels of inflammatory cytokines, ROS production, and transcriptional activation of antioxidant enzymes. Our results show that the concentration of PM<sub>2.5</sub> in Recife air is according to the current Brazil standard but exceeds WHO standards. PM-Diesel reduced the viability in 48 h ( $p < 0.0002$ ) and 72 h ( $p < 0.0001$ ) of exposure, affecting more than 60% of the cells. While the PM-Recife reduced the viability by almost 50% after 72 h ( $p < 0.03$ ). The PM-Diesel increased the levels of IL-6 in 48 h ( $< 0.03$ ) and 72 h ( $p < 0.005$ ) of exposure and both PMs increased IL-8 in 72 h ( $p < 0.02$ ). Both PMs induced apoptosis and intracellular oxidative stress in A549 cells after 72 h ( $p < 0.02$ ), in addition to transcriptionally activating the enzymes superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, thioredoxin and ferredoxin reductase ( $p < 0.02$ ). PM-Recife, like PM-Diesel, is toxic to lung cells, capable of inducing apoptosis, inflammatory responses, oxidative stress, and altering the cellular system of antioxidants. Such findings point to the need of further studies to understand the mechanisms involved in the pathogenesis of PM-Recife.

**Key words:** Air pollution. Alveolar cells. Apoptosis. Oxidative stress. Public health. Automobiles.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Comparação de tamanho entre o material particulado fino (MP <sub>2,5</sub> ) e grosso (MP <sub>10</sub> ).....	17
<b>Figura 2</b> - Vias biológicas que ligam a exposição ao MP com vias oxidativas e inflamatórias no pulmão e no sistema cardiovascular.....	30
<b>Figura 3</b> - Modelo ilustrativo da atuação do material particulado nas células.....	31
<b>Figura 4</b> - Registro do crescimento da frota de veículos de Recife: 2000 - 2018.....	39
<b>Figura 5</b> - Frota de Recife registrada por tipo de veículo - Novembro/ 2018.....	39
<b>Figura 6</b> - Evolução da frota de Recife por tipo de veículo de 2000 a 2018.....	40
<b>Figura 7</b> - Internações por infarto agudo do miocárdio em Recife entre 2000 e 2018.....	41
<b>Figura 8</b> - Internações por câncer de pulmão em Recife entre 2000 e 2018.....	41
<b>Figura 9</b> - Amostrador de partículas IPM-FDS 2,5µ/10µ Fine Particulate Sampler.....	47
<b>Figura 10</b> - Viabilidade das células A549 expostas a MP-Diesel e MP-Recife.....	55
<b>Figura 11</b> - Quantificação de morte celular em células A549 expostas a MP-Diesel e MP-Recife.....	57
<b>Figura 12</b> - Níveis de IL-6 em células A549 expostas a MP-Diesel e MP-Recife.....	59
<b>Figura 13</b> - Níveis de IL-8 em células A549 expostas a MP-Diesel e MP-Recife.....	60
<b>Figura 14</b> - Níveis de estresse oxidativo intracelular em células expostas a MP-Diesel e MP-Recife.....	62
<b>Figura 15</b> - Expressão relativa dos genes que codificam para proteínas antioxidantes em células A549 expostas a MP-Diesel.....	64
<b>Figura 16</b> - Expressão relativa dos genes que codificam para proteínas antioxidantes em células A549 expostas a MP-Recife.....	65

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Principais efeitos da poluição do ar na saúde humana a curto e longo prazo. .21	
<b>Quadro 2</b> - Estudos recentes desenvolvidos a partir do $MP_{2,5}$ de diferentes cidades. .... 32	
<b>Quadro 3</b> - Padrões nacionais de qualidade do ar ( resolução Conama nº 491/2018). .... 35	
<b>Quadro 4</b> - Sequências de primers utilizados nas reações de RT-qPCR. .... 51	
<b>Quadro 4</b> - Sequências de primers utilizados nas reações de RT-qPCR. .... 52	
<b>Quadro 5</b> - Relação de massa, volume e concentração de $MP_{2,5}$ amostrado da atmosfera de Recife. .... 54	

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AMPs** - Peptídeos Antimicrobianos

**ATI** - Células Alveolares do Tipo I

**ATII** - Células Alveolares do Tipo II

**AVC** - Acidente Vascular Cerebral

**CAT** - Catalase

**CETESB** - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

**CFCs** - Cloro Fluorocarbonos

**CH<sub>4</sub>** - Metano

**CN** - Controle Negativo

**CO** - Monóxido de carbono

**CO<sub>2</sub>** - Dióxido de Carbono

**CONAMA** - Conselho Nacional do Meio Ambiente

**CPRH** - Agência Estadual de Meio Ambiente

**CTTU** - Companhia de Trânsito e Transporte Urbano do Recife

**DATASUS** - Departamento de Informática do SUS

**DETRAN** - Departamento Estadual de Trânsito

**DIC** - Doença Cardíaca Isquêmica

**DPOC** - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

**EROs** - Espécies Reativas de Oxigênio

**FerR** - Ferredoxina redutase

**GPX1** - Glutathione peroxidase

**HAPs**- Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

**IARC** - Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

**IL** – Interleucina

**IFN $\gamma$**  - Interferon gama

**IQAR** - Índice de Qualidade do Ar

**MS** - Ministério da Saúde

**MP** - Material Particulado

**MP<sub>10</sub>** - Material Particulado de diâmetro aerodinâmico de 2,5 a 10  $\mu\text{m}$

**MP<sub>2,5</sub>** - Material Particulado de diâmetro aerodinâmico menor que 2,5  $\mu\text{m}$

**MP-Diesel** - Material particulado proveniente da queima de diesel

**MP-Recife** - Material particulado derivado da atmosfera de Recife

**NO<sub>x</sub>** - Óxidos de Nitrogênio

**N<sub>2</sub>O** - Óxido Nitroso

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**OPAS** - Organização Pan-Americana de Saúde

**PRONAR** - Programa Nacional de Controle de Qualidade do Ar

**PTS** - Partículas Totais em Suspensão

**SO<sub>x</sub>** - Óxidos de enxofre

**SO<sub>2</sub>** - Dióxido de Enxofre

**SOD** - Superóxido dismutase

**Thio** - Tioredoxina

**TNF** - Fator de Necrose Tumoral

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
2.1. Poluição atmosférica .....	14
2.2 Poluição do ar e saúde pública.....	18
2.3 Mecanismos associados ao MP <sub>2,5</sub> e respostas celulares .....	22
2.3.1 <i>Estresse oxidativo e sistema de antioxidantes</i> .....	24
2.3.2 <i>Citocinas pró-inflamatórias</i> .....	26
2.3.3 <i>MP e o Epitélio alveolar</i> .....	27
2.4 Padrões e monitoramento de qualidade do ar .....	33
2.4.1 <i>Monitoramento e qualidade do ar em Recife</i> .....	38
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	43
<b>4 HIPÓTESE</b> .....	44
<b>5 OBJETIVO GERAL</b> .....	45
5.1 Objetivos específicos.....	45
<b>6 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....	46
6.1. Coleta e processamento do material particulado .....	46
6.2. Concentração de MP <sub>2,5</sub> no ar de Recife .....	48
6.3. Cultura de células e tratamentos com material particulado .....	48
6.4 Medidas de viabilidade celular - XTT.....	48
6.5 Quantificação de morte celular - Anexina V/Iodeto de propídeo .....	49
6.6 Avaliação dos níveis de citocinas inflamatórias - CBA.....	50
6.7 Medidas de estresse oxidativo intracelular - NBT .....	50
6.8 Determinação do perfil de expressão de enzimas e proteínas antioxidantes - RT-qPCR .....	50
6.9 Análise Estatística .....	52
<b>7 RESULTADOS</b> .....	53
7.1. Concentração de MP <sub>2,5</sub> no ar de Recife .....	53
7.2 Viabilidade das células A549 expostas a MP- Diesel e MP- Recife .....	54
7.3 Quantificação de morte celular em células A549 expostas a MP- Diesel e MP- Recife .....	56
7.4 Dosagem dos níveis de citocinas inflamatórias em células A549 expostas a MP-Diesel e MP-Recife .....	58
.....	60

7.5 Medidas de estresse oxidativo intracelular em células A549 expostas a MP-Diesel e MP-Recife .....	61
7.6 Perfil de expressão dos genes que codificam para proteínas antioxidantes em células A549 expostas a MP-Diesel e MP-Recife .....	63
<b>8 DISCUSSÃO</b> .....	66
<b>9 CONCLUSÃO</b> .....	76
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	77

## 1 INTRODUÇÃO

A qualidade do ar atmosférico é essencial a todas as formas de vida na Terra, podendo influenciar direta ou indiretamente na saúde, desenvolvimento e economia de uma população. Todavia, a elevação dos níveis da poluição atmosférica decorrente do rápido crescimento industrial, aumento da frota de veículos e consequente queima de combustíveis fósseis nos grandes centros urbanos, tem comprometido cada vez mais a qualidade de vida dos seres vivos, se tornando um grave problema de saúde pública (BAI *et al.*, 2018; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2018).

Dados recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam, por ano, mais de três milhões de mortes em todo o mundo relacionadas à exposição dos indivíduos à poluição do ar em ambientes externos (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2018). Essa poluição crescente induz inúmeros efeitos negativos à saúde humana, que vão desde um aumento considerável nos casos de infecções respiratórias, até o agravamento ou desencadeamento de doenças graves como inflamação pulmonar, câncer de pulmão e doenças cardiovasculares, atuando tanto como fator desencadeante, quanto como cofator (ANDERSON; THUNDIYIL; STOLBACH, 2012; COHEN *et al.*, 2017; FAJERSZTAJN *et al.*, 2013; GUARNIERI; BALMES, 2014; SHAH *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2013).

Apesar dos avanços ocorridos nas últimas décadas, com redução dos níveis de emissões de veículos novos, o grande aumento da frota veicular em cidades como São Paulo, Rio de Janeiro e Recife nos últimos anos é responsável pela crescente elevação dos níveis de poluentes atmosféricos. Recife possui uma população de mais de 1,6 milhões de habitantes e uma frota de aproximadamente 700 mil veículos (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2019; DEPARTAMENTO ESTADUAL DE TRÂNSITO, 2019). Segundo dados do DETRAN/PE, na última década, a frota de veículos da capital mais que duplicou, fato que deve ter contribuído para a elevação dos níveis de poluentes atmosféricos em Recife e região metropolitana (NASCIMENTO; CARVALHO; OLIVEIRA, 2019; NASCIMENTO *et al.*, 2019).

Aliado a isto, tem-se a redução na velocidade média dos veículos. Carros circulando em velocidade muito lenta, com acelerações e paradas constantes, como ocorre nos engarrafamentos, estão relacionados tanto à elevação do consumo de combustíveis, quanto ao aumento da emissão de poluentes. Além de contribuir para a ascensão do caos no trânsito da cidade, deixando a vida da população ainda mais estressante. Dados da Companhia de Trânsito e Transporte Urbano do Recife (CTTU) indicam que, nos horários de pico, a velocidade média

no trânsito de Recife é de 11 km/h (CARVALHO, 2016a). Vale ressaltar que Recife, assim como outras grandes metrópoles brasileiras, ainda não possui um sistema fixo de monitoramento de poluentes atmosféricos que contemple material particulado.

Paralelo ao crescimento da frota veicular de Recife, estudos prévios do nosso grupo de pesquisas indicaram um aumento no número de internações hospitalares e mortes por doenças associadas à poluição atmosférica na cidade nos últimos 18 anos. Ressalta-se que os dados de crescimento mais contundentes são as internações e mortes devidas a câncer de pulmão (NASCIMENTO; CARVALHO; OLIVEIRA, 2019; NASCIMENTO *et al.*, 2019).

Um dos principais poluentes atmosféricos é o material particulado (MP), composto por várias substâncias tóxicas, incluindo metais, carbono orgânico e sais minerais, além de alérgenos ou endotoxinas (LIU, J. *et al.*, 2019), que está presente na maioria das cidades do mundo, inclusive as com baixo índice de desenvolvimento (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019). Entre os principais mecanismos envolvidos na toxicidade associada ao MP estão a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a produção de citocinas pró-inflamatórias (GHIO; CARRAWAY; MADDEN, 2012; GONZALEZ-FLECHA, 2004). Dados na literatura revelam que a elevada concentração de MP está associada ao aumento da morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares e respiratórias, podendo incluir ainda o sistema nervoso central e o sistema imunológico (BAI *et al.*, 2018; BAI *et al.*, 2019; BANG *et al.*, 2018; MIRANDA *et al.*, 2012). Dessa forma, o controle da poluição e a melhoria da qualidade do ar tem sido uma preocupação constante dos cientistas em todo o mundo, uma vez que os poluentes atmosféricos podem causar danos em escala global à saúde pública e ao meio ambiente (BRASIL, 2018; GHORANI-AZAM; RIAHI-ZANJANI; BALALI-MOOD, 2016; HETTFLEISCH *et al.*, 2017; PATELLA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2016; SLOVIC *et al.*, 2015).

Assim sendo, o presente trabalho aprofundou os estudos com MP, focando no papel de espécies reativas do oxigênio na indução de apoptose em células alveolares do tipo II humanas da linhagem A549, tratadas por MP de diferentes fontes: proveniente apenas da queima de diesel e coletado da atmosfera da cidade de Recife, bem como a participação de citocinas inflamatórias na resposta celular a esse MP. Os resultados obtidos neste estudo poderão nortear tratamentos futuros para distúrbios cardiorespiratórios causados ou agravados por poluição atmosférica, além de sensibilizar as autoridades no desenvolvimento de políticas públicas que visem a redução da poluição do ar em Recife e região metropolitana.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

A associação entre poluição do ar e saúde vem sendo descrita mundialmente como um importante problema econômico e social. Alguns poluentes atmosféricos são indicados como agente causador e agravador de doenças agudas e crônicas, gerando diversos impactos negativos à população, não apenas relacionados à saúde. Dessa forma, esse tem sido um tópico importante na comunidade científica e política, devido ao seu impacto na saúde humana e ecológica. Trata-se de um tema que merece grande atenção, especialmente nos grandes centros urbanos, como Recife.

### 2.1. Poluição atmosférica

É considerado um poluente atmosférico qualquer material presente no ar com capacidade de afetar a saúde humana ou impactar negativamente o meio ambiente (GHORANI-AZAM; RIAHI-ZANJANI; BALALI-MOOD, 2018). Os poluentes na atmosfera são inúmeros, mas a OMS destaca seis como os principais poluentes atmosféricos prejudiciais à saúde humana e ao ecossistema, estes são: material particulado (MP<sub>2.5</sub> e MP<sub>10</sub>), ozônio (O<sub>3</sub>), monóxido de carbono (CO), óxidos de enxofre (SO<sub>x</sub>), óxidos de nitrogênio (NO<sub>x</sub>) e chumbo (Pb) (BAI *et al.*, 2018; MIRANDA *et al.*, 2012). Todos eles, mesmo em baixas concentrações, estão associados a efeitos adversos à saúde (NASCIMENTO *et al.*, 2017).

Há inúmeras fontes de poluição atmosférica e os efeitos causados por esses poluentes podem ser de curto, médio ou longo prazo, levando ao aparecimento de distúrbios respiratórios ou provocando a exacerbação de outras condições patológicas pré-existentes. A poluição do ar está ligada a milhões de mortes em todo o mundo, afetando especialmente habitantes industriais e urbanos, mas atingindo também habitantes rurais (GHORANI-AZAM; RIAHI-ZANJANI; BALALI-MOOD, 2016; MATSUDA *et al.*, 2015; OLMO *et al.*, 2011; SÉNÉCHAL *et al.*, 2015).

Esses poluentes são provenientes, em grande parte, da queima de combustíveis fósseis ou de reações fotoquímicas e de oxidação que ocorrem na atmosfera após a saída dos gases de exaustão (KATSOUYANNI, 2013; MATSUDA *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2018). As fontes de poluentes podem ser divididas em duas categorias: fontes naturais, definidas como fenômenos naturais que têm efeitos nocivos ou liberam substâncias nocivas no meio ambiente, tais como erupções vulcânicas, radiação e incêndios florestais; e fontes antropogênicas, que são as fontes poluentes de responsabilidade do homem, como a queima de

combustíveis fósseis, descargas de processos industriais de produção, agricultura e emissões de transporte (BAI *et al.*, 2018).

As atividades industriais, o crescente número de veículos automotores em circulação e as queimadas são, dentre as atividades antrópicas, as maiores produtoras de substâncias poluentes (BRASIL, 2018). A expansão das indústrias siderúrgicas, a queima de combustíveis fósseis e a combustão são consideradas novas fontes de poluentes, que ganharam força com a revolução industrial e tem refletido, até hoje, em altos níveis de poluição, impactando direta e indiretamente a vida humana (DAPPER; SPOHR; ZANINI, 2016; GHORANI-AZAM; RIAHI-ZANJANI; BALALI-MOOD, 2016). Com a globalização, a poluição atmosférica deixou de ser uma característica associada exclusivamente às grandes metrópoles ou polos industriais, seus impactos também podem ser identificados em situações de queima de biomassa, atividades de mineração e uso de técnicas de pulverização de agrotóxicos, dentre outras (BRASIL, 2019b).

Nos centros urbanos, os veículos constituem uma fonte significativa de emissões de gases do efeito estufa. Essas emissões são fontes de poluentes como o MP, óxido de nitrogênio, dióxido de enxofre e ozônio, que contribuem para o aquecimento global e mudanças climáticas extremas, que afetam tanto a saúde humana como o meio ambiente, podendo causar sérios danos às águas, ao solo e ao ar. Os contaminantes ambientais são prejudiciais à diversidade da vida, estando relacionados, inclusive, à extinção de algumas espécies de plantas e animais (GHORANI-AZAM; RIAHI-ZANJANI; BALALI-MOOD, 2016; HETTFLEISCH *et al.*, 2017; PATELLA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2016; SLOVIC *et al.*, 2015). Assim sendo, a melhoria da qualidade do ar dos centros urbanos traria uma grande redução de gastos ao estado, além de preservar a qualidade do solo e das águas, bem como melhorar a visibilidade e expectativa de vida da população (BRASIL, 2018).

De forma geral, os gases de efeito estufa, tais como dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), gases fluorados como o ozônio (O<sub>3</sub>) e cloro fluorocarbonos (CFCs) (SLOVIC *et al.*, 2015), são capazes de reagir com o ozônio estratosférico, resultando na depleção da camada de ozônio, cuja principal função é proteger os seres humanos, animais e plantas contra a radiação ultravioleta rasa, bem como absorver os raios ultravioletas do Sol e os converter em energia térmica, nos protegendo contra o efeito de aquecimento (BAI *et al.*, 2018).

Os estudos relacionados ao desenvolvimento futuro dos níveis de poluição atmosférica devido às mudanças climáticas e de emissões concentraram-se principalmente no O<sub>3</sub>, um gás formado na atmosfera através de várias reações químicas relacionadas a emissões antropogênicas e precursoras naturais que, devido a seu longo tempo de vida, pode ser

transportado por grandes distâncias na atmosfera; e no MP, composto por componentes primários emitidos diretamente das fontes geradoras e pelos aerossóis orgânicos e inorgânicos formados na atmosfera, com tempo de vida útil que vai de horas a semanas (GEELS *et al.*, 2015). Trata-se de um material de composição altamente heterogênea, que apresenta discrepância regional, além de variação sazonal (CHEN; LI; SANG, 2016).

Neste trabalho daremos destaque ao MP, que é considerado o principal responsável pelos agravos à saúde relacionados ao sistema cardiorespiratório (NASCIMENTO *et al.*, 2017). O MP pode ser derivado de várias fontes, como exaustão de motores de combustão interna, processos industriais, operações de usinas termoeletricas, poeira de asfalto, incêndios florestais e poeira do solo (KATSOUYANNI, 2013; MATSUDA *et al.*, 2015; NGOC *et al.*, 2018), consistindo, basicamente, em uma mistura de partículas carbonadas com substâncias químicas orgânicas adsorvidas e metais reativos que, suspensas na atmosfera, provocam diferentes graus de danos à saúde da população (BAI *et al.*, 2018; GHORANI-AZAM; RIAHI-ZANJANI; BALALI-MOOD, 2018; HAMANAKA; MUTLU, 2018; KATSOUYANNI, 2003; OLMO *et al.*, 2011).

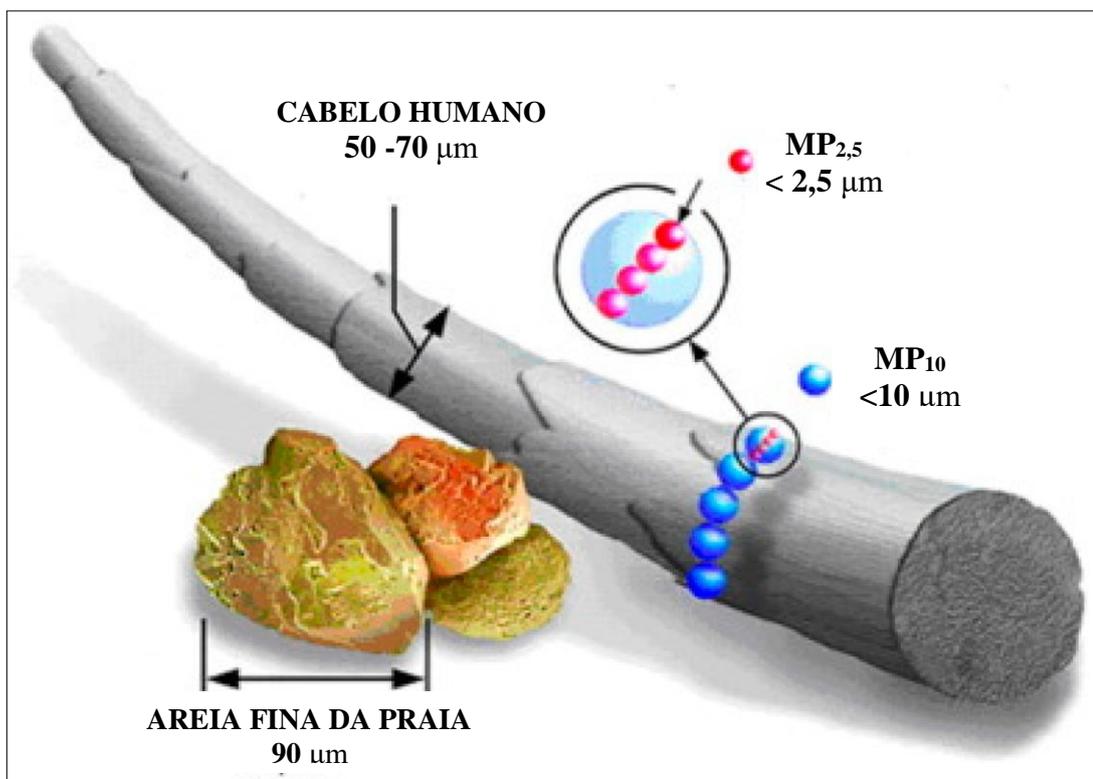
Entre os componentes comuns do MP, podemos encontrar nitratos, sulfatos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), endotoxinas e metais como ferro, cobre, níquel, zinco e vanádio (WANG *et al.*, 2018). Dependendo do nível de exposição, concentração no ar inalado, granulometria, composição química, fonte (natural ou antropogênica) e intensidade de emissão, o MP pode causar doenças leves a graves e levar à redução acentuada na expectativa de vida. Seus riscos à saúde são determinados pelo tamanho das partículas, pela área superficial e pela composição destas (KWON *et al.*, 2018; PARK *et al.*, 2018).

A classificação mais utilizada para o MP é baseada no tamanho das partículas e suas propriedades aerodinâmicas, que são os determinantes do transporte de partículas, penetração e deposição na via aérea respiratória. Dessa forma, o MP pode ser classificado como grosso, quando possui de 2,5 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro aerodinâmico ( $\text{MP}_{10}$ ); fino, possuindo menos de 2,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro ( $\text{MP}_{2,5}$ ) e ultrafino, quando tem menos de 0,1  $\mu\text{m}$  de diâmetro ( $\text{MP}_{0,1}$ ) (BAI *et al.*, 2018; GHORANI-AZAM; RIAHI-ZANJANI; BALALI-MOOD, 2018; HAMANAKA; MUTLU, 2018; OLMO *et al.*, 2011). A figura 1 compara os tamanhos de  $\text{MP}_{10}$  e  $\text{MP}_{2,5}$  aos diâmetros da areia fina da praia ( $\sim 90 \mu\text{m}$ ) e do cabelo humano ( $\sim 70 \mu\text{m}$ ), respectivamente.

As partículas finas e ultrafinas são normalmente geradas de fontes de combustão, como a queima de combustíveis fósseis em veículos automotores, indústrias, incêndios, queima da biomassa ou por reações atmosféricas de gases, sendo formadas por um núcleo de carbono com diferentes materiais adsorvidos à sua superfície (OLMO *et al.*, 2011; ORGANIZAÇÃO

MUNDIAL DA SAÚDE, 2006; XIA, 2016). Enquanto a fração grossa (MP<sub>10</sub>) origina-se principalmente por processos mecânicos, como operações de construção, ressuspensão de poeira nas estradas pelo vento, processos industriais e agricultura (NGOC *et al.*, 2018; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2006). Na maioria dos ambientes urbanos, existe MP<sub>10</sub> e MP<sub>2,5</sub>, mas a proporção dessas partículas varia substancialmente entre cidades ao redor do mundo, dependendo da geografia local, meteorologia e fontes específicas de MP (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2006).

**Figura 1** - Comparação de tamanho entre o material particulado fino (MP<sub>2,5</sub>) e grosso (MP<sub>10</sub>).



Fonte: Ngco *et al.* (2018, tradução nossa).

As partículas grossas geralmente não penetram além do brônquio superior. Já o material particulado fino (MP<sub>2,5</sub>) representa uma ameaça mais nociva, pois consegue penetrar nas pequenas vias aéreas e alvéolos, não apenas agravando doenças cardíacas e pulmonares, mas também influenciando negativamente outras comorbidades, tais como diabetes, câncer, morte súbita, nascimento prematuro, baixo peso ao nascer e alterações cognitivas, por mecanismos que ainda não são bem compreendidos (GHORANI-AZAM, 2018; HAMANAKA; MUTLU, 2018; OLMO *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2018).

Os efeitos mecânicos da poluição atmosférica à saúde humana estão sendo vastamente estudados por pesquisadores de todo o mundo. A ampla gama de pesquisas que investigaram

os mecanismos associados aos efeitos nocivos do MP nas células e tecidos permitiu que muitos avanços fossem alcançados e que muitos pontos-chaves fossem elucidados (CARVALHO *et al.*, 2004, 2008; CARVALHO, 2016a, 2016b, 2017, 2019). Porém, considerando os inúmeros prejuízos que a poluição do ar pode provocar, envolvendo não apenas o quesito de saúde humana, mas também ambiental e social, além da perspectiva econômica e política, muito ainda precisa ser esclarecido. Dessa forma, muito ainda precisa ser investigado e debatido.

## **2.2 Poluição do ar e saúde pública**

A poluição atmosférica é globalmente reconhecida como um grave problema de saúde pública, podendo ser definida como qualquer forma de matéria capaz de tornar o ar impróprio ou prejudicial à saúde, interferindo no bem-estar público, causando danos à fauna e à flora ou prejudicando à qualidade de vida da população. Uma mistura de gases e partículas que, em quantidades nocivas, são liberadas na atmosfera devido a atividades naturais ou humanas, apresentando um sério impacto toxicológico na saúde humana e no meio ambiente (BAI *et al.*, 2018; BRASIL, 2018; GHORANI-AZAM; RIAHI-ZANJANI; BALALI-MOOD, 2016; KELLY; FUSSELL, 2015; TORRES *et al.*, 2017).

Dados da OMS mostram que nove em cada dez pessoas respiram um ar com altos níveis de poluentes. Estimativas atualizadas revelam um número alarmante: sete milhões de pessoas morrem todos os anos em decorrência da poluição em ambientes externos e internos, e cerca de 90% dessas mortes ocorrem em países de baixa e média renda, devido aos altos volumes de emissões da indústria, dos transportes e da agricultura, além do cozimento por meio de combustíveis ou tecnologias poluentes em ambientes interiores. Por esse motivo, em 2019, a poluição do ar foi considerada, pela OMS, o maior risco ambiental para a saúde (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019).

Os prejuízos gerados pela poluição do ar não estão relacionados apenas à saúde e qualidade de vida das pessoas, ela também gera impactos negativos no que se refere à perspectiva econômica e social, tais como queda da produtividade agrícola e aumento de custos dos sistemas de saúde, uma vez que levam ao aumento do número de atendimentos e internações hospitalares, além do uso de medicamentos e maior vulnerabilidade das populações carentes (BRASIL, 2018; INSTITUTO DE ENERGIA E MEIO AMBIENTE, 2018; SLOVIC *et al.*, 2015). Segundo a OMS, nos 15 países que mais emitem gases de efeito estufa, os impactos da poluição do ar na saúde chegam a custar mais de 4% do seu Produto Interno Bruto (PIB) (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019). A China ocupa o primeiro lugar

nesse *ranking*, seguido por Estados Unidos, União Europeia, Índia, Rússia, Indonésia e Brasil, ocupando a sétima posição. Esta lista conta ainda com Japão, Canadá, México, Irã, Austrália, Coreia do Sul, Arábia Saudita e Nigéria (INSTITUTO MUNDIAL DE RECURSOS, 2019). Estima-se que até 2060, a poluição do ar pode vir a custar, mundialmente, cerca de US\$ 2,6 trilhões por ano, incluindo o período da doença, contas médicas e redução da produção agrícola (BAI *et al.*, 2018).

A poluição atmosférica também contribui para o aumento do aquecimento global que, como já se sabe, pode elevar o número de catástrofes naturais, com chuvas mais fortes e prolongadas, o que aumenta o risco de contaminação por doenças de transmissão hídrica e alimentar. É possível, inclusive, que o aquecimento global favoreça a elevação no número de casos de doenças transmitidas por vetores, pois amplia a faixa de temperatura ideal para os mosquitos vetores, mantendo seu nicho ecológico e suas condições de sobrevivência (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROFISSIONAIS DE EPIDEMIOLOGIA DE CAMPO, 2018). Se medidas firmes e eficazes não forem tomadas, estima-se que entre 2030 e 2050, as mudanças climáticas venham a causar cerca de 250 mil mortes adicionais por ano, devido à desnutrição, malária, diarreia e estresse por calor (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019).

Frequentemente, os efeitos da má qualidade do ar não são tão visíveis quando comparados a outros fatores com maior facilidade de identificação. Contudo, os estudos epidemiológicos têm demonstrado fortes correlações entre a exposição aos poluentes atmosféricos e os efeitos de morbidade e mortalidade por problemas respiratórios e cardiovasculares, mesmo quando as concentrações dos poluentes não ultrapassam os padrões de qualidade do ar vigentes. As populações mais vulneráveis são as crianças, os idosos e as pessoas que apresentam doenças respiratórias pré-existentes, como asma, bronquite crônica e doença pulmonar obstrutiva crônica (BRASIL, 2018; DAPPER; SPOHR; ZANINI, 2016; ESTRELLA *et al.*, 2019; HAMANAKA; MUTLU, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2016; SLOVIC *et al.*, 2015).

Estudos clínicos demonstraram haver um aumento nas taxas de sintomas oculares, como irritação, vermelhidão, lacrimejamento e anormalidades da superfície ocular e lacrimal em indivíduos saudáveis expostos à poluição atmosférica aguda e crônica dos centros urbanos (MATSUDA *et al.*, 2015). A poluição do ar também já foi associada à saúde mental, uma vez que induz estresse oxidativo, implicado como um dos mecanismos moleculares na patogênese da depressão, sendo relacionada ao aumento do risco de suicídio e a sintomas depressivos, além de estar ligada a níveis mais altos de estresse (HETTFLEISCH *et al.*, 2017; LIN *et al.*, 2017);

e a doenças neurodegenerativas, ao passo que algumas pesquisas a correlacionam com o declínio da função cognitiva em idosos (POWER *et al.*, 2011; WEUVE *et al.*, 2012), sendo ainda sugerida como um fator de risco para doença de Parkinson (RITZ *et al.*, 2016)..

Pesquisas que avaliaram a exposição materna a poluentes atmosféricos durante a gestação, revelam diversos impactos negativos desde a gestação até o nascimento do bebê, a exemplo de pré-eclâmpsia e restrição do crescimento fetal, como consequência dos efeitos da poluição do ar sobre a função e o crescimento da placenta (HETTFLAISCH *et al.*, 2017), incluindo ainda baixo peso ao nascer e efeitos no neurodesenvolvimento e função cognitiva (KELLY; FUSSELL, 2016). Há relatos de que a poluição do ar pode influenciar, ainda, na patogênese da infertilidade feminina (CONFORTI *et al.*, 2018). Pesquisas semelhantes indicam que a poluição atmosférica promove estresse oxidativo e exerce efeito genotóxico, além de atuar como um importante desregulador endócrino, sendo um fator de risco para doenças metabólicas, como obesidade e diabetes mellitus (CONFORTI *et al.*, 2018; HAMANAKA; MUTLU, 2018; KELLY; FUSSELL, 2016).

As alterações genéticas e epigenéticas induzidas por poluentes atmosféricos afetam os genes responsáveis pelo controle do ciclo celular, apoptose e diferenciação celular, aumentando as chances de desenvolvimento do câncer (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Um estudo de coorte que examinou a relação entre os principais poluentes atmosféricos e toda a mortalidade por câncer, pesquisando referências desde outubro de 1958 a abril de 2018, indica que a exposição à poluentes atmosféricos está associada ao aumento da mortalidade por diversos tipos de câncer, incluindo câncer de pulmão, fígado, bexiga, câncer colorretal, renal, de pâncreas e de laringe (KIM *et al.*, 2018).

Em resumo, os efeitos adversos da poluição atmosférica podem se dar de acordo com a forma de exposição (aguda ou crônica), sendo responsável por um grande número de mortes e internações hospitalares, em decorrência, principalmente, de doenças respiratórias e cardiovasculares, mas podendo estar associada a inúmeras outras comorbidades e consequências geradas a curto e longo prazo (BRASIL, 2019a), como pode ser observado no quadro 1.

É importante ressaltar que a exposição à poluição atmosférica ocupa o nono lugar entre os fatores de risco de doenças modificáveis, estando acima de outros fatores comuns, como sedentarismo, colesterol alto e uso de drogas, e pode se tornar a principal causa ambiental de morte prematura, ultrapassando inclusive o saneamento deficiente e a falta de água potável (KELLY; FUSSELL, 2015). A OMS reconhece que a poluição do ar é um fator de risco crítico para doenças crônicas não transmissíveis, causando cerca de 24% das mortes por doenças

cardíacas, 25% por acidente vascular cerebral (AVC), 43% por doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e 29% por câncer de pulmão (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019). Milhões de pessoas morrem devido a fontes poluentes, tanto urbanas quanto rurais, sendo os níveis mais altos de mortalidade atribuídos a eventos cardiovasculares agudos isquêmicos e/ou trombóticos (HAMANAKA; MUTLU, 2018; KELLY; FUSSELL, 2015).

**Quadro 1** - Principais efeitos da poluição do ar na saúde humana a curto e longo prazo.

Problemas de curto prazo (nos dias de alta concentração de poluentes)	Problemas de médio e longo prazo (15 a 30 anos vivendo em locais com muita poluição)
Irritação nas mucosas do nariz e dos olhos;	Desenvolvimento de problemas pulmonares e cardiovasculares;
Irritação na garganta (com presença de ardor e desconforto);	Desenvolvimento de cardiopatias
Problemas respiratórios	Diminuição da qualidade e expectativa de vida (em até dois anos)
Agravamento de enfisema pulmonar e bronquite;	Malformações congênitas
Irritações na pele	Aumento das chances de desenvolver câncer, principalmente de pulmão
Elevação do estresse	Distúrbios de fertilidade

**Fonte:** Adaptado de Brasil (2019b).

De forma geral, os resultados obtidos nos estudos citados anteriormente, que associam poluição atmosférica e saúde pública, corroboram a hipótese de que o ar contaminado é um dos maiores fatores de risco para a saúde ambiental no mundo. Alerta-se para a necessidade de formulações de novas políticas públicas a nível global, bem como a adoção de padrões mais rigorosos para redução de emissões veiculares, a fim de melhorar a qualidade do ar em ambientes de tráfego e, globalmente, desacelerar os efeitos das mudanças climáticas, influenciando na qualidade do ar e atenuando os resultados adversos à saúde. Sabe-se que a

redução da poluição do ar pode vir a salvar milhões de vidas em todo o mundo (BRASIL, 2018; MARTINS; FERREIRA, 2011).

### **2.3 Mecanismos associados ao MP<sub>2,5</sub> e respostas celulares**

O MP<sub>2,5</sub> foi reconhecido como o principal fator de risco associado à poluição do ar (CARVALHO, 2019). Os efeitos lesivos relacionados a esse MP ocorrem em curto prazo, pela ação direta nas vias respiratórias, e a longo prazo, pois, uma vez inalado, pode alcançar os alvéolos, chegar à circulação sanguínea e atingir outros órgãos, além dos pulmões. Dessa forma, o MP<sub>2,5</sub> apresenta potencial risco à saúde, mesmo quando em concentrações relativamente baixas na atmosfera (NASCIMENTO *et al.*, 2017; OLMO *et al.*, 2011). Assim, a OMS recomenda o uso do MP<sub>2,5</sub> como um indicador de risco para a saúde humana, em vez de MP<sub>10</sub> (OLMO *et al.*, 2011).

Em todo o mundo, o MP<sub>2,5</sub> tem sido considerado como o principal gatilho ambiental no desenvolvimento de doenças respiratórias e cardiovasculares. A Sociedade Americana do Câncer revelou que a mortalidade cardiopulmonar aumenta em 6% a cada 10 µg/m<sup>3</sup> de MP<sub>2,5</sub> concentrados no ar (ABRAHAMOWICZ *et al.*, 2003). Aliado a isso, a exposição prolongada a MP<sub>2,5</sub> tem sido associada ao aumento da mortalidade prematura por DPOC, AVC, doença cardíaca isquêmica, câncer de pulmão e infecção respiratória aguda. A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), agência especializada em câncer da OMS, classificou a poluição do ar e o MP<sub>2,5</sub> como carcinogênicos para os seres humanos (CAMPAGNOLO *et al.*, 2019; GHORANI-AZAM; RIAHI-ZANJANI; BALALI-MOOD, 2018; KELLY; FUSSELL, 2015; MENDES *et al.*, 2017; NIE *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2017).

Um estudo avaliou os efeitos do MP<sub>2,5</sub> sobre alterações genotóxicas, de metilação e hidroximetilação do DNA, bem como as atividades de enzimas antioxidantes em tecidos de camundongos. Os resultados demonstraram que camundongos expostos diariamente ao MP<sub>2,5</sub>, em uma concentração que mimetiza a exposição de 24 horas em concentração média encontrada no ambiente, apresentaram, após três meses, níveis aumentados de lesões no DNA, relacionadas à ocorrência de estresse oxidativo nos pulmões, fígado e rim, em paralelo à diminuição dos níveis globais da marca epigenética 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) no DNA do pulmão e fígado quando comparados com camundongos controle (OLIVEIRA *et al.*, 2018). A atividade mutagênica e genotóxica do MP foi associada a HAPs encontrados em estações de tráfego intenso, mediada por alguns metais como ferro e cobre (RODRÍGUEZ-COTTO, 2014).

O MP<sub>2,5</sub> exerce numerosos efeitos nas células e tecidos, podendo estar relacionado também a irritações de pele, contribuindo para a inflamação e o envelhecimento por meio da síntese prejudicada do colágeno (KWON *et al.*, 2018; PARK *et al.*, 2018). Além de estimular a elevação da inflamação sistêmica e do estresse oxidativo, o MP<sub>2,5</sub> é capaz de oxidar os lipídios sanguíneos, o que pode levar à progressão da aterosclerose e desfechos cardiovasculares adversos, além de outros efeitos sistêmicos (MCGUINN *et al.*, 2019). Alguns estudos epidemiológicos confirmaram que a exposição à MP<sub>2,5</sub> aumenta também a incidência e mortalidade do câncer de fígado (PAN *et al.*, 2016; PEDERSEN *et al.*, 2017). Li *et al.* (2018), em estudo desenvolvido *in vivo*, utilizando ratos expostos a altas concentrações de MP<sub>2,5</sub>, revelou que a exposição prolongada a esse material provocou alterações histopatológicas e declínio da função do fígado, além de desencadear fibrose hepática, aumentar a inflamação e induzir estresse oxidativo e apoptose celular.

Evidências demonstram ainda que o MP<sub>2,5</sub> pode estimular o fator ativador plaquetário, induzindo a senescência celular, que, por sua vez, reduz a expressão de proteínas e peptídeos antimicrobianos das vias aéreas (AMPs), permitindo que patógenos como *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium tuberculosis*, tenham mais facilidade em aderir às células epiteliais das vias aéreas e, conseqüentemente, aumentar a infecção nessas áreas (ESTRELLA *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019). O MP<sub>2,5</sub>, quando nas vias aéreas, pode aumentar tanto a ligação de *P. aeruginosa* às células epiteliais, como a formação de biofilme (WOO *et al.*, 2018). Xian *et al.* (2020) demonstrou que a exposição ao MP<sub>2,5</sub> pode levar à perda da função da barreira epitelial nasal e aumentar a exposição de tecidos mais profundos a patógenos estranhos, irritantes, poluentes e alérgenos, além de elevar a produção de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo alta suscetibilidade à rinite e rinosinusite em pessoas que vivem em áreas com altas concentrações de MP<sub>2,5</sub>.

A toxicidade causada por MP<sub>2,5</sub> também foi destacada como um potencial fator de risco para doenças neurodegenerativas, pelo fato de induzir citotoxicidade, peroxidação lipídica, ativação microglial e inflamação nas células microgliais a partir de estudos *in vivo* e *in vitro* (BAI *et al.*, 2019). Além de alterar a expressão de proteínas apoptóticas, causando apoptose neuronal, e diminuir os níveis de densidade pós-sináptica de proteínas sinápticas estruturais e funcionais (CHEN; LI; SANG, 2016).

Possíveis mecanismos têm sido sugeridos para explicar a lesão tecidual provocada pelo MP<sub>2,5</sub>, que leva à inflamação e estresse oxidativo pulmonar e sistêmicos, tal como aumento do influxo de cálcio em resposta ao contato com macrófagos, elevação da expressão de mediadores pró-inflamatórios, aumento da viscosidade sanguínea e dos níveis de fibrinogênio e proteína C

reativa (fatores que favorecem a coagulação) (OLMO, 2011). No entanto, os mecanismos exatos ainda não foram totalmente elucidados.

### 2.3.1 Estresse oxidativo e sistema de antioxidantes

Um dos principais mecanismos envolvidos na toxicidade associada ao MP é a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, por serem altamente reativas, provocam danos ao DNA, proteínas e membranas celulares, podendo culminar na morte da célula (GHIO; CARRAWAY; MADDEN, 2012; LIN *et al.*, 2017). O termo “Espécies Reativas de Oxigênio” refere-se a uma gama de metabólitos derivados do oxigênio molecular ( $O_2$ ). As EROs são produzidas no metabolismo celular normal, tendo papel importante em várias funções vitais, como na resposta imunológica e mecanismos de sinalização celular. Entretanto, quando são produzidas em excesso, podem provocar danos teciduais, sendo relacionadas com a patogênese de uma ampla gama de doenças (ALMEIDA, 2016).

Dentre as principais EROs estão o radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical superóxido ( $O_2^\bullet$ ) e o oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) (ZAFRA; CASTRO; ALCHÉ, 2018). Sua geração ocorre por diferentes mecanismos: compostos como HAPs, nitrosaminas e quinonas adsorvidos no MP fino e ultrafino, podem gerar EROs após inalados. Além disso, a fagocitose destas partículas ativa as células do sistema imune, que então produzem  $O_2^\bullet$  pela ação de uma NADPH oxidase ligada à membrana. Este superóxido dismuta  $H_2O_2$  por ação da superóxido dismutase. A reação do  $H_2O_2$  com ferro presente no MP leva à formação do  $OH^\bullet$ , uma espécie bem mais reativa e tóxica do que as anteriores (GHIO; CARRAWAY; MADDEN, 2012; GONZALEZ-FLECHA, 2004; LIN *et al.*, 2017).

As células possuem um sistema de enzimas e outros compostos antioxidantes que desempenham um importante papel na manutenção e controle dos níveis de EROs e no reparo de danos às biomoléculas. Dentre os componentes antioxidantes não enzimáticos cita-se, entre outros, a glutatona, o ácido ascórbico e a vitamina E (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Já no sistema enzimático de antioxidantes, temos enzimas que reparam danos à fita de DNA e às proteínas, destacando-se a superóxido dismutase (SOD), que tem papel fundamental na defesa do organismo contra as EROs, pois atua na remoção do ânion superóxido (BASKOYLU *et al.*, 2018), que pode atuar como precursor de outras EROs altamente tóxicas, incluindo hidroperóxil, hidroxil e peroxinitrito, radicais suficientemente reativos para iniciar a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas (SAKAMOTO; IMAI, 2017); a catalase (CAT),

que evita o acúmulo de metahemoglobina e dissocia o  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular; e a glutathiona peroxidase (GPX1), que catalisa a redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos, entre eles o  $H_2O_2$ , usando-o como substrato para oxidação da glutathiona reduzida (GSH), formando glutathiona oxidada (GSSG) e água (CAETANO, 2016; GAETANI *et al.*, 1989; GLORIEUX *et al.*, 2015).

Outras enzimas importantes são a Tioeredoxina (Thio), um transportador de elétrons necessário para os ciclos catalíticos de enzimas biosintéticas, que atua na proteção das proteínas citosólicas; e a ferredoxina redutase (FerR), que intermedia a transferência de elétrons num grande número de reações metabólicas. Todas essas substâncias, enzimáticas ou não, atuam no controle do estresse oxidativo e na resposta a injúrias ao DNA, levando a proteção das células contra danos produzidos pelos radicais livres (CAPACHO, 2012; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Esses antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos e aminoácidos das proteínas e ao DNA, evitando a formação de lesões e a perda da integridade celular. Entretanto, quando as células são expostas a concentrações excessivas de EROs, há um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes, o que culminará em estresse oxidativo. Quando o estresse oxidativo é estabelecido em altos níveis, o que se observa são danos celulares irreversíveis, que desencadeiam processos de morte celular, que irá se manifestar na forma de necrose ou apoptose (MATÉS, 2012). O estresse oxidativo também é um potente indutor da proteína p53, conhecida como “guardiã do genoma”, pois controla a expressão de genes que afetam diversos processos celulares importantes, incluindo proliferação, reparo do DNA e morte celular. Em resposta a altos níveis de estresse ou dano no DNA, a p53 induz a apoptose e senescência através da superregulação de genes apoptóticos, mantendo a estabilidade genômica (RIBEIRO, 2018).

O processo de apoptose pode ser desencadeado por uma série de estímulos extracelulares, que são agrupados basicamente em duas classes: polipeptídeos homólogos aos receptores de fator de necrose tumoral (TNF) ou Fas, que estão diretamente acoplados à maquinaria de morte celular. Membros desta classe interagem diretamente com proteases denominadas caspases e com o receptor, induzindo sua oligomerização, o que dá início à cascata proteolítica das caspases. A outra classe de estímulos que induzem apoptose pertencem aqueles que ativam as caspases indiretamente, como tratamentos que induzem danos ao DNA (radiação, agentes quimioterápicos, espécies reativas de oxigênio), diversos fármacos (estaurosporina, ionóforos de  $Ca^{2+}$ , taspigargina) e “ausência de fatores de sobrevivência” como retirada de

fatores de crescimento do meio (DANIAL; KORSMEYER, 2004; MEIER, VOUSDEN, 2007). A atividade proteolítica culmina na degradação de uma série de substratos celulares, como os relacionados ao citoesqueleto (actina, fodrina), e na ativação de endonucleases que clivam o DNA, gerando fragmentos internucleossômicos com tamanhos múltiplos de 180-200 kDa. (DANIAL, KORSMEYER, 2004).

### 2.3.2 Citocinas pró-inflamatórias

As citocinas são polipeptídeos produzidos e secretados por variados tipos celulares, que possuem funções autócrinas, parácrinas ou endócrinas que possibilitam a regulação da imunidade e da inflamação. Ligadas a receptores específicos da membrana, elas conseguem sinalizar para células através de mensageiros secundários, podendo aumentar ou diminuir a expressão de proteínas da membrana, bem como a proliferação e secreção celular. Existem duas categorias de citocinas: pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. As principais citocinas pró-inflamatórias são TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e interferon gama (IFN $\gamma$ ), que ativam o sistema imunológico e participam da resposta inflamatória aguda. Dentre as principais anti-inflamatórias estão IL-10, TGF- $\beta$  e IL-1ra, um antagonista natural do receptor de IL-1 (CHALMERS *et al.*, 2019; MOLDOVEANU *et al.*, 2009).

Além da participação de EROs na resposta celular à poluição atmosférica, esta usualmente envolve, ainda, a participação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-1 $\beta$ , sugerindo que o processo inflamatório gerado por MP pode estar relacionado aos efeitos nocivos dessas partículas nos pulmões e no sistema respiratório como um todo (KIM *et al.*, 2016; ORONA *et al.*, 2014).

A IL-6 é um mediador inflamatório típico e indicador sensível da resposta inflamatória aguda. Está envolvida em uma série de atividades imunológicas, atuando também nos processos inflamatórios subjacentes de doenças inflamatórias crônicas (YUAN *et al.*, 2019). Muitos estudos sugerem que a IL-6 atua no processo de inflamação associado a diferentes tipos de doenças pulmonares agudas, contribuindo para o recrutamento de neutrófilos pulmonares (QUINTON; WALKEY; MIZGERD, 2018). Essa interleucina é produzida por muitos tipos celulares, especialmente monócitos, macrófagos ativos e linfócitos T, além de células endoteliais e fibroblastos. É secretada em baixos níveis, mas há um aumento da sua expressão na presença de inflamação ou trauma (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são consideradas citocinas pró-inflamatórias de alta importância, pois estimulam a apresentação de antígenos, a expressão de moléculas de adesão nas células

endoteliais, a atividade das células inflamatórias e a expressão de enzimas degradantes da matriz, como a colagenase (MOLDOVEANU *et al.*, 2009). A TNF- $\alpha$  promove a resposta imune e inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção e sua ativação, provocando uma série de efeitos no organismo. É produzida principalmente por macrófagos ativados e está envolvida na inflamação sistêmica e reação de fase aguda, sendo capaz de induzir febre, morte celular apoptótica e inflamação. Já a IL-1 $\beta$ , pertencente ao agregado familiar da IL-1, é secretada por muitas células, incluindo macrófagos, células NK, monócitos e neutrófilos e está envolvida em uma variedade de atividades celulares, incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose. TNF, IL-1 e IL-6, produzidos durante a resposta imune inata ao dano tecidual, têm efeitos sistêmicos que contribuem para a defesa do hospedeiro, sendo responsáveis por muitas das manifestações clínicas da infecção e da doença inflamatória (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

A IL-8, por sua vez, não é apenas uma citocina pró-inflamatória, mas também uma quimiocina que pode mediar a migração de células inflamatórias para locais sob injúria e afetar a resposta imune na fase inflamatória aguda (LU *et al.*, 2019). É o principal mediador da resposta imune inata aos micróbios intracelulares e é indutora-chave da imunidade mediada por célula. Produzida pelos fagócitos mononucleares ativados e pelas células dendríticas, estimula a diferenciação dos linfócitos Th em Th1 produtores de IFN- $\gamma$  (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

### 2.3.3 MP e o Epitélio alveolar

A resposta inflamatória pulmonar é geralmente causada por infecções e exposição a toxinas, alérgenos ou substâncias irritantes, envolvendo respostas imunes inatas e adaptativas. Quando um invasor é encontrado, o epitélio das vias aéreas é a primeira linha de defesa e atua liberando enzimas, juntamente com EROs, óxido nítrico, fator de ativação plaquetário e citocinas para atrair células inflamatórias e estimular resposta imune contra o organismo invasor, culminando na liberação de uma variedade de quimiocinas e citocinas, a depender do tipo de patógeno invasor (CHALMERS *et al.*, 2019).

A inflamação aguda é dominada pelos neutrófilos, enquanto as reações crônicas envolvem especialmente macrófagos e linfócitos. Os neutrófilos representam uma segunda linha de defesa, sendo as primeiras células a serem recrutadas para os locais da lesão, respondendo à liberação de citocinas, especialmente IL-8. Uma vez recrutados, desempenham um papel crucial na inflamação, matando os patógenos fagocitados através da liberação de

EROs e proteases. Os macrófagos também têm papel essencial na modulação das respostas inflamatórias, tanto agudas quanto crônicas. Eles residem nas vias aéreas, alvéolos e interstício ou migram para a microvasculatura pulmonar, mas, embora possam proliferar dentro do pulmão, seu número não é suficiente para combater, sozinhos, uma infecção ou insulto. A função dos macrófagos é aumentada pelas células dendríticas. Juntos eles são capazes de fagocitar bactérias, particulados e células apoptóticas (CHALMERS *et al.*, 2019; MOLDOVEANU *et al.*, 2009). Quando o insulto pulmonar é controlado, espera-se a elevação de citocinas anti-inflamatórias, que auxiliam na regulação do sistema de defesa e facilitam a apoptose das células inflamatórias pelos macrófagos. No entanto, em casos de infecção potente, com lesão pulmonar contínua, há um desequilíbrio entre os sistemas pró e anti-inflamatório, reiniciando a cascata de inflamação e o recrutamento de neutrófilos, que novamente desempenham seu papel na inflamação (CHALMERS *et al.*, 2019).

Os linfócitos, por sua vez, são encontrados em toda a via aérea e no parênquima pulmonar. Os linfócitos T fornecem imunidade mediada por células: os linfócitos T CD4 são células T auxiliares, que se subdividem em Th1 e Th2, com diferentes perfis de citocinas. As Th1 estimulam a imunidade celular e produzem respostas pró-inflamatórias a vírus e outros parasitas intracelulares, além de eliminar células cancerígenas. As células Th2 direcionam a imunidade humoral para regular a produção de anticorpos a fim de combater organismos extracelulares. Enquanto isso, os linfócitos B produzem respostas imunes humorais através da síntese de anticorpos (CHALMERS *et al.*, 2019; MOLDOVEANU *et al.*, 2009).

Embora as células inflamatórias tenham atuação central no processo inflamatório pulmonar, as células epiteliais, endoteliais e mesenquimais também participam desse processo. Durante o insulto pulmonar agudo, as células endoteliais são ativadas para expressar fatores quimiotáticos, incluindo moléculas de adesão que levam à inserção e diapedese de leucócitos na região. Mecanismos de quimiotaxia direcionam a migração de neutrófilos e a produção adicional de quimiocinas para formação de tecido de granulação, incluindo matriz celular, fibroblastos, células endoteliais e leucócitos. Após um insulto, os macrófagos e as células epiteliais secretam quimiocinas e citocinas, promovendo o acúmulo de neutrófilos e a inflamação local (CHALMERS *et al.*, 2019; MOLDOVEANU *et al.*, 2009).

As células dendríticas, que são células apresentadoras de antígenos (APCs), também participam do processo de resposta imune pulmonar, sendo, juntamente com os macrófagos, a primeira linha de defesa no reconhecimento de vários patógenos. Elas estimulam as células T virgens, que ativam uma resposta Th1 e Th2, o que resulta em respostas imunes celulares e humorais contra o organismo invasor. Isso culmina na estimulação adicional de macrófagos e

linfócitos T, resultando na liberação de uma variedade de quimiocinas e citocinas de acordo com o patógeno invasor. De forma simultânea, o dano pulmonar também ativa as células endoteliais capilares que, além de contribuírem para a liberação de quimiocinas, aumentam a regulação das moléculas de adesão à superfície, facilitando a ligação e migração de células inflamatórias para o local do insulto (CHALMERS *et al.*, 2019; MOLDOVEANU *et al.*, 2009).

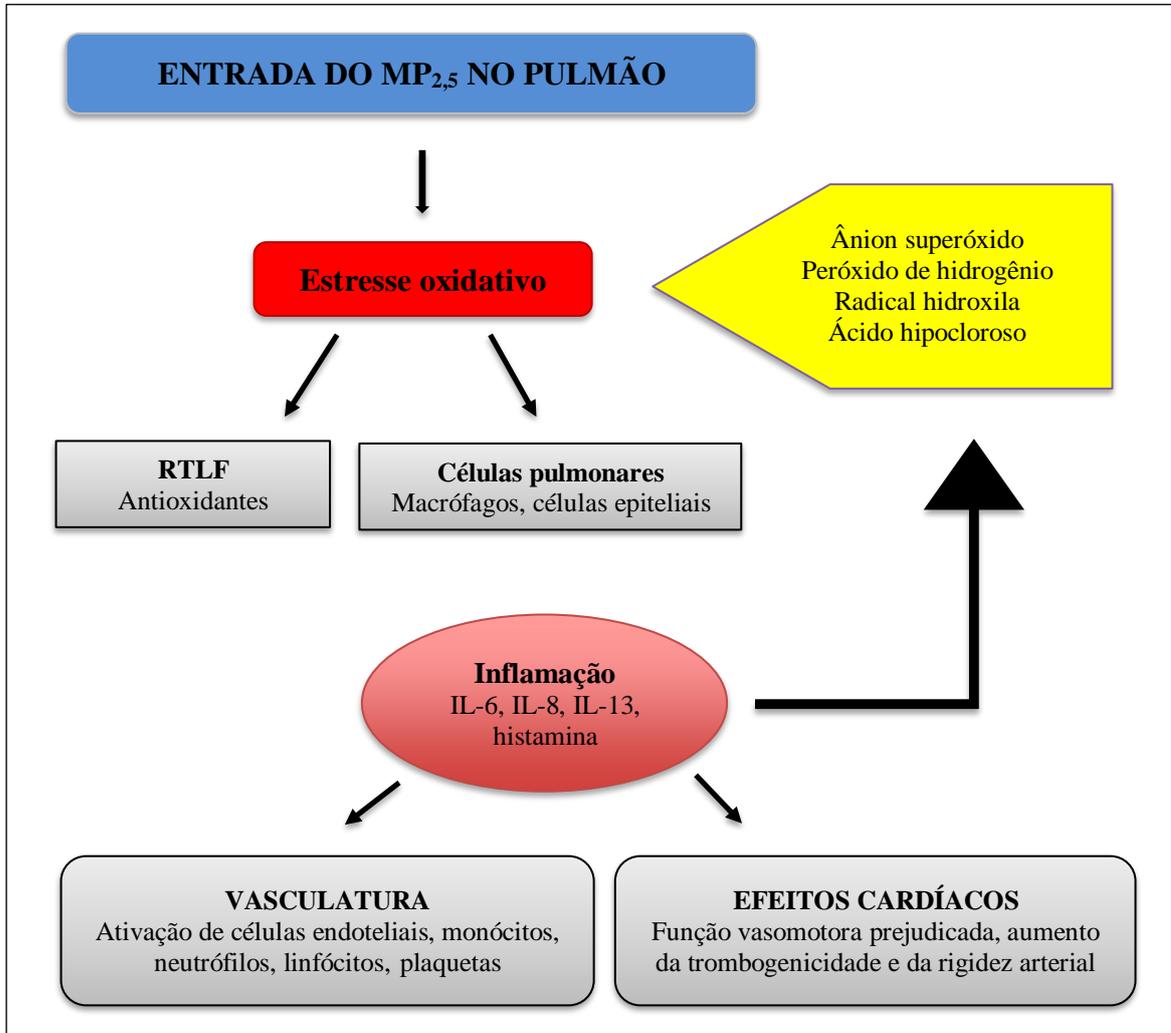
Muitos elementos contidos no MP podem provocar, direta ou indiretamente, danos oxidativos nas vias aéreas e nos tecidos pulmonares. A inflamação e a geração de EROs no pulmão provavelmente ajudam a remover os estímulos prejudiciais e a iniciar o reparo tecidual. No entanto, a persistência da inflamação pulmonar e o desequilíbrio entre a produção de EROS e a resposta antioxidante, podem causar danos ao epitélio alveolar e desencadear efeitos sistêmicos indesejáveis (RAO *et al.*, 2018).

O epitélio alveolar é formado, basicamente, por dois tipos celulares: células alveolares do tipo I (ATI) e células alveolares do tipo II (ATII). As células alveolares do tipo I são alongadas e cobrem 95% da superfície alveolar, sendo as responsáveis pelo processo de troca gasosa. Já as células alveolares do tipo II são cubóides, cobrem aproximadamente 5% da superfície alveolar e possuem proteínas surfactantes responsáveis pela produção de surfactante pulmonar, que impede o colapamento dos alvéolos, e que participam da defesa do hospedeiro ligando moléculas bacterianas da superfície, modulando a atividade leucocitária e induzindo a opsonização do patógeno. Quando o alvéolo pulmonar é danificado, as ATI, mais sensíveis, morrem e as ATII se proliferam e se diferenciam em ATI. Por esse motivo as ATII constituem um ótimo modelo para o estudo da resposta do epitélio alveolar à EROs e à poluição atmosférica (CARVALHO *et al.*, 2004; MASON, 2006; MASON; WILLIAMS, 1977, 1997). No epitélio alveolar também temos a presença dos macrófagos alveolares, que são a principal fonte de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios que regulam a resposta imune nos pulmões (MOLDOVEANU *et al.*, 2009).

Os diversos efeitos do MP<sub>2,5</sub> à saúde são resultado de mecanismos complexos e interdependentes, que atuam por diferentes vias fisiológicas e sustentam uma cadeia de eventos envolvendo estresse oxidativo pulmonar e sistêmico induzido por poluição e inflamação, apresentando um risco associado de disfunção vascular, aterosclerose, alteração da função cardíaca autonômica, bem como doenças isquêmicas cardiovasculares e obstrutivas pulmonares. Como pode ser observado na figura 2, quando inalado, o MP se deposita nos alvéolos pulmonares, onde causa estresse oxidativo, ativando antioxidantes presentes no fluido de revestimento do trato respiratório (RTLf), macrófagos e células epiteliais que secretam citocinas pró-inflamatórias, o que irá culminar em inflamação pulmonar e sistêmica. Esse MP

pode se difundir pela circulação sanguínea, causando danos a outros sistemas, especialmente o cardiovascular (KELLY; FUSSELL, 2015; ZHOU *et al.*, 2018).

**Figura 2** - Vias biológicas que ligam a exposição ao MP com vias oxidativas e inflamatórias no pulmão e no sistema cardiovascular.



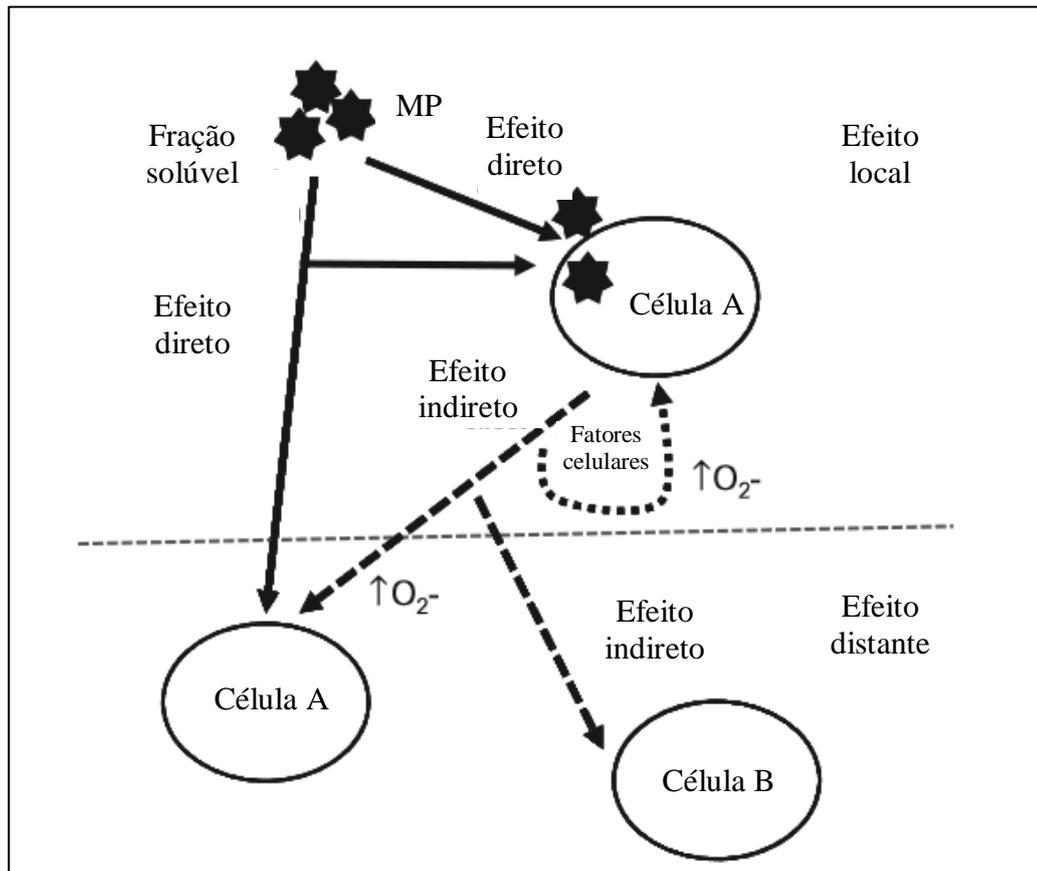
**Fonte:** Adaptado de Kelly; Fussell (2015, tradução nossa).

**Nota:** Quando inalado, o MP<sub>2,5</sub> alcança os alvéolos pulmonares gerando estresse oxidativo e inflamação pulmonar, podendo invadir a circulação sanguínea e induzir uma inflamação sistêmica que, no sistema cardiovascular, provoca efeitos vasculares e cardíacos, além de incitar a geração de EROs. A produção excessiva de EROs exacerba ainda mais o estresse oxidativo pulmonar, iniciando um novo ciclo que engloba inflamação e estresse oxidativo pulmonar e sistêmico.

**Legenda:** RTLF- Fluido de revestimento do trato respiratório.

Segundo Ortona *et al.* (2014), o MP pode exercer efeito sobre a função celular de forma direta ou indireta. A maneira direta se dá por meio de interação física, que produz um efeito local, ou através de sua fração solúvel, que pode provocar efeito local ou distante. Já na maneira indireta de atuação, o MP age induzindo a liberação de fatores celulares, que também podem exercer a sua ação de forma local ou sistêmica, como pode ser observado na figura 3.

**Figura 3** - Modelo ilustrativo da atuação do material particulado nas células.



**Fonte:** Orona *et al.* (2014, tradução nossa).

**Nota:** O MP pode atuar diretamente nas células locais ou através de sua fração solúvel, afetando células distantes. De maneira indireta, os fatores celulares podem exercer a sua ação localmente, através de uma ação autócrina (célula A) ou sistemicamente, causando efeito distante, em células diferentes (célula A ou célula B).

Por todas as evidências relacionando o  $MP_{2.5}$  a uma carga global de doenças, este tem sido um foco de preocupação internacional. Vale ressaltar que mesmo cidades com baixo índice de desenvolvimento podem apresentar níveis muito elevados de MP, até maiores do que cidades bem desenvolvidas. A exemplo disso temos algumas cidades do Paquistão ou África, devido à queima de carvão e lenha para preparo de alimentos e aquecimento, além de falta de regulamentação que impeça o uso de veículos muito antigos e combustíveis de baixa qualidade (CARVALHO, 2019; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019).

Dessa forma, estudos em diferentes regiões do planeta são necessários para avaliar e fornecer informações quanto à exposição à poluição do ar. Políticas públicas e pesquisas na área são essenciais para reverter a situação, inclusive em países em desenvolvimento, como o Brasil, que possui vários fatores que contribuem para o aumento dos níveis de  $MP_{2.5}$ , com crescentes taxas de morbimortalidade respiratória (OLIVEIRA *et al.*, 2012). No quadro 2 estão

listados alguns dos estudos mais recentes, desenvolvidos a partir dos efeitos toxicológicos de MP<sub>2,5</sub> derivado de diferentes cidades.

**Quadro 2** - Estudos recentes desenvolvidos a partir do MP<sub>2,5</sub> de diferentes cidades.

Estudo	Fonte do MP	Modelo de estudo
Xian <i>et al.</i> (2020)	Pequim (China)	Biópsia da mucosa nasal de pessoas saudáveis
Liu, J. <i>et al.</i> (2019)	Pequim (China)	Macrófagos (RAW264.7)
Liu, L. <i>et al.</i> (2019)	NIST, Gaithersburg, MD, EUA	Células epiteliais das vias aéreas humanas (BEAS-2B)
Sotty <i>et al.</i> (2019)	Dunkerque (França)	Modelos 3D de fenótipo mucociliar organo-típico
Tan <i>et al.</i> (2019)	GuangZhou (China)	Células epiteliais brônquicas humanas (16HBE)
Yuan <i>et al.</i> (2019)	Nanquim (China)	Células epiteliais brônquicas humanas (HBE e BEAS-2B)
Jin <i>et al.</i> (2018)	Taiyuan (China)	Células epiteliais brônquicas humanas (16HBE)
Oliveira <i>et al.</i> (2018)	São Paulo (BR)	Camundongos
Wang <i>et al.</i> (2018)	Wuhan (China)	Células epiteliais das vias aéreas humanas (BEAS-2B)
Wang <i>et al.</i> (2017)	GuangZhou (China)	Células endoteliais da veia umbilical (HUVECs)
Piao <i>et al.</i> (2017)	MP-Diesel	Queratinócitos humanos (HaCaT)

**Fonte:** A autora.

## 2.4 Padrões e monitoramento de qualidade do ar

A poluição do ar é um importante problema de saúde pública no mundo, com duas principais preocupações: o impacto na saúde humana, como as doenças respiratórias e cardiovasculares, e a preocupação com o meio ambiente, como o aquecimento global (BAI *et al.*, 2018).

A gestão da qualidade do ar é a responsável por garantir que o desenvolvimento sócio-econômico ocorra de forma sustentável e ambientalmente segura. Para tanto, se faz necessário ações de prevenção, combate e redução das emissões de poluentes e dos efeitos da degradação do ambiente atmosférico (BRASIL, 2018). No Brasil, os padrões de qualidade do ar são estabelecidos pela resolução Conama nº 491, de 19 de novembro de 2018, que revogou e substituiu a resolução Conama nº 3/1990 e dispõe sobre os padrões de qualidade do ar, respeitando as estratégias estabelecidas no Programa Nacional de Controle da Qualidade do Ar (PRONAR). De acordo com esta resolução define-se por padrão de qualidade do ar:

[...] um dos instrumentos de gestão da qualidade do ar, determinado como valor de concentração de um poluente específico na atmosfera, associado a um intervalo de tempo de exposição, para que o meio ambiente e a saúde da população sejam preservados em relação aos riscos de danos causados pela poluição atmosférica (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2019a).

É considerado um poluente atmosférico qualquer material que esteja em desacordo com os níveis estabelecidos nesta portaria, com relação a intensidade, quantidade, concentração ou tempo. Que tornem ou possam tornar o ar impróprio ou nocivo à saúde, ofensivo ao bem-estar público, danoso aos materiais, à fauna e flora e prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2019a, 2019b).

Na resolução Conama nº 3/1990, os padrões de qualidade do ar eram divididos em primários e secundários. Sendo considerados padrões primários as concentrações de poluentes que, ultrapassadas, podem afetar a saúde da população. E como padrões secundários, as concentrações de poluentes atmosféricos com baixo efeito adverso sobre o bem-estar da população e mínimo dano ao meio ambiente (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2019b). Já segundo a resolução Conama nº 491/2018, os padrões nacionais de qualidade do ar são divididos em duas categorias: padrões de qualidade do ar intermediários (PI), estabelecidos como valores temporários a serem cumpridos em etapas; e padrão de qualidade do ar final (PF), valores estabelecidos pela OMS em 2005, nas diretrizes de qualidade

do ar global (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2019a, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2005).

As Diretrizes de qualidade do ar da OMS determinam uma concentração média anual de  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  como valor de referência a longo prazo para  $\text{MP}_{2,5}$ . Isso representa o limite inferior em que efeitos significativos de morbimortalidade foram observados em estudos realizados pela Sociedade Americana do Câncer. A média de 24 horas, baseado no relacionamento entre os níveis de MP de 24 horas e anuais, é de  $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . A recomendação é que a média anual tenha precedência sobre a média de 24 horas, pois, em níveis baixos, há menos preocupação com excursões episódicas. No entanto, destaca-se que valores de referência para a média de 24 horas protegerá contra picos de poluição que, de outra forma, levariam a excesso de morbimortalidade. O recomendado é que países com áreas que não atendam aos valores das diretrizes de 24 horas realizem ações imediatas para atingir esses níveis no menor tempo possível (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2005).

A resolução nacional vigente (Conama nº 491/18) determina padrões mais rigorosos de qualidade do ar, que já devem ser cumpridos a partir da sua publicação. Dentre as principais alterações destacam-se: a inclusão de padrões de qualidade do ar para  $\text{MP}_{2,5}$  e chumbo; a padronização da divulgação de informações sobre a qualidade do ar pelos órgãos ambientais estaduais, por meio do Índice de Qualidade do Ar (IQAR), além da inclusão de concentrações de  $\text{MP}_{2,5}$  para determinação de episódios críticos de poluição do ar, os quais são definidos como “situação caracterizada pela presença de altas concentrações de poluentes na atmosfera em curto período de tempo, resultante da ocorrência de condições meteorológicas desfavoráveis à dispersão dos mesmos” (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2019a).

Em seu Art. 3º, a atual resolução estabelece que os padrões de qualidade do ar a serem regulamentados pela legislação ambiental são os seguintes: partículas totais em suspensão (partículas de material sólido ou líquido suspensas no ar com diâmetro aerodinâmico de até 50 micrômetros), fumaça, partículas inaláveis ( $\text{MP}_{10}$  e  $\text{MP}_{2,5}$ ), dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ), monóxido de carbono (CO), ozônio ( $\text{O}_3$ ), dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ) e chumbo (Pb), como pode ser observado no quadro 3. Mantendo como unidade de medida de concentração dos poluentes atmosféricos o micrograma por metro cúbico ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ), com exceção do CO, que é reportado como partes por milhão (ppm). A presente resolução determina ainda, como condições de referência,  $25^\circ\text{C}$  para temperatura e pressão de 760 milímetros de coluna de mercúrio.

Os padrões de qualidade do ar definidos nesta resolução serão adotados sequencialmente, em quatro etapas: padrões de qualidade do ar intermediários (PI-1, PI-2, PI-3) e padrão de qualidade do ar final (PF), estando inclusos no padrão de qualidade do ar final

poluentes como monóxido de carbono (CO), partículas totais em suspensão (PTS) e chumbo (Pb). Os padrões denominados PI-1 são os que se encontram em vigor atualmente. Já os padrões PI-2, PI-3 e PF serão adotados de forma subsequente, levando em consideração os planos de controle de emissões atmosféricas e os relatórios de avaliação da qualidade do ar desenvolvidos pelos órgãos estaduais e distrital de meio ambiente, que devem ser elaborados em até três anos a partir do momento em que essa resolução entrou em vigor. Caso não seja possível a migração para o padrão subsequente, prevalece o padrão já adotado.

**Quadro 3** - Padrões nacionais de qualidade do ar ( resolução Conama nº 491/2018).

Poluente Atmosférico	Período de referência	PI-1 µg/m <sup>3</sup>	PI-2 µg/m <sup>3</sup>	PI-3 µg/m <sup>3</sup>	PF µg/m <sup>3</sup>
Material Particulado - MP <sub>10</sub>	24 horas	120	100	75	50
	Anual <sup>1</sup>	40	35	30	20
Material Particulado – MP <sub>2,5</sub>	24 horas	60	50	37	25
	Anual <sup>1</sup>	20	17	15	10
Dióxido de Enxofre - SO <sub>2</sub>	24 horas	125	50	30	20
	Anual <sup>1</sup>	40	30	20	-
Dióxido de Nitrogênio - NO <sub>2</sub>	1 hora <sup>2</sup>	260	240	220	200
	Anual <sup>1</sup>	60	50	45	40
Ozônio - O <sub>3</sub>	8 horas <sup>3</sup>	140	130	120	100
Fumaça	24 horas	120	100	75	50
	Anual <sup>1</sup>	40	35	30	20
Monóxido de Carbono - CO	8 horas <sup>3</sup>	-	-	-	9 ppm
Partículas Totais em Suspensão - PTS	24 horas	-	-	-	240
	Anual <sup>4</sup>	-	-	-	80
Chumbo - Pb <sup>5</sup>	Anual <sup>1</sup>	-	-	-	0,5

**Fonte:** Adaptado de Brasil (2018).

**Nota:** 1 - Média aritmética anual.

2 - Média horária.

3 - Máxima média móvel obtida no dia.

4 - Média geométrica anual.

5 - Medido nas partículas totais em suspensão

**ppm** - Partes por milhão

**µg/m<sup>3</sup>** - Micrograma por metro cúbico

Nas diretrizes de qualidade do ar da OMS, o nível intermediário 1 adota uma concentração média anual de MP<sub>2,5</sub> de 35 µg/m<sup>3</sup>. Esse nível corresponde às maiores

concentrações médias relatadas em estudos de efeitos à saúde a longo prazo, estando associado a uma mortalidade significativa no mundo desenvolvido. O nível intermediário 2 é fixado em  $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$  e baseia-se nos estudos de exposição e mortalidade a longo prazo, estando associado a impactos significativos à saúde decorrentes das exposições diárias e de longo prazo à  $\text{MP}_{2.5}$ . Atender a esses limites reduziria os riscos da exposição a longo prazo em cerca de 6% em relação ao valor do nível 1. No nível intermediário 3, o valor recomendado é de  $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Esse valor é próximo das concentrações médias relatadas em estudos de exposição a longo prazo e fornece uma redução adicional de 6% no risco de mortalidade em relação ao nível 2. Como pode ser observado no quadro 2, a resolução Conama nº 491/18 adota os mesmos padrões estabelecidos pela OMS no que diz respeito ao PF e PI-3 para concentração anual de  $\text{MP}_{2.5}$ , mas com relação ao PI-1 e PI-2 os valores adotados são menores.

Segundo a OMS, os padrões de qualidade do ar devem variar de acordo com as abordagens adotadas para balancear riscos à saúde, considerações econômicas e outros fatores políticos e sociais que dependem, entre outras coisas, do nível de desenvolvimento e da capacidade nacional de gerenciar a qualidade do ar. As diretrizes recomendadas pela OMS levam em conta esta heterogeneidade e, em particular, reconhecem que, ao formularem políticas de qualidade do ar, os governos devem considerar cuidadosamente suas circunstâncias locais antes de adotar os valores propostos como padrões nacionais (BRASIL, 2018). Vale ressaltar que desde que foi publicada, em 1990, a legislação brasileira para MP só foi revisada e atualizada depois de quase 30 anos. Até então, eram estabelecidos apenas os padrões de qualidade do ar para  $\text{MP}_{10}$  inalável que, inclusive, eram muito superiores aos níveis recomendados pela OMS. Mas nenhum padrão para  $\text{MP}_{2.5}$  havia sido estabelecido até o ano de 2018.

As primeiras estações de monitoramento da qualidade do ar no Brasil, com monitoramento contínuo de MP, foram estabelecidas na década de 1970 nas capitais e regiões metropolitanas dos estados de São Paulo, pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), e Rio de Janeiro, pelo Instituto Ambiental do estado e, até então, são as únicas monitorando  $\text{MP}_{2.5}$ . Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais possuem estações de monitoramento de curto prazo e a região amazônica é monitorada devido à queima de biomassa. Bahia, Espírito Santo, Sergipe e o Distrito Federal também possuem registros de monitoramento do ar, já os demais estados brasileiros não apresentam dados de monitoramento acessíveis (INSTITUTO DE ENERGIA E MEIO AMBIENTE, 2018). Devido ao tamanho do país, às diversas atividades de cada região e diferenças de clima, a qualidade do ar varia muito,

assim como a composição química das partículas. A falta de monitoramento contínuo impede o estabelecimento de novos padrões para a qualidade do ar (RODRÍGUEZ-COTTO, 2014).

Um outro ponto altamente relevante, quando se fala de qualidade do ar atmosférico, é a qualidade dos combustíveis utilizados. Sabe-se que veículos a diesel emitem maior quantidade de MP e o recente escândalo de fraude em testes de emissões veiculares pela Volkswagen trouxe o assunto à tona novamente com grande impacto mundial, conforme comentário publicado na Lancet (CARVALHO, 2016b). Lankoff *et al.* (2017) avaliou a toxicidade de partículas de exaustão de diesel derivadas de dois combustíveis de primeira geração (FAME B7 e FAME B20) e um de segunda (FAME / HVO - Biocombustível sintético de hidrocarboneto). Seus achados indicaram que as emissões de partículas de cada tipo de biodiesel exercem efeitos tóxicos nas células BEAS-2 e A549, se manifestando em forma de morte celular (apoptose ou necrose), diminuição das concentrações de proteínas, produção de EROs, bem como aumento da expressão de genes antioxidantes e genes que codificam proteínas de resposta a danos no DNA. Kowalska *et al.* (2017) em estudo semelhante, utilizando os mesmos combustíveis e mesmas linhagens celulares, demonstrou que tanto as partículas geradas dos combustíveis de primeira geração, como dos de segunda geração, induzem efeitos genotóxicos nas células, aumentando as quebras de fita única, as frequências de micronúcleos e a expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização de danos ao DNA. A qualidade do ar também é altamente afetada pela idade da frota de veículos, uma vez que carros mais velhos têm maiores níveis de emissão (CARVALHO, 2019). Dessa forma, são pontos que precisam ser debatidos e melhor conduzidos pelas autoridades.

Carvalho (2016, 2017) destaca que, no Brasil, a maioria das grandes cidades não possui monitoramento da qualidade do ar e nem realizam testes de emissão em seus veículos. Ressalta que, apesar de existir diferenças proporcionais de mortes relacionadas à poluição do ar entre o Brasil e países como a China, onde a poluição do ar é mais grave, o número de aproximadamente 50 mil mortes ao ano relacionada à poluição no Brasil, é um número elevado. De maneira geral, em relação ao controle da poluição do ar, o Brasil ainda tem muito a avançar.

Miranda *et al.* (2012), em colaboração com instituições brasileiras e coordenação da Escola de Medicina da Universidade de São Paulo, conduziu um estudo entre junho de 2007 e agosto de 2008 em seis grandes cidades do Brasil: São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Curitiba, Recife e Porto Alegre, onde foi mensurado a concentração de MP<sub>2,5</sub> e a proporção de carbono negro, uma forma de carbono produzida durante a combustão incompleta de combustíveis fósseis, madeira ou biomassa, presente nesse material, em cada uma dessas cidades. Os resultados demonstraram que as concentrações de MP<sub>2,5</sub> foram maiores em São Paulo

(28,1  $\mu\text{g}/\text{m}^{-3}$ ) e menores em Recife (7,3  $\mu\text{g}/\text{m}^{-3}$ ). Enquanto a proporção percentual de carbono negro foi menor no Rio de Janeiro (20%), seguido de Recife (26%), Porto Alegre (26%), Curitiba (30%), Belo Horizonte (31%) e São Paulo com o maior resultado (38%). Nesse estudo os autores revelam que a alta porcentagem encontrada nessas seis cidades não foi algo comum para o Brasil, citando estudos anteriores que demonstraram valores em torno de 30% de carbono negro no MP. Vale ressaltar que, na época do estudo, Recife tinha um menor número de habitantes e menor frota de veículos, mas a cidade cresceu muito desde então. No entanto, não tem sido conduzido muitos estudos sobre a poluição do ar na capital pernambucana.

#### *2.4.1 Monitoramento e qualidade do ar em Recife*

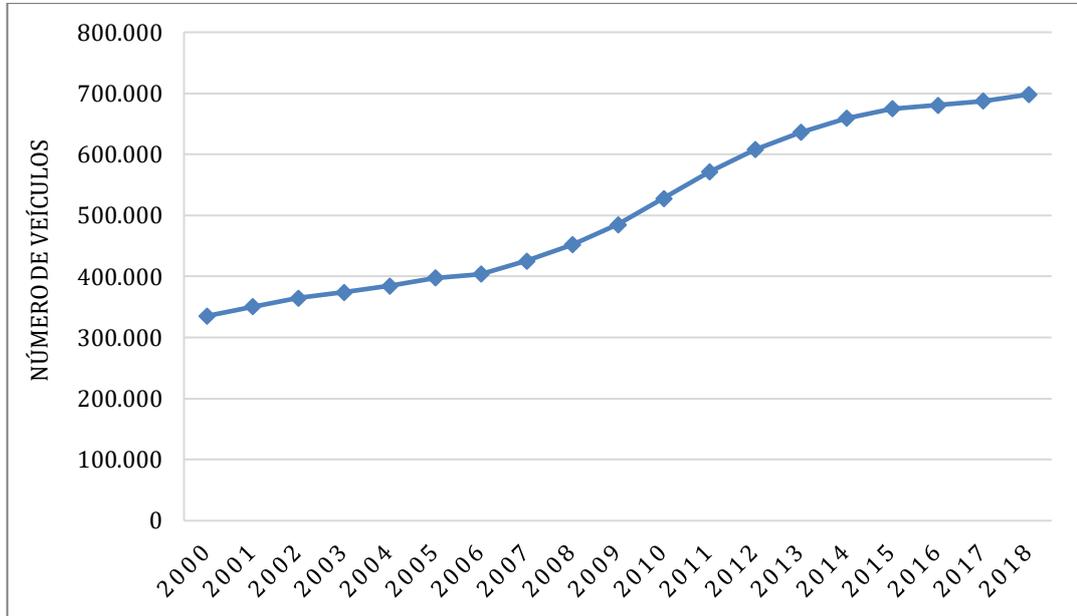
Em Pernambuco, o órgão responsável pela avaliação e monitoramento da qualidade do ar é a Agência Estadual de Meio Ambiente (CPRH). O levantamento de dados, bem como a produção de inventários de fontes de poluição atmosférica (estacionárias e móveis) e cálculo das estimativas de emissões tiveram início pela CPRH no ano de 1989. A partir de 1991, foi iniciado um projeto para implantação de uma rede de monitoramento da qualidade do ar em Recife e região metropolitana, a fim de possibilitar, a longo prazo, o conhecimento contínuo das tendências de contaminação (AGÊNCIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE, 2018). No entanto, essa rede entrou em operação apenas recentemente e seu monitoramento é restrito a gases.

Assim como relatado no estudo de Miranda *et al.* (2012), Recife não tem conduzido muitos estudos sobre a poluição do ar, mas isso não significa que a cidade não apresente problemas quanto a isso. Adversidades são relatadas com frequência sobre emissões de veículos e emissões de navios oceânicos, algo que, apesar de representar ameaça, não tem sido bem direcionado pelas autoridades competentes. Até o momento não há informações disponíveis que confirmem se o setor municipal de transporte público tem adotado políticas voltadas a melhoria da qualidade das frotas de veículos e dos combustíveis empregados na cidade. Nesse quesito, muito ainda precisa ser feito. Além disso, Recife foi uma das capitais que mais cresceu na última década.

Segundo o mais recente levantamento do Departamento Estadual de Trânsito de Pernambuco (DETRAN-PE), a frota total de Recife é de quase 700 mil veículos (figura 4). Desses, quase 60% é referente a automóveis (410.318), cerca de 14% são veículos de carga, incluindo caminhões e caminhonetes (94.328), 21% são referentes a motos (149.617), enquanto

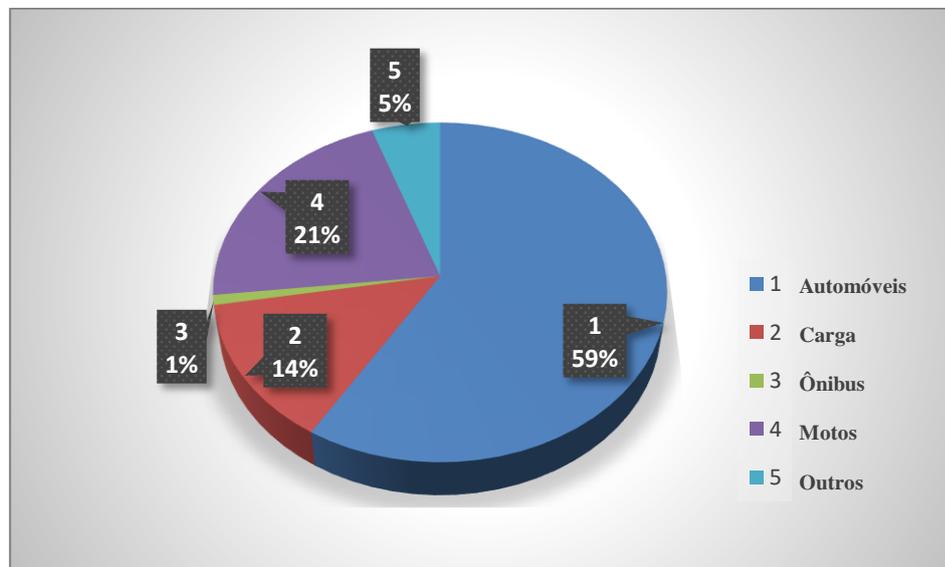
ônibus e micro-ônibus representam menos de 1% do valor total da frota (6.612), como pode ser observado na figura 5 (DEPARTAMENTO ESTADUAL DE TRÂNSITO, 2019).

**Figura 4** - Registro do crescimento da frota de veículos de Recife: 2000 - 2018.



**Fonte:** A autora, baseado nos dados do Detran-PE (2019).

**Figura 5** - Frota de Recife registrada por tipo de veículo - Novembro/ 2018.

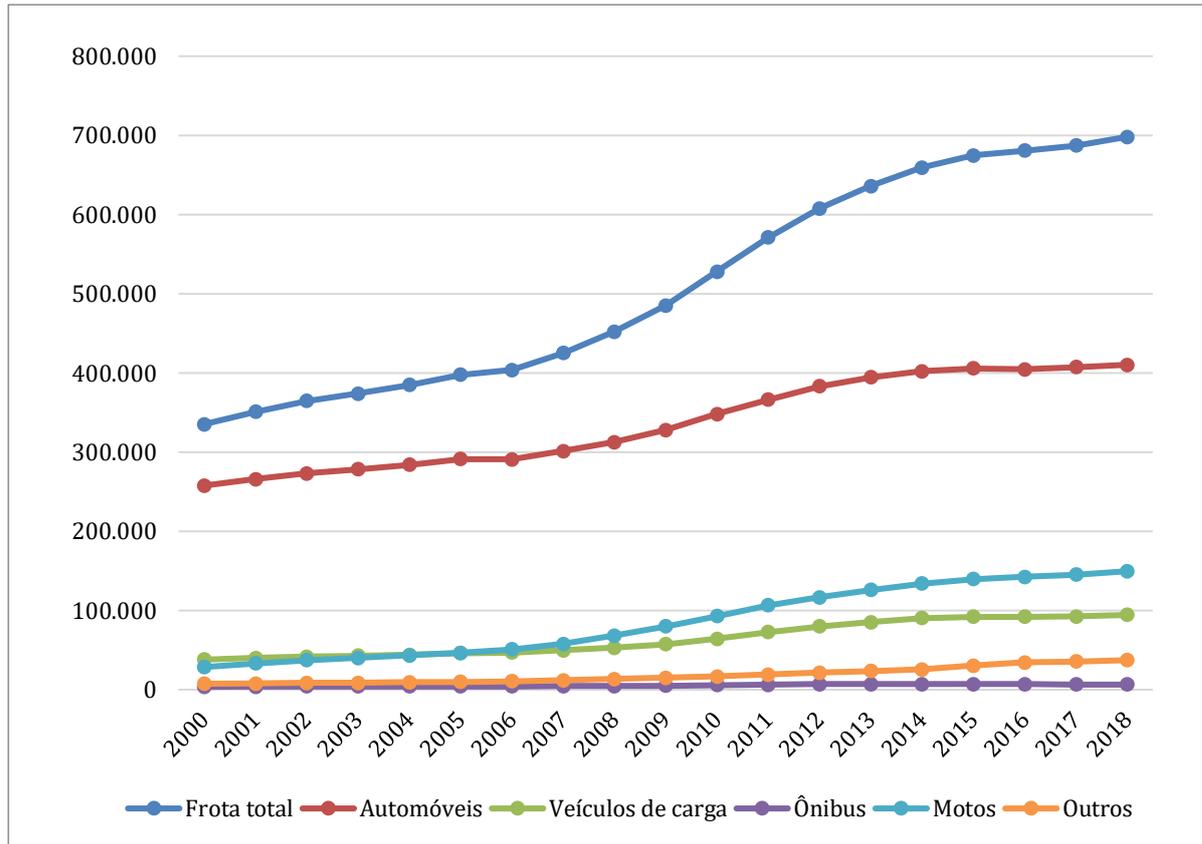


**Fonte:** A autora, baseado nos dados do Detran-PE (2019).

O número de veículos particulares na capital, bem como motos e veículos de carga (caminhão, caminhonete) apresentaram um crescimento considerável na última década, enquanto observa-se que a quantidade de ônibus na cidade praticamente não sofreu alterações desde os anos 2000, como mostra a figura 6. Esses dados demonstram o quanto a cidade precisa

de políticas públicas que visem a melhoria da qualidade e quantidade de meios de transporte público, uma vez que, com transporte público de qualidade, as pessoas poderiam passar a usar menos seus carros particulares e, com isso, a poluição por veículos automotores poderia diminuir. Essa medida também contribuiria para melhorar o caótico trânsito de Recife.

**Figura 6** - Evolução da frota de Recife por tipo de veículo de 2000 a 2018.

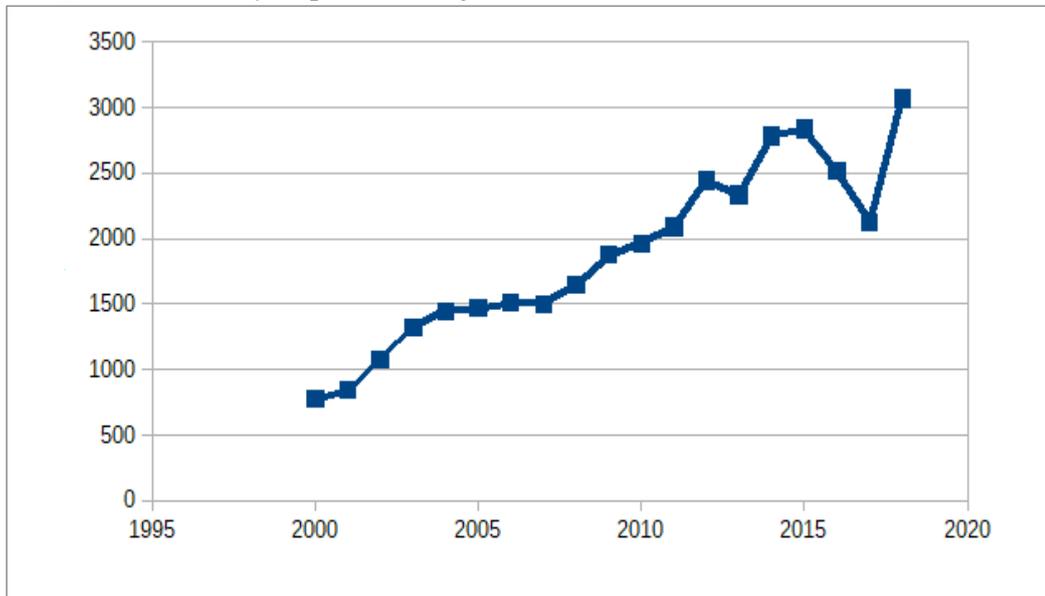


**Fonte:** A autora, baseado nos dados do Detran-PE (2019).

Paralelo ao crescimento da frota de veículos, entre os anos de 2000 e 2018, observou-se também, na capital, a elevação no número de internações hospitalares atribuídas a doenças relacionadas à poluição atmosférica (NASCIMENTO; CARVALHO; OLIVEIRA, 2019). Tanto bronquite aguda, quanto bronquite crônica, enfisema e outras doenças respiratórias crônicas apresentaram um aumento ao longo dos anos analisados. O mesmo se observa para o número de mortes relacionadas a essas doenças. Internações por infarto agudo do miocárdio também apresentaram crescimento considerável e, apesar de uma breve redução entre 2015 e 2016, apresentou um pico de elevação em 2018 (Figura 7), não apresentando, no entanto, alterações importantes no número de mortes no período analisado. Os dados mais incisivos são as internações devidas a câncer de pulmão, que apresentaram crescimento de mais de dez vezes nos últimos 10 anos analisados (Figura 8). Apesar do aumento vertiginoso nas internações por

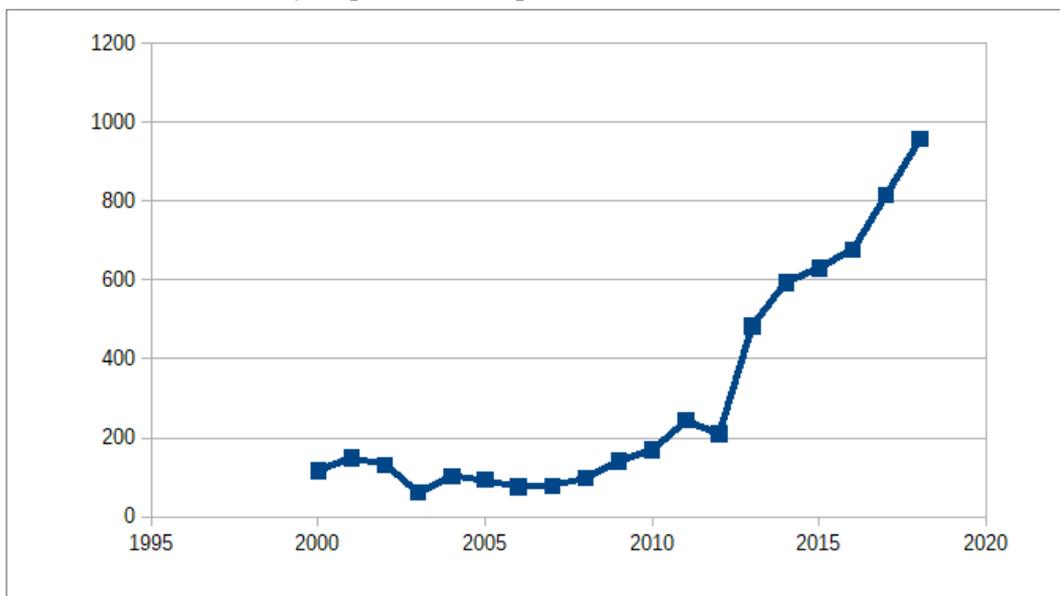
câncer de pulmão, o número de mortes cresceu em menor grau, mas ainda mostra valores de até 90 % de aumento em relação às mínimas do período analisado.

**Figura 7** - Internações por infarto agudo do miocárdio em Recife entre 2000 e 2018.



**Fonte:** A autora, baseado nos dados do Datasus (2019).

**Figura 8** - Internações por câncer de pulmão em Recife entre 2000 e 2018.



**Fonte:** A autora, baseado nos dados do Datasus (2019).

Apesar da forte associação epidemiológica estabelecida entre o MP e diversas doenças (RODRÍGUEZ-COTTO, 2014; ZHANG *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2018), não se conhece nenhum estudo biológico publicado caracterizando respostas toxicológicas da poluição atmosférica da cidade de Recife. Este é o primeiro estudo a relatar os efeitos do MP de Recife

em células pulmonares, avaliando se ele é capaz de induzir morte celular, respostas imunológicas e estresse oxidativo nas células expostas. Este também é um estudo pioneiro na avaliação do perfil transcricional de proteínas e enzimas antioxidantes frente a toxicidade associada aos MPs. Estudos desse tipo são extremamente importantes, pois a partir deles pode-se sensibilizar os órgãos responsáveis a implementar políticas de saúde ambiental mais rigorosas, a fim de manter os níveis de poluição do ar o mais baixo possível.

### 3 JUSTIFICATIVA

O estudo dos efeitos biológicos da poluição atmosférica é extremamente importante, a fim de orientar políticas públicas que visem a redução dos níveis de poluição em grandes metrópoles, como Recife. Infelizmente, a ausência de monitoramento da qualidade do ar na cidade e de dados históricos sobre os níveis de poluentes atmosféricos, não permitem fazer uma correlação direta entre os níveis de poluentes e os dados de internações hospitalares (DATASUS). No entanto, esses dados sugerem esta relação e os resultados obtidos neste estudo tendem a confirmá-la.

Muitos aspectos mecanísticos envolvidos na morte de células alveolares do tipo II expostas à poluição atmosférica ainda não foram estudados. Recife não possui nenhum estudo biológico publicado caracterizando respostas toxicológicas dos seus poluentes atmosféricos. Além disso, muitos mecanismos associados ao MP-Diesel ainda precisam ser esclarecidos. Dessa forma, aprofundamos os estudos focando no papel de EROs na resposta ao MP, morte celular, respostas inflamatórias e perfil transcricional de enzimas antioxidantes em células A549 tratadas com MP-Diesel e MP-Recife. Sabendo que veículos a diesel emitem maior quantidade de MP, emissões derivadas de diesel se mostraram um ótimo modelo para comparação com os resultados a serem obtidos do MP de Recife.

Os resultados obtidos foram esclarecedores e poderão nortear tratamentos futuros para distúrbios cardiorrespiratórios e outras doenças crônicas associadas à poluição atmosférica, além de servir de subsídio para a adoção de políticas públicas que visem reduzir a emissão de poluentes por veículos automotores, como o investimento maciço em transportes de massa (metrô e trem), visto que o aumento da capacidade e qualidade do transporte público deve incentivar a população a deixar seus carros em casa, contribuindo tanto para uma redução dos níveis de poluição atmosférica, como para uma melhoria no caótico trânsito da cidade. Além disso, os resultados aqui obtidos poderão servir como um gatilho para o início da implementação de uma rede fixa de monitoramento da qualidade do ar em Recife e região metropolitana voltada para MP.

#### **4 HIPÓTESE**

O material particulado coletado da atmosfera de Recife (MP-Recife), assim como o derivado da queima do diesel (MP-Diesel), é capaz de induzir morte celular, gerar resposta inflamatória e estresse oxidativo em células alveolares do tipo II humanas.

## **5 OBJETIVO GERAL**

Estudar a poluição atmosférica de Recife através de material particulado (MP) em suspensão e comparar seus efeitos na indução de apoptose, resposta inflamatória e estresse oxidativo em células alveolares do tipo II humanas (A549) com os desencadeados por MP-diesel.

### **5.1 Objetivos específicos**

- a) Coletar MP da atmosfera de Recife e determinar a concentração de MP<sub>2,5</sub>;
- b) Avaliar a citotoxicidade do MP-Recife e do MP-Diesel (MPs);
- c) Verificar o potencial apoptótico dos MPs;
- d) Verificar o potencial inflamatório dos MPs;
- e) Avaliar a geração de EROs intracelular induzido pelos MPs;
- f) Avaliar o perfil de expressão de proteínas e enzimas antioxidantes em células A549 expostas aos MPs.

## 6 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Para responder aos objetivos propostos neste trabalho, foram realizados estudos imunológicos, bioquímicos e moleculares em células pulmonares da linhagem A549 expostas ao MP- Diesel e MP-Recife. As metodologias utilizadas e descritas a seguir enfatizam a avaliação do estresse oxidativo, morte celular e respostas inflamatórias nessas células.

### 6.1. Coleta e processamento do material particulado

Neste estudo foram utilizados MPs de duas fontes diferentes: MP proveniente da queima de diesel (MP-Diesel), derivado apenas de emissões de diesel, constituído de uma mistura de MP<sub>2,5</sub> e MP<sub>10</sub>. Esse MP foi coletado de filtros instalados nos escapamentos de ônibus de uma frota de São Paulo, gentilmente cedidos pelo Dr. Paulo Saldiva, chefe do Laboratório de Poluição Atmosférica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP); e MP derivado da atmosfera de Recife (MP-Recife), coletado no Campus Recife da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em uma laje situada no laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva, 2º andar do Centro de Ciências da Saúde (CCS), na face voltada para a BR-101. O equipamento ficava a uma distância aproximada de 50 m da BR-101 e cerca de 100 m do Hospital das Clínicas da UFPE.

Para obtenção do MP-Recife foi utilizado um avançado amostrador de partículas modelo IPM-FDS 2,5µ/10µ Fine Particulate Sampler da INSTRUMEX (figura 9). Esse amostrador de partículas usa um conjunto de impactores padronizados pela USEPA (United States Environmental Protection Agency) para separar partículas com uma corrente de ar proporcionada por uma bomba de vácuo. A entrada de ar possui uma simetria circular para não ser afetada pela direção do vento, construída de forma a impedir a entrada de chuva, insetos e partículas muito grandes.

O sistema é composto por uma entrada de ar unidirecional, contendo um conjunto de impactores projetados para separar partículas de diferentes tamanhos: o primeiro retém partículas com diâmetro aerodinâmico maior que 10 micrômetros, enquanto o segundo, no tubo inferior, captura apenas partículas com diâmetro aerodinâmico entre 2,5 e 10 micrômetros (MP<sub>10</sub>). Dessa forma, o ar que sai deste segundo impactor contém apenas MP<sub>2,5</sub>, que foi coletado em filtros especiais de Teflon - Polytetra Fluro Ethylene (PTFE) de 47 mm de diâmetro. O equipamento permite variar o fluxo de ar, que foi mantido em 16 L/min. Vale ressaltar que,

apesar de o amostrador ter capacidade para coletar também  $MP_{10}$ , neste estudo nós optamos por trabalhar apenas com  $MP_{2,5}$ .

**Figura 9** - Amostrador de partículas IPM-FDS 2,5 $\mu$ /10 $\mu$  Fine Particulate Sampler.



Fonte: A autora.

Após a coleta os filtros foram armazenados em placas de 60 mm e mantidos a 4°C até o momento da pesagem. Para a pesagem os filtros foram incubados durante a noite na sala de pesagem, em ambiente com temperatura variando entre 23°C e 24°C, a fim equilibrar temperatura e umidade. Após esse período, os filtros foram expostos a uma barra ionizante para retirada da eletricidade estática resultante da desigualdade entre as cargas positiva e negativa, o que pode atrair pó e outros elementos estranhos. Em seguida, eles foram pesados em micro-balança analítica de alta precisão, modelo XP2U, da Mettler Toledo com resolução de 0,1  $\mu$ g. Vale ressaltar que os filtros foram pesados antes e depois da coleta do MP, possibilitando, ao final da coleta, realizar a subtração das medidas da pesagem pré e pós-exposição e, dessa forma, calcular a massa de  $MP_{2,5}$  coletada em cada filtro. Após pesagem, os filtros foram preparados para uso nos tratamentos de células ou mantidos a 4°C até seu processamento.

Para o uso em tratamentos de culturas de células o conteúdo dos filtros foi recuperado por sonicação destes em PBS filtrado e a solução resultante foi então armazenada a -20 °C até o momento do uso. O MP proveniente de emissões de diesel, de maneira similar ao obtido a

partir de filtros expostos ao ambiente, foi ressuspendido em PBS filtrado e sonicado para homogeneização.

## **6.2. Concentração de MP<sub>2,5</sub> no ar de Recife**

A cada dez amostragens os dados foram transferidos do amostrador para um computador, utilizando o programa *Hyper terminal*. O coletor registra alguns dados importantes referentes à cada coleta realizada, como temperatura ambiente, temperatura do filtro, pressão atmosférica, fluxo de ar (L/min), tempo de amostragem, volume total amostrado, entre outros. Após pesagem dos filtros, foi possível se determinar a concentração do MP<sub>2,5</sub> na atmosfera utilizando a massa de MP coletado em cada filtro e dividindo pelo volume total de ar amostrado.

## **6.3. Cultura de células e tratamentos com material particulado**

No presente estudo foram utilizadas células alveolares do tipo II humanas, da linhagem A549, uma linhagem celular imortalizada derivada de células epiteliais basais de adenocarcinoma alveolar humano, isoladas em 1972 dos pulmões de um indivíduo do sexo masculino, caucasiano, de 58 anos de idade. Estas foram cultivadas em meio de cultura Dubelcco's Modified Eagle Media completo (DMEM) High Glucose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS-Vitrocell-Embriolife, São Paulo, BRA) e 1% de antibiótico/antimicótico (Penicilina 10.000 U/mL /Streptomomicina 10.000 µg/mL - Gibco-Life Technologies, SP, BRA). As culturas de células foram mantidas em estufa à 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> e umidade de 95%, sendo observadas ao microscópio invertido a cada 24 horas para avaliar o perfil de crescimento e morfologia. Os tratamentos com MP foram realizados utilizando MP em uma concentração de 300 µg/mL. Após tempos variados de exposição, células aderentes e não aderentes ou o sobrenadante, foram recolhidos para a realização dos testes.

## **6.4 Medidas de viabilidade celular - XTT**

A citotoxicidade do MP de ambas as fontes foi avaliada através do ensaio de XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide), segundo Rosas-Hernandez *et al.* (2018), adaptado pelo nosso grupo. Este ensaio mede a viabilidade celular através da atividade mitocondrial e baseia-se na medida da conversão do sal de tetrazólio XTT a um composto de coloração laranja. As células foram cultivadas em placa de 24 poços, em

triplicata, em uma densidade de  $3.10^4$  por poço e incubadas em estufa por até 24 horas. Após crescimento (60-80% de confluência), o meio foi trocado, as células foram tratadas com MP (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubadas em estufa de  $\text{CO}_2$  pelos tempos de 24 h, 48 h e 72 h. Ao final de cada tempo de exposição o meio (DMEM) foi removido, as células foram lavadas de duas a três vezes com PBS e então foi adicionado 300  $\mu\text{L}$  de DMEM isento de vermelho de fenol (Vitrocell–Embriolife) para iniciar o ensaio de XTT. 150  $\mu\text{L}$  da solução XTT foi adicionado em cada poço e, após um período de incubação de 2 a 4 horas, a absorbância foi medida em um comprimento de onda de 500 nm, utilizando a leitura em 630 nm para correção de valores inespecíficos.

### 6.5 Quantificação de morte celular - Anexina V/Iodeto de propídeo

Os níveis de morte celular em células A549 expostas aos MPs e dos controles negativos, foram medidos após coloração com Anexina V e iodeto de propídeo (PI), seguido de análise do ciclo celular por citometria de fluxo (FACS), segundo procedimentos já estabelecidos (CARVALHO *et al.*, 2008) e adaptados pelo nosso grupo.

Neste ensaio, realizado em duplicata, as células foram cultivadas em placas de seis poços, em uma densidade de  $1.10^5$  por poço. Após as culturas atingirem 60 a 80% de confluência, as células foram tratadas com MP (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e então levadas a estufa de  $\text{CO}_2$ , onde foram mantidas pelos tempos de 24 h, 48 h e 72 h. Ao final de cada tempo de exposição, as células foram desgrudadas com o auxílio de *cell scraper*, transferidas para tubos de citometria devidamente identificados e centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm. Após centrifugação o *pellet* foi lavado com 500  $\mu\text{L}$  de PBS, centrifugado novamente e ressuspenso em 500  $\mu\text{L}$  de *Binding buffer* (1x). Foi adicionado 5  $\mu\text{L}$  de Anexina V-FITC (Invitrogen™), seguido de incubação em temperatura ambiente por 10-15 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas mais uma vez, lavadas com 500  $\mu\text{L}$  de *Binding buffer* (1x), centrifugadas novamente e então ressuspenso em 200  $\mu\text{L}$  de *Binding buffer* (1x) para receber 5  $\mu\text{L}$  de PI (Sigma-Aldrich). As amostras então foram incubadas por 10-15 minutos, na sequência foram tratadas com 16  $\mu\text{L}$  de RNase (Invitrogen™) e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por mais 15 minutos. As leituras foram realizadas no citometro de fluxo BD FACSCalibur™. Vale ressaltar que todas as incubações foram feitas no escuro e as amostras foram mantidas protegidas da luz até o momento da leitura.

## **6.6 Avaliação dos níveis de citocinas inflamatórias - CBA**

Para estes ensaios as células foram cultivadas em duplicata em placas de cultura de 24 poços, em uma densidade de  $3.10^4$  por poço. Após cerca de 24 horas de cultivo (60-80% de confluência), essas células foram tratadas com MP (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e então levadas a estufa de  $\text{CO}_2$ , onde foram mantidas pelos tempos de 3 h, 6 h, 24 h, 48 h e 72h. Após esses períodos, o meio foi coletado, centrifugado e o sobrenadante armazenado a  $-20^\circ\text{C}$ . A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de lowry e em seguida foi feito o ajuste de proteínas entre as amostras. Posteriormente, as amostras foram utilizadas para quantificação dos níveis de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-1 $\beta$ ), determinados utilizando o Kit da BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines, cuja leitura foi realizada utilizando o citometro de fluxo BD FACSCalibur™.

## **6.7 Medidas de estresse oxidativo intracelular - NBT**

As medidas de estresse oxidativo intracelular foram realizadas utilizando Nitroblue Tetrazólio (NBT), segundo Orona *et al.* (2014). As células foram cultivadas em triplicata em placa de 24 poços, em uma densidade de  $3.10^4$  por poço e incubadas em estufa até atingir 60 a 80% de confluência. Após crescimento, o meio foi substituído, as células foram tratadas com MP (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubadas em estufa de  $\text{CO}_2$  por tempos predeterminados (24 h, 48 h, 72 h). Após finalização de cada tempo de exposição o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com PBS e então incubadas com Nitroblue Tetrazólio (NBT) por 1 hora. Este composto reage com o ânion superóxido, sendo utilizado como um indicador de estresse oxidativo. A liberação intracelular de EROs é detectada pela formação de um precipitado de formazan azul após redução do NBT. O precipitado foi solubilizado com hidróxido de potássio (KOH) e Dimetilsulfóxido (DMSO) e a leitura foi realizada espectrofotometricamente com leitor de microplaca, em comprimento de onda de 655 nm.

## **6.8 Determinação do perfil de expressão de enzimas e proteínas antioxidantes - RT-qPCR**

Para determinação dos níveis de expressão de proteínas ou enzimas antioxidantes, as células foram cultivadas em placas de 60 mm em uma densidade de  $3.10^5$ , até atingir confluência de aproximadamente 80%. Após esse período, o meio foi substituído e as células foram tratadas com MP (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e mantidas na estufa de  $\text{CO}_2$  por diferentes tempos de

exposição: 3 h, 6 h, 24 h e 48 h. O ensaio foi realizado com as amostras em duplicata. O isolamento de RNA total foi realizado utilizando o reagente Trizol (Life Technologies). O RNA isolado foi tratado com DNase (Promega) e então submetido à reação de transcriptase reversa para síntese de cDNA (High capacity reverse transcription kit - Applied Biosystems). Esse cDNA foi então utilizado para determinação da expressão relativa dos genes que codificam para as proteínas glutathiona peroxidase (GPX1), superóxido dismutase (SOD1 e SOD2), catalase (CAT), ferredoxina redutase (FerR) e tioredoxina (Thio). As sequências nucleotídicas dos primers utilizados estão dispostas no quadro 4.

A RT-qPCR foi realizada no termociclador QuantStudio 5 (Thermofisher) utilizando power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) como intercalante e GAPDH e/ou  $\beta$ -actina como controle endógeno. Os experimentos foram analisados pelo método de quantificação relativa, utilizando o método  $\Delta\Delta CT$  pelo Software Applied Biosystems RQ.

**Quadro 4** - Sequências de primers utilizados nas reações de RT-qPCR.

(continua)

Primers		Sequências 5'-3'
GPX1	F	CGCCTGCTGGCCTCCCCTTA
	R	AGCCGAGCAGCACACATGGC
SOD1	F	GGAAGTCGTTTGGCTTGTGG
	R	GGGGCCTCAGACTACATCCA
SOD2	F	GAACCCAAAGGGGAGTTGCT
	R	TGAGCCTTGGACACCAACAG
CAT	F	CTTCGACCCAAGCAACATGC
	R	CGGTGAGTGTCAGGATAGGC
FerR	F	GTCTTCACTCGACTCTGCCTC
	R	CCTGAGCACCTGGAGAAC
Thio	F	TGAAGTCAAATGCATGCCAC

**Quadro 4** - Sequências de primers utilizados nas reações de RT-qPCR.  
(conclusão)

Primers		Sequências 5'-3'
<b>β-actina</b>	R	GGCTCCAGAAAATTCACCAC
	F	GAGCACAGAGCCTCGCCTTT
<b>GAPDH</b>	R	TCATCATCCATGGTGAGCTGG
	F	GCCGCATCTTCTTTTGCGT
	R	GTTGACTCCGACCTTCACCT

**Fonte:** A autora.

## 6.9 Análise Estatística

Os dados quantitativos foram expressos em valores médios (média ± DP). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Graphpad Prism (versão 5.0, San Diego, CA, USA), considerando o valor de  $p < 0.05$  estatisticamente significativo. Inicialmente os dados foram submetidos a um teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e as diferenças foram avaliadas através do teste ANOVA, para análises paramétricas, e pelo teste Kruskal-Wallis, com pós-hoc de Dunn, para análises não-paramétricas. Os resultados de todos os experimentos foram analisados considerando a média de dois a três experimentos independentes, realizados em duplicata ou triplicata.

## 7 RESULTADOS

Através dos ensaios metodológicos citados no tópico anterior, foi possível esclarecer alguns pontos importantes acerca dos efeitos do MP-Recife e do MP-Diesel nas células alveolares (A549). Os principais resultados obtidos neste trabalho estão descritos na sequência.

### 7.1. Concentração de MP<sub>2,5</sub> no ar de Recife

Durante o período de coleta, a concentração de MP<sub>2,5</sub> ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) amostrado variou entre 24  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  e 5  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , chegando a uma concentração média de aproximadamente 12,9  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Valor que ultrapassa a concentração média anual determinada pela OMS (10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) e adotada pela resolução Conama n° 491/18 como padrão de qualidade do ar final (PF). Esse número representa mais da metade da média estipulada no PI-1 (20  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ), que se encontra em vigor atualmente. E chega bem próximo da média anual estabelecida pela Resolução Conama n° 491/18 como PI-3 (15  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) que, apesar de ainda não estar em vigor, representa uma concentração bastante elevada (BRASIL, 2018; CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2019a).

Observamos ainda que nos dias iniciais de coleta, a concentração do MP<sub>2,5</sub> chegou muito próximo da média diária determinada pela OMS (25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) e adotada pela resolução Conama n° 491/18 como PF. No entanto, esse valor não foi ultrapassado em nenhuma das amostragens, mostrando que, no que diz respeito ao valor diário preconizado pela legislação brasileira, a concentração de MP<sub>2,5</sub> circulante em Recife se encontra dentro dos padrões estabelecidos. No entanto, um período maior de amostragem é necessário para confirmar esses resultados. Esses dados podem ser observados no quadro 5.

**Quadro 5** - Relação de massa, volume e concentração de MP<sub>2,5</sub> amostrado da atmosfera de Recife.

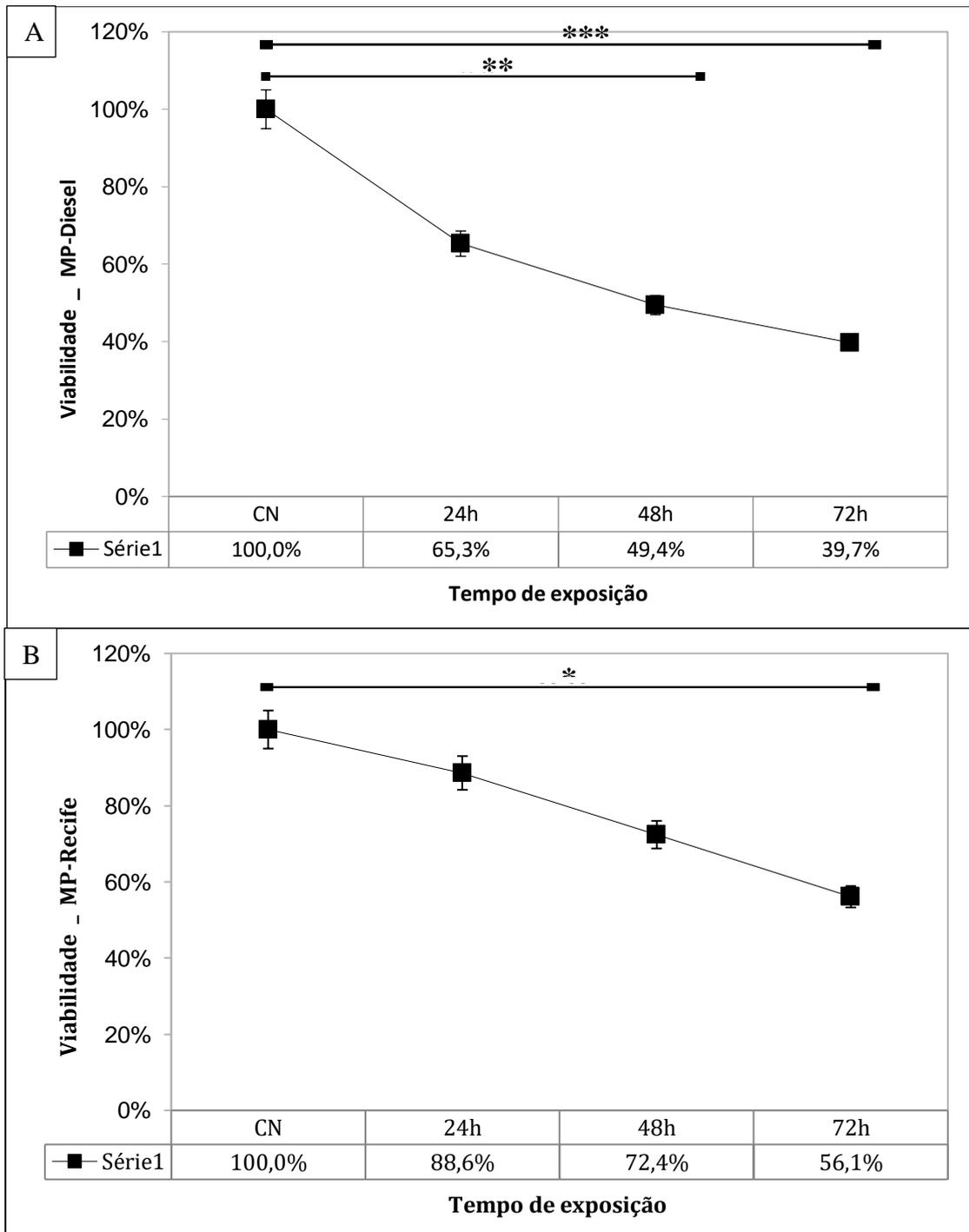
Filtro	Nº Serial	Massa (µg)	Volume amostrado (m <sup>3</sup> )	Concentração de MP <sub>2,5</sub> (µg/m <sup>3</sup> )	Período de amostragem
1	P6412473	495,67	23,39	21,19	14 a 17/10/2019
2	P6412471	616,00	25,6	24,06	21 a 24/10/2019
3	P6412470	583,00	25,89	22,52	25/10 a 1/11/2019
4	P6412475	375,50	28,08	13,37	04-07/11/2019
5	P6412472	468,00	31,31	14,95	8-13/11/2019
6	P6412474	383,00	30,5	12,56	14-20/11/2019
7	P6412468	254,00	31,47	8,07	21-26/11/2019
8	P6412469	329,00	33,43	9,84	27/11 a 03/12
9	P6412467	240,00	30,59	7,85	5-10/12/2019
10	P6412469	329,00	37,09	8,87	11-18/12/2019
11	P6412463	241,00	27,94	8,63	20/12 a 03/01/20
12	P6412464	568,00	34,29	16,56	06-10/01/2020
13	P6412465	160,00	28,72	5,57	13-16/01/2020
14	P6412462	201,00	33,18	6,06	17-23/01/2020

Fonte: A autora.

## 7.2 Viabilidade das células A549 expostas a MP- Diesel e MP- Recife

O efeito citotóxico dos MPs foi avaliado a partir da medida da viabilidade celular, utilizando o ensaio de XTT. Os ensaios realizados a partir de células A549 expostas a MP-Diesel (figura 10A), corroborando estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (dados ainda não publicados), mostraram que esse MP reduziu consideravelmente a viabilidade celular, à medida que se aumentou o tempo de exposição. Os resultados apresentaram-se estatisticamente significativos em 48 e 72 horas de exposição, com mais de 60% da população celular tendo sua viabilidade comprometida após este último tempo de exposição.

Resultados semelhantes aos obtidos a partir de ensaios com o MP-Diesel foram encontrados na exposições das células A549 ao MP-Recife: Esse MP se mostrou tóxico, reduzindo a viabilidade da população celular de forma estatisticamente significativa em 72 h de exposição, chegando a afetar quase 50% das células, como pode ser observado na figura 10B.

**Figura 10 - Viabilidade das células A549 expostas a MP-Diesel e MP-Recife.**

**Fonte:** A autora.

**Nota:** Viabilidade de células A549 expostas a 300 µg/mL de (A) MP-Diesel e (B) MP-Recife, mensurada pelo ensaio colorimétrico XTT e lida a 500 nm, com correção em 630 nm. Os resultados foram analisados considerando a média de três experimentos independentes, realizados em triplicata e as análises estatísticas foram realizadas através do teste de Kruskal-Wallis, com pós-hoc de Dunn (\*\*\*P = < 0,0001; \*\*P= 0,0002 \*P= 0,0216).

**Legenda:** CN= Controle negativo (células não expostas a MP, mantidas em cultura por 72 h).

### 7.3 Quantificação de morte celular em células A549 expostas a MP- Diesel e MP- Recife

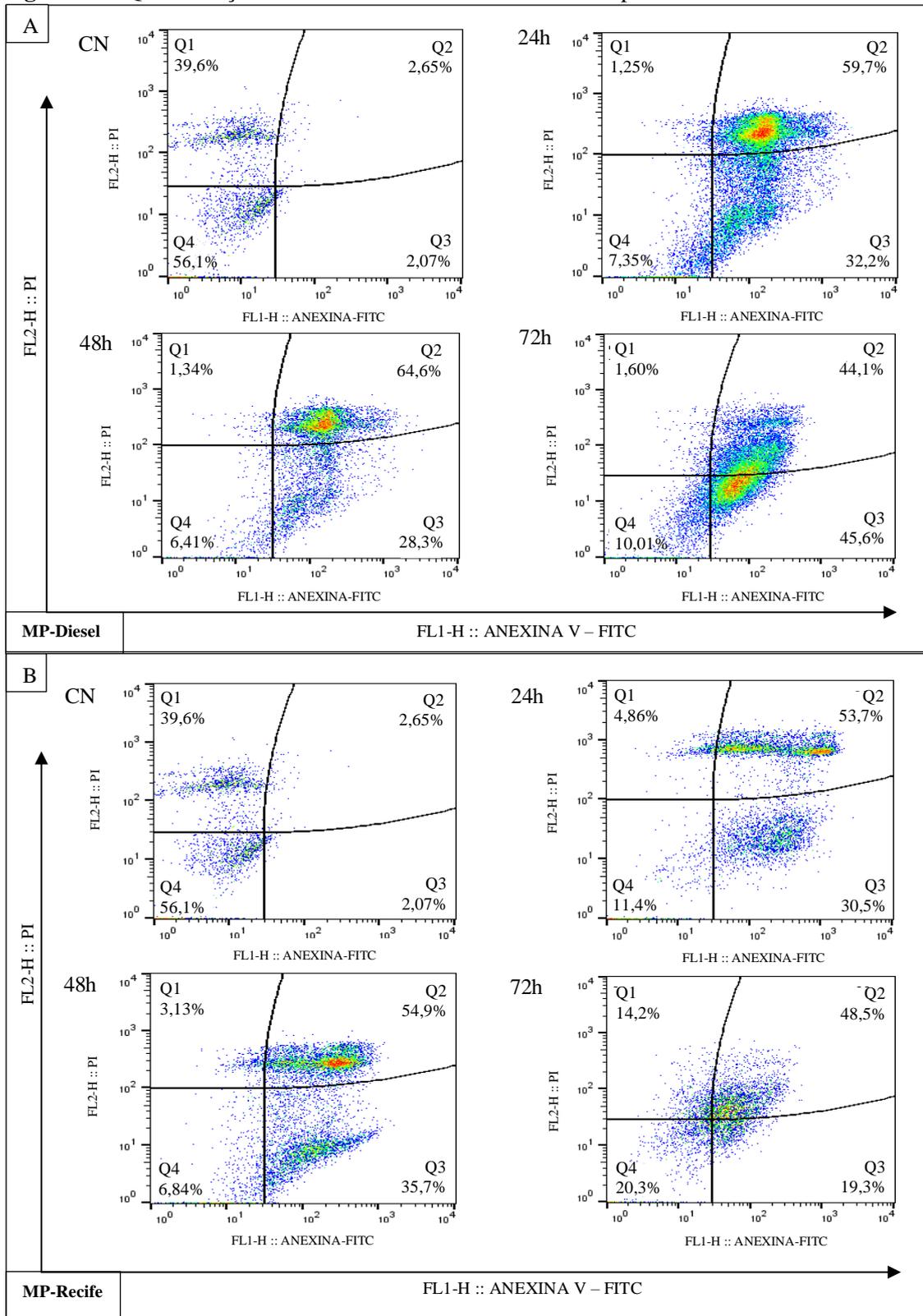
Após observar que os MPs de ambas as fontes são capazes de reduzir a viabilidade celular e sabendo que MP-Diesel, segundo dados ainda não publicados do nosso grupo de pesquisa, induz apoptose em células A549, foi investigado a capacidade apoptótica do MP-Recife frente as células alveolares. A fim de avaliar se a mortalidade induzida pelo MP-Recife se dá por via de necrose ou apoptose nós conduzimos ensaios de morte celular utilizando marcação dupla com Anexina V e Iodeto de propídio (PI).

A marcação das células com Anexina V-FITC/PI nos permitiu a distinção de quatro grupos celulares: células viáveis, localizadas no quadrante inferior esquerdo, que não foram marcadas por anexina ou iodeto de propídio; células em apoptose, localizadas no quadrante inferior direito, marcadas intensamente por anexina V-FITC; células inviáveis, que se encontram no quadrante superior esquerdo, marcadas por PI e células em apoptose tardia, presentes no quadrante superior direito, marcadas por PI e por anexina V-FITC (figura 11).

Os resultados mostraram que, na exposição ao MP-Diesel, a maioria das células apresentou marcação dupla para AnexinaV/PI, sendo 59,7%, 64,6% e 44,1%, em 24h, 48h e 72h, respectivamente, indicando uma porcentagem significativa de células induzidas à apoptose tardia. O número de células que responderam apenas a Anexina V, ou seja, que estavam, sugestivamente, em um estágio inicial de apoptose, também foi relevante: 32,2%, 28, 2% e 45,6%, nesta ordem (figura 11A). Os resultados da exposição das células ao MP-Recife foram bastante semelhantes aos do MP-Diesel: a maior parte das células se encontravam em apoptose tardia, sendo 53,7% em 24 h, 54,9% em 48 h e 48,5 em 72 h e apoptose inicial, sendo 30,5% 35,7% e 19,3%, respectivamente (figura 11B). No controle negativo os resultados foram 39,6% (PI), 2,65% (AnexinaV/PI) e 2,07% (AnexinaV).

No último tempo de exposição avaliado (72 h) foi observada uma mudança no perfil de distribuição celular: as células diminuíram de tamanho, ficando menos distribuídas, outro evento característico de células apoptóticas. Dessa forma, pode-se inferir que, na exposição a ambos os MPs, a maior parte das células foi induzida a um processo de apoptose inicial e/ou tardia, com um total de 10,01% de células viáveis na exposição ao MP-Diesel e 20,3% frente ao MP-Recife. No controle negativo as células viáveis representam 56,1%, como mostrado na figura 11.

**Figura 11** - Quantificação de morte celular em células A549 expostas a MP-Diesel e MP-Recife.



**Fonte:** A autora.

**Nota:** Quantificação de morte celular em células A549 expostas a 300 µg/mL de (A) MP-Diesel e (B) MP-Recife por 24 h, 48 h e 72 h. As células foram duplamente marcadas com Anexina V- FITC e Iodeto de propídio e as leituras foram realizadas por citometria de fluxo.

**Legenda:** CN= Controle negativo (células não expostas a MP, mantidas em cultura por 72 h).

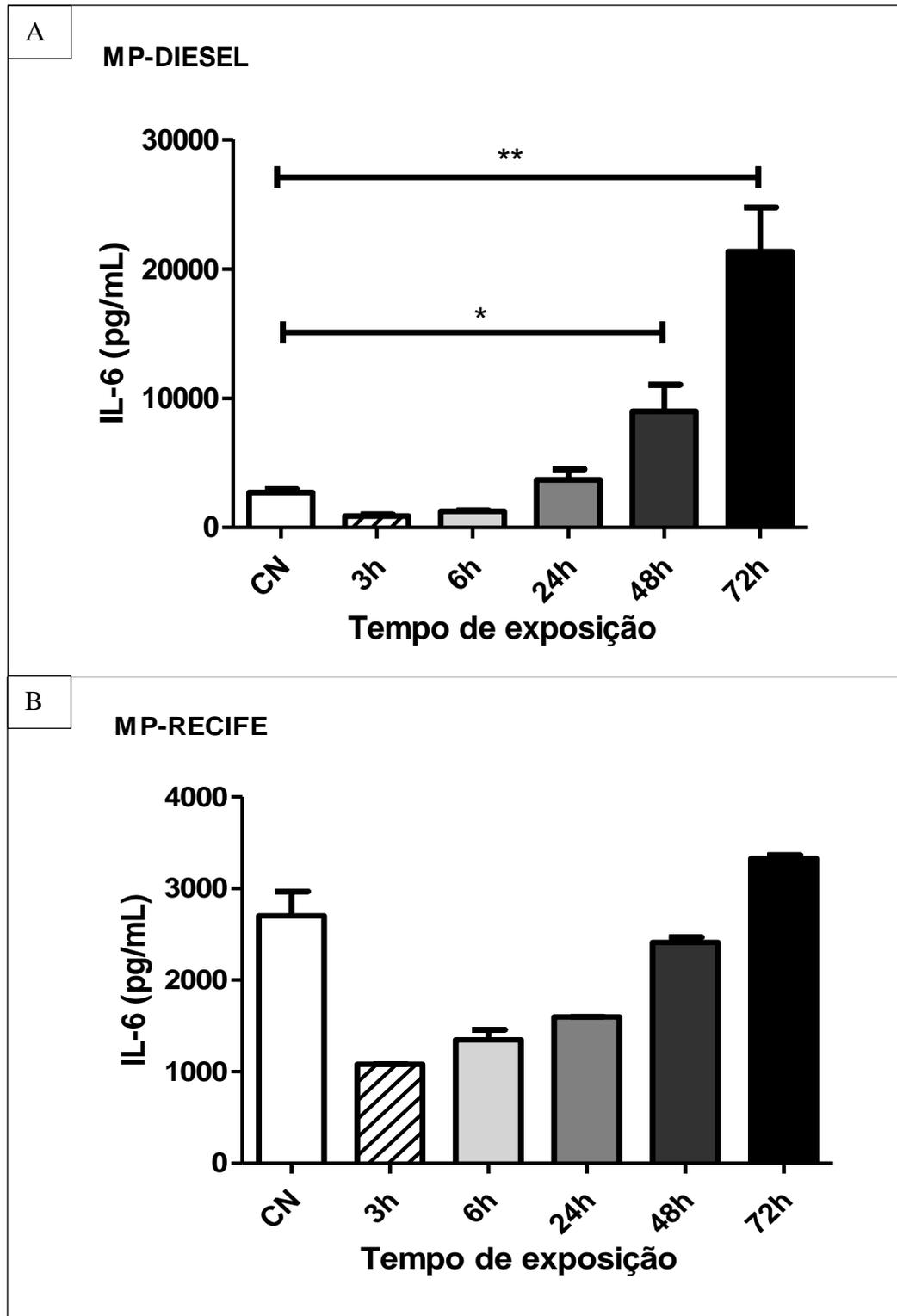
#### **7.4 Dosagem dos níveis de citocinas inflamatórias em células A549 expostas a MP-Diesel e MP-Recife**

Diante dos resultados de toxicidade e morte celular, nosso próximo passo foi investigar o efeito citotóxico das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-1 $\beta$  após exposição de culturas de células A549 ao MP-Recife e ao MP-Diesel. Não foram encontrados níveis detectáveis de TNF- $\alpha$ , IL-10 ou IL-1 $\beta$  nas amostras analisadas. Por outro lado, foi observado elevação crescente nos níveis de IL-6 em células expostas ao MP-Diesel já a partir de 24 h de exposição. Estatisticamente os resultados foram significativos ( $p < 0,05$ ) nas amostras expostas por 48 e 72 horas (figura 12A) em relação ao controle negativo, que se trata de células não expostas ao MP mantidas em cultura por 72 h. As células expostas ao MP-Recife também apresentaram elevação nos níveis de IL-6 em 72 h de exposição, no entanto, esses valores não foram significativos quando comparados ao controle negativo, como mostrado na figura 12B.

Complementando nossos resultados do perfil inflamatório, nossos achados demonstraram, ainda, haver um aumento significativo na produção de IL-8 em 72 h de exposição, tanto nas células expostas ao MP-Diesel (figura 13A), quanto nas expostas ao MP-Recife (Figura 13B).

É importante salientar que as dosagens realizadas a partir do sobrenadante dos nossos controles negativos (células não expostas a MP), mostraram uma produção acentuada de IL-6 e IL-8, que deve ser melhor investigada.

**Figura 12** - Níveis de IL-6 em células A549 expostas a MP-Diesel e MP-Recife.

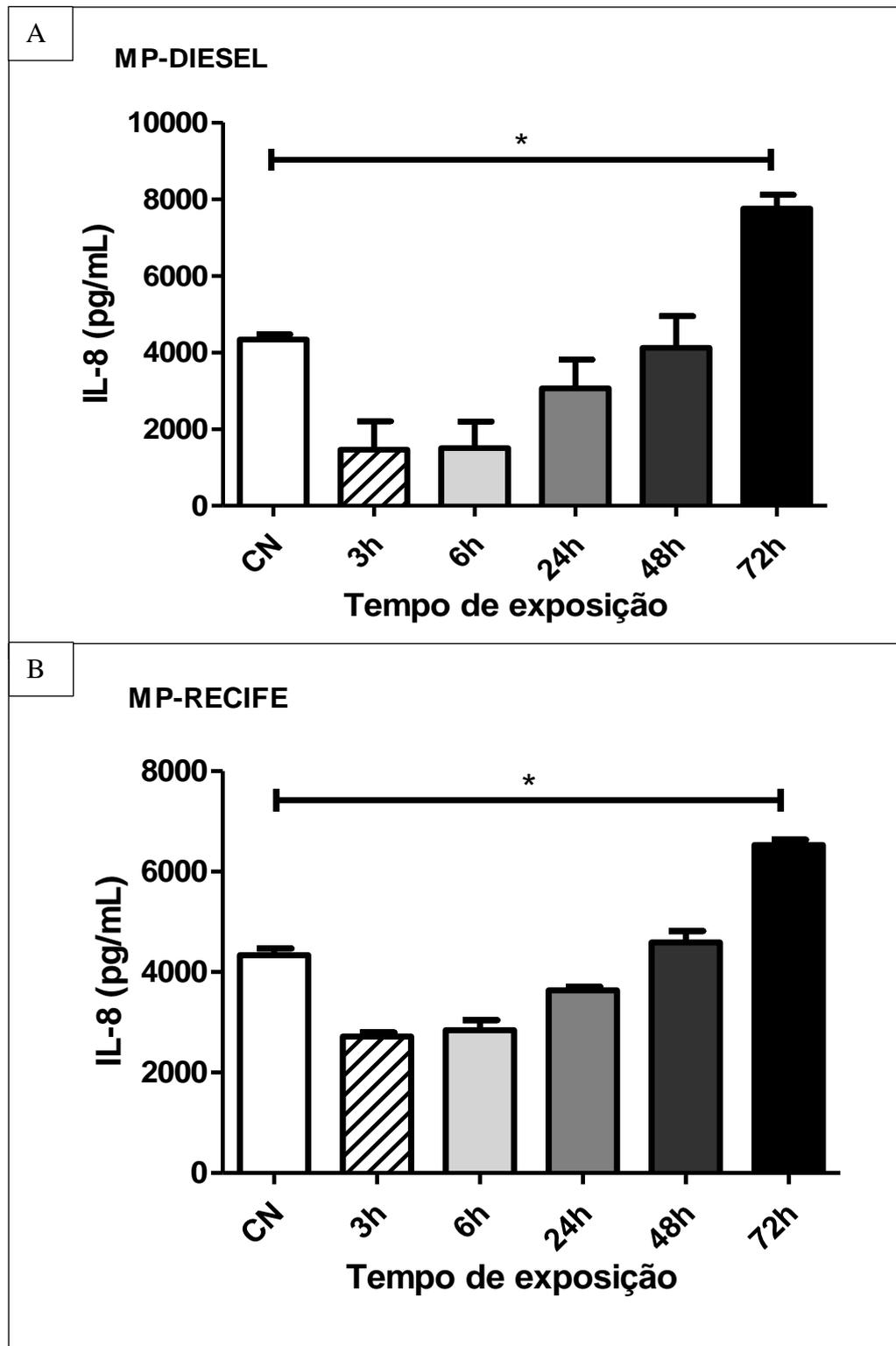


**Fonte:** A autora.

**Nota:** Produção de IL-6 em células A549 expostas a 300 µg/mL de (A) MP-Diesel e (B) MP-Recife. Os níveis foram mensurados por CBA e lidos através de citometria de fluxo. O ensaio foi feito em duplicata e as análises estatísticas foram realizadas através do teste de Kruskal-Wallis, com pós-hoc de Dunn (\*P= 0,0233; \*\*P= 0,0043).

**Legenda:** CN= Controle negativo (células não expostas a MP, mantidas em cultura por 72 h).

**Figura 13** - Níveis de IL-8 em células A549 expostas a MP-Diesel e MP-Recife.



**Fonte:** A autora.

**Nota:** Produção IL-8 em células A549 expostas a 300 µg/mL de (A) MP-Diesel e (B) MP-Recife. Os níveis foram mensurados por CBA e lidos através de citometria de fluxo. O ensaio foi feito em duplicata e as análises estatísticas foram realizadas através do teste de Kruskal-Wallis, com pós-hoc de Dunn (A: \* P=0,0246 B: \*P=0,0171).

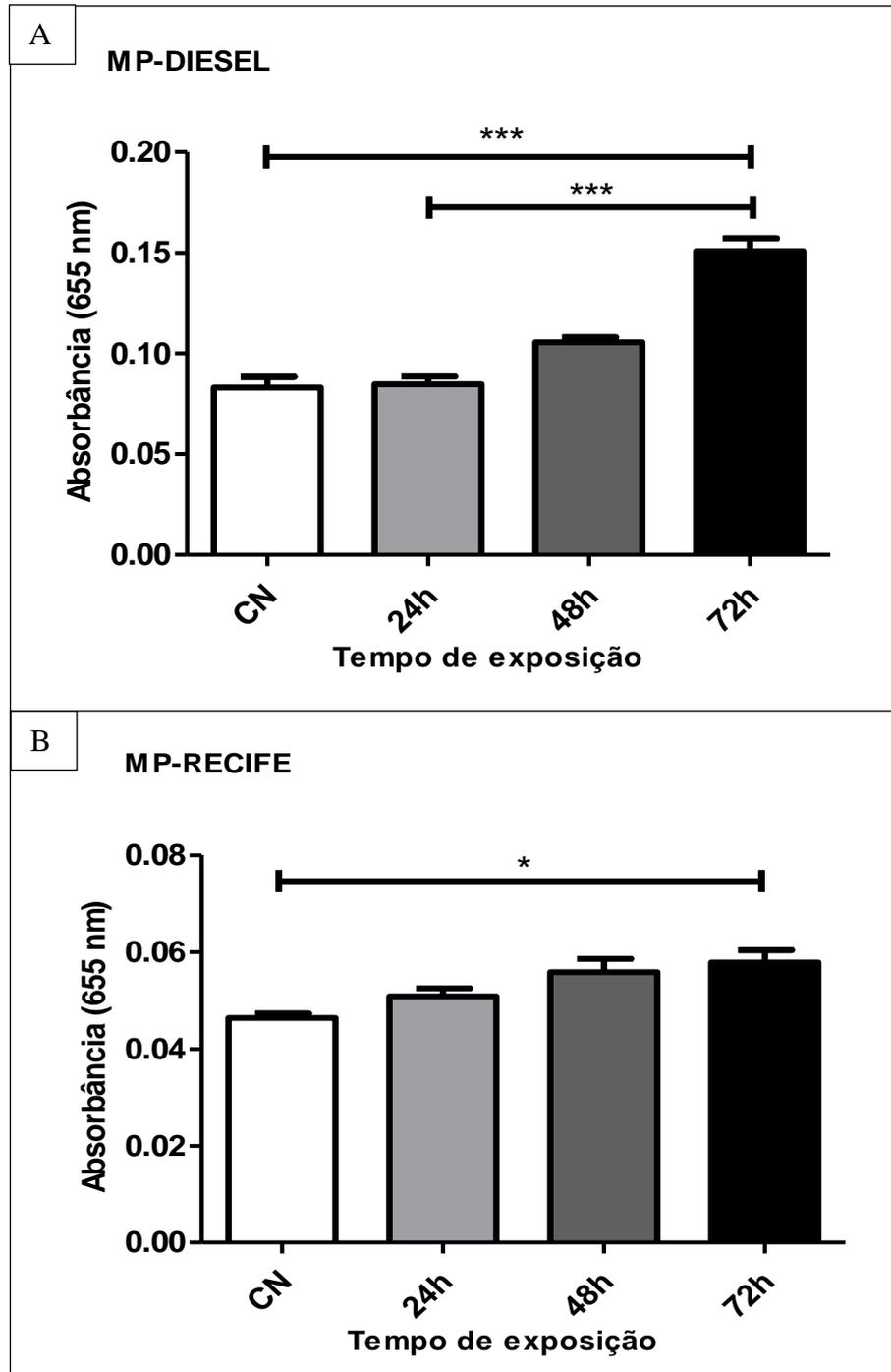
**Legenda:** CN= Controle negativo (células não expostas a MP, mantidas em cultura por 72 h).

### **7.5 Medidas de estresse oxidativo intracelular em células A549 expostas a MP-Diesel e MP-Recife**

Outro ponto investigado neste trabalho foi a indução de estresse oxidativo intracelular mediada pelos MPs. A geração de ânion superóxido, um importante indutor do estresse oxidativo, foi medida através do ensaio colorimétrico de NBT. Os resultados indicaram elevação nos níveis de estresse oxidativo intracelular em células expostas a MP-Diesel, de acordo com o aumento do tempo de exposição. As análises estatísticas revelaram aumento significativo para o tempo de 72 h de exposição em relação ao controle negativo e em relação ao tempo de 24 h de exposição, como pode ser observado na figura 14A.

De forma semelhante aos resultados com MP-Diesel, os ensaios de NBT realizados em células expostas ao MP-Recife demonstraram haver aumento nos níveis de estresse oxidativo intracelular, sendo diretamente proporcional ao tempo de exposição. As análises estatísticas foram significativas para o tempo de 72 h de exposição das células a esse MP. Estes resultados são mostrados na figura 14B.

**Figura 14** - Níveis de estresse oxidativo intracelular em células expostas a MP-Diesel e MP-Recife.



**Fonte:** A autora.

**Nota:** Níveis de estresse oxidativo intracelular em células A549 expostas a 300 µg/mL de (A) MP-Diesel e (B) MP-Recife. Os níveis foram mensurados por ensaio colorimétrico de NBT e lidos a 655 nm. Os resultados foram analisados considerando a média de três experimentos independentes, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas através do teste de Kruskal-Wallis, com pós-hoc de Dunn (\*P=0,0103; \*\*\* P = < 0,0001).

**Legenda:** CN= Controle negativo (células não expostas a MP, mantidas em cultura por 72 h).

## **7.6 Perfil de expressão dos genes que codificam para proteínas antioxidantes em células A549 expostas a MP-Diesel e MP-Recife**

Após constatar que os MPs de ambas as fontes são capazes de induzir estresse oxidativo nas células alveolares, o próximo passo foi avaliar o perfil de expressão dos genes que codificam para as principais enzimas do sistema antioxidante, a fim de verificar se há alteração na sua ativação frente à exposição das células alveolares ao MP-Diesel e ao MP-Recife. Ressalta-se que não há, do nosso conhecimento, nenhum estudo publicado fazendo esse tipo de correlação com material particulado.

Após exposição das células A549 ao MP-Diesel, os estudos moleculares indicaram um aumento significativo nos níveis de ativação transcricional de glutathione peroxidase (GPX1), superóxido dismutase 1 (SOD1) (isoforma citoplasmática), ferredoxina redutase (FerR) e tioredoxina (Thio) nas amostras tratadas com MP-Diesel durante 24 h, em relação ao controle negativo (figuras 15A, 15B, 15E e 15F, nesta ordem). Superóxido dismutase 2 (SOD2) (isoforma mitocondrial), por sua vez, apresentou elevação logo nas primeiras horas de exposição ao MP, com pico em 3 h, reduzindo consideravelmente no tempo de 6h e voltando a aumentar à medida que a exposição permanece (figura 15C). Enquanto isso, catalase (CAT) apresentou aumento crescente nos níveis de transcrição gênica, que se elevou de acordo com o tempo de exposição, mostrando valores significativos nas amostras expostas por 48 h, como pode ser observado na figura 15D.

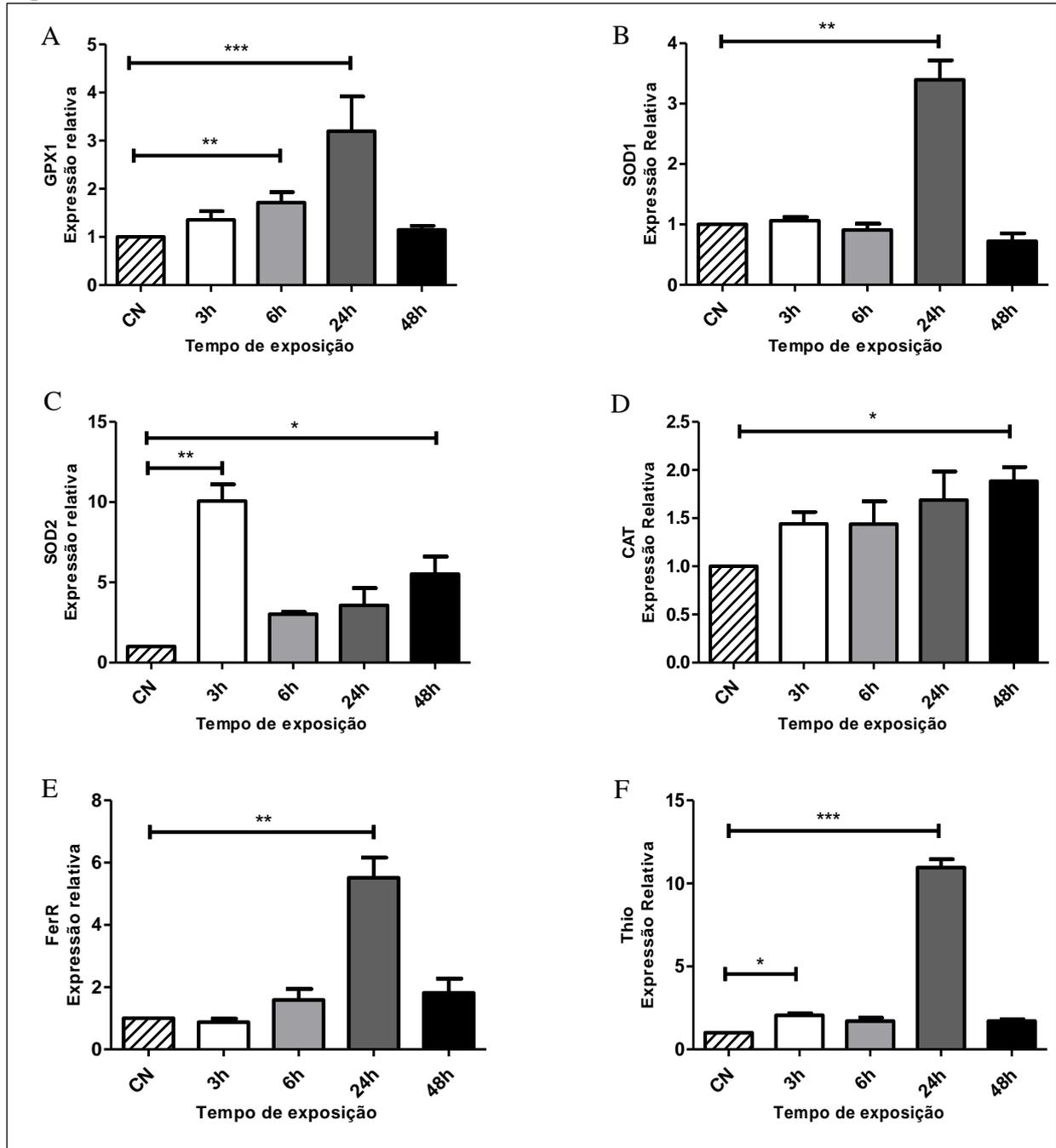
Com relação às células expostas ao MP-Recife, os resultados mostraram que todos os alvos elevaram significativamente sua expressão 48 h após a exposição, com exceção de SOD1. Essa enzima demonstrou repressão gênica frente à exposição das células a esse MP, uma vez que todas as amostras analisadas apresentaram valores abaixo do controle negativo (figura 16B).

GPX1 mostrou elevação logo no tempo de 3 h, reduzindo no período de 6 h e 24 h e voltando a se elevar significativamente em 48 h (figura 16A). O gene SOD2 permaneceu inativo nas 6 h iniciais de exposição, começando a ser expresso apenas a partir das 24h de exposição, para atingir pico significativo em 48 h (figura 16C). Já CAT, assim como no ensaio com MP-Diesel, apresentou crescimento constante desde o tempo inicial, no entanto, apesar de apresentar valores significativos também no tempo de 48 h, como a maioria dos genes avaliados, seu pico de ativação foi em 24 h, como pode ser observado na figura 16D.

FerR e Thio, assim como no ensaio com MP-Diesel, se elevaram de maneira correspondente às outras enzimas. Dessa forma, ambas apresentaram elevação significativa nas

amostras expostas ao MP-Recife por até 48 h (figuras 16E e 16F) e em 24 h quando expostas ao MP-Diesel (figuras 15E e 15F).

**Figura 15** - Expressão relativa dos genes que codificam para proteínas antioxidantes em células A549 expostas a MP-Diesel.

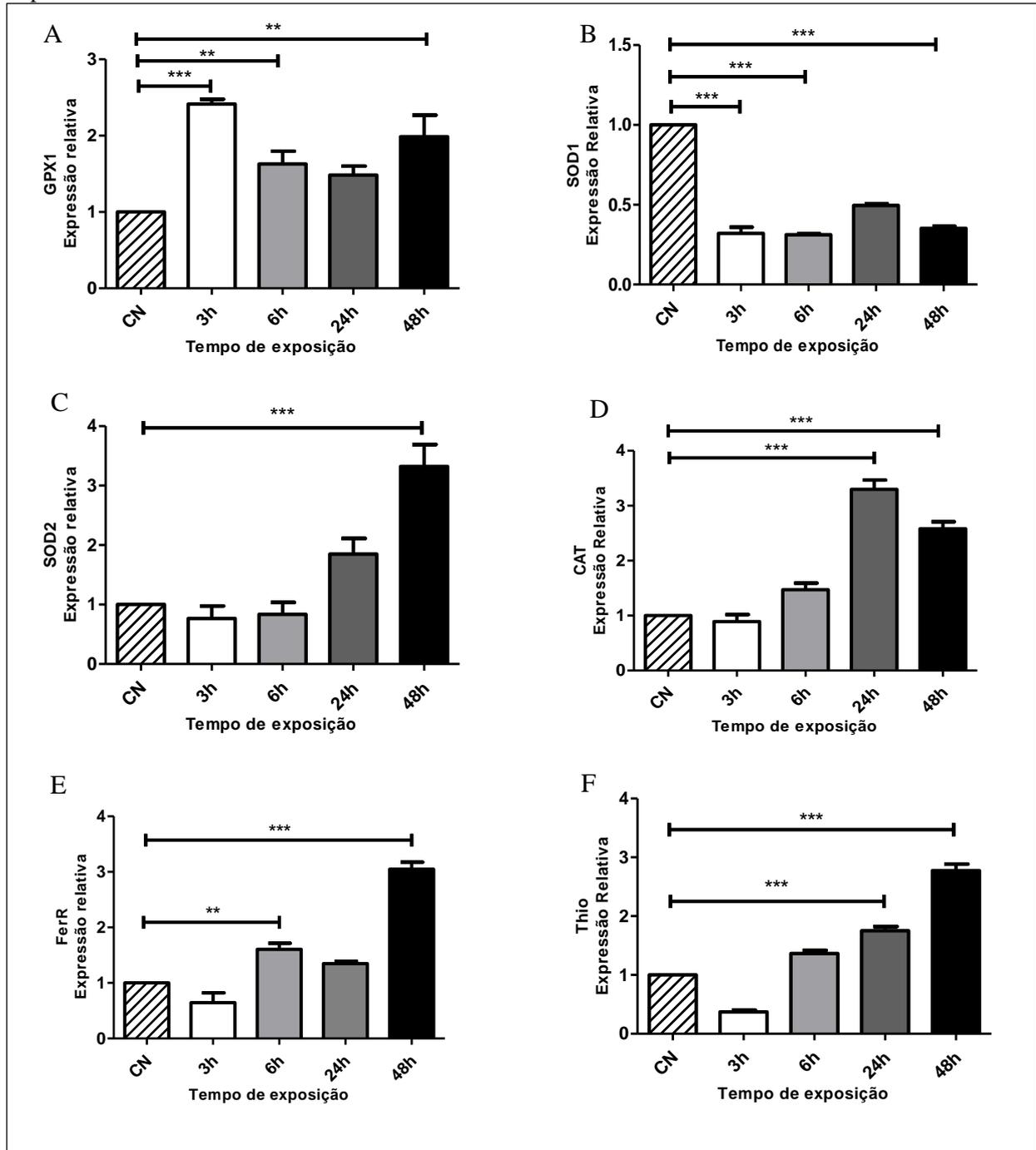


**Fonte:** A autora.

**Nota:** Análise da expressão gênica de (A) Glutationa peroxidase (GPX1), (B) Superóxido dismutase 1 (SOD1), (C) Superóxido dismutase 2 (SOD2), (D) Catalase (CAT), (E) Ferredoxina redutase (FerR) e (F) Tioredoxina (Thio) em células A549 expostas a 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de MP-Diesel. As análises estatísticas foram realizadas através do teste de Kruskal-Wallis, com pós-hoc de Dunn (A: \*\*\*  $P = < 0,0001$ , \*\* $P = 0,0031$ ; B: \*\* $P = 0,0013$ ; C: \*\* $P = 0,0053$ , \* $P = 0,0127$ ; D: \* $P = 0,0232$ ; E: \*\* $P = 0,0073$ ; F: \*\*\* $P = < 0,0001$ , \* $P = 0,012$ ), considerando a média de dois a três ensaios independentes realizados em triplicata.

**Legenda:** CN = Controle negativo (células não expostas a MP, mantidas em cultura por 48 h).

**Figura 16** - Expressão relativa dos genes que codificam para proteínas antioxidantes em células A549 expostas a MP-Recife.



**Fonte:** A autora.

**Nota:** Análise da expressão gênica de (A) Glutathiona peroxidase (GPX1), (B) Superóxido dismutase 1 (SOD1), (C) Superóxido dismutase 2 (SOD2), (D) Catalase (CAT), (E) Ferredoxina redutase (FerR) e (F) Tioredoxina (Thio) em células A549 expostas a 300 µg/mL de MP-Recife. As análises estatísticas foram realizadas através do teste de Kruskal-Wallis, com pós-hoc de Dunn (A:\*\*\* P= 0,0009, \*\* P= <0,0028; B: \*\*\*P= <0,0005; C: \*\*\*P= 0,0005 D: \*\*\*P=< 0,0007; E: \*\*\*P=0,0001 \*\*P= 0,0013; F: \*\*\*P= <0,0005), considerando a média de dois ensaios independentes realizados em triplicata.

**Legenda:** CN= Controle negativo (células não expostas a MP, mantidas em cultura por 48 h).

## 8 DISCUSSÃO

O estudo dos efeitos do MP nas células pulmonares tem aberto muitos espectros na ciência. Diversas pesquisas tem demonstrado que o MP atua de forma nociva, de modo a desencadear inúmeros efeitos patogênicos quando inalado, com desenvolvimento e agravamento de doenças não apenas respiratórias e pulmonares, mas também cardiovasculares, neurodegenerativas, hepáticas, imunológicas e metabólicas, além de ser um fator de risco para diversos tipos de câncer (CAMPAGNOLO *et al.*, 2019; CHEN; LI; SANG, 2016; ESTRELLA *et al.*, 2019; GHORANI-AZAM; RIAHI-ZANJANI; BALALI-MOOD, 2018; KELLY; FUSSELL, 2015; KIM *et al.*, 2016; KOWALSKA *et al.*, 2017; LIN *et al.*, 2017; MCGUINN *et al.*, 2019; MENDES *et al.*, 2017; NIE *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2018; XIAN *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019). Dessa forma, no presente estudo nós coletamos MP<sub>2,5</sub> da atmosfera de Recife e avaliamos seus efeitos nas células alveolares, focando em morte celular, estresse oxidativo e respostas inflamatórias geradas, assim como realizado com MP-Diesel.

A partir de dados fornecidos pelo amostrador usado nas coletas do MP do ar de Recife, foi possível determinar a concentração média do MP<sub>2,5</sub> circulante na cidade. A partir disso, observamos que a concentração do MP<sub>2,5</sub> na atmosfera de Recife ultrapassa os valores médios anuais preconizados pela OMS e pela resolução Conama n° 491/18 para o Padrão de qualidade do ar final (PF), chegando bem próximo do padrão intermediário 3 (PI-3). Mas está de acordo com o estabelecido no padrão intermediário 1 (PI-1), padrão que está em vigor atualmente no Brasil. Além disso, vimos que a concentração de MP<sub>2,5</sub> não ultrapassa o valor de referência para a concentração de MP<sub>2,5</sub> por 24 h em nenhum dos dias de amostragem. Apesar disso, a média encontrada para Recife reflete uma realidade preocupante.

De acordo com os resultados de pesquisas de Dockery *et al.* 1993, usadas pela OMS como referência para criação das diretrizes de qualidade do ar, os efeitos na saúde podem ser esperados quando as concentrações médias anuais de MP<sub>2,5</sub> estão na faixa de 11 a 15 µg/m<sup>3</sup>, embora os efeitos adversos à saúde não sejam totalmente descartados abaixo desses níveis (DOCKERY *et al.*, 1993 *apud* ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2006). Alguns estudos recentes corroboram essa hipótese: Hanigan *et al.* (2019) conduziu um estudo de corte na cidade de Sydney, na Austrália, onde as concentrações de MP<sub>2,5</sub> são relativamente baixas, 4,5 µg/m<sup>3</sup> em média. Esse estudo acompanhou, por um período de 7 anos, mais de 75 mil participantes entre 45 e 79 anos de idade, com a ocorrência de 3282 mortes no período. Os autores demonstraram uma correlação entre os níveis de MP<sub>2,5</sub> e a mortalidade ocorrida. Apesar

de os modelos utilizados não terem apresentado significância estatística, os autores atribuíram isso a pequenas diferenças de exposição à poluição ou a fatores associados aos pesos atribuídos às covariáveis analisadas. Estes achados evidenciam que a exposição à poluição atmosférica de baixo nível está associada ao aumento do risco de mortalidade e redução de expectativa de vida. Resultados semelhantes foram encontrados para exposição aguda ao MP: Huttunen *et al.* (2012), demonstrou que mesmo baixos níveis de MP<sub>2,5</sub> na atmosfera, típicos de cidades menores, estão associados à inflamação sistêmica aguda. Seu estudo, realizado com 52 idosos com cardiopatia isquêmica na cidade de Kotka, na Finlândia, onde a concentração média diária de MP<sub>2,5</sub> no ambiente foi de 8,7 µg/m<sup>3</sup>, mostrou que o MP<sub>2,5</sub> esteve fortemente associado ao aumento dos níveis de marcadores inflamatórios dentro de alguns dias após a exposição.

Para concentração anual de MP<sub>2,5</sub>, a resolução Conama n° 491/18 adota os mesmos padrões estabelecidos pela OMS no que diz respeito ao PF e PI-3, mas com relação ao PI-1 e PI-2 os valores adotados são menores. A OMS determina que a definição de padrões precisa visar o alcance das menores concentrações possíveis, no contexto de restrições locais, capacidades e prioridades de saúde pública. Os países devem adotar padrões cada vez mais rigorosos, acompanhando o progresso através do monitoramento contínuo de reduções de emissões e concentrações decrescentes de MP (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2006). Infelizmente, esse acompanhamento no Brasil é muito deficiente, uma vez que muitos dos grandes centros urbanos do país, inclusive Recife, não possuem rede fixa de monitoramento do ar.

Vale ressaltar que os valores determinados nos padrões intermediários da OMS refletem as concentrações nas quais são esperadas respostas de mortalidade devido à poluição do ar por MP<sub>2,5</sub>, com base nos achados científicos. Assim, a determinação de um padrão de concentração média de MP<sub>2,5</sub> a longo prazo (10 µg/m<sup>3</sup>) também confere peso aos resultados de estudos diários de exposição, que examinam as relações entre a exposição ao MP e resultados adversos agudos à saúde. Nesses estudos, as médias de longo prazo (3 a 4 anos) estão na faixa de 13 a 18 µg/m<sup>3</sup> (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2006), valor que chegou bem próximo ao do MP coletado em Recife, apesar de o período analisado ser menor. Destacamos que o período em que a concentração de MP<sub>2,5</sub> esteve menor em Recife é referente ao período de férias, dessa forma, a quantidade de veículos circulantes na cidade e em especial na BR-101, próximo ao local de coleta na UFPE, estava bem menor que o normal. Já os primeiros dias de amostragem se deram durante o período letivo, no qual a movimentação de veículos na Universidade estava maior e o trânsito estava mais congestionado, como de costume. Esse fato sugere que, em dias normais, a concentração média de MP<sub>2,5</sub> no local amostrado em Recife deve variar entre 10 e

25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , no entanto, um período maior de amostragem será necessário para confirmar essa hipótese.

Após coleta e processamento do MP-Recife, estudos foram realizados a fim de esclarecer aspectos importantes associados a esse material e seus possíveis efeitos à saúde da população de Recife. Para tal, usamos células da linhagem A549, um modelo celular amplamente utilizado para o estudo da toxicidade associada à poluição atmosférica, e MP proveniente de duas fontes distintas: o MP-Diesel e o MP-Recife, ambos em uma concentração de 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . O MP-Diesel é um importante componente da poluição do ar externo, sendo considerado o principal contribuinte ao MP associado ao tráfego de áreas urbanas (UPADHYAY *et al.*, 2018). Segundo O'Driscoll *et al.* (2018), até 40% do MP atmosférico das cidades é composto por MP-Diesel, com este valor variando de cidade para cidade (CARVALHO, 2019). A fração orgânica desse MP exclui todos os metais e inorgânicos e retém a maioria dos compostos orgânicos, como os HAPs, aumentando resposta inflamatória e estresse oxidativo, principal efeito da toxicidade induzida por essas partículas, e provocando alterações na função pulmonar (NEMMAR *et al.*, 2018; O'DRISCOLL *et al.*, 2018; SKOVMAND *et al.*, 2017). Dessa forma, o mecanismo pelo qual o MP-Diesel afeta a saúde humana tem sido amplamente estudado, sendo utilizado como partículas de referência para efeito de comparação das respostas oxidativas e inflamatórias de outros tipos de MP, como o de diversas cidades ao redor do mundo. Já o MP-Recife não possui caracterização conhecida, o que ainda será feito por nosso grupo de pesquisa, assim como não possui nenhum estudo publicado caracterizando seus efeitos biológicos.

No presente estudo nós demonstramos que o MP-Recife, de forma semelhante ao MP-Diesel, se mostrou tóxico às células A549, sendo capaz de reduzir a viabilidade celular de acordo com o tempo de exposição. Vimos também que ambos os MPs aumentaram significativamente a geração de EROs nesta linhagem de células, induzindo estresse oxidativo intracelular. Estes achados são semelhantes aos resultados de outros estudos realizados a partir do MP de cidades como Rio de Janeiro e São Paulo, no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2018; RODRÍGUEZ-COTTO *et al.*, 2014), Jiangmen e Nanquim, na China (HU *et al.*, 2017; YUAN *et al.*, 2019) e Buenos Aires, na Argentina (ORONA *et al.*, 2014).

Outro ponto investigado neste estudo foi o potencial apoptótico dos MPs. Não há estudos anteriores caracterizando o perfil de morte celular associado a exposição de células pulmonares ao MP-Recife. Mas estudos recentes com MP-Diesel mostraram que a apoptose desencadeada por essas partículas em células A549 é independente de p53. Por outro lado, verificou-se, através de ensaios de RT-qPCR, ativação transcricional das proteínas pró-

apoptóticas da família Bcl-2, Noxa e Puma, além dos receptores de morte celular Fas e DR5, demonstrando a importância da ativação destas proteínas para o processo de apoptose desencadeado por MP-Diesel (em fase de elaboração)<sup>1</sup>.

Aqui, a partir dos ensaios com anexinaV/PI, demonstramos que o MP-Recife provoca respostas de morte celular bastante semelhantes às induzidas pelo MP-Diesel em todos os tempos de exposição, induzindo as células alveolares a um processo de apoptose inicial e tardia. Porém, levando em consideração que o percentual de células viáveis na exposição ao MP-Recife é mais que o dobro da percentagem vista na exposição ao MP-Diesel, bem como os resultados dos ensaios de toxicidade, podemos sugerir que essa indução de morte celular por MP-Recife se dá de forma mais branda.

O protocolo de Anexina V/PI é amplamente utilizado para determinar se as células são viáveis, apoptóticas ou necróticas através de diferenças na integridade da membrana plasmática e permeabilidade. Muitos estudos realizados com MP utilizaram essa metodologia para ensaios de morte celular e alguns mostraram resultados que estão de acordo com os encontrados aqui. Wang *et al.* (2017), empregou a dupla marcação com AnexinaV-FITC/PI para investigar a apoptose de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) induzida por MP<sub>2,5</sub>, revelando que esse material induziu significativamente a apoptose de HUVECs nas concentrações testadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Piao *et al.* (2017) quando avaliou os mecanismos biológicos do MP em queratócitos humanos (HaCaT) e no tecido da pele de camundongos. Esses achados também são corroborados por Hu *et al.* (2017) que, utilizando a mesma linhagem celular (HaCaT), descobriu que o MP<sub>2,5</sub> provoca estresse oxidativo, aumento do dano ao DNA e apoptose mediada pelas mitocôndrias. Liu, J. *et al.* (2019), utilizando uma linhagem celular murina de macrófagos (RAW264.7) demonstrou que o MP<sub>2,5</sub>, entre outras coisas, conseguiu ativar a via de apoptose mediada por mitocôndrias nas células espumosas dos macrófagos. Esses estudos corroboram nossos achados, ao mesmo tempo que abrem novos questionamentos para estudos futuros com o MP-Recife.

Após determinar que o MP-Recife, assim como o MP-Diesel, está associado a impactos negativos nas células A549, no que diz respeito a mortalidade celular e danos oxidativos, nós avaliamos seu efeito no status inflamatório dessas células. Os dois MPs provocaram elevação nos níveis de IL-6, mas enquanto os valores para MP-Recife não se mostraram significativos, as células expostas ao MP-Diesel apresentaram valores estatisticamente significativos em 48h e 72 h após a exposição. Complementando nossos resultados do perfil inflamatório, observamos

---

<sup>1</sup> Artigo a ser publicado com o título “*Diesel exhaust particles induce cell death in A549 cells accompanied by p53-independent increased expression of pro-apoptotic proteins*” de autoria de Castro, Menck e Carvalho.

que ambos os MPs elevaram significativamente os níveis de secreção da IL-8 nas células A549, apresentando valores estatisticamente significativos em 72 h de exposição. Esses resultados sugerem que tanto IL-6 quanto IL-8 podem desempenhar um papel importante no processo de indução do estresse oxidativo mediado por esses MPs, uma vez que ambas estão elevadas no período de 72 h, momento em que, de acordo com nossos achados, o estresse oxidativo aumenta de maneira significativa nas células.

Nossos resultados se assemelham aos de outros estudos que se concentraram no MP de diferentes cidades e outras linhagens celulares. Níveis mais elevados de IL-8 em células expostas a MP foram relatados em um estudo conduzido por Orona *et al.* (2014), a partir do MP coletado no centro de Buenos Aires, demonstrando que, atuando de forma indireta, esse MP é capaz de reduzir a viabilidade celular e aumentar a geração de ânion superóxido e os níveis de IL-8 nas células A549. Xian *et al.* (2020), avaliou o impacto direto do MP<sub>2,5</sub>, coletado em áreas urbanas de Pequim, em amostras de biópsia da mucosa nasal obtidas de indivíduos saudáveis, revelando aumento significativo da produção de IL-8 e perda de função da barreira epitelial nasal. Em estudo recente Liu, L. *et al.* (2019) desenvolveu modelos de lesão pulmonar induzida por MP, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, e demonstrou que o tratamento com MP provocou uma resposta inflamatória grave, com elevação dos níveis de IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ , além de apoptose celular. Ambos estudos corroboram nossos achados e a hipótese de que inflamação e doença pulmonar induzida por partículas podem envolver diferentes mediadores no pulmão.

De forma semelhante, Kim *et al.* (2016), após ensaio utilizando cultura de fibroblastos nasais, demonstrou que partículas de exaustão de diesel aumentam a expressão de IL-6 e IL-8, sugerindo que ele seja capaz de induzir ou agravar alergias e doenças respiratórias crônicas. Yuan *et al.* (2019) investigou o MP<sub>2,5</sub> coletado em Nanjing (China) e revelou que ele reduz a viabilidade e aumenta o estresse oxidativo em células de epitélios brônquicos humanos de maneira dependente do tempo, assim como aconteceu no nosso estudo. Além de elevar significativamente a concentração de IL-6 e IL-8, estando de acordo com os nossos resultados.

A resposta inflamatória pulmonar geralmente resulta na liberação de uma variedade de quimiocinas e citocinas incluindo interferon gama, TNF- $\alpha$  e interleucinas como IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-12 e IL-13, a depender do tipo de patógeno invasor. Na inflamação aguda pulmonar os neutrófilos são os primeiros a responder à liberação de citocinas; sendo IL-8 a quimiocina primária a mediar a migração desses neutrófilos, que matam os patógenos fagocitados liberando EROs e proteases (CHALMERS *et al.*, 2019). Isso justifica a elevação significativa dessa quimiocina em resposta aos dois MPs. Assim como IL-6, já que ambas estão associadas à inflamação pulmonar aguda.

Quando o insulto pulmonar é controlado, espera-se a elevação de citocinas anti-inflamatórias, particularmente IL-10, TGF- $\beta$  e IL-1Ra, que ajudam na regulação do sistema de defesa e facilitam a apoptose das células inflamatórias por macrófagos. No entanto, em casos de infecção muito agressivas e/ou prolongadas, os mecanismos anti-inflamatórios não são capazes de controlar a inflamação subjacente, resultando em lesão pulmonar contínua. Isso inicia a cascata de inflamação e recruta mais neutrófilos, que novamente desempenham seu papel crucial na inflamação (CHALMERS *et al.*, 2019).

Neste estudo também avaliamos as citocinas IL-10, IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ , mas não foram encontrados níveis detectáveis de nenhuma delas. A IL-10 é uma das principais citocinas anti-inflamatórias, estando entre as suas principais ações a supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (DIDION, 2017). Como citado por Chalmers *et al.* (2019), citocinas anti-inflamatórias tendem a se elevar quando o agente indutor da inflamação é controlado, a fim de reestabelecer o sistema de defesa e eliminar células inflamatórias apoptóticas. Dessa forma, o fato de IL-10 não ter níveis detectáveis no nosso estudo pode estar associado ao fato de o estímulo inflamatório permanecer ativo, gerando inflamação e estresse oxidativo prolongados. Entretanto, vale ressaltar que mesmo níveis basais ou baixos de IL-10, podem regular ou suprimir a expressão de outros produtos gênicos inflamatórios ou vasculares (DIDION, 2017).

TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , por sua vez, são citocinas pró-inflamatórias, sendo a TNF $\alpha$  bastante estudada nos ensaios com MP. No entanto, nenhuma delas apresentou níveis detectáveis nas amostras analisadas após tratamento com MP-Diesel ou MP-Recife. Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* com MP<sub>2,5</sub> revelaram aumento nas secreções de citocinas como IL-6, IL-8 e TNF $\alpha$  (GUO *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2019; RODRIGUEZ-COTTO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2012). No entanto, alguns mostram resultados discordantes: no Brasil, em um estudo conduzido por Rodríguez-Cotto *et al.* (2014), o MP de regiões urbanas e industrializadas no Rio de Janeiro foi analisado quanto a respostas tóxicas e pró-inflamatórias em células epiteliais brônquicas humanas, demonstrando que o mesmo pode aumentar ou diminuir a secreção dessas citocinas *in vitro*, sendo este efeito específico do local e dependente do tempo. Gualtieri *et al.* (2010), avaliou o MP coletado da cidade de Milão (Itália) e observou que, enquanto o MP<sub>10</sub> elevou os níveis de IL-8 nas células A549 e BEAS-2B tratadas, não foram detectados níveis aumentados dessa citocina na exposição dessas mesmas linhagens ao MP<sub>2,5</sub>. Quanto a essas discordâncias, Wang *et al.* (2018) destaca que os achados relacionados as secreções de citocinas induzidas por MP<sub>2,5</sub> são variáveis, podendo ser moduladas por múltiplos

mecanismos moleculares, devido a diferenças na origem, morfologia e composição do MP<sub>2.5</sub> de diferentes regiões ou países.

Nesse contexto, estudos tem ressaltado que eventos de estresse oxidativo ligados à inflamação podem ser uma resposta adaptativa a fatores ambientais, envolvendo a regulação das vias de sinalização (PIK3 / AKT, Nrf2 / ARE) associadas à defesa contra o estresse oxidativo como tentativa de autodefesa (CHENG *et al.*, 2012; ORONA *et al.*, 2014). Um estudo conduzido por Upadhyay *et al.* (2018), objetivando avaliar resposta inflamatória e níveis de estresse oxidativo em células epiteliais das vias aéreas após exposição a partículas de exaustão de diesel, demonstrou que isso aumentou significativamente a expressão de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo nessas células. Esses resultados são semelhantes aos de Vattanasit *et al.* (2013), que investigou *in vitro* os efeitos desse MP na indução de danos oxidativos no DNA e respostas inflamatórias em linfoblastos humanos, revelando que, de acordo com a geração de EROs induzida, o nível de bases de DNA oxidado aumentou significativamente após a exposição. Ambos corroboram os nossos achados.

Neste cenário, sabe-se que o sistema de antioxidantes é fundamental para a manutenção do equilíbrio redox intracelular, pois atua de forma a controlar os níveis de EROs produzidos em resposta a estímulos internos ou externos e assim proteger as células do estresse oxidativo, representando um componente altamente relevante no estudo da resposta celular frente ao MP (CARVALHO *et al.*, 2004; MASON, 2006; MASON; WILLIAMS, 1977, 1997). Dessa forma, ressalta-se a importância do presente trabalho como o primeiro estudo conhecido a estudar a ativação transcricional de enzimas antioxidantes em células tratadas com MP.

Após observar que os MPs aqui estudados são capazes de induzir estresse oxidativo nas células pulmonares, acompanhado de resposta inflamatória prolongada e queda da viabilidade celular, nosso próximo objetivo foi avaliar o perfil dos genes que codificam para as principais enzimas antioxidantes, a fim de investigar como elas se comportam frente ao estresse oxidativo induzido após exposição ao MP-Diesel e ao MP-Recife.

De modo geral, observamos alteração significativa na ativação transcricional de todas as enzimas investigadas, ocorrendo o pico de expressão, na maior parte delas, em 24 h quando expostas ao MP-Diesel e em 48 h frente ao MP-Recife. Dentre essas destacamos a elevação na expressão de SOD e CAT, que são as principais enzimas a compor a defesa antioxidante na maioria das células expostas ao oxigênio, uma vez que são responsáveis pela metabolização do radical superóxido a peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e este a H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>, respectivamente (BASKOYLU *et al.*, 2018; CAETANO, 2016; SAKAMOTO; IMAI, 2017). Dessa forma, como mencionado por Caetano (2016), a relação entre as concentrações de SOD e CAT é altamente

relevante, pois quando SOD está aumentada, há a produção em excesso de  $H_2O_2$ , sendo necessário a secreção de CAT para que haja a conversão do  $H_2O_2$ , o que seria um possível mecanismo de proteção contra o excesso de EROs produzido diante da ação do MP nas células pulmonares.

As células eucarióticas têm três isoformas da enzima SOD: SOD citosólica, contendo  $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  (SOD1); SOD mitocondrial, contendo  $Mn^{2+}$  (SOD2) e SOD extracelular, contendo  $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  (SAKAMOTO; IMAI, 2017). Aqui nós avaliamos a expressão gênica de SOD1 e SOD2 frente a exposição aos MPs e observamos que, na exposição das células ao MP-Diesel, as duas isoformas tiveram aumento transcricional significativo. Já na exposição ao MP-Recife, apenas SOD2 foi expressa, enquanto SOD1 sofreu repressão. Este fato sugere que esta enzima atua por mecanismos diferentes frente a exposição das células a esses dois MPs ou, ainda, que o MP- Recife, por mecanismos ainda não estudados, inativa a expressão gênica de SOD1.

Um outro ponto interessante a se destacar é que a CAT é a única enzima que permanece sendo transcrita ativamente nas 48 h após a exposição ao MP-Diesel. Enquanto as outras enzimas aumentam significativamente em 24 h e decaem em 48 h, CAT tem níveis crescentes desde o tempo inicial (3 h), até o último momento da exposição, apresentando valores significativos em 48 h de exposição, logo após SOD1 atingir seu pico. Algo semelhante acontece na exposição ao MP-Recife, no entanto, frente á esse MP, CAT apresenta ativação estatisticamente significativa tanto em 24 h quanto nas 48 h finais de exposição. Isso nos permite inferir que, uma vez que o estresse oxidativo se estabelece a partir da elevação dos níveis de EROs, devido ao aumento da produção ou ao metabolismo reduzido (SCHAFER; BUETTNER, 2001), na exposição a esse MP, CAT foi essencial na neutralização de EROs proveniente da metabolização do ânion superóxido pela SOD1.

Outro componente importante do sistema antioxidante enzimático e na regulação celular redox é a glutathiona peroxidase (GPX1) que, assim como a CAT, remove  $H_2O_2$  intracelular, porém de forma indireta, uma vez que o usa como substrato para a oxidação da glutathiona reduzida (GSH), formando glutathiona oxidada (GSSG) e água (CAETANO, 2016; GLORIEUX ET AL., 2015). Aqui nós observamos que a GPX1 começa a ser expressa logo no início da exposição aos MPs, com pico logo em 3 h de exposição ao MP-Recife, decaindo em 6h, mas permanecendo ativa até as 48 h. Por outro lado, na exposição ao MP-Diesel o pico é atingido em 24 h, mas com elevação significativa a partir das 6 h. Observamos que na exposição ao MP-Diesel, a elevação de GPX1 se dá logo após o SOD2 atingir o seu pico de ativação, momento em que, supõe-se, há maior produção de  $H_2O_2$ , sugerindo que este seja o motivo de maior secreção desta enzima neste período. Já na exposição ao MP-Recife, GPX1 é a única enzima

que se eleva significativamente logo nas 3 h iniciais de exposição, nos levando a deduzir que ela desempenha um papel chave no combate inicial a EROs frente a esse MP. Ela também atua de forma significativa no tempo máximo de exposição (48 h), quando a maioria das enzimas, incluindo SOD2 e CAT, estão também elevadas, sugerindo que este seja o período crucial de combate a EROs.

Oliveira *et al.* (2018) observou que camundongos expostos a um ar ambiente enriquecido com MP<sub>2,5</sub> coletado de uma avenida de tráfego intenso na cidade de São Paulo, cidade brasileira que mais tem estudos conduzidos relacionados à poluição atmosférica e riscos a saúde da população, apresentaram diminuição de GSH e aumento da atividade de SOD nos pulmões e nos eritrócitos, resultados consistentes com a indução de estresse oxidativo local e sistêmico. Esses resultados corroboram nossos achados, uma vez que, quando SOD está elevada, supõe-se que logo os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se elevarão também, estimulando a expressão de CAT e GPX1. GPX1 ativa provocará a diminuição dos níveis de GSH, uma vez que usará o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em excesso para oxidá-la, formando GSSG e H<sub>2</sub>O.

Com relação a Thio e FerR, estas são enzimas auxiliares. Enquanto as FerR intermediam a transferência de elétrons num grande número de reações metabólicas, as Thio facilitam a redução de outras proteínas pela troca de tiol-dissulfeto de cisteína (CAPACHO, 2012; PEREIRA; CARDOSO, 2012). Dessa forma a ativação dessas enzimas dependerá das demais, por esse motivo, supõe-se, seus picos de ativação transcricional coincidem com os das demais enzimas.

De modo geral, esses resultados indicam que, frente a exposição ao MP-Recife as células ativam suas defesas antioxidantes mais tardiamente quando comparado ao MP-Diesel. Isso pode estar relacionado a diferença de toxicidade entre essas duas partículas. Apesar de o MP-Recife, assim com o MP-Diesel, elevar a produção de EROs e, conseqüentemente, induzir estresse oxidativo intracelular de acordo com o tempo de exposição, este o faz de forma menos agressiva que o MP-Diesel, que possui toxicidade mais acentuada, como mostrado pelos resultados dos ensaios de toxicidade e morte celular. Adicionalmente sugere-se que, em células alveolares, o dano associado a esses MPs resulta em um desequilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes celulares, culminando em estresse oxidativo intracelular. Associado a esse evento, o aumento de IL-6 e IL-8 após a exposição poderia contribuir também para os danos celulares, assim como para a apoptose.

Resultados como estes são importantes para esclarecer os possíveis mecanismos fisiopatológicos associados à exposição das células pulmonares ao MP-Recife, que ainda é tão pouco estudado. Mais ensaios são necessários a fim de elucidar o mecanismo de ação do MP-

Recife nas células, mas nossos achados fortalecem a ideia de que a poluição atmosférica de Recife precisa ser melhor investigada e tratada com mais atenção. Alguns estudos têm indicado que a apoptose desencadeada por MP, assim como a resposta inflamatória, são reguladas pela via de TNF $\alpha$  e fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (DAGHER *et al.*, 2006; HOFFMANN *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2018). Dessa forma, esse quesito será mais explorado e investigado em nossos estudos futuros com MP-Recife.

Coletivamente, esses achados apontam para a necessidade de novas abordagens e estudos mais aprofundados para compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese associada ao MP-Recife, uma vez que ele representa alto risco para a população, podendo ser um fator desencadeante e agravante de inúmeras doenças, como as citadas no decorrer deste trabalho, comprometendo a qualidade de vida da população e, conseqüentemente, reduzindo a expectativa de vida.

## 9 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo, concluímos que a concentração de MP<sub>2,5</sub> em suspensão no ar de Recife, no período amostrado, está de acordo com o padrão nacional vigente, no entanto, ultrapassa alguns valores anuais, preconizados pela OMS, que representam risco considerável à saúde da população.

O MP-Recife, de maneira semelhante ao MP-Diesel é um material tóxico para as células pulmonares, sendo capaz de induzir morte celular via apoptose, provocar respostas inflamatórias, através da secreção de IL-6 e IL-8, e estresse oxidativo intracelular, porém de maneira mais branda. Dessa forma, a ativação transcricional de proteínas antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo induzido pelo MP-Recife ocorre, em geral, de maneira mais tardia quando comparada às respostas produzidas pelo MP-Diesel.

Este estudo poderá nortear tratamentos futuros para distúrbios cardiorespiratórios associados à poluição atmosférica, além de servir de subsídio para a adoção de políticas públicas que visem restringir a emissão de poluentes por veículos automotores, bem como incentivar a implementação de uma rede fixa de monitoramento da qualidade do ar em Recife voltada para MP.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ABRAHAMOWICZ, M. *et al.* Flexible modeling of exposure-response relationship between long-term average levels of particulate air pollution and mortality in the American Cancer Society study. **Journal of toxicology and environmental health**, Washington, v. 66, p. 1625-1654, 2003.

AGÊNCIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE (Pernambuco). **Monitoramento da Qualidade do Ar**. Disponível em: [http://www.cprh.pe.gov.br/monitoramento/qualidade\\_ar/Mais%20Informa%E7%F5es/39742%3B56912%3B171701%3B0%3B0.aspDAD](http://www.cprh.pe.gov.br/monitoramento/qualidade_ar/Mais%20Informa%E7%F5es/39742%3B56912%3B171701%3B0%3B0.aspDAD). Acesso em: 14 nov. 2018.

ALMEIDA, L. T. **Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes em células HepG2 infectadas pelo Caraparu virus (Bunyaviridae)**. 2016. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.

ANDERSON, J. O.; THUNDIYIL, J. G.; STOLBACH, A. Clearing the air: a review of the effects of particulate matter air pollution on human health. **Journal of medical toxicology**, Philadelphia, v. 8, p. 166-75, 2012.

ANDRADE, M. F., *et al.* Vehicle emissions and PM<sub>2.5</sub> mass concentrations in six Brazilian cities. **Air quality, atmosphere, and health**, Dordrecht, v. 5, p. 79-88, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROFISSIONAIS DE EPIDEMIOLOGIA DE CAMPO (Brasília). **Vigilância em saúde de populações expostas a contaminantes químicos**. Disponível em: <https://proepi.org.br/ead/mod/book/view.php?id=588&chapterid=238>. Acesso em: 18 dez. 2018.

BAI, K. J. *et al.* Microglial activation and inflammation caused by traffic-related particulate matter. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 311, p. 108762, 2019.

BAI, L. *et al.* Air pollution forecasts: an overview. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 17, p. 1- 44, 2018.

BANG, C. S. *et al.* Ambient air pollution in gastrointestinal endoscopy unit; rationale and design of a prospective study. **Medicine**, Baltimore, v. 97, p. e13600, 2018.

BASKOYLU, S.N, *et al.* Single copy/knockin models of ALS SOD1 in *C. elegans* suggest loss and gain of function have different contributions to cholinergic and glutamatergic neurodegeneration. **PloS genetics**, San Francisco, v. 14, p. e1007682, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Riscos Ambientais e a saúde humana**. Disponível em: <https://portalms.saude.gov.br/vigilancia-em-saude/vigilancia-ambiental/vigiar/riscos-ambientais-e-a-saude-humana>. Acesso em: 09 jan. 2019a.

BRASIL. Ministério da saúde. **Vigilância em saúde ambiental**. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/vigilancia-em-saude/vigilancia-ambiental/vigiar>. Acesso em: 06 fev. 2019b.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Cidades Sustentáveis**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/cidades-sustentaveis/qualidade-do-ar.html>. Acesso em: 05 nov. 2018.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (Brasil). Resolução nº 491, 19 de novembro de 2018. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, nov. 2018. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=21/11/2018&jornal=515&pagina=155&totalArquivos=178>. Acesso em: 04 fev. 2019a.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (Brasil). Resolução Conama nº 3, de 28 de junho de 1990. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 22 ago. 1990. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/res/res90/res0390.html>. Acesso em: 09 jan. 2019b.

CAETANO, C. C. S. **Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes em macrófagos murinos após infecção pelo Mayaro virus (Togaviridae)**. 2016. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.

CAMPAGNOLO, D. *et al.* In-vehicle airborne fine and ultra-fine particulate matter exposure: The impact of leading vehicle emissions. **Environment International**, Elmsford, v. 123 p. 407-416, 2019.

CAPACHO, A. S. C. **Avaliação in silico da tioredoxina redutase como alvo para terapia anti-tumoral**. 2012. Dissertação (mestrado). Universidade de Lisboa, Lisboa, 2012.

CARVALHO, H. *et al.* Mitogen-activated protein kinases modulate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in primary rat alveolar epithelial cells. **Journal of cellular biochemistry**, New York, v. 92, p. 502-13, 2004.

CARVALHO, H. Sustained activation of p53 in confluent nucleotide excision repair-deficient cells resistant to ultraviolet-induced apoptosis. **DNA Repair**, Amsterdam, v. 7, p. 922-931, 2008.

CARVALHO, H. The air we breathe: differentials in global air quality monitoring. **The Lancet Respiratory Medicine**, London, v. 4, p. 603-605, 2016a.

CARVALHO, H. The end of diesel-powered cars? **The Lancet Respiratory Medicine**, London, v. 4, p. e2-3, 2016b.

CARVALHO, H. The global burden of air pollution-associated deaths—how many are needed for countries to react? **The Lancet Planetary Health**, London, v. 1, p. e179, 2017.

CARVALHO, H. Air pollution-related deaths in Europe - time for action. **Journal of Global Health**, Edinburgh, v. 9, p. 020308, 2019.

CHALMERS, S. *et al.* Diagnosis and treatment of acute pulmonary inflammation in critically ill patients: The role of inflammatory biomarkers. **World Journal of Critical Care Medicine**, Pleasanton, v.8, p. 59-71, 2019.

CHEN, M.; LI, B.; SANG, N. Particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) exposure season-dependently induces neuronal apoptosis and synaptic injuries. **Journal of Environmental Sciences**, China, v. 54, p. 336-345, 2016.

CHENG, W.Y. *et al.* Linking oxidative events to inflammatory and adaptive gene expression induced by exposure to an organic particulate matter component. **Environmental health perspectives**, Research Triangle Park, v. 120, p. 267–274, 2012.

CONFORTI, A. *et al.* Air pollution and female fertility: a systematic review of literature. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 16, p.117, 2018.

COHEN, A. J. *et al.* Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015. **Lancet**, London, v. 389, p. 1907-1918, 2017.

DAGHER, Z. *et al.* Activation of different pathways of apoptosis by air pollution particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in human epithelial lung cells (L132) in culture. **Toxicology**, Amsterdam, v. 225, p. 12-24, 2006.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**, Cambridge, v. 116, p. 205-219, 2004.

DAPPER, S. N.; SPOHR, C.; ZANINI, R. R. Poluição do ar como fator de risco para a saúde: uma revisão sistemática no estado de São Paulo. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 30, p. 83 - 97, 2016.

DEPARTAMENTO ESTADUAL DE TRÂNSITO (Pernambuco). **Estatísticas**. Disponível em: <https://www.detran.pe.gov.br/estatisticas-info>. Acesso em: 03 fev. 2019.

DIDION, S. P. Unraveling the role and complexities of inflammation in hypertension. **Hypertension**, Dallas, v. 70, p. 700-702, 2017.

ESTRELLA, B. *et al.* Effects of air pollution on lung innate lymphoid cells: review of *in vitro* and *in vivo* experimental studies. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Suíça, v. 16, p. 2347, 2019.

FAJERSZTAJN, L. *et al.* Air pollution: a potentially modifiable risk factor for lung cancer. **Nature reviews. Cancer**, London, v. 13, p. 674–678, 2013.

KELLY, F. J.; FUSSELL, J. C. Air pollution and public health: emerging hazards and improved understanding of risk. **Environmental geochemistry and health**, Kew, v. 37, p. 631- 649, 2015.

GAETANI, G. F. *et al.* Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood: the journal of hematology**, New York, v. 73, p. 334-339, 1989.

GEELS, C. *et al.* Future premature mortality due to O<sub>3</sub>, secondary inorganic aerosols and primary pm in europe \_ Sensitivity to changes in climate, anthropogenic emissions, population and building stock. **International journal of environmental research and public health**, Basel, v. 12, p. 2837-2869, 2015.

GHIO, A.J.; CARRAWAY, M.S.; MADDEN, M.C. Composition of air pollution particles and oxidative stress in cells, tissues, and living systems. **Journal of toxicology and environmental health - Part B - Critical reviews**, Washington, v.15, p.1-21, 2012.

GHORANI-AZAM, A.; RIAHI-ZANJANI, B.; BALALI-MOOD, M. Effects of air pollution on human health and practical measures for prevention in Iran. **Journal of Research in Medical Sciences**, Isfahan, v. 21, p.1-12, 2016.

GLORIEUX, C., *et al.* Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 87, p. 84-97, 2015.

GONZALEZ-FLECHA, B. Oxidant mechanisms in response to ambient air particles. **Molecular aspects of medicine**, Elmsford NY, v. 25, p. 169-182, 2004.

GUARNIERI, M.; BALMES, J. R. Outdoor air pollution and asthma. **Lancet**, London, v. 383, p. 1581-1592, 2014.

GUALTIERI, M. *et al.* Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of different PM fractions in human epithelial lung cells. **Toxicology in vitro**, New York, v. 24, p. 29-39, 2010.

GUO, Z. *et al.* PM<sub>2.5</sub>-Induced oxidative stress and mitochondrial damage in the nasal mucosa of rats. **International journal of environmental research and public health**, Basel, v. 14, p. 134, 2017.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4<sup>th</sup> ed. Cidade: Oxford University Press, 2007.

HAMANAKA, R. B.; MUTLU, G. M. Particulate matter air pollution: effects on the cardiovascular system. **Frontiers in Endocrinology**, Lausanne, v. 9, p. 680, 2018.

HANIGAN, I. C. *et al.* All-cause mortality and long-term exposure to low level air pollution in the “45 and up study” cohort, Sydney, Australia, 2006–2015. **Environment International**, Elmsford, v. 126, p. 762 - 770, 2019.

HETTFLAISCH, K. *et al.* Short-term exposure to urban air pollution and influences on placental vascularization indexes. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 125, p. 753-759 , 2017.

HOFFMANN, A. *et al.* The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. **Science**, New York, v. 298, p. 1241-1245, 2002.

HU, R. *et al.* PM<sub>2.5</sub> Exposure elicits oxidative stress responses and mitochondrial apoptosis pathway activation in HaCaT keratinocytes. **Chinese medical journal**, Beijing, v. 130, p. 2205-2214, 2017.

HUTTUNEN, K. *et al.* Low-level exposure to ambient particulate matter is associated with systemic inflammation in ischemic heart disease patients. **Environmental Research**, New York, v. 116, p. 44-51, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA (Brasil). **Pernambuco/Recife**. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pe/recife/panorama> e <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pe/recife/pesquisa/22/28120>. Acesso em: 12 jan. 2019.

INSTITUTO DE ENERGIA E MEIO AMBIENTE (Brasil). **1º Diagnóstico da rede de monitoramento da qualidade do ar no Brasil (2014)**. Disponível em: [http://www.forumclima.pr.gov.br/arquivos/File/Rosana/Diagnostico\\_Qualidade\\_do\\_Ar\\_Versao\\_Final\\_Std.pdf](http://www.forumclima.pr.gov.br/arquivos/File/Rosana/Diagnostico_Qualidade_do_Ar_Versao_Final_Std.pdf). Acesso em: 05 dez. 2018.

INSTITUTO MUNDIAL DE RECURSOS. **Os países que mais emitiram gases de efeito estufa nos últimos 165 anos**. Disponível em: <https://wribrasil.org.br/pt/blog/2019/04/ranking-paises-que-mais-emitem-carbono-gases-de-efeito-estufa-aquecimento-global>. Acesso em: 03 ago. 2019.

JIN, X. *et al.* Mitochondrial damage mediated by ROS incurs bronchial epithelial cell apoptosis upon ambiente PM<sub>2,5</sub> exposure. **Journal of toxicological Sciences**, Sapporo v. 43, p. 101-111, 2018.

KATSOUYANNI, K. Ambient air pollution and health. **British medical bulletin**, London, v. 68, p. 143-156, 2003.

KIM, J. A. *et al.* Diesel exhaust particles upregulate interleukins IL-6 and IL-8 in nasal fibroblasts. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, p. e0157058, 2016.

KIM, H. *et al.* Long-term exposure to air pollutants and cancer mortality: a meta-analysis of cohort studies. **International journal of environmental research and public health**, Basel, v. 15, p. 2608, 2018.

KOWALSKA, M., *et al.* Genotoxic potential of diesel exhaust particles from the combustion of first- and second-generation biodiesel fuels - the FuelHealth project. **Environmental Science and Pollution Research**, London, v. 24, p. 24223–24234, 2017.

KWON, K. *et al.* Negative cellular effects of urban particulate matter on human keratinocytes are mediated by P38 MAPK and NF-κB-dependent expression of TRPV 1. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v.19, p. 2660, 2018.

LANKOFF, A. *et al.* A comparative analysis of in vitro toxicity of diesel exhaust particles from combustion of 1st- and 2nd-generation biodiesel fuels in relation to their physicochemical properties—the FuelHealth project. **Environmental Science and Pollution Research**, Basel, v. 24, p.19357–19374, 2017.

LI, R. *et al.* Effects of sub-chronic exposure to atmospheric PM<sub>2.5</sub> on fibrosis, inflammation, endoplasmic reticulum stress and apoptosis in the livers of rats. **Toxicology research**, Cambridge, v. 7, p. 271, 2018.

LIN, Y. *et al.* The impacts of air pollution on maternal stress during pregnancy. **Scientific reports**, London, v.7, p. 40956, 2017.

LIU, J. PM<sub>2.5</sub> aggravates the lipid accumulation, mitochondrial damage and apoptosis in macrophage foam cells. **Environmental Pollution**, Barking, v.249, p. 482-490, 2019.

LIU, L. *et al.* Fibroblast growth factor 10 protects against particulate matter-induced airway inflammatory response through regulating inflammatory signaling and apoptosis. **American journal of translational research**, Madison, v. 11, p. 6977-6988, 2019.

LU, Y. R. *et al.* High concentrations of serum interleukin-6 and interleukin-8 in patients with bipolar disorder. **Medicine**, Baltimore, v. 98, p. e14419, 2019.

MAHIPAL, S. V *et al.* Effect of 15-lipoxygenase metabolites, 15-(S)-HPETE and 15-(S)-HETE on chronic myelogenous leukemia cell line K-562: reactive oxygen species (ROS) mediate caspase-dependent apoptosis. **Biochemical pharmacology**, Oxford, v. 74, p. 202-214, 2007.

MARTINS, R. D.; FERREIRA, L. C. Uma revisão crítica sobre cidades e mudança climática: vinho velho em garrafa nova ou um novo paradigma de ação para a governança local? **Revista de Administração pública**, Rio de Janeiro, v. 45, p. 611-641, 2011.

MASON, R.J. Biology of alveolar type II cells, **Respirology**, Carlton, v.11, p. S12-S15, 2006.

MASON, R. J.; WILLIAMS, M. C. Alveolar type II cells. *In*: CRYSTAL, R. G. *et al.* (ed.). **The Lung: Scientific Foundations**. 2. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. p. 81-91.

MASON, R. J.; WILLIAMS, M. C. Type II alveolar cell. Defender of the alveolus. **The American review of respiratory disease**, Baltimore, v. 115, p. 81-91, 1977.

MATÉS, J. M. Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. **Archives of toxicology**, Berlin, v. 86, p. 1649-1665, 2012.

MATSUDA, M. *et al.* Lacrimal cytokines assessment in subjects exposed to different levels of ambient air pollution in a large metropolitan area. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, p. e0143131, 2015.

MCGUINN, L.A. *et al.* Association of long-term PM<sub>2.5</sub> exposure with traditional and novel lipid measures related to cardiovascular disease risk. **Environment International**, Elmsford, v. 122, p. 193-200, 2019.

MEIER, P.; VOUSDEN, K. H. Lucifer's labyrinth - ten years of path finding in cell death. **Molecular cell**, Cambridge, v. 28, p. 746-754, 2007.

MENDES, A. *et al.* Health impacts related to air pollution: perspectives of the futurar project. **Boletim Epidemiológico Observacoes**. Lisboa, v. 6, p. 46-50, 2017.

MILLER, E.W. *et al.* Boronate-based fluorescent probes for imaging cellular hydrogen peroxide. **Journal of the american chemical society**, Washington, v. 127, p. 16652-16659, 2005.

- MIRANDA, R. M. *et al.* Urban air pollution: a representative survey of PM<sub>2.5</sub> mass concentrations in six Brazilian cities. **Air Quality, Atmosphere & Health**, São Paulo, v. 5, p.63-77, 2012.
- MOLDOVEANU *et al.* Infl ammatory mechanisms in the lung. **Journal of inflammation research**, Auckland, v. 2, p. 1-11, 2009.
- NASCIMENTO, A.P. *et al.* Associação entre concentração de partículas finas na atmosfera e doenças respiratórias agudas em crianças. **Revista de saúde pública**, São Paulo, v. 51, p. 1-10, 2017.
- NASCIMENTO, C. M; OLIVEIRA, S. A.; CARVALHO, H. Poluição atmosférica e possíveis efeitos à população de Recife: um estudo baseado nos dados do departamento de informática do SUS (DATASUS). In: V Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica (2019), Recife. **Blucher Biophysics Proceedings**. São Paulo: Editora Blucher, 2019. v. 2, p. 103 - 106. Disponível em: <https://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/polui-atmosfera-e-possveis-efeitos-populao-de-recife-um-estudo-baseado-nos-dados-do-departamento-de-informtica-do-sus-datasus-30604>. Acesso em: 01 set. 2019.
- NASCIMENTO, C. M. *et al.* Poluição atmosférica e possíveis efeitos à população de Recife. In: MARAVIESKI, S. P. *et al.* (org.). **Teorias e Métodos da Biofísica**. 1. ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. p. 60-65.
- NEMMAR, A. *et al.* *In vivo* protective effects of nootkatone against particles-induced lung injury caused by diesel exhaust is mediated via the NF-κB pathway. **Nutrients**, Bethesda, v. 10, p. 263, 2018.
- NGOC, L. T. N. *et al.* Particulate matter exposure of passengers at bus stations: a review. **International journal of environmental research and public health**, Basel, v.15, p. 2886, 2018.
- NIE, D. *et al.* Characterization of fine particulate matter and associated health burden in Nanjing. **International journal of environmental research and public health**, Basel, v. 15, p. 602, 2018.
- O'DRISCOLL, C. A., *et al.* Differential effects of diesel exhaust particles on T cell differentiation and autoimmune disease. **Particle and Fibre Toxicology**, London, v. 15, p. 35, 2018.
- OLIVEIRA, B. F. A. *et al.* Risk assessment of PM<sub>2.5</sub> to child residents in Brazilian Amazon region with biofuel production. **Environmental Health**, London, v. 11, p. 64, 2012.
- OLIVEIRA, A. A. F. *et al.* Genotoxic and epigenotoxic effects in mice exposed to concentrated ambient fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) from São Paulo city, Brazil. **Particle and Fibre Toxicology**, London, v. 15, p. 40, 2018.
- OLMO, N. R. S. *et al.* A review of low-level air pollution and adverse effects on human health: implications for epidemiological studies and public policy. **Clinics**, São Paulo, v. 66, p. 681-690, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Air Quality Guidelines Global Update 2005**. Geneve: WHO, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide-Global update 2005- Summary of risk assessment**. Geneve: WHO, 2006.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Poluição do ar**, Whashington, 2019.  
Disponível em:  
[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_joomlabook&view=topic&id=345](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_joomlabook&view=topic&id=345). Acesso em: 16 fev. 2019.

ORONA, N. S. *et al.* Direct and indirect air particle cytotoxicity in human alveolar epithelial cells. **Toxicology in Vitro**, New York, v. 28, p. 796-802, 2014.

PAN, W. C. *et al.* Fine particle pollution, alanine transaminase, and liver cancer: a taiwanese prospective cohort study (REVEAL-HBV). **Journal of the national cancer institute**, Oxford, v. 108, p. djv341, 2016.

PARK, S. *et al.* Air pollution, autophagy, and skin aging: impact of particulate matter (PM<sub>10</sub>) on human dermal fibroblasts. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 19, p. 2727, 2018.

PATELLA, V. *et al.* Urban air pollution and climate change: “The Decalogue: Allergy Safe Tree” for allergic and respiratory diseases care. **Clinical and molecular allergy**, London, v. 16, p. 20, 2018.

PEDERSEN, M. *et al.* Ambient air pollution and primary liver cancer incidence in four European cohorts within the ESCAPE Project. **Environmental research**, New York, v. 154, p. 226-233, 2017.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Tocantins, v. 3, p. 146-152, 2012.

PIAO, M. J., *et al.* Particulate matter 2.5 damages skin cells by inducing oxidative stress, subcellular organelle dysfunction, and apoptosis. **Archives of Toxicology**, Berlim, v. 92, p. 2077-2091, 2018.

POWER, M. C., *et al.* Traffic-related air pollution and cognitive function in a cohort of older men, Environ. **Environmental health perspectives**, Research Triangle Park, v. 119, p. 682-687, 2011.

QUINTON, L. J., WALKEY, A. J., MIZGERD, J. P. Integrative physiology of pneumonia. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 98, p.1417-1464, 2018.

RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S.K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature protocols**, London, v. 1, p. 3159-3165, 2006.

- RIBEIRO, V. M. **Efeito do consumo de bebidas ricas em polifenóis sobre a concentração de enzimas antioxidantes e níveis relativos de rnam dos genes p53 e atm em animais alimentados com dieta hiperlipídica.** 2018. Tese (doutorado) - Universidade Federal Fluminense Niterói, Niterói, 2018.
- RITZ, B., *et al.* Traffic-related air pollution and Parkinson's disease in Denmark: a casecontrol study. **Environmental health perspectives**, Research Triangle Park, v. 124, p.351-356, 2016.
- RODRIGUEZ-COTTO, R. I. *et al.* African dust storms reaching Puerto Rican coast stimulate the secretion of IL-6 and IL-8 and cause cytotoxicity to human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). **Health**, Irvine, Califórnia, v. 5, p. 14-28, 2013.
- RODRÍGUEZ-COTTO, R. I. *et al.* Particle pollution in Rio de Janeiro, Brazil: Increase and decrease of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 in human lung cells. **Environmental pollution**, Barking, v. 194, p.112-120, 2014.
- ROSAS-HERNANDEZ, H. *et al.* Cytotoxicity profile of pristine graphene on brain microvascular endothelial cells. **Journal of applied toxicology**, Chichester, v. 39, p. 966-973, 2019.
- SAKAMOTO, T.; IMAI, H. J. Hydrogen peroxide produced by superoxide dismutase SOD-2 activates spermin *Caenorhabditis elegans*. **Biological chemistry**, Berlim, v. 292, p. 14804-14813, 2017.
- SALDIVA, S. *et al.* Small-scale variations in urban air pollution levels are significantly associated with premature births: a case study in São Paulo, Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 15, p. 2236, 2018.
- SALVO, A. *et al.* Reduced ultrafine particle levels in São Paulo's atmosphere during shifts from gasoline to ethanol use. **Nature Communications**, London, v. 8, p. 77, 2017.
- SANTOS, U. P. *et al.* Association between traffic air pollution and reduced forced vital capacity: a study using personal monitors for outdoor workers. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, p. e0163225, 2016.
- SÉNÉCHAL, H *et al.* A review of the effects of major atmospheric pollutants on pollen grains, pollen content, and allergenicity. **The Scientific World Journal**, London, v. 2015, p.1-29, 2015.
- SCHAFER, F.; BUETTNER, G. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free radical biology and medicine**, New York, v. 30, p. 1191-1212, 2001.
- SHAH, A. S. *et al.* Global association of air pollution and heart failure: a systematic review and meta-analysis. **Lancet**, London, v. 382, p.1039-1048, 2013.
- SKOVMAND, A. *et al.* Lung inflammation and genotoxicity in mice lungs after pulmonary exposure to candle light combustion particles. **Toxicology letters**, Amsterdam, v. 276, p. 31-38, 2017.

SLOVIC, A. D. *et al.* How can urban policies improve air quality and help mitigate global climate change: a systematic mapping review. **Journal of Urban Health: Bulletin of the New York Academy of Medicine**, New York, v. 93, p. 73-95, 2015.

SOTTY, J. *et al.* Toxicological effects of ambiente fine(PM<sub>2.5-0.18</sub>)and ultrafine(PM<sub>0.18</sub>) particles in healthy and diseased 3Dorgano-typicmucociliary-phenotype models. **Environmental Research**. New York, v. 176, p. 108538, 2019.

TAN, Y. *et al.* LncRNA LOC101927514 regulates PM<sub>2.5</sub>-driven inflammation in human bronchial epithelial cells through binding p-STAT3 protein. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 319, p. 119-128, 2019.

TORRES, P. *et al.* Atmospheric pollution: brief review of the situation in Portugal and the impacts on public health. **Boletim Epidemiológico Observações**. Lisboa, v. 6, p. 20-25, 2017.

UPADHYAY, S. *et al.* Multi-cellular human bronchial models exposed to diesel exhaust particles: assessment of inflammation, oxidative stress and macrophage polarization. **Particle and fibre toxicology**, London, v.15, p. 19, 2018.

VATTANASIT, U. *et al.* Oxidative DNA damage and inflammatory responses in cultured human cells and in humans exposed to traffic-related particles. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, v. 217, p. 23-33, 2014.

XIA, T. *et al.* Pulmonary diseases induced by ambient ultrafine and engineered nanoparticles in twenty-first century. **National Science Review**, China, v. 3, p. 416-429, 2016.

XIAN, M. *et al.* Particulate Matter 2.5 Causes Deficiency in Barrier Integrity in Human Nasal Epithelial Cells. **Allergy, asthma & immunology research**, Seoul, v. 12, p. 56-71, 2020.

WANG, B. *et al.* Human bronchial epithelial cell injuries induced by fine particulate matter from sandstorm and non-sandstorm periods: association with particle constituents. **Journal of environmental sciences (China)**, Beijing, v. 47, p. 201-210, 2016.

WANG, J. *et al.* PM<sub>2.5</sub> stimulated the release of cytokines from BEAS-2B cells through activation of IKK/NF-κB pathway. **Human and Experimental Toxicology**, London, v. 38, p. 311-320, 2018.

WANG, W. *et al.* PM<sub>2.5</sub> induced apoptosis in endothelial cell through the activation of the p53-baxcaspase pathway. **Chemosphere**, New York, v. 177, p. 135-143, 2017.

WEUVE, J. *et al.* Exposure to particulate air pollution and cognitive decline in older women. **Archives of internal medicine**, Chicago, v. 172, p. 219-227, 2012.

WOO S. H. *et al.* Effects of fine particulate matter on *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation *in vitro*. **BioMed Research International**, New York, v. 2018, p. 10, 2018.

YANG, M. *et al.* Citotoxicidade do 9,10-fenantrenequinona do poluente do ar: papel das espécies reativas de oxigênio e sinalização redox. **BioMed Research International**, New York, v. 2018, p.15, 2018.

YANG, Y. *et al.* The association between ambient air pollution and daily mortality in Beijing after the 2008 olympics: a time series study. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, p. e76759, 2013.

YUAN, Q. *et al.* Ambient fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) induces oxidative stress and pro inflammatory response via up-regulating the expression of CYP1A1/1B1 in human bronchial epithelial cells in vitro. **Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis**, Amsterdam, v. 839, p. 40-48, 2019.

ZACCARELLI-MARINO *et al.* Association between the occurrence of primary hypothyroidism and the exposure of the population pear to industrial pollutants in São Paulo state, Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 16, p. 3464, 2019.

ZAFRA, A.; CASTRO, A. J.; ALCHÉ, J. D. Identification of novel superoxide dismutase isoenzymes in the olive (*Olea europaea* L.) pollen. **BMC Plant Biology**, London, v. 18, p. 114, 2018.

ZHANG, S. *et al.* Ambient fine particulate matter inhibits innate airway antimicrobial activity in preschool children in e-waste areas. **Environment International**, Elmsford, v. 123, p. 535-542, 2019.

ZHANG, Y. *et al.* Analysis of PM<sub>2.5</sub>-induced cytotoxicity in human HaCaT cells based on a microfluidic system. **Toxicology in Vitro**, New York, v. 43, p. 1-8, 2017.

ZHANG, Z. *et al.* The effect of curcumin on human bronchial epithelial cells exposed to fine particulate matter: a predictive analysis. **Molecules**, Basel, v.17, p. 12406-12426, 2012.

ZHOU, T. *et al.* Fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) aggravates apoptosis of cigarette-inflamed bronchial epithelium in vivo and vitro. **Environmental Pollution**, Barking, v. 248, p. 1-9, 2018.