

Joaquim de Paula Ribeiro

Efeitos do $PM_{2.5}$ sobre o coração de ratos

Universidade Federal do Rio Grande
Rio Grande – RS - 2015

Joaquim de Paula Ribeiro

Efeitos do PM_{2.5} sobre o coração de ratos

Trabalho apresentado como requisito parcial para avaliação de rendimento e obtenção de título de mestre em Ciências Fisiológicas, Fisiologia Animal Comparada, na Universidade Federal do Rio Grande, estando sob orientação da Prof^a Dr^a Carolina Rosa Gioda e co-orientado pelo Prof^o.Dr. Pablo Elias Martinez.

Universidade Federal do Rio Grande

Rio Grande – RS - 2015

Agradecimentos

Aos meus pais, os quais nunca deixaram que algo faltasse, que me deram apoio em tudo e que de alguma maneira foram os exemplos necessários para me guiar até aqui.

À todos aqueles que estiveram ao meu lado, dando incentivo, elogios, críticas, e carinho (amigos, filha e namorada). Obrigado por estarem comigo, este trabalho também é de vocês.

À Prof^a Dr^a Carla Amorim Neves Gonçalves, pois foi quem “abriu as portas do laboratório” para mim, me apresentando a pesquisa experimental, e com isso, dando a oportunidade que eu precisava.

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Carolina Rosa Gioda, pela orientação e confiança em trabalharmos juntos, além e ter tido eu como primeiro orientando de mestrado. Espero ter correspondido às expectativas...

À Ana Cristina Kalb, que dedicou muito de seu tempo me ensinando o que eu sei de técnicas bioquímicas. Sem sua ajuda e paciência este trabalho não estaria pronto. Muito obrigado!

Agradeço também aos professores do PPGCF-FAC, estes que foram de fundamental importância na construção do meu conhecimento em ciências fisiológicas, e em especial aos professores Dr. Pablo Eliaz Martinez, Dr. José Maria Monsserate Dr^a Marta Marques de Souza, como também às Dr^a Paula Peixoto Campos e Adriana Gioda, por suas importantes colaborações.

Agradeço ao CNPq e CAPES pelo fomento de inúmeras pesquisas, e com isso a viabilização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ABC – Do inglês “ATP building cassetes” (cassetes acoplados ao ATP)
ABAP – 2,2'-azobis - (2-metilpropanoamidina)
ACAP – Capacidade antioxidante contra o radical peroxil
ATP – Trifosfato de Adenosina
Al – Alumínio
AMPc – Monofosfato de adenosina cíclico
As – Arsênio
AU – Ácido úrico
Ba – Bário
BHT – Hidroxitolueno butilado
Ca – Cálcio
CAT – Catalase
Cd – Cádmiio
CDNB – 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno
CEUA – Comitê de ética no uso de animais
CO – Monóxido de carbono
Co – Cobalto
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cr – Cromo
CREAL – Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
CT – Controle
Cu – Cobre
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EDTA – Do inglês “Ethylenediamine tetraacetic acid” (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
EPM – Erro padrão da média
ERNS – Espécies reativas de nitrogênio
EROS – Espécies reativas de oxigênio
ERONS – Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
FB – Filtro branco
Fe – Ferro
FP – Do inglês “Fine Particle” (partícula fina)
FURG – Fundação Universidade Federal do Rio Grande
GCL – Glutamato cisteína ligase
GMPc – Monofosfato de guanosina cíclico
GPx – Glutationa peroxidase
GSH – Glutationa reduzida
GSSG – Glutationa oxidada
GSSG – RGSSG-redutase
GST – Glutationa S-transferase
Hg – Mercúrio
XN – Xantina
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
H₂O – Água
H₂DCF-DA – 2'7'diacetato de diclorofluoresceína
HEPES – 4-(2-hidroxietil) ácido etanosulfônico -1-piperazina

H&E – Hematoxilina e eosina
HNO₃ – Ácido nítrico
HOCl – Ácido hipocloroso
HX – Hipoxantina
IC – Insuficiência cardíaca
ICB – Instituto de ciências biológicas
ICP-MS – Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado individualmente
IL - Interleucina
IP – Intraperitoneal
K – Potássio
KCl – Cloreto de potássio
LPO – Lipoperoxidação
MDA – Malondialdeído
MDR – Resistência a múltiplas drogas
Mg – Magnésio
MgCl – Cloreto de magnésio
MgCl·6H₂O – Cloreto de magnésio hexaidratado
Mn – Manganês
Mo – Molibdênio
MRP1 – Do inglês “Multidrug resistance protein 1” (Proteína de resistência associada a múltiplas drogas)
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
MT – Metalotioneínas
MXR – Resistência a multi-xenobióticos
Na – Sódio
NAD – Dinucleotídeo adenina nicotinamida oxidado
NaCl – Cloreto de sódio
NADH – Dinucleotídeo adenina nicotinamida reduzido
NDA – 2,3-naftalenodicarboxialdeído
Ni – Níquel
NO – Óxido nítrico
NO₂ – Dióxido nítrico
O₂ – Oxigênio
O₂^{•-} – Anion radical superóxido
O₃ – Ozônio
OH[•] – Radical hidroxila
ONOO⁻ – Peroxinitrito
P450 – Citocromo P450 oxidase
PAH – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
Pb – Chumbo
PCB – Bifenílos policlorados
Pgp – Glicoproteína-P
pH – Potencial hidrogeniônico
PLA₂ – Fosfolipase A₂
PM – Do inglês “Particulate Matter” (Material Particulado)
PMN – Polimorfonucleado
PUC-Rio – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro
RB – Rodamina B

RI – Região industrial
RJ – Rio de Janeiro
RNA – Ácido ribonucleico
RR – Região rural
Sb – Antimônio
SC – Solução concentrada
SDS – Dodecil sulfato de sódio
Se – Selênio
SO₂ – Dióxido de enxofre
Si – Silício
SOD – Superóxido dismutase
SP – São Paulo
TBA – Ácido tiobarbitúrico
Ti – Titânio
TMP – 1,1,3,3-tetrametoxipropano
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
TrxR – Tioredoxina redutase
Tris-HCl – Trizma hidrocloreto
UFP – Do inglês “Ultrafine Particle” (partícula ultra fina)
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
V – Vanádio
WHO – Do inglês “World Health Organization” (Organização mundial de saúde)
Zn – Zinco

SUMÁRIO

FOLHA DE ROSTO	I
AGRADECIMENTOS	II
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	III
RESUMO	IV
1. INTRODUÇÃO:	5
1.1. CARACTERIZAÇÃO DAS REGIÕES DE ESTUDO	5
1.2. MATERIAL PARTICULADO	6
1.3. SISTEMAS ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO	9
1.4. RESISTÊNCIA A MULTI-XENOBIÓTICOS	13
2. OBJETIVOS:	14
2.1. OBJETIVOS GERAIS	14
2.2. OBJETIVOS EXPECÍFICOS	15
3. MATERIAIS E METODOS:	15
3.1. AMOSTRAGEM	15
3.2. MODELO ANIMAL E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	16
3.3. BIOACUMULAÇÃO	16
3.4. ENSAIOS BIOQUÍMICOS	17
3.5. ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA A MULTI-XENOBIÓTICOS	20
3.6. ANÁLISES HISTOLÓGICAS	20
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
4. ARTIGO:	21
5. DISCUSSÃO:	41
6. CONCLUSÃO:	47
BIBLIOGRAFIA:	48
TABELAS COMPLEMENTARES (ANEXO I)	V

RESUMO

A poluição do ar tem aumentado nas últimas décadas, resultando em vários problemas de saúde na população exposta. Entre os constituintes presentes no ar atmosférico está o material particulado (do inglês-PM), que possui diferentes tamanhos (0.1-10 μm) e pode ser gerado por processos naturais e antropogênicos. Algumas partículas são emitidas diretamente e outras se formam por reações químicas na atmosfera. O tamanho e composição caracterizam seus efeitos toxicológicos, bem como sua capacidade migratória para outras regiões. Inúmeras substâncias compõem o PM, tais como os metais, dos quais alguns são conhecidos por desencadear efeitos deletérios como o estresse oxidativo. Em megacidades, como Rio de Janeiro, os níveis de $\text{PM}_{2.5}$ são elevados, muitas vezes excedendo os limites permitidos, alcançando regiões rurais afastadas das zonas industriais e urbanas. Assim, o coração é um órgão alvo de injúrias e foi objeto de nosso estudo, verificando os efeitos negativos da porção metálica do $\text{PM}_{2.5}$ sobre este sistema, quando exposto por via intraperitoneal (IP). Avaliando o potencial toxicológico do $\text{PM}_{2.5}$ de uma região industrial (RI) e de uma região rural (RR), coletando $\text{PM}_{2.5}$ de ambas as regiões e quantificando sua composição. Ao final da dissecação do coração, foi analisada a capacidade bioacumulativa dos metais encontrados no $\text{PM}_{2.5}$, pelo método de espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente. Bioquimicamente, foi quantificada a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) através do uso de diacetato de 2,7 diclorodidrofluoresceína. Também quantificada a capacidade antioxidante total contra o radical peróxil (ACAP), com uso de diidrocloreto de metilpropionamidina. Além disso, foi determinada a lipoperoxidação (LPO) pelo método T-BARS, atividade da glutatona S-transferase (GST) com reagente 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno, também atividade da enzima glutamato cisteína ligase (GCL), através da formação da gama-glutamil cisteína. Logo, quantificamos os níveis de glutatona reduzida (GSH) pela reação com 2,3-naftalenocarboxialdeído, estes que foram lidos em fluorímetro (Victor 2 Perkin Elmer). Ainda, foi analisada a atividade total do complexo de resistência a multi-xenobióticos (MXR), através de sua capacidade de extrusão de rodamina B (RB). Além disso, foram feitas análises morfológicas, infiltrado inflamatório, quantificação de células por campo e dano tecidual pelo método histológico de coloração com hematoxilina e eosina. Os dados foram analisados estatisticamente através da ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$ -significante, $p < 0,0001$ -muito significativo). Destacamos que a mistura de vestígios metálicos presentes no $\text{PM}_{2.5}$ mobilizam as defesas antioxidantes, e que estas são utilizadas para manter a homeostase redox e potencializar o mecanismo cardioprotetor, evitando assim o estresse oxidativo. Nossos resultados apontam que na RI foi necessária maior síntese de glutamyl cisteína para a formação de GSH, e seus níveis ainda assim foram diminuídos, o que demonstra a importância do presente sistema antioxidante sobre a produção de ROS mediado por metais. Obtivemos também uma menor capacidade de extrusão de xenobióticos pelo sistema MXR e maior atividade da GST nos grupos da RR. Assim, a exposição ao extrato metálico de $\text{PM}_{2.5}$, em RI e RR, demonstraram resultados semelhantes em alguns parâmetros, o que é explicado pelas semelhanças e entre os níveis e composição química de ambas as regiões, indicando que as áreas no entorno de regiões industriais podem ser igualmente afetadas. Demonstramos ainda, que os metais encontrados no $\text{PM}_{2.5}$ são capazes de bioacumular no tecido cardíaco, causando alterações no perfil antioxidante (ACAP, GST e GSH), causando LPO e conseqüente dano tecidual, visto nos dados histopatológicos, prejudicando outros detoxificadores como MXR. Portanto, concluímos que a exposição ao extrato metálico do $\text{PM}_{2.5}$ tanto de RI, quanto RR resulta em bioacumulação, sendo um importante mediador de lesão oxidativa e potencial modulador da homeostase redox, gerando lesão lipídica e reduzindo a capacidade detoxificadora e conseqüentemente causando lesões teciduais.

1. INTRODUÇÃO

A identificação dos fatores de risco que contribuem para o aumento da mortalidade, bem como o perfil da poluição regional, correlacionando o estudo fisiopatológico a fatores bióticos e abióticos, é de grande valia na identificação de diferentes patologias (BAI *et al.*, 2007; GILL *et al.*, 2011; POLICHETTI *et al.*, 2009; TAYLOR *et al.*, 1992). Neste sentido, tem-se dado atenção à poluição do ar, onde estimativas traçadas pela Organização Mundial de Saúde (WHO), apontam uma taxa de mortalidade mundial de 3 milhões de pessoas anualmente em decorrência da exposição à poluentes atmosféricos (ANDRE *et al.*, 2010). Estes que são gerados a partir da emissão de substâncias advindas dos automóveis e indústrias, levando a um aumento de 76% na taxa de mortalidade (ANDRE *et al.*, 2010). Com isso, contribuindo para o agravamento das disfunções metabólicas e sistêmicas. Alguns estudos apontam que a exposição a níveis elevados de poluentes podem causar uma série de prejuízos à saúde do indivíduo (COSTANTINI, 2010; FUENTES-MATTEI *et al.*, 2010; GILL *et al.*, 2011). Por esse motivo, trabalhos apontam a importância de um melhor entendimento a cerca do ambiente em que o indivíduo está incluso, caracterizando patologias de maior incidência em regiões geográficas específicas, onde se têm mostrado os efeitos danosos de alguns constituintes presentes no ar, como o material particulado (GILL *et al.*, 2011). Estudos mostram que o material particulado está diretamente relacionado com o desencadeamento de doenças respiratórias como enfisema, doenças pulmonares obstrutivas crônicas, asma, bronquite e outras, assim como doenças cardíacas como aterosclerose, hipertensão, arritmia cardíaca e infarto do miocárdio, sendo estas as mais citadas (ARAUJO *et al.*, 2008; BAI *et al.*, 2007; GILL *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2012).

É importante considerar a faticidade pelo qual se está exposto ao PM, sendo possível calcular seu fator de deposição, assim, os valores de inalação do PM se obtêm com base na multiplicação da concentração do número de partícula (CNP), a massa do PM e o volume minuto (V_m) ($CNP \times \text{massa do PM} \times V_m$), sendo o V_m o resultado da multiplicação da frequência respiratória (f) e o volume corrente (VC) ($V_m = VC \times f$) (INT PANIS *et al.*, 2010). Contudo, o aumento nos níveis de poluição do ar influenciam a taxa ventilatória, gerando um aumento ainda maior na inalação destes poluentes, especialmente em momentos de atividade física, podendo chegar a valores seis a oito vezes maiores do que em repouso (DAIGLE *et al.*, 2003; ZUURBIER *et al.*, 2009). Com isso, notamos o quão expostos estamos aos PM, porém poucos estudos mostram seus mecanismos de ação sobre o organismo e como se dá o desencadeamento fisiopatogenico.

1.1. CARACTERIZAÇÃO DAS REGIÕES DE ESTUDO

É comum que grandes metrópoles apresentem elevados índices de poluição, como uma consequência da atividade industrial e urbana. Em nosso estudo, uma região considerada rural e outra com características urbanas/industriais foram analisadas. A cidade de Duque de Caxias abriga inúmeras indústrias, com atividades como a produção de solventes, fabricação de tinta, impressão, produção de aço estrutural, fabricação de couro e a maior refinaria do país (RODRÍGUEZ-COTTO *et al.*, 2014). Seropédica, considerada área rural, possui atividade agrícola que vem reduzindo devido a expansão das indústrias vizinhas, dando lugar à extração mineral, bem como a presença de fábricas de cerveja, usina elétrica e produção de alimentos (MATEUS *et al.*, 2013). Com isso, Seropédica, apresenta baixos níveis de poluição segundo as diretrizes brasileiras, embora ultrapasse os limites de PM_{2.5} segundo a WHO ($10 \mu\text{g m}^{-3}$) (MATEUS *et al.*, 2013). Considerando que no Brasil ainda não existem diretrizes que apontem os limites diários para o PM_{2.5}. Portanto, as regiões de estudo do presente trabalho, tem como foco dois locais distintos, que são áreas metropolitanas do Rio de Janeiro. Um é Seropédica e o comparativo a cargo de Duque de Caxias, uma região urbana, que divide espaço com indústrias.

Duque de Caxias apresenta poluição devido ao tráfego de veículos, como também a poluição gerada por indústrias. Duque de Caxias fica a ~52Km da região a qual será comparada (Seropédica), que é considerada uma área rural (RODRÍGUEZ-COTTO *et al.*, 2014). Este comparativo é de extrema importância, uma vez que Seropédica é um município de ~78.000 habitantes e que apresenta pouca geração de poluentes industriais (MATEUS *et al.*, 2013).



Imagem de satélite das regiões de coleta do PM do presente estudo e a distância entre elas. RR (Seropédica) e RI (Duque de Caxias). Como referência, estão apontadas imagens correspondentes a cada local. Coordenadas geométricas: Seropédica - (22° 44' 38" S and 43° 42' 28" W), Duque de Caxias (22°42'15.5"S 43°18'41.3"W). Imagem retirada e modificada de www.googlemaps.com.

1.2. MATERIAL PARTICULADO

O material particulado (do inglês *particulate matter*-PM) é formado primariamente das emissões de veículos e fontes de combustão, como também a partir de emissões domésticas, industriais, incêndios florestais, cigarros e variações climáticas, dentre outros (POLICHETTI *et al.*, 2009). O PM contém grande teor de elementos químicos, ficando estes em suspensão e formando partículas (ARAUJO *et al.*, 2008). As partículas e os poluentes, independentemente da região, podem conter gases como o óxido nítrico (NO), dióxido de enxofre (SO₂), ozônio (O₃), monóxido de carbono (CO) e outros resíduos de elementos variados (BAI *et al.*, 2007; GIODA *et al.*, 2011). Um importante poluente é o CO, que apresenta influência sobre a contratilidade dos cardiomiócitos, através da diminuição da sensibilidade dos miofilamentos por cálcio (Ca²⁺), influenciando no ciclo de contração-relaxamento, sendo a exposição crônica, um fator pró-arritmogênico (ANDRE *et al.*, 2010). Neste sentido, numa tentativa de compensação para uma melhor funcionalidade do sistema circulatório, é aumentada a produção do NO endógeno (POWERS & JACKSON, 2008). No entanto, mediante aumentos nas liberações de anion superóxido (O₂⁻), este pode vir a formar o peroxinitrito (ONOO⁻), estando o oxigênio (O₂) presente na reação (NO+O₂ = NO₂+O₂⁻ = ONOO⁻), assim o ONOO⁻ é uma espécie reativa de nitrogênio (ERN), também conhecido por danificar estruturas celulares (POWERS & JACKSON, 2008; TABIMA *et al.*, 2012). Podendo ser encontrados também, elementos inorgânicos como parte integrante do PM (PERRONE *et al.*, 2010). Quanto à suas dimensões, o PM é classificado em tamanhos que variam desde PM_{≤0.1} μm à PM₁₀ μm (PM_{0.1}-PM₁₀), onde os PM_{≤0.1} μm são partículas ultrafinas (UFP) e PM_{≤2.5} μm partículas finas (FP), sendo estas, capazes de permanecerem por mais tempo no ar e apresentarem maior permeabilidade no epitélio alveolar (POLICHETTI *et al.*, 2009). Estes constituintes podem alcançar as vias aéreas superiores, chegando até os pulmões e coração, através da circulação e causando danos à saúde por reagir com outras moléculas e no contato celular (ARAUJO *et al.*, 2008; POPE, 2000). Já o PM_{≤10} μm (PM₁₀), uma vez inalado, fica acumulado nas paredes alveolares, causando reações inflamatórias na região, e está relacionado com risco de morte, sendo que tanto a exposição crônica quanto aguda, gera alterações da pressão arterial sistólica e aumento da morbidade e mortalidade por exposição (BAI *et al.*, 2007; GILL *et al.*, 2011). Devido a isso, estudos experimentais, epidemiológicos e clínicos em associação, são de extrema importância, levantando indícios que apontam o PM como importante fator de risco (POLICHETTI *et al.*, 2009). No entanto, são as UFP quem apresentam maior capacidade sistêmica de causar estresse

oxidativo e de interagir com proteínas plasmáticas, interferindo na resposta inflamatória (ARAUJO *et al.*, 2008). Isso porque são rapidamente absorvidas, vindo a alcançar o sistema circulatório, atingindo outros órgãos (POLICHETTI *et al.*, 2009). A cardiotoxicidade de regiões urbanas apontam índices aumentados de isquemia do miocárdio, estando correlacionado à toxicidade do local, apontando a poluição do ar como promotora de regulação de genes inflamatórios, desequilíbrio da proliferação celular, diferenciação e apoptose (VILLARREAL-CALDERON *et al.*, 2012). Em adição, alterações gênicas responsáveis pelo desequilíbrio entre o processo de fissão/fusão mitocondrial, também foram observados em ratos expostos aos PM_{2.5} (LI *et al.*, 2015).

Os metais fazem parte da composição do PM independentemente do tamanho e apresentam heterogeneidade, onde podemos encontrar o silício (Si), alumínio (Al), cálcio (Ca), ferro (Fe), titânio (Ti), vanádio (V), cromo (Cr), níquel (Ni), cobre (Cu), zinco (Zn) e chumbo (Pb) (POLICHETTI *et al.*, 2009). Além desses, também o potássio (K), sódio (Na), antimônio (Sb), cádmio (Cd) e o magnésio (Mg) (KIM *et al.*, 2015b), bem como arsênio (As), manganês (Mn), cobalto (Co), molibdênio (Mo), selênio (Se) e mercúrio (Hg) (QUITERIO *et al.*, 2004). Neste sentido, é uma priori entender que mesmo em baixas concentrações, metais apresentam alta capacidade de interação com elementos biológicos, exercendo efeitos fisiológicos significativos (KONTAS, 2007; QUITERIO *et al.*, 2004). Em estudos *ex-vivo*, os metais solúveis contidos no PM reduzem a capacidade de recuperação pós eventos de isquemia e reperfusão, uma vez que são capazes de alterar a homeostase do Ca²⁺, inibindo o influxo celular e abrir canais de Ca²⁺ intracelulares (BAGATE *et al.*, 2006). Já se sabe que os níveis de metais em regiões industriais alcançam valores duas vezes maiores em comparação a locais rurais, explicitando interdependência da concentração e a região onde este está sendo coletado (GIODA *et al.*, 2011; STEENHOF *et al.*, 2011). Assim sendo, trabalhos prévios apontam maior incidência de metais contidos no ar atmosférico das mesmas zonas que pretendemos estudar, bem como suas possíveis vias de ação, dentre eles podemos citar o Fe (MATEUS *et al.*, 2013). Este metal está em grande concentração no corpo humano e tem importante função na interação com o O₂, por ser um metal de transição que apresenta alta capacidade de oxidação, sendo transportado por proteínas específicas (PUNTARULO, 2005). O Ni, que é um importante desencadeador de uma cascata de respostas fisiológicas, apresentando capacidade hipotérmica e arritmogênica em corações de ratos, podendo também causar lesões oxidativas devido à inibição de enzimas antioxidantes (CAMPEN *et al.*, 2001). O Ni, assim como Hg, apresentam toxicidade aguda,

ocorrendo alterações dos mecanismos antioxidantes e consequente lipoperoxidação (LPO), gerando também aumentos nas concentrações de Fe, tendo sido testado em ratos (STOHS & BAGCHI, 1995). Os efeitos do Ni em sinergismo com V podem iniciar a geração de agentes inflamatórios nos pulmões, causar bradicardia, hipotermia e elevação dos níveis de fibrinogênio, visto em ratos (CAMPEN *et al.*, 2001). Metais como V e Fe apresentam a mais elevada capacidade oxidante e potencial de geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), também em ratos (CAMPEN *et al.*, 2001). Além disso, induzem a formação de ERNS, que influenciam na oxidação promovida pela xantina oxidase (XO). Esta enzima degrada a hipoxantina (HX) em xantina (XN) e logo em ácido úrico (AU), um antioxidante não enzimático que possui grande afinidade por metais (TABIMA *et al.*, 2012). Já o Cd, aumenta a LPO logo após o contato com os tecidos, não estando relacionado à geração de espécies reativas de oxigênio (STOHS & BAGCHI, 1995). Alguns metais como As e Sb, apresentam citotoxicidade devido à sua capacidade de oxidação de grupos sulfidrila, em enzimas e mitocôndrias e, com isso, prejudicando a respiração celular (LESLIE *et al.*, 2001). Outro metal é o Cr, que é de grande potencial carcinogênico, gerando também LPO e dano de DNA. Em contra partida, o Zn parece influenciar na estabilização da membrana celular, diminuindo a formação de ROS (STOHS & BAGCHI, 1995). Assim, vemos que cada metal possui um efeito específico, e a interação dos sistemas biológicos irá gerar respostas também específicas, apresentando efeitos toxicocinéticos variáveis (STOHS & BAGCHI, 1995). Com base nisso, quando ocorre a exposição sinérgica de poluentes, pode ser gerada uma resposta inesperada, considerando que a coexposição e consequente interação entre os elementos pode ser um fator importante na resposta celular (SAÏDI *et al.*, 2013). A interação entre os metais presentes no PM e os sistemas biológicos pode ser um determinante crucial no entendimento toxicológico da poluição do ar e seus efeitos negativos sobre os órgãos, uma vez que esta interação pode potencializar ou inibir uma resposta protetora da célula (CAMPEN *et al.*, 2001). Nossas regiões de estudo serão dois locais do estado do Rio de Janeiro, Brasil, onde os metais mais encontrados em fase aquosa, em zonas urbanas são o V e Ni (40%), Al e Fe (<3%), estando presentes também o Zn, Si e Cu em proporções menores (GILL *et al.*, 2011; GIODA *et al.*, 2011).

1.3. SISTEMAS ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO

Recentemente, estudos apontam o estresse oxidativo como um importante marcador na caracterização patogênica, apresentando grande potencial de causar danos à saúde, sendo considerado resultado da ação de agentes oxidantes (RODRIGUEZ, 2001). Condições de redução

da capacidade antioxidante, ou incapacidade desta em combater EROS, resulta no comprometimento do sistema imune, alterações dos níveis hormonais, metabolismo lipídico, indução de mudanças no DNA, câncer, entre outros (COSTANTINI, 2010; FUENTES-MATTEI *et al.*, 2010; LUSHCHAK, 2011). A produção de ROS é um evento normal durante o metabolismo celular, na redução parcial do O_2 , obtendo como produto intermediário o O_2^- , peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e/ou radical hidroxila (OH^*) (ABELE & PUNTARULO, 2004). Porém, EROS também pode ser intensificado por estresse ambiental, todavia, os organismos possuem maquinarias enzimáticas para prevenir e/ou limitar os possíveis danos gerados por EROS (CAVALETTO *et al.*, 2002). Após o desequilíbrio entre a formação de EROS e sua detoxificação, ocorre um estado de oxidação do tecido aumentando ainda mais a produção de ROS intra e extracelular (ABELE & PUNTARULO, 2004). Com isso, se inicia uma série de reações na tentativa de resistir à peroxidação lipídica que foi desencadeada, ativando complexos enzimáticos e/ou conjugando antioxidantes não enzimáticos como flavonoides, ubiquinóis, vitaminas (A, C, E), bem como a glutatona, os quais contribuem com o sistema antioxidante enzimático (URSO & CLARKSON, 2003). Contudo, a continuação da formação de EROS altera a relação entre a formação de glutatona reduzida e sua forma oxidada (GSH/GSSG), bem como a razão do dinucleotídeo adenina nicotinamida reduzido e oxidado (NADH/NAD) (ABELE & PUNTARULO, 2004). Ainda, os mecanismos antioxidantes contam com a prevenção da formação de EROS e reparo celular, mantendo o estado redox dentro de uma faixa de variação, que na presença de elevada concentração de metais de transição, este estado redox pode ser comprometido (VALKO *et al.*, 2006). Em contrapartida, a produção de EROS tem sido relatada também como um importante mecanismo de sinalização celular, induzindo a expressão de genes pró inflamatórios (GONZÁLEZ-FLECHA, 2004). Isso se dá, através da regulação de fatores de transcrição sensíveis ao estado redox, como o fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$) e interleucina 8 (IL-8) (GONZÁLEZ-FLECHA, 2004).

Deve-se considerar a geração espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONS), como respostas fisiológicas importantes, onde somente a formação destas espécies em proporções acima da capacidade de detoxificação leva ao estresse oxidativo (TABIMA *et al.*, 2012). Portanto, a inflamação é uma das principais respostas alveolares resultantes da geração de RONS em decorrência da exposição ao PM (GONZÁLEZ-FLECHA, 2004). Assim, cada EROS possui um mecanismo de detoxificação, a exemplo, o O_2^- , que é reduzido a H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase citoplasmática (CuZnSOD), ou mitocondrial (MnSOD) (ABELE &

PUNTARULO, 2004). O H_2O_2 , que pode ser convertido ao OH^\bullet pela reação de Fenton ou sofrer decomposição pela enzima catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), gerando água e O_2 (CAVALETTO *et al.*, 2002). Além disso, o combate a EROS apresenta também mecanismos antioxidantes não enzimáticos como a GSH e uma gama de vitaminas capazes de contribuir para a detoxificação (ABELE & PUNTARULO, 2004; JI, 2001).

A GSH é sintetizada pela ação de duas enzimas, primeiramente a glutamato cisteína ligase (GCL), conjugando o glutamato e a cisteína, formando o gama glutamil cisteína, logo, a glutathiona sintetase (GSS), que liga a glicina formando a GSH (UCHIDA *et al.*, 2010). Após a oxidação da GSH, esta é convertida a glutathiona oxidada (GSSG), que sofre ação da enzima GSSG redutase (GSSG-R), que converte novamente a GSSG em GSH, e este ciclo é de extrema importância para o equilíbrio redox. Os níveis de GSH também podem estar ligados à ativação das caspases, e com isso às vias de sinalizações apoptóticas, bem como, à inibição do complexo I mitocondrial, devido à S-nitrosilação deste, quando em baixos níveis de GSH (BALLATORI *et al.*, 2009). Danos no ciclo da GSH contribuem com o desencadeamento do estresse oxidativo, como também na atividade da GST, que atua na catalisação da conjugação da GSH com xenobióticos (BALLATORI *et al.*, 2009; ROMIEU *et al.*, 2008). A GST faz parte de uma superfamília de enzimas que em humanos se divide em até sete isoformas, dentre elas: alpha, mu, pi, sigma, theta, zeta, e omega, onde algumas de suas subfamílias apresentam capacidade específica de metilação de metais pesados como o As inorgânico (CHOWDHURY *et al.*, 2006). A GST apresenta também, capacidade de ligação à uma gama de hormônios e metabólitos endógenos, mediando o transporte intracelular destes produtos (WARHOLM *et al.*, 1981). Podendo se ligar tanto de forma covalente quanto não covalente, apresentando também um importante papel regulador na ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), e com isso influenciar na via de sinalização de sobrevivência ou morte celular (TOWNSEND & TEW, 2003). A variação na expressão das isoenzimas da GST pode ser um fator crucial na predisposição do indivíduo aos efeitos tóxicos e elementos cancerígenos (SHEWEITA & TILMISANY, 2003). Nesta condição, a GST protege as células cancerígenas contra o estresse oxidativo, induzindo resistência adicional à drogas de combate ao câncer, contribuindo com o complexo de resistência a multi-xenobióticos (MXR), devido à sua capacidade de extrusão de conjugados (KRISHNA & MAYER, 2000). Além desses sistemas antioxidantes, proteínas com múltiplas funções biológicas, como as metalotioneínas (MT), que apresentam atividade regulada por metais como Cu e Zn, detoxificando outros metais como Cd e Hg, ajudam a regular a

homeostase redox celular, tentando evitar o desencadeamento do estresse oxidativo (CAVALETTO *et al.*, 2002).

A interação de metais com outras moléculas no ambiente celular pode gerar alterações biológicas, a exemplo, a reação de Haber-Weiss, onde o grau de toxicidade do anion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e H_2O_2 se dá em decorrência de sua reação com Fe, formando o OH^{\cdot} , provocando prejuízos às membranas, proteínas e ao DNA (PUNTARULO, 2005). Além disso, é importante considerar a ação sinérgica de respostas celulares pulmonares sinalizando as células cardíacas sobre a presença de prováveis agentes oxidantes, pela ação conjunta de variados agentes pró inflamatórios como TNF e IL-8 (GONZÁLEZ-FLECHA, 2004). Assim, a partir de fosfolípídeos de membrana, a fosfolipase A_2 (PLA_2) inicia a síntese de ácido araquidônico, este que é substrato para a formação de componentes inflamatórios e consequente aumento da geração de EROS (TABIMA *et al.*, 2012). Através do aumento da atividade de agentes quimiotáticos, prostaglandinas (PGH) são mobilizadas ao local da lesão, contendo grande número de células polimorfonucleares (PMN), estes que durante a fagocitose de restos celulares liberam $O_2^{\cdot-}$ (JI, 2001). Com isso, vindo a ser catalisado por antioxidantes enzimáticos como SOD, formando o H_2O_2 que na presença de metais de transição (Fe, Cu, Zn) é convertido a OH^{\cdot} , ou ainda ácido hipocloroso (HOCl) (JI, 2001). Portanto, se torna evidente a influencia que o PM apresenta sobre os potenciais efeitos pró inflamatórios, onde já é aceitável que este atinja a circulação sanguínea por diferentes vias, ultrapassando as paredes dos alvéolos ou após a fagocitose por macrófagos alveolares (ARAUJO *et al.*, 2008; POPE, 2000). Além disso, é bem aceito que o $PM_{2.5}$ é um potente indutor de oxidação mitocondrial, gerando estresse oxidativo em pulmão, e ainda possui potencial carcinogênico, através da capacidade de EROS de inativar vias de supressão tumoral (SOBERANES *et al.*, 2012). Com isso, a exposição a longo prazo está diretamente relacionada a aumentos significativos de morte por câncer de pulmão e coração (POPE III *et al.*, 2002).

Os elementos que compõe a poluição do ar parecem ser capazes de inibir a atividade das enzimas antioxidantes: SOD, CAT e glutathiona peroxidase (GPx), atribuindo esta resposta à super atividade da tiorredoxina redutase (TrxR), como consequência da cronicidade de exposição (ANDRE *et al.*, 2010; ROMIEU *et al.*, 2008). Estas modulações enzimáticas fazem com que cardiomiócitos apresentem alterações fenotípicas características da insuficiência cardíaca (IC), apresentando também íntima relação com alterações na viscosidade do sangue e evidente indução do estresse oxidativo (ANDRE *et al.*, 2010). Tem sido documentado também, que aumentos na

atividade da GPx e GST na conjugação da GSH com xenobióticos e radicais livres, podem estar relacionado à superexpressão destas enzimas numa proporção descontrolada, estando relacionado com tumores malignos, como mecanismo de proteção contra o reconhecimento por linfócitos citotóxicos (RAJNEESH *et al.*, 2008).

1.4. RESISTÊNCIA A MULTI-XENOBIÓTICOS (MXR)

O complexo MXR é resultado de transportadores de membrana dependentes de trifosfato de adenosina (ATP), entre outros fatores, é um mecanismo idêntico ao encontrado em células tumorais, conhecido como resistência a múltiplas drogas (MDR) (TOOMEY & EPEL, 1993). Embora presente em vários tecidos saudáveis, estes transportadores são ainda assim encontrados com maior prevalência em células cancerígenas (GOTTESMAN *et al.*, 2002). As superfamílias de proteínas transportadoras, conhecidas também como cassetes ligados ao ATP (do inglês *ATP-binding cassette* - ABC), partilham de algum grau de homologia em sua sequência de aminoácidos, estando preservada em seus domínios e subdivididos em sete famílias (A-G) (KUNJACHAN *et al.*, 2013). São bombas transmembranares de extrusão de xenobióticos, que incluem dentre outras, duas importantes subfamílias como a glicoproteína-P (Pgp ou ABCB1), e a proteína de resistência associada a múltiplas drogas (MRP1 ou ABCC1) (MOLINAS *et al.*, 2012). Os transportadores ABC são dependentes da hidrólise do ATP, logo são ATPases, facilitando o transporte ativo de substâncias através das membranas (HASLAM *et al.*, 2015). Como exemplo, inibidores da tirosina quinase e nucleotídeos cíclicos como o monofosfato de adenosina cíclico e o monofosfato de guanosina cíclico (AMPc e GMPc) e até derivados do ácido araquidônico (HASLAM *et al.*, 2015). Além disso, MRP1 também é um transportador ativo primário de produtos da LPO, bem como de GSH e alguns metais, evitando a acumulação intracelular (LESLIE *et al.*, 2001). De maneira geral, o complexo MDR não é só resultado da ação das bombas de efluxo, mas também da capacidade de reparo do DNA, inibição das vias apoptóticas, alterações da composição da membrana celular e biotransformação de drogas, culminando na modulação da expressão destas bombas (KUNJACHAN *et al.*, 2013). Assim, é sugerido como um mecanismo que apresenta ação primária essencial na defesa contra xenobióticos, apresentando grande ubiquidade (KURELEC *et al.*, 2000), sendo um sistema inato, que responde a eventos citotóxicos e que tem propriedade de ampliar sua capacidade, evidenciando uma resposta adaptativa. Assim, MXR também é um importante meio de proteção contra agressões ambientais através da detoxificação frente à exposição por metais (CHIN *et al.*, 1990). A extrusão de metais pelo MRP1, parece estar relacionada com o efluxo de GSH, não es-

tando claro ainda se estes se encontram conjugados, no entanto isto sugere que a extrusão de metais, por este complexo, ocorre por um mecanismo GSH- dependente (LESLIE *et al.*, 2001). De fato, parece existir cotransporte de muitas substâncias quando conjugadas com GSH, aumentando a resistência mediada por MRP1 (HIPFNER *et al.*, 1999). Além disso, este sistema transporta uma ampla variedade de substratos, incluindo os contaminantes hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) e bifenilos policlorados (PCB), impedindo sua acumulação (SAEZ *et al.*, 2008). No entanto, esta exposição pode resultar da ativação de agentes de detoxificação em associação, como a citocromo P450 oxidase (P450) e o transportador de múltiplas drogas P-glicoproteína (PGP), que podem responder a qualquer droga (GOTTESMAN *et al.*, 2002).

A hipótese do presente estudo é que a composição do $PM_{\leq 2.5}$, na região de estudo, apresenta elementos tóxicos, capazes de gerar uma cascata de efeitos que variam desde a modulação dos sistemas antioxidantes e alterações da resposta de detoxificação celular. Com isso, pode vir a prejudicar o sistema cardíaco, através de uma cascata de reações bioquímicas em detrimento da concentração e interação dos elementos encontrados. Para tanto, foram avaliados aspectos relacionados à bioacumulação no tecido cardíaco, determinação de EROS, capacidade antioxidante total, atividade da GCL, formação de GSH e atividade da GST. Também foi quantificada a atividade do mecanismo de resistência a multi-xenobióticos (MXR), infiltrado inflamatório, dano e proliferação celular no coração de *Rattus norvegicus*, frente à exposição ao $PM_{\leq 2.5}$. As regiões de estudo fornecem um comparativo, a fim de saber se locais menos poluídos, realmente estão livres dos danos causados pelo PM. Neste sentido, este estudo pode vir a fornecer dados à órgãos de fiscalizações a cerca da toxicidade do PM do ambiente de coleta, contribuindo na complementação dos dados toxicológicos que constituem bases de informações no Brasil, vindo a reforçar as Resoluções nº 003/1990 e nº 008/1990 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

2. OBJETIVO GERAL

- Quantificar a composição dos filtros coletados e a constituição do $PM_{2.5}$ de cada região de estudo;
- Verificar possíveis diferenças toxicológicas entre os $PM_{2.5}$ sobre o tecido cardíaco;
- Fazer curvas concentração-resposta frente ao extrato do $PM_{2.5}$

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a possível bioacumulação no tecido cardíaco;
- Determinar a formação de EROS;
- Quantificar a capacidade antioxidante total contra o radical peroxil (ACAP);
- Avaliar o grau de LPO;
- Mensurar a atividade da GCL e GST;
- Quantificar os níveis de GSH;
- Determinar a atividade do complexo MXR;
- Verificar a possível presença de infiltrado inflamatório e danos teciduais no tecido cardíaco.

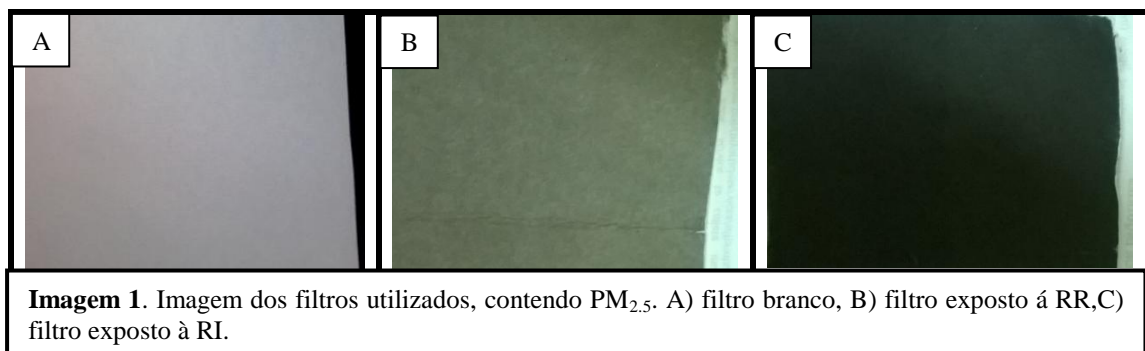
3. MATERIAIS E METODOS

Nossos experimentos estão em conformidade com as normas e diretrizes do bem estar animal e de acordo com a aprovação do comitê de ética ao uso animal da Universidade Federal do Rio Grande (CEUA-FURG), sob número de processo Pq0075/2014.

3.1. AMOSTRAGEM

Amostras de material particulado (PM_{2.5}) foram coletados no estado do Rio de Janeiro, Brasil, em duas regiões distintas, uma caracterizada como urbana/industrial, região metropolitana do RJ (Duque de Caxias), e outra rural (Seropédica). As amostras foram coletadas utilizando amostradores de grande volume (Energética, SP) com fluxo médio de 1 m³/min. e fixados a ~2 m do solo. As coletas foram realizadas a cada 6 dias durante 24 h, entre os meses de junho a agosto de 2012, usando filtros de microfibras de vidro borossilicato (Energica 254 X 203 mm, espessura de 0,22 µm). Para realizar nossos experimentos, os filtros contendo PM_{2.5} foram pesados e uma alíquota extraída, sob agitação, com solução salina (0,9% NaCl), sendo este o veículo de exposição por via intra peritoneal (IP). Os filtros foram diluídos na proporção de 1 g para 100 ml de solução salina, sendo então filtrado em malha de 30 µm e, posteriormente, filtrado novamente

em filtro de seringa (0,45 μm), logo, tudo aquilo maior que 0,45 μm ficou retido, não tendo sido usado, e com isso, nos assegurando maior homogeneidade na composição das partículas que compunham as soluções. A solução obtida a partir das filtragens foi um extrato bruto de $\text{PM}_{2.5}$, considerada a de maior concentração (SC) de cada região. Logo, outras duas concentrações foram obtidas a partir da SC, que foram diluídas 5X e 10X em solução salina. Isso nos permitiu elaborar uma curva de diluições seriadas a partir da SC, obtendo concentrações decrescentes (SC, 5X diluído e 10X diluído), a fim de obter dados correspondentes à diferentes respostas frente ao extrato das duas regiões e se estas respostas são concentração-dependentes. Os filtros utilizados estão exemplificados na figura 1, sendo possível ver o filtro branco, limpo de PM, o filtro que ficou exposto à região rural e o filtro exposto à região industrial (A, B e C respectivamente).



3.2. MODELO ANIMAL E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 56 ratos machos da linhagem Wistar, com 3 meses de idade, pesando aproximadamente 250g. Os animais foram obtidos do centro de reprodução e experimentação de laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e mantidos no biotério de roedores convencionais do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Rio Grande - FURG. Foram mantidos em gaiolas coletivas (3 e 4 animais por caixa) e alimentados com ração própria para roedores e com água “*ad libitum*”, mantidos em sala com ciclo claro/escuro de 12h/12h, com temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$). Foram elaborados oito grupos de sete ratos para a realização do experimento, sendo um grupo controle sem filtro, somente solução salina 0,9%, (CT) e um grupo controle com a diluição de um filtro limpo de PM, caracterizado como filtro branco (FB). Os filtros coletados em Seropédica correspondem à região rural (RR), destes fizemos: 1 grupo com diluição de 10X, 1 grupo com diluição de 5X e 1 grupo com o extrato concentrado (SC). O mesmo foi realizado para os filtros coletados na região de Duque de Caxias, esta que corresponde à região urbana/industrial (RI). O grupo exposto ao

filtro limpo de PM foi considerado o controle da descrição dos resultados. O grupo controle sem filtro, somente solução salina (CT) foi utilizado a fim de verificar uma possível toxicidade dos filtros, já que os mesmo possuem alguns elementos químicos em sua constituição.

Grupos	CTR		RR			RI		
Concentrações	CT	FB	10X	5X	SC	10X	5X	SC

Para a exposição, os grupos receberam por via intraperitoneal (IP) durante 25 dias ininterruptos 1 mL das soluções com diferentes concentrações de PM (10X, 5X e SC), bem como nos controles com filtro branco (FB) e também nos controles sem filtro (CT). Os animais foram finalizados por decapitação 24 h após o último dia de administração e os corações foram dissecados para as análises bioquímicas e histológicas.

3.3. BIOACUMULAÇÃO

Para se verificar a bioacumulação, o coração foi removido, pesado e liofilizado, até que os pesos das amostras permanecem constantes. Logo, foram enviados para PUC-Rio, para quantificação de metais por espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). Para a quantificação dos metais, após a liofilização, os corações foram mantidos em 2,5 mL de ácido nítrico (HNO_3) durante 12 horas, e então as amostras foram aquecidas durante 4 h a 80 °C e, posteriormente centrifugadas e analisadas, conforme Mateus *et al.*, (2013).

3.4. ENSAIOS BIOQUÍMICOS

3.4.1. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Para as análises bioquímicas, a determinação da concentração de proteínas foi realizada com uso do Biureto, conforme prescrito no Kit. Neste ensaio 100 mg do tecido foi homogeneizado em 400 µL de tampão, contendo Tris-HCl (100 mM), EDTA (2 mM), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5mM) que foram diluídos em 500mL de água ultra pura (Milli-Q) e pH ajustado em 7,75, sendo adaptado quando necessário para análises específicas. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 10.000 G em 4 °C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para mensurar a concentração de proteínas de cada tecido. Após, 375 µl de Biureto foi adicionado em todos os ependorffs e acrescido 7,5 µl de tampão de homogeneização para o branco, 7,5 µl de padrão para o controle de padronização de fluorescência ou 7,5 µl de amostras nos ependorffs correspondentes e em duplicata. Então, o conteúdo foi homogeneizado e a micro placa foi

montada com 150 μl e em duplicata pra cada ependorff, sendo então lida no ELISA com comprimento de onda de 550 nm.

3.4.2. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS).

Para a quantificação de ROS, tivemos como base o método descrito por Viarengo *et al.*, (1999), que consiste na geração de fluorocromo a partir da adição de diacetato de 2,7' diclorodihidrofluoresceína 16 μM ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$, Molecular Probes) diluído em 4,275 mL de álcool 100%, que na presença de ROS do sobrenadante, é detectado no leitor de microplacas (Victor2, Perkin Elmer), com comprimento de ondas de 488 nm para excitação e 525 nm para emissão. Assim, para a montagem das placas fizemos triplicatas de branco com tampão de reação contendo em mM: 30 de HEPES, 200 de KCl e 1 de MgCl_2 , em H_2O ultra pura e pH7,2 e tampão de homogeneização (10 μL). O volume final para todas as poças 147,5 μL , dos quais foram em μL : 127,5 tampão de reação (HEPES 30 mM, KCl 200 mM, MgCl_2 1 mM), 10 sobrenadante do tecido, 10 de $\text{H}_2\text{DCF-DA}$. Os resultados foram analisados por área relativa de fluorescência.

3.4.3. QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL CONTRA O RADICAL PEROXIL (ACAP).

Para a determinação de ACAP, seguimos o mesmo protocolo de quantificação de ROS, porém, utilizamos meia placa 7,5 μL água Milli-Q, (controles), com outra metade que continha um gerador de radicais peroxil. Portanto, a partir da técnica de determinação de ROS, adicionamos 7,5 μL de diidrocloreto de metilpropionamida (ABAP; 4 mM; Aldrich), comparando as amostras com este gerador de radicais peroxil, com as que não adicionamos. Sendo então as amostras lidas (Victor2, Perkin Elmer) a 37 °C, com comprimento de onda de 488 nm de excitação e 525 nm de emissão, conforme descrito por Amado *et al.*, (2009). Os resultados foram expressos por área relativa de fluorescência.

3.4.4. DETERMINAÇÃO DE LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO)

Utilizamos o método descrito por Oakes & Van Der Kraak (2003), que consiste em gerar fluorescência a partir da conjugação entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e um dos produtos finais da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA). A leitura foi realizada em espectrofotômetro, em 520 nm, de excitação e 580nm de emissão. Para isso, foi feita uma curva padrão com 1.21436

nmol/ μ L, que continha 50 nmol em 41.2 μ L, de 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP), adicionando 5 μ L de TMP a 25 mL de H₂O ultra pura, sendo este o padrão de 50 nmol que foi diluído seriadamente para obtenção de uma curva padrão (0,006 nmol, 0,01221 nmol, 0,02441 nmol, 0,04883 nmol, 0,09766 nmol, 0,19631 nmol, 0,39063 nmol e 0,78000 nmol). Logo, utilizamos 100 μ L de sobrenadante das amostras, e em todos os tubos de ensaio, adicionamos 20 μ L de hidroxitolueno butilado (BHT) (15,5 mg em 50 mL etanol), exceto na curva padrão, 150 μ L de ácido acético 20%, 150 μ L de TBA (0,4 g em 50 mL H₂O ultra pura), 50 μ L H₂O ultra pura, 20 μ L SDS (8.1%). Após a homogeneização, os tubos foram colocados em banho em 95 °C por 30 minutos. Ao final, adicionado 100 μ L de H₂O ultra pura e 500 μ L de n-butanol em cada tubo, homogeneizados e centrifugados (3.000 rpm, 10min.,15 °C), separando assim as fases orgânica e inorgânica. A seguir, com os sobrenadantes, foram montadas as microplacas em quadruplicada e os resultados foram expressos em nmol de MDA por mg de proteínas.

3.4.5.ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

Para determinar a atividade da GST, adicionamos 25 mM de GSH (Sigma) em 50 mM do reagente 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB, Sigma), sendo a leitura realizada em 340 nm. Utilizamos tampão fosfato (0,1 mM) para a reação a pH7.0, conforme descrito por Habig & Jakoby (1981). Por se tratar de um ensaio cinético, foram feitas oito leituras a cada 15 segundos, de apenas duas colunas por vez, tendo como poças padrões o tampão de homogeneização (10 μ L) acrescido de 235 μ L de solução de CDNB (50 mM) todas as poças, e para as amostras, foram adicionados 10 μ L do sobrenadante. A leitura foi feita em comprimento de onda de 340 nm e os resultados expressos em nmoles de CDNB/min/mg de proteína.

3.4.6.DETERMINAÇÃO DA GLUTAMATO CISTEÍNA LIGASE (GCL) E CONCENTRAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) TOTAL

Quantificamos a concentração total da glutationa reduzida (GSH) e atividade da GCL conforme White *et al.*, (2003), onde GSH é capaz de reagir com o composto 2,3-naftalenodicarboxialdeído (NDA), gerando fluorescência. Adicionamos ácido tricloroacético às amostras, para que ocorresse a precipitação das proteínas, sendo então as placas levadas para centrífuga por 5min. Ao final o sobrenadante foi transferido para as placas e lidas em espectrofotômetro (VÍctor 2, Perkin Elmer). Adicionamos à cada poça das placas a solução de derivação do NDA e incubamos por 30 minutos, então as amostras foram lidas a 480nm/520nm

excitação/emissão respectivamente. A quantificação da atividade da GCL foi feita pelos níveis de γ -glutamil cisteína/mg de proteína, e os níveis de GSH estão expressos em nmoles de GSH/mg de proteína.

3.5.ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA A MULTI-XENOBIÓTICOS

A determinação da atividade dos transportadores do mecanismo de resistência a multi-xenobióticos (MXR) ocorreu seguindo o protocolo descrito por Kurelec *et al.*, (2000), com base no conhecimento de que este mecanismo tem como substrato a Rodamina B (RB). Foram incubados por duas horas 50 mg dos corações de uma mesma região (ápice) em 500 μ L de RB (10 nM). Após a incubação (2 h), os tecidos foram lavados em solução salina, para a retirada do excesso de RB, secados e congelados para leitura única. Logo após, foram homogeneizados em 400 μ L de H₂O Milli-Q e centrifugados (7500G, 5min). O sobrenadante foi colocado em poças contendo 200 μ L (duplicata), tendo como branco, o mesmo número de amostras de poças (H₂O Milli-Q). Assim, a partir do método de bioacumulação do substrato fluorescente RB, foi possível detectar as variações funcionais do complexo. Quanto maior a acumulação do substrato no interior da célula, menor a atividade de MXR em retirar RB do meio interno celular. Os dados foram interpretados pelo nível de RB/mg de tecido.

3.6.HISTOLOGIA

As análises histológicas foram realizadas conforme metodologia descrita por Carson & Hladik (2009). Assim, através de cortes (6 μ m) dos corações, que estavam fixados em formalina 10%, estes foram processados e fixados, sendo então as lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E). O exame histológico foi feito com uso de um microscópio de luz (Olympus-BX 51).

3.7. ANALISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, sendo representados como média \pm EPM. A comparação entre os grupos foram realizadas utilizando *one way* ANOVA seguido do teste de Tukey. Também foi utilizado o teste t-student para o comparativo entre a composição dos filtros e as concentrações de PM_{2.5} entre as regiões. Em todos os testes estatísticos foram considerados como significância estatística o $p < 0.05$.

4. ARTIGO

Artigo a ser submetido à revista "Environment International" quails "A1".

Toxicological effects of particulate matter (PM_{2.5}) in rats: bioaccumulation, antioxidants alterations, lipid damage and ABC transporters activity

Joaquim de Paula Ribeiro^{ab#}, Ana Cristina Kalb^{ab#}, Paula Peixoto Campos^c, Pablo Elias Martinez^{ab}, Adriana Gioda^d, Alex Rubén Huaman De La Cruz^d, Marta Marques de Souza^{ab}, Carolina Rosa Gioda^{ab}

^aBiological Sciences Institute, Federal University of Rio Grande - FURG, Carreiros, RS, Brazil.

^bGraduated program in Comparative Animal Physiology, Biological Sciences Institute, FURG, Brazil

^cDepartment of Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^dPontifical Catholic University of Rio de Janeiro (PUC-Rio), Department of Chemistry, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Co-first authors

*Corresponding author: Carolina Rosa Gioda

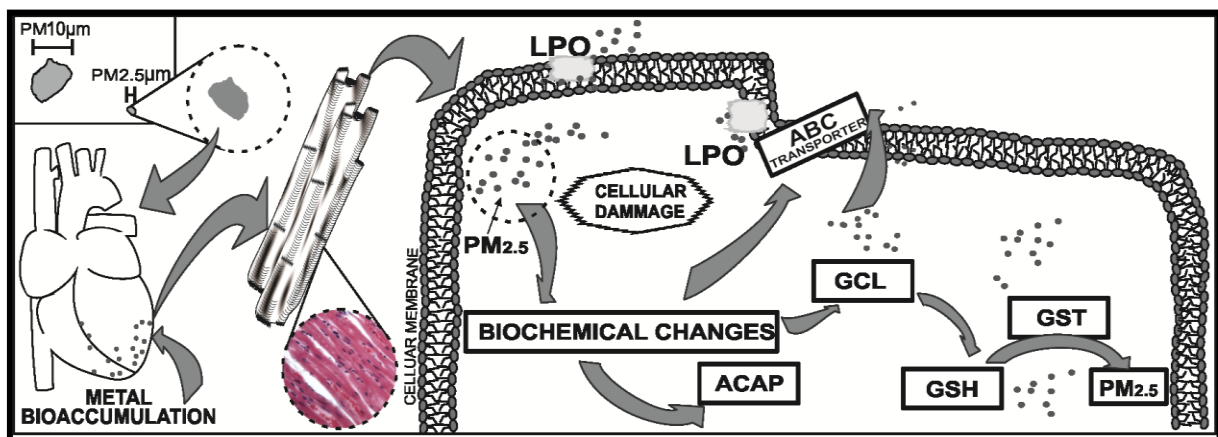
Av. Itália Km 8, Campus Carreiros, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, CEP: 96203-900, Rio Grande, Rio Grande do Sul - Brasil - Caixa-postal: 474.

Phone: +55 5332935188

E-mail: carolinagioda@yahoo.com.br

Abstract

Studies have demonstrated harmful effects of atmospheric pollutants on cardiac systems. This is due to the presence of particulate matter (PM), a complex mix of numerous substances, including trace metals. In this study, it was investigated the toxicity of PM_{2.5} from two regions in the state of Rio de Janeiro (one considered rural and the other industrial) through in vivo experiments in rats during 25 days. Metal accumulation and biochemical responses were evaluated after exposure to three different concentrations of PM_{2.5} (10x dilution, 5x dilution and concentrated). Experimental data show bioaccumulation of diverse trace metals in the heart of groups exposed to PM_{2.5} from both regions. Furthermore, a mobilization of the antioxidant defenses, with an increase in the total antioxidant capacity in response to the industrial and rural area PM_{2.5}. Increased glutamate cysteine ligase activity and a decrease in the reduced glutathione concentration were verified in response to the industrial region PM_{2.5}. Glutathione S-transferase activity was increased in groups exposed to the 5x and concentrated rural PM. We also demonstrated that despite the increased antioxidant capacity due to PM_{2.5} toxicity, an increase in lipid peroxidation of cardiac tissue was observed in both areas. Also, ABC transporters activity in cardiac tissue exposed to PM_{2.5}, was reduced in response to the 5x concentration of the rural and industrial region. Histological analysis demonstrate that the heart presented a decreased in cardiac cells in animals exposed to PM_{2.5} in rural and industrial areas in all concentrations tested. The results conclude that exposure different concentrations to PM_{2.5} causes biochemical changes in heart tissue with a consequent damage in biological structures in response to both PM sources, factors that should favor the development cardiac diseases.



Key Words: antioxidants enzymes, bioaccumulation, heart, ABC transporters, oxidative stress, particulate matter, PM_{2.5}

Introduction

Air pollution has increased over the last decades, resulting in several health problems that contribute to deteriorating environmental quality and a reduced lifespan of the exposed populations (Huttunen et al., 2012; Gill et al., 2011; Pope, 2000). Among the constituents present in the atmospheric air, particulate matter (PM) has received special attention in different locations around the world due to evidences of damages to human health (Kim et al., 2015; Huttunen et al., 2012; Bai et al., 2007; Peters et al., 2001; Gold et al., 2000). PM can be generated by natural (e.g., sea spray, volcanic activity, and biological material) and anthropogenic (e.g., industries, biomass and fossil fuel burning) processes (Martinelli et al., 2013; Bai et al., 2007). Some particles can be emitted directly from the sources, while others are formed by chemical reactions in the atmosphere. The size and chemical composition of the particles are characteristics that play important roles eliciting toxicological effects. With regards to size, PM are classified according to their diameter in coarse mode (PM_{10} , particles less than or equal to 10 μm), fine mode ($PM_{2.5}$, less than or equal particles to 2.5 μm), and ultrafine mode ($PM_{0.1}$, particles smaller than 0.1 μm); their size is directly related to their potential toxicological effects in organisms (Kim et al., 2015; Araujo et al., 2008).

Fine particulate matter ($PM_{2.5}$) is generated mainly from anthropogenic sources; it can penetrate deeper into the respiratory system and remain longer in the atmosphere, thereby deteriorating air quality (Araujo et al., 2008; Pope, 2000). Several substances are present in the chemical composition of PM (i.e., trace metals) that in some models are known to trigger toxicological effects in different tissues (Méndez-Armenta et al., 2011; Wallenborn et al., 2009). Many metals in appropriate concentrations play essential roles in organisms (e.g., as enzymes cofactors); however, these metals can also have toxic properties (Seiler and Berendonk, 2012). For example, some metals can cause a redox imbalance in tissues leading to oxidative stress, although this reaction depends on the metal type, combination of metals, time of exposure and concentration/dose (Cobbina et al., 2015; Gilmour et al., 1996; Guerrero-Castilla et al., 2014; Stohs and Bagchi, 1995; Wang et al., 2014). In several places (i.e., Rio de Janeiro), the $PM_{2.5}$ levels are high in many regions and often exceed the suggested limits. Due to its topography and proximity to the ocean, Rio de Janeiro is an interesting location to study air quality. The levels of pollutants can vary greatly from one site to another because the mountain and sea breeze can favor the dilution of pollutants or increase their concentrations. In this study, two different sites

were chosen to evaluate the health effects of PM_{2.5} exposure. One of the sites (Duque de Caxias) has urban and industrial characteristics. Big industries are located in this area, and some complaints about health problems have been registered by the local population therefore, this region deserves special attention. A rural area (Seropédica) was selected for use as a reference site for data comparison. Agriculture and mining are the main activities at this site, however, during the last decade some industries have been installed, and this location is near the industrial areas (Mateus et al., 2013).

The main purpose of this work was to evaluate the effects of the metal combinations present in fine particulate matter (PM_{2.5}) samples obtained from a rural and urban/industrial state of Rio de Janeiro, Brazil. It was employed *in vivo* models to evaluate whether different concentrations of metals were able to induce toxicological effects in the heart through bioaccumulation, ROS generation, modification of the antioxidant systems, lipid peroxidation, ABC transporters activity and histological alterations. There is a scarcity of data in the literature evaluating the effects of particulate matter *in vivo* in cardiac systems and its implications in biological processes. Therefore, the investigation of the effects of the metal mixtures that make up particulate matter on physiological processes may explain at least in part the dysfunctions and symptoms present in the studied populations exposed constantly to atmospheric pollution.

2 Material and methods

2.1 Sampling

Samples of fine particulate matter (PM_{2.5}) were collected by the State Environmental Institute (INEA) from the Rio de Janeiro Metropolitan Area (RJMA), Brazil, during wintertime (June and July), when the highest levels of PM occur. Two sites were chosen for simultaneous sampling: an urban/industrial site (Duque de Caxias) and a rural site (Seropédica). The activities in Duque de Caxias (22°42'15.5"S 43°18'41.3"W) are related to industries. Seropédica (22°75'76" S, 43°68'492" W) is located in the west of Rio de Janeiro state approximately 50 km from the industrial zone and 20 km from the ocean. Samples were collected using high-volume samplers (Energetica, Brazil) with an average flow of 1.14 m³ min⁻¹. Samples were collected for 24 h every 6 d using borosilicate glass microfiber filters (Energy, 254 × 203 mm, 0.22 μm thickness). To determine the PM mass, the filters were weighed before and after sampling using an

analytical balance (Mettler, Switzerland, ± 0.0002 g). To determine the metal content, an aliquot of the filter was extracted with 3.0 mL of twice-distilled nitric acid and heated for 2 h at 95 °C, diluted with ultrapure water and centrifuged to separate insoluble material (Mateus et al., 2013). Blank filters were handled in parallel to the samples in order to observe possible contamination in the manufacture of the filters. The extracts were analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Quantification of the main elements (Li, Be, Mg, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Rb, Sr, Ag, Cd, Sb, Ba, Hg, Tl, and Pb) was performed using an ELAN 6000 (PerkinElmer-Sciex, USA). Analytical curves in the range of 50 to 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ were used to quantify the elements and the operational conditions were described in Mateus et al., (2013).

2.2 Animal model

Male Wistar rats (± 250 g) from the Animal Center of the Federal University of Rio Grande – FURG were placed in a 12 hour light/dark cycle and fed ad libitum. The animals were allowed to acclimate for 7 days. After the 25 day experimental period, the rats were euthanized and their tissues were removed for analysis. These experiments were approved by the Committee Ethics in Research with Animals (CEUA) with protocol number Pq075/2014.

2.3 Experimental model and groups

The $\text{PM}_{2.5}$ filter containing metals and other compounds was extracted and diluted with saline solution (0.9%) in a ratio of 1 g/100 mL and subsequently filtered through a 30 μm mesh. After, the saline extracts were filtered again in a 0.45 μm cellulose acetate membrane (Macherey-Nagel, Germany) to eliminate smaller particles and bigger compounds, and these extract were considered concentrated solution (CS). Concentration response curves were generated using the particulate matter in its concentrated form (CS) and diluted 5- or 10-fold. The rats were divided into eight groups and administered the extract of particulate matter by intraperitoneal injection (IP) (1mL) for 25 days. The experiments were divided in eight groups, each one contained six animals. Two groups were selected as control: one received 0.9% saline solution (CT), and another received the extract solution in concentrated form obtained from blank filters (BF), which are without particulate matter. The other two groups were treated with extract solution of

PM_{2.5} from the rural region (RR) and urban/industrial region (IR). These groups were subdivided into three groups and exposed to the PM_{2.5} extracts at three different concentrations: concentrated solution (CS) (± 1 g membrane/100 mL saline), 5-fold diluted extract, and 10-fold diluted extract.

2.4 Bioaccumulation in the heart

For this analysis, the hearts were lyophilized and weighed after removal. The hearts were kept in 2.5 mL of twice-distilled nitric acid for 12 h. Then, they were extracted on a heat plate for 4 h at 80 °C. Finally, the extracts were diluted with purified water, centrifuged and analyzed by ICP-MS for determination of the metals present as described above.

2.5 Biochemical procedure

2.5.1 Sample preparation and protein quantification

The tissue was homogenized in Tris-HCl buffer (100 mM, pH 7.8) containing 2 mM EDTA and 5 mM MgCl₂.6H₂O. After the samples were centrifuged for 20 min at 4 °C (10,000 x g), the supernatant was used for the experimental procedures. The protein concentration was determined using the Biuret method for all analyses and read at a wavelength of 550 nm.

2.5.2 Total antioxidant capacity (ACAP) measurement

In this assay, 10 μ L of supernatant was added to reaction buffer containing 4 mM ABAP (2,2'-azobis(2-methylpropionamidine)dihydrochloride) at 37 °C to generate the sub-product peroxy radical. Then, 16 μ M H₂DCF-DA (10 μ L) was added, and the oxidation of this radical was quantified through the formation of the fluorescent compound (DCF) that express antioxidant capacity against the peroxy radical from the tissue. The fluorescence was read at wavelengths of 488/525 nm and expressed as the relative area. This method was performed according to the protocol of Amado *et al.*, (2009). A greater antioxidant capacity implies low fluorescence and the oxidation of H₂DCF-DA.

2.5.3 Glutathione S-transferase activity

This analysis was according to the method of Habig & Jakoby, (1981). Potassium phosphate buffer (pH 7.0) was added to 10 μ L of supernatant containing 25 mM glutathione, resulting in the formation of a complex with 1-chloro-2,4 dinitrobenzene (50 mM, CDNB, Sigma). The GST activity was measured at 340 nm.

2.5.4 GCL activity and glutathione (GSH) levels

This method followed the protocol of White *et al.*, (2003). The reaction buffer containing 40 mM ATP, 20 mM glutamic acid, 20 mM sodium borate, 2 mM serine, and 40 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ was dissolved in a Tris-HCl (400 mM) and EDTA (2 mM) solution (pH 7.8). The heart tissue supernatant and cysteine (2 mM) were added, and the mixture was incubated with NDA (naphthalene dicarboxaldehyde) for 30 min. In this analysis reduced glutathione or glutamylcysteine reacts with naphthalene dicarboxaldehyde (NDA, Invitrogen) for 30 minutes at 25°C. Then, the samples were centrifuged for 5 minutes at 4 °C, and the formation of the fluorescent product was detected at wavelengths of 472/528 nm.

2.5.5 TBARS levels

Thiobarbituric acid-reactive substances was measured according to the protocol of Oakes & Van Der Kraak, (2003). This method consists of adding the heart supernatant (100 μ l) to 20% acetic acid (pH 3.5, 150 μ l), 0.8% 2-thiobarbituric acid (150 μ l) and 8.1% SDS (20 μ l). The reaction was incubated for 30 minutes at 95°C, and then n-butanol (500 μ l) was added. After the samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes, the fluorescence was detected at 553/515 nm. A standard curve was generated with TMP (1,1,3,3-tetramethoxypropane), and the concentration of malondialdehyde (MDA) was verified and expressed in nmol MDA/mg protein.

2.6 ABC proteins activities

The ABC proteins activities analysis was performed according to the method of Kurelec *et al.*, (2000). Cardiac tissue was incubated with rhodamine B (10 μ M) for two hours. Then, the heart

tissue was washed in saline solution to remove excess rhodamine, homogenized in ultra pure water and centrifuged at 7500 x g for 5 min at 25 °C. The supernatant was read in a fluorimeter at 485 and 590 nm, excitation and emission, respectively (Victor 2, Perkin Elmer).

2.7. Histology

The heart tissue were collected and incubated in 4% paraformaldehyde for 24 hrs. After this period, the tissues were dehydrated in increasing concentrations of ethanol and the samples were embedded in Paraplast (Sigma P3808). Six-micrometer-thick sections (Leica RM 2255) were cut and stained with Hematoxylin-Eosin (Carson & Hladik 2009). The histological examination was performed using a light microscope (Olympus - BX 41). Images were captured with a planapochromatic objective (40x) in light microscopy (final magnification = 400x –zoom 1280x960cc) seven slides per group and five representative fields per animal. The images were digitized through a JVC TK-1270/JCB microcamera and transferred to an analyzer (software Image-Pro Plus 7.0, Media Cybernetics, Inc. Silver Spring, MD, USA).

2.8 Statistical Analysis

The values were represented as the mean \pm SEM with significance set as $p < 0.05$. The biochemical data were analyzed with one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. The blank filter was considered control group for all analysis.

3 Results and Discussion

The average concentrations of $PM_{2.5}$ were $8.5 \pm 4.0 \mu\text{g m}^{-3}$ for rural region and $14.4 \pm 4.1 \mu\text{g m}^{-3}$ for industrial region. These levels for RR are in accordance with the suggested limit by WHO ($10 \mu\text{g m}^{-3}$). However, IR presented an average almost 50% higher. The fine fraction of particulate matter remains in the atmosphere longer and can travel long distances. Thus, a comparative study between rural and industrial areas was performed with an emphasis on bioaccumulation, the antioxidant profile, cellular damage and ABC transporters activity, which is a protein responsible for xenobiotic extrusion. Our first investigation analyzed the trace metals present and their concentrations in administered solution by IP way (Table 1). The prevailing metals in the

concentrated solutions were Ca, K, Cu, Ni and Ba, with concentrations ranging from 0.8 to 7.5 mg L⁻¹. The toxic elements such as Pb, V, Hg, Cr, Cd and As were also detected, however in lower levels, 0.001 to 0.22 mg L⁻¹. All metals were also detected in the controls, as expected, as the filter and reagents have trace metals as impurities. However, statistic differences between control and samples were obtained for most of the metals, as we see below (Table 1).

Tabela 1. Metal concentrations (mg L⁻¹) present in the PM_{2.5} saline extract administrated to rats exposed for 25 days. The rural region (RR) and industrial region (IR) groups were divided into the CT (control), BF (blank filter), 10x dilution, 5x dilution and concentrated solution (CS). The values represent the means ± SE (n=3). * p< 0.05 and ** p<0,0001 represent significant differences compared to the blank filters (BF)

Metals	Metals concentrations in different groups (mg/L)							
	CT	FB	RR_10X	RR_5X	RR_SC	RI_10X	RI_5X	RI_SC
Li	0.014±0.000	0.014±0.000	0.013±0.000	0.014±0.000	0.015±0.000	0.014±0.000	0.014±0.000	0.015±0.000
Be	0.002±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000
Mg	0.023±0.002	0.193±0.145	0.195±0.078	0.408±0.007*	1.311±0.051**	0.166±0.003	0.332±0.006*	0.970±0.058**
K	0.268±0.041	1.450±1.141	1.187±0.458	2.384±0.038	7.429±0.461	1.447±0.046	2.179±0.006	6.581±0.465
Ca	0.158±0.026	1.283±1.005	0.902±0.324	1.837±0.031	3.967±0.237**	1.062±0.004	1.897±0.028	4.955±0.311**
Ti	0.000±0.000	0.001±0.000	0.000±0.000	0.001±0.000	0.004±0.000	0.003±0.002	0.002±0.000	0.004±0.000*
V	0.041±0.006	0.038±0.021	0.046±0.014	0.060±0.002	0.062±0.002	0.058±0.000	0.053±0.001	0.060±0.002
Cr	0.144±0.023	0.138±0.096	0.172±0.065	0.224±0.007	0.227±0.009	0.218±0.002	0.196±0.004	0.220±0.013
Mn	0.007±0.000	0.007±0.000	0.011±0.002	0.013±0.000	0.038±0.001**	0.010±0.000	0.013±0.000	0.024±0.001*
Fe	0.041±0.010	0.049±0.039	0.054±0.027	0.101±0.005	0.162±0.005*	0.087±0.008	0.096±0.003	0.159±0.009*
Co	0.009±0.000	0.009±0.000	0.009±0.000	0.009±0.000	0.01±0.000	0.009±0.000	0.009±0.000	0.010±0.000
Ni	0.605±0.172	0.618±0.226	0.759±0.209	0.817±0.028	0.794±0.025	1.812±0.864	1.596±0.057	2.124±0.081
Cu	0.387±0.166	0.386±0.283	0.519±0.195	0.660±0.010	0.822±0.055	0.731±0.057	1.060±0.048	1.573±0.051*
Zn	0.009±0.002	0.009±0.005	0.124±0.058	0.335±0.004*	2.398±0.093**	0.252±0.011	0.434±0.002*	2.971±0.018**
Ga	0.010±0.000	0.021±0.008	0.014±0.000	0.020±0.000	0.051±0.001**	0.016±0.001	0.020±0.000	0.054±0.000**
As	0.031±0.004	0.026±0.016	0.031±0.010	0.040±0.000	0.044±0.001	0.058±0.016	0.043±0.000	0.051±0.001
Rb	0.007±0.000	0.009±0.002	0.008±0.001	0.010±0.000	0.020±0.001	0.009±0.000	0.010±0.000	0.017±0.001
Sr	0.007±0.000	0.025±0.014	0.014±0.003	0.026±0.000	0.097±0.013	0.015±0.000	0.025±0.000	0.108±0.005
Ag	0.007±0.000	0.007±0.000	0.007±0.000	0.007±0.000	0.008±0.000	0.007±0.000	0.007±0.000	0.007±0.000
Cd	0.001±0.000	0.001±0.000	0.001±0.000	0.002±0.000*	0.004±0.000**	0.001±0.000	0.002±0.000	0.004±0.000**
Sb	0.000±0.000	0.000±0.000	0.001±0.000	0.003±0.000*	0.008±0.000**	0.001±0.000	0.002±0.000	0.008±0.000**
Ba	0.010±0.000	1.016±0.759	0.366±0.119	0.960±0.112	3.953±0.182	0.554±0.079	0.854±0.006	3.965±0.214
Hg	0.001±0.000	0.001±0.000	0.001±0.000	0.001±0.000	0.001±0.000	0.001±0.000	0.001±0.000	0.001±0.000
Tl	0.002±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000
Pb	0.003±0.000	0.002±0.000	0.002±0.000	0.003±0.000	0.010±0.000**	0.003±0.000	0.003±0.000	0.005±0.000*

Also, the bioaccumulation of different metals in heart after 25 days of exposure to PM_{2.5} were verified and exhibited in Table 2. The metals that suffered accumulation were in RR 10x (Fe, Rb, Ti, and Zn), IR 5x (Ag, Ba, Cu, Cd, Fe, Ga, Hg, Li, Rb, Sb, Ti, Tl, and Zn) and IR CS (Rb, and Zn) (Table 2). Some metals present in solution were not detected in heart samples. The IR 5x group presented higher accumulation for all detected metals.

Table 2- Screening of the bioaccumulation of different metals (mg kg^{-1}) in the hearts of rats exposed to different concentrations of $\text{PM}_{2.5}$ saline extracts for 25 days. The rural region (RR) and industrial region (IR) groups were divided into the CT (control), BF (blank filter), 10x dilution, 5x dilution and concentrated solution (CS). The values represent the means \pm SE ($n=3$). * $p<0.05$ represent significant differences compared to the blank filters (BF).

Metals	Bioaccumulation means of metals (mg/Kg) in the heart/groups							
	CT	FB	RR 10X	RI 10X	RR 5X	RI 5X	RR SC	RI SC
Ag	1.349 \pm 0.2	1.40 \pm 0.215	1.499 \pm 0.249	1.385 \pm 0.215	1.518 \pm 0.215	2.874 \pm 0.249*	1.365 \pm 0.215	1.855 \pm 0.215
Ba	2.141 \pm 0.242	1.637 \pm 0.313	2.160 \pm 0.271	1.745 \pm 0.271	2.055 \pm 0.242	3.635 \pm 0.313*	1.720 \pm 0.271	2.357 \pm 0.242
Cu	16.529 \pm 3.500	15.729 \pm 3.500	24.290 \pm 3.031	27.468 \pm 3.500	20.926 \pm 3.031	37.260 \pm 3.500*	21.166 \pm 2.711	24.581 \pm 2.711
Cd	0.256 \pm 0.021	0.218 \pm 0.024	0.255 \pm 0.021	0.193 \pm 0.021	0.269 \pm 0.019	0.391 \pm 0.024*	0.196 \pm 0.021	0.256 \pm 0.024
Fe	133.514 \pm 26.744	118.012 \pm 30.881	234.162 \pm 23.920*	184.682 \pm 30.88	148.737 \pm 26.74	309.150 \pm 30.881*	149.839 \pm 23.920	182.259 \pm 26.744
Ga	1.979 \pm 0.207	1.842 \pm 0.232	2.218 \pm 0.232	1.818 \pm 0.232	2.135 \pm 0.207	3.772 \pm 0.268*	1.790 \pm 0.232	2.227 \pm 0.207
Hg	0.151 \pm 0.020	0.150 \pm 0.020	0.198 \pm 0.017	0.158 \pm 0.017	0.172 \pm 0.017	0.336 \pm 0.020*	0.156 \pm 0.017	0.179 \pm 0.017
Li	2.922 \pm 0.395	2.704 \pm 0.457	3.014 \pm 0.395	2.475 \pm 0.395	2.910 \pm 0.354	5.131 \pm 0.457*	2.438 \pm 0.395	3.378 \pm 0.354
Rb	14.548 \pm 1.745	13.249 \pm 2.015	23.647 \pm 1.745*	19.096 \pm 2.015	14.509 \pm 2.015	34.908 \pm 2.015*	15.799 \pm 1.745	24.209 \pm 1.745*
Sb	0.049 \pm 0.005	0.037 \pm 0.005	0.045 \pm 0.005	0.049 \pm 0.005	0.040 \pm 0.005	0.076 \pm 0.006*	0.035 \pm 0.005	0.039 \pm 0.005
Ti	12.009 \pm 0.339	13.641 \pm 2.615	23.268 \pm 2.339*	14.617 \pm 2.339	13.241 \pm 2.339	29.548 \pm 3.020*	16.432 \pm 3.020	19.493 \pm 3.020
Tl	0.314 \pm 0.034	0.294 \pm 0.040	0.352 \pm 0.040	0.323 \pm 0.034	0.399 \pm 0.040	0.672 \pm 0.040*	0.317 \pm 0.034	0.361 \pm 0.034
Zn	24.999 \pm 3.198	21.718 \pm 4.129	40.536 \pm 3.576*	35.950 \pm 4.129	28.311 \pm 3.198	58.560 \pm 4.129*	28.700 \pm 3.198	40.433 \pm 4.129*

The presence of metals in cardiac tissue can foster mitochondrial alterations and cytosolic reactions, leading to cellular damages. In the cells, the metals can react with specific enzymes to increase ROS production and changes antioxidant systems resulting in a redox imbalance (Donaldson and MacNee, 2001) and causing alterations in the DNA (Risom et al., 2005). Méndez-Armenta *et al.*, (2011) reported that rats exposed to heavy metals suffered histochemical changes in the muscle and alterations in the I and IV complexes of the electron transport chain. Moreover, other components in addition to the mitochondrial respiratory chain are responsible for free radical production. Metals can induce the development oxidative stress of different forms. The interaction of trace metals (e.g., Fe and Cu) can occur through the Haber-Weiss and Fenton reactions in the cell cytosol and result in the formation of hydroxyl radicals, which can interact with and damage biological structures compromising cell viability (Stohs and Bagchi, 1995). Previous studies showed that PM exposure could directly interfere with the mitochondrial complex, so decreasing oxygen consumption and mitochondrial ATP production (Marchini et al., 2013). Therefore, it was investigated a possible redox imbalance of the cardiac system through of the ACAP analysis to verify the toxicological effects of the metals present in the $\text{PM}_{2.5}$ saline

extract. The ACAP increased following exposure to the PM from both regions (RR and IR) at all tested concentrations compared to both controls (Figure 1). Interestingly, no significant differences were observed between the same concentrations (5x, 10x, and CS) from the different regions (RR and IR groups). These results demonstrate that the mixture of trace metals present in the PM_{2.5} mobilizes antioxidant defenses, suggesting an adaptive response of cardiac tissues to maintain homeostasis in an attempt to avoid oxidative stress.

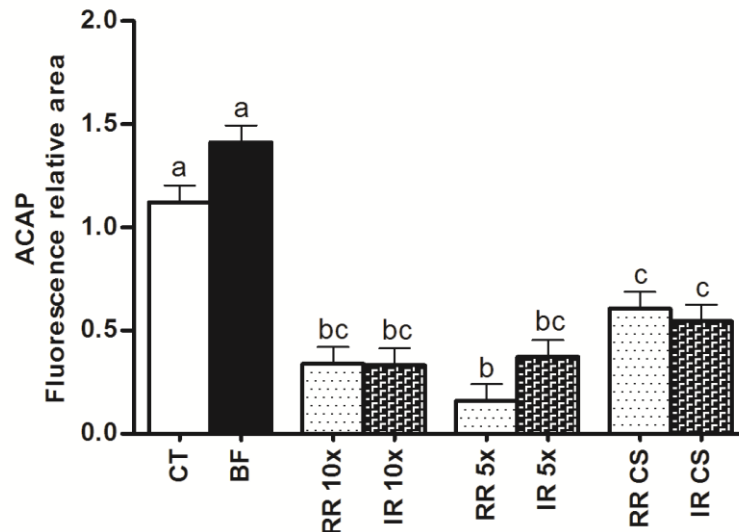


Figure 1- ACAP (relative area) in the heart of rats exposed to different concentrations of PM_{2.5} saline extracts for 25 days. The rural region (RR) and industrial region (IR) groups were divided into CT (control), BF (blank filter), 10x dilution, 5x dilution and concentrated solution (CS). The values represent means \pm SEM (n=6). Significant differences among groups are represented by different letters ($p < 0.05$).

When evaluated lipoperoxidation through the TBARS method, all groups at the concentrations tested showed an increase compared to both controls in both regions (Figure 2). In the RR groups, the rats exposed to the 10x solution showed higher lipid damage compared to rats exposed to the 5x and CS ($p < 0.0001$). The TBARS level in the IR group showed that lipoperoxidation damage occurred in all groups; although the same level of significance was observed among the different concentrations tested (10x, 5x and concentrated). When the extracts from the different regions at the same concentrations (5x and concentrated) were compared, increased lipoperoxidation was observed in the IR groups compared to the RR groups ($p < 0.0001$, Figure 2). The increased TBARS levels demonstrate an imbalance between reactive oxygen species production and antioxidants defense systems leading to lipoperoxidation damage.

Moreover, an increase in lipoperoxidation in RR and IR can be justified by the similarities between chemical composition in both regions and to indicate that areas near of polluted regions can be equally affected. According Araujo et al. (2008), an increase in the oxidative stress with higher levels of hepatic lipid peroxidation and increased expression of the Nrf2, SOD, CAT and GST in rats exposed to ultrafine particles were also observed.

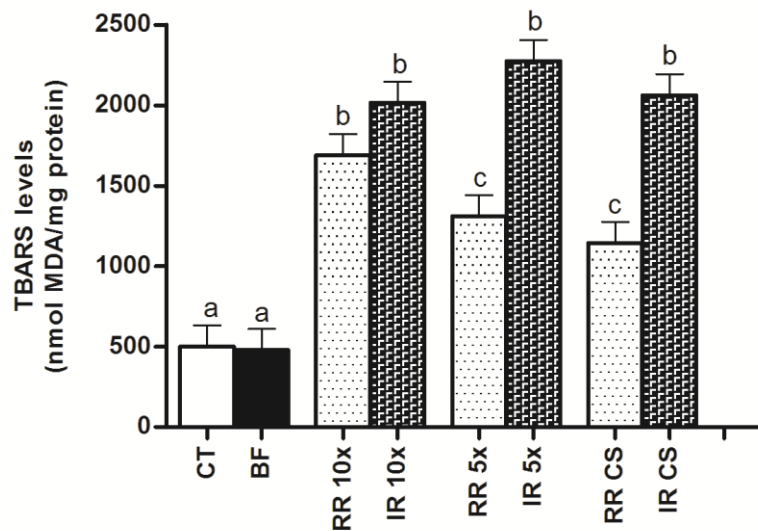


Figure 2- TBARS levels (nmol TMP/mg protein) in the hearts of rats exposed to different concentrations of PM_{2.5} saline extracts for 25 days. The rural region (RR) and industrial region (IR) groups were divided into CT (control), BF (blank filter), 10x dilution, 5x dilution and concentrated solution (CS). The values represent means \pm SEM (n=6). Significant differences among groups are represented by different letters ($p < 0.05$). TMP: 1,1,3,3-tetramethoxypropano, employed as standard.

The GCL activity was also evaluate in this study by being a key enzyme involved in the synthesis of glutamylcysteine, which is required for glutathione biosynthesis, a non-enzymatic antioxidant (Nair et al., 2013). It was observed that the RR extracts did not induced a significant alteration in GCL activity compared to both controls (Figure 3A). However, all concentrations of the IR extract induced increased GCL activity compared to the controls ($p < 0.05$) and compared to the same concentrations in the RR groups (5x, 10x, and CS, $p < 0.0001$; concentrated, $p < 0.05$). In addition, the results showed a decrease in glutathione concentration in the RR (5x) group compared to both controls ($p < 0.05$) (Figure 3B). In the IR groups, glutathione formation was decreased in the 5x and CS groups compared to both controls ($p < 0.05$). No significant difference was observed when the same concentration was compared among the IR versus RR groups.

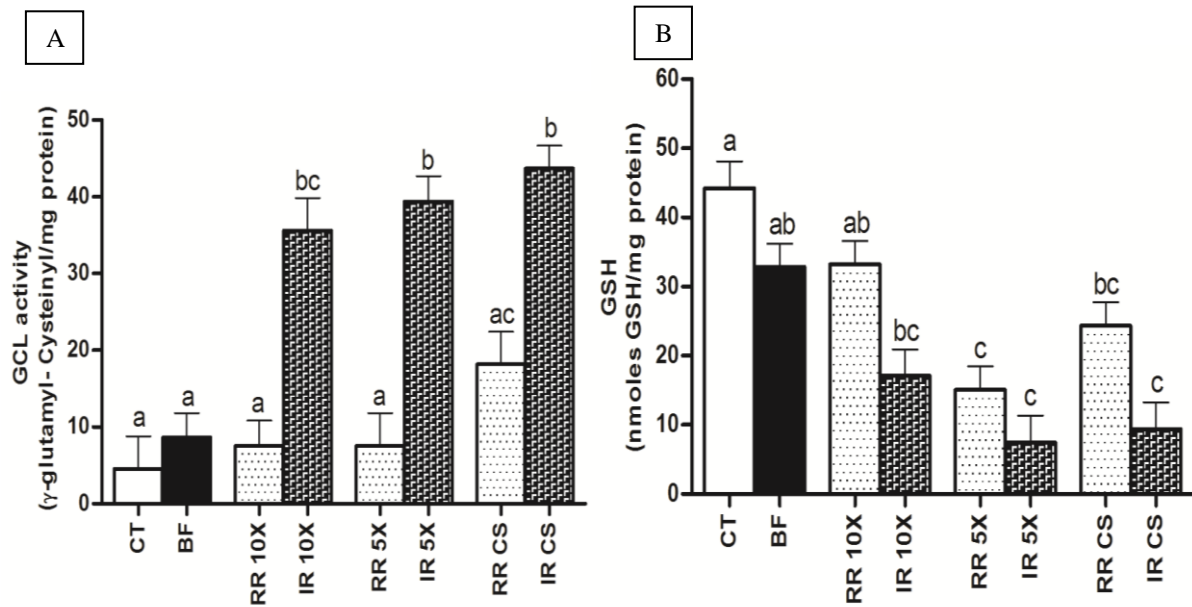


Figure 3- (A) GCL activity (nM of GSH equivalents/h/mg protein) and (B) GSH (nM GSH/mg protein) in the hearts of rats exposed to different concentrations of PM_{2.5} saline extracts for 25 days. The rural region (RR) and industrial region (IR) groups were divided into CT (control), BF (blank filter), 10x dilution, 5x dilution, and concentrated solution (CS). The values represent means \pm SEM (n=5). Significant differences among groups are represented by different letters (p<0.05). GSH: reduced glutathione.

From the results it can be inferred an increased synthesis of glutamylcysteine was required for GSH formation in the groups exposed to the industrial region extracts at all concentrations tested. In these same groups, a decrease in the glutathione concentration was verified in the groups exposed to the 5x and concentrated extracts. These findings can be related to higher use of GSH for heart tissue to neutralize ROS generation and/or due to interaction of metal presented in PM_{2.5} with its cysteine residues. Antioxidant enzymes are an essential and primary line of defense in tissues to scavenge ROS and avoid its harmful effects. Here, we investigated GST activity, which is an important antioxidant enzyme that serve as an active front against increased ROS and toxic compounds (Casalino et al., 2004; Daggett et al., 1998; Hayes and Pulford, 1995). An increase in GST activity was observed in the RR 5x and CS groups compared to the same concentrations in the IR groups and the controls (p < 0.05) (Figure 4). A reduction in GSH levels at the tested concentrations was also observed in the RR groups possible due a higher GST activity. In contrast, the GST activity in the IR groups was not modified compared to the controls (Figure 4), suggesting the importance of free GSH in this group in scavenging ROS and the metals present in the cell medium due to exposure to the PM_{2.5} extract. In other hand, in the IR groups a higher lipoperoxidation was demonstrated in relation to RR group in the same concentration (5x and CS).

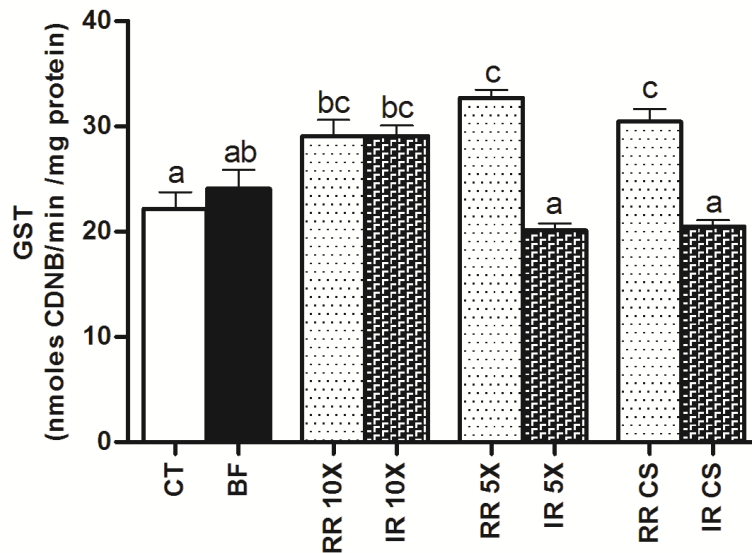


Figure 4. GST activity (nanomoles of CDNB-GSH/min/mg protein) in the hearts of rats exposed to different concentrations of PM_{2.5} saline extracts for 25 days. The rural region (RR) and industrial region (IR) groups were divided in CT (control), BF (blank filter), 10x dilution, 5x dilution and concentrated solution (CS). The values represent means \pm SEM (n=6). Significant differences among groups are represented by different letters (p<0.05). CDNB-GSH: conjugate of CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) with glutathione (GSH) due to GST activity

Metals can alter the enzymes involved in GSH synthesis (GSH synthetase and GCL) (Nair et al., 2013; Coban et al., 2007) and also establish chemical bonds with the sulfhydryl groups of proteins (Jomova & Valko, 2011; Quig, 1998). These factors may be one of the reason of the reduced GSH concentration in both regions. Furthermore, these results may indicate that the concentrations of pollutants and the types of metals present can mobilize different antioxidant systems for protection in cardiac tissues.

In this study, we demonstrated for the first time the activity of the ABC proteins, which is a family transporter characterized as by express phenotype multixenobiotic resistance (Kurelec et al., 2000), in cardiac tissues exposed to PM_{2.5}. The activity of ABC proteins and its multidrug resistance occur via the extrusion of compounds endogenous or xenobiotic that interfere with cellular process (Gottesman et al., 2002). Here, we evaluated the pump activity by measuring the accumulation of rhodamine B. A higher accumulation of rhodamine in the RR and RI groups was verified at the 5x concentration compared to both controls (p< 0.05) (Figure 5), demonstrating

that reduced activity of this protein consequently resulted in the reduced extrusion of metals at these concentrations. However, no significant differences were observed between regions (Figure 5). In addition, in IR the higher accumulation of different metals occur in this concentration (5x) and can be due inhibition of its activity. The experimental results showed that the non-enzymatic GSH antioxidant system appeared to play a significant role (directly and/or indirectly) in an attempt to minimize the damages caused by PM, perhaps due to the reduced ABC protein activity. Moreover, its depletion might favor a lipoperoxidation event at the other concentrations.

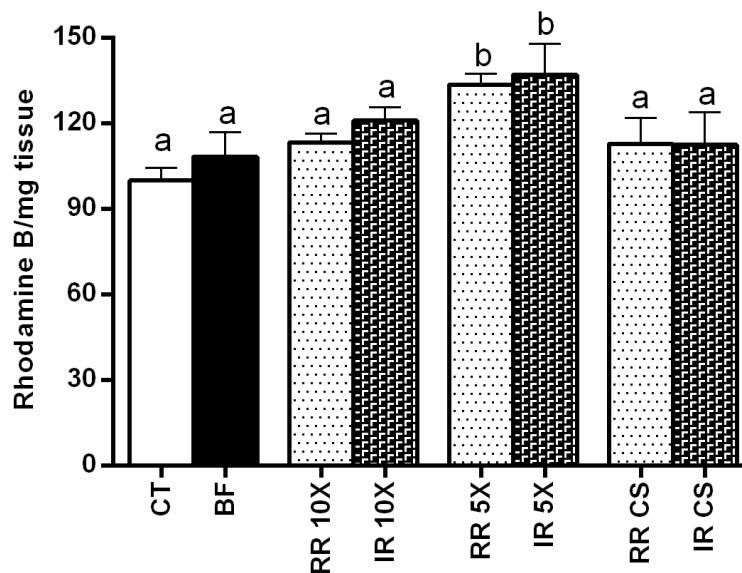


Figure 5- MXR activity (rhodamine B/mg tissue) in the hearts of rats exposed to different concentrations of PM_{2.5} saline extracts for 25 days. The rural region (RR) and industrial region (IR) groups were divided into CT (control), BF (blank filter), 10x dilution, 5x dilution and concentrated solution (CS). The values represent means \pm SEM (n=5). Significant differences among groups are represented by different letters ($p < 0.05$).

Another question of this study was to verify if the toxicological effects of PM changed cardiac muscle structure. Histopathological analysis (Figure 6) verified a significantly decrease of cardiomyocytes percentage of cells in RR (10x, 5x, and CS) and IR (10x, 5X, and CS) when compared with the group exposed to the blank filter ($p < 0.05$). Regardless, occurs an increased in percentage of nucleus as verified in images (Figure 6) and this result was due a higher number accessory cells as fibroblasts. We also observed cardiac cellular hyaline degeneration in some portions of the heart slides and absence inflammatory infiltrate.

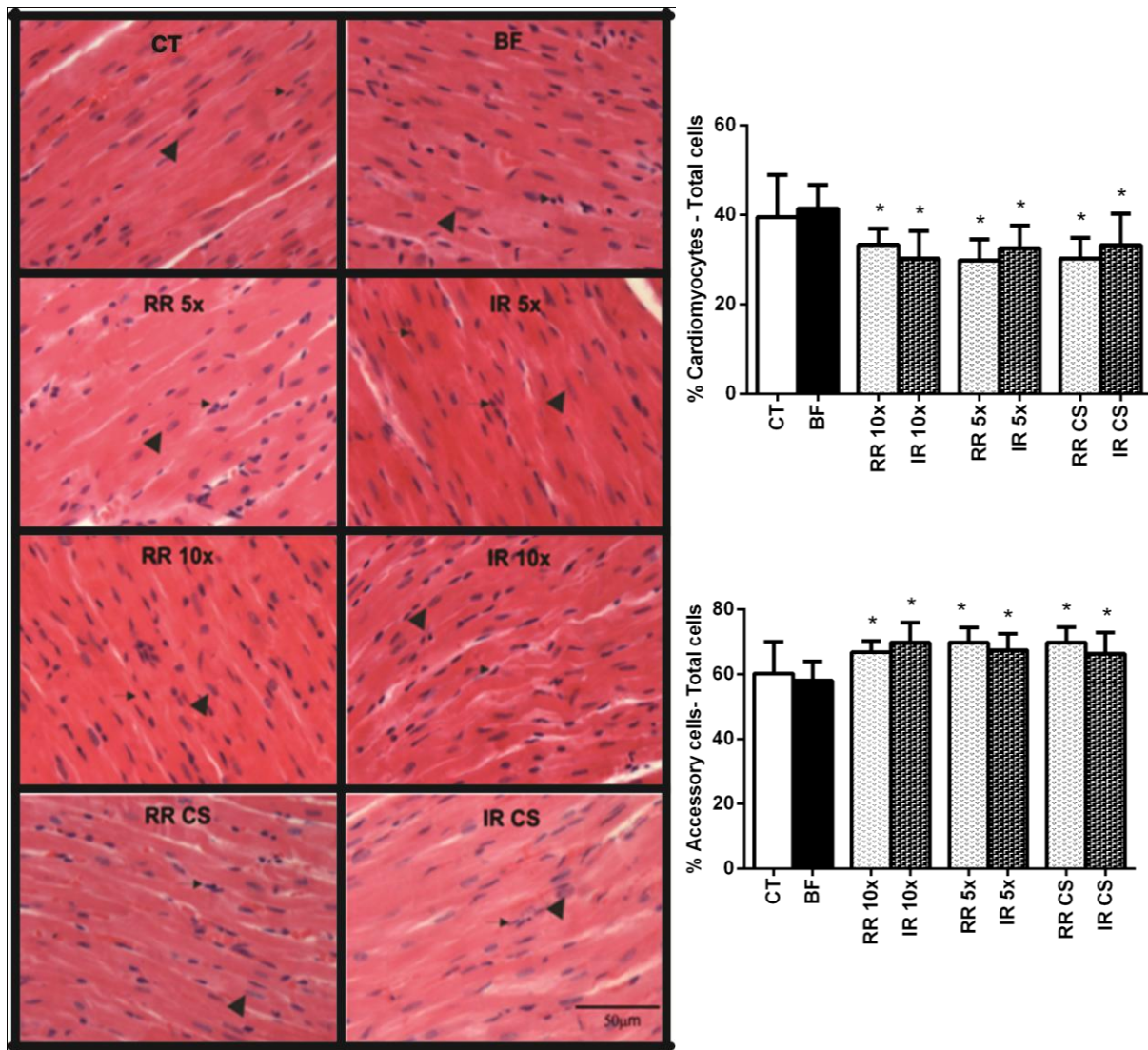


Figure 6. Histological analysis (Hematoxylin & Eosin, 400 x) in heart slices of rats exposure different concentrations of PM_{2.5} saline extracts during 25 days exposure. The rural region (RR) and industrial region (IR) were divided in CT (control), BF (blank filter), 10x diluted, 5x diluted and concentrated solution (CS). The values are represented means \pm SEM (n=4). Differences statistical among groups are represented for different letters ($p < 0.05$). Arrow head (▶) represents muscle cells and (↑) accessory cells.

The fibrosis verified in cardiac tissue can be associated with a higher requirement of extracellular matrix production in order to compensate the loss cardiomyocytes, being known as a healing process observed in diverse cardiomyopathies (Cieslik et al., 2014; Schuetze et al., 2014; Kai et al., 2006). Histological alterations in the heart as degeneration and fibrosis were also verified in exposure rats to lead (Dewanjee et al., 2013). It is also known that metals can generate oxidant reactions favoring the oxidative stress (Shi et al., 2004; Pulido and Parrish 2003) and this

imbalance was demonstrated in our work through indicators as lipid peroxidation and decreased of GSH level. In study these evidences indicate an imbalance redox that can be compromising heart tissue and cellular viability with consequent decreased of myocytes as exhibit in Figure 6.

4. Conclusion

In present study, rat exposure to metallic extract of $PM_{2.5}$ from industrial and rural regions demonstrated similar heart alterations in analyzed parameters. Despite of lower pollution index in RR, similarities in the chemical constituents of particles in both regions seems to contribute for its harmful effects. Among concentrations tested, the RR 5x and IR 5x regions groups were more affected after $PM_{2.5}$ exposure. Changes in the redox status of cardiac tissue resulted in alterations in antioxidant systems (ACAP, GST and GSH), bioaccumulation, lipid peroxidation, decreased cardiomyocytes number and reduced extrusion of metals from the cellular environment. Therefore, the investigation of parameters analyzed will serve as important indicators to show susceptibility and adaptations of cardiac tissue, after *in vivo* exposure, and to try to elucidate possible mechanism evolved in triggering cardiac pathophysiology promoted by air pollution.

Conflict of Interest

The authors report no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, RJ, Brazil) for financial support and to Instituto Estadual do Ambiente (INEA, RJ, Brazil) for providing the $PM_{2.5}$ samples.

References

- Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.L.R., Yunes, J.S., Monserrat, J.M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total Environ.* 407, 2115–2123. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.11.038
- Araujo, J.A., Barajas, B., Kleinman, M., Wang, X., Bennett, B.J., Gong, K.W., Navab, M., Harkema, J., Sioutas, C., Lulis, A.J., Nel, A.E., 2008. Ambient particulate pollutants in the ultrafine range promote early atherosclerosis and systemic oxidative stress. *Circ. Res.* 102, 589–596. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.164970
- Bai, N., Khazaei, M., van Eeden, S.F., Laher, I., 2007. The pharmacology of particulate matter air pollution-induced cardiovascular dysfunction. *Pharmacol. Ther.* 113, 16–29. doi:10.1016/j.pharmthera.2006.06.005
- Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, V., Calzaretto, G., Landriscina, C., 2004. Rat liver glutathione S-transferase activity stimulation following acute cadmium or manganese intoxication. *Toxicology* 200, 29–38. doi:10.1016/j.tox.2004.03.004
- Cobbina, S.J., Chen, Y., Zhou, Z., Wu, X., Feng, W., Wang, W., Li, Q., Zhao, T., Mao, G., Wu, X., Yang, L., 2015. Interaction of four low dose toxic metals with essential metals in brain, liver and kidneys of mice on sub-chronic exposure. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 280–291. doi:10.1016/j.etap.2014.11.030
- Daggett, D. a., Oberley, T.D., Nelson, S. a., Wright, L.S., Kornguth, S.E., Siegel, F.L., 1998. Effects of lead on rat kidney and liver: GST expression and oxidative stress. *Toxicology* 128, 191–206. doi:10.1016/S0300-483X(98)00080-8
- Donaldson, K., MacNee, W., 2001. Potential mechanisms of adverse pulmonary and cardiovascular effects of particulate air pollution (PM10). *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203, 411–415. doi:10.1078/1438-4639-00059
- Gill, E. a, Curl, C.L., Adar, S.D., Allen, R.W., Auchincloss, A.H., O’Neill, M.S., Park, S.K., Van Hee, V.C., Diez Roux, A. V, Kaufman, J.D., 2011. Air pollution and cardiovascular disease in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 53, 353–60. doi:10.1016/j.pcad.2011.02.001
- Gilmour, P.S., Brown, D.M., Lindsay, T.G., Beswick, P.H., MacNee, W., Donaldson, K., 1996. Adverse health effects of PM10 particles: involvement of iron in generation of hydroxyl radical. *Occup. Environ. Med.* 53, 817–822. doi:10.1136/oem.53.12.817
- Gold, D.R., Litonjua, a, Schwartz, J., Lovett, E., Larson, a, Nearing, B., Allen, G., Verrier, M., Cherry, R., Verrier, R., 2000. Ambient pollution and heart rate variability. *Circulation* 101, 1267–1273. doi:10.1161/01.CIR.101.11.1267

- Gottesman, M.M., Fojo, T., Bates, S.E., 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* 2, 48–58. doi:10.1038/nrc706
- Guerrero-Castilla, A., Olivero-Verbel, J., Marrugo-Negrete, J., 2014. Heavy metals in wild house mice from coal-mining areas of Colombia and expression of genes related to oxidative stress, DNA damage and exposure to metals. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 762, 24–29. doi:10.1016/j.mrgentox.2013.12.005
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol.* 77, 218–31.
- Hayes, J.D., Pulford, D.J., 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 445–600. doi:10.3109/10409239509083492
- Huttunen, K., Siponena, T., Salonenc, I., Yli-Tuomia, T., Aurelae, M., Dufvad, H., Hillamoe, R., Linkolaf, E., Pekkanena, J., Pennanena, A., Petersh, A., Salonena, R.O., Schneiderh, A., Lankia, T., 2012. Low-level exposure to ambient particulate matter is associated with systemic inflammation in ischemic heart disease patients. *Environ. Res.* 116, 44–51. doi:10.1016
- Jomova, K., Valko, M., 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283, 65–87. doi:10.1016/j.tox.2011.03.001
- Kim, K., Kabir, E., Kabir, S., 2015. A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environ. Int.* 74, 136–143. doi:10.1016/j.envint.2014.10.005
- Kurelec, B., Smital, T., Pivèevia, B., Eufemia, N., Epel, D., 2000. Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein, and chemosensitizers. *Ecotoxicology* 9, 307–327. doi:10.1023/A:1026560922731
- Marchini, T., Magnani, N., D’Annunzio, V., Tasat, D., Gelpi, R.J., Alvarez, S., Evelson, P., 2013. Impaired cardiac mitochondrial function and contractile reserve following an acute exposure to environmental particulate matter. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830, 2545–2552. doi:10.1016/j.bbagen.2012.11.012
- Mateus, V.L., Monteiro, I.L.G., Rocha, R.C.C., Saint’Pierre, T.D., Gioda, A., 2013. Study of the chemical composition of particulate matter from the Rio de Janeiro metropolitan region, Brazil, by inductively coupled plasma-mass spectrometry and optical emission spectrometry. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 86, 131–136. doi:10.1016/j.sab.2013.03.003
- Méndez-Armenta, M., Nava-Ruiz, C., Fernández-Valverde, F., Sánchez-García, a., Rios, C., 2011. Histochemical changes in muscle of rats exposed subchronically to low doses of heavy metals. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 32, 107–112. doi:10.1016/j.etap.2011.03.001

- Oakes, K.D., Van Der Kraak, G.J., 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat. Toxicol.* 63, 447–463. doi:10.1016/S0166-445X(02)00204-7
- Peters, a, Dockery, D.W., Muller, J.E., Mittleman, M. a, 2001. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation* 103, 2810–2815. doi:10.1161/01.CIR.103.23.2810
- Pope, C.A., 2000. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: Biologic mechanisms and who's at risk? *Environ. Health Perspect.* 108, 713–723. doi:10.1289/ehp.00108s4713
- Quig, D., 1998. Cysteine metabolism and metal toxicity. *Altern. Med. Rev.* 3, 262–270.
- Risom, L., Møller, P., Loft, S., 2005. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat. Res.* 592, 119–137. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.06.012
- Seiler, C., Berendonk, T.U., 2012. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.* 3, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2012.00399
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321–336. doi:10.1016/0891-5849(94)00159-H
- Wallenborn, J.G., Schladweiler, M.J., Richards, J.H., Kodavanti, U.P., 2009. Differential pulmonary and cardiac effects of pulmonary exposure to a panel of particulate matter-associated metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 241, 71–80. doi:10.1016/j.taap.2009.08.003
- Wang, X., Wang, H., Li, J., Yang, Z., Zhang, J., Qin, Z., Wang, L., Kong, X., 2014. Evaluation of Bioaccumulation and Toxic Effects of Copper on Hepatocellular Structure in Mice. *Biol. Trace Elem. Res.* 159, 312–319. doi:10.1007/s12011-014-9970-2
- White, C.C., Viernes, H., Krejsa, C.M., Botta, D., Kavanagh, T.J., 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate–cysteine ligase activity. *Anal. Biochem.* 318, 175–180. doi:10.1016/S0003-2697(03)00143-X

5. DISCUSSÃO

Nos estudos de nosso grupo, temos comparado o potencial efeito tóxico do $PM_{2.5}$ de uma zona rural e industrial/urbana, como também quantificado a constituição deste, nos possibilitando observar elementos lesivos ao tecido cardíaco de ratos, quando expostos por via IP. Nossa hipótese inicial foi que o PM da RI seria mais prejudicial do que o PM da RR, e que o PM iria apresentar toxicidade e capacidade de influenciar a produção de ROS, modulando a capacidade antioxidante e ativação do sistema MXR, bem como poderiam apresentar respostas inflamatórias. Também sugerimos que partículas poderiam ficar acumuladas às paredes do músculo cardíaco, portanto, foi analisado a bioacumulação ocorrida neste órgão. Por último, investigamos o infiltrado inflamatório e proliferação celular, promovidos pelo $PM_{2.5}$.

Assim, foi verificada a concentração média de $PM_{2.5}$ na RR como sendo 59% da RI, apresentando vazão média ($m^3/min.$) iguais (Tabela 3, anexo I), com isso demonstrando homogeneidade no fluxo e confiabilidade na coleta. O fato a se destacar é que apesar dos níveis de $PM_{2.5}$ encontrados na RR, serem menores significativamente quando comparado a RI ($p<0,05$), ainda assim as concentrações médias de metais contidos nesta região são mais elevadas em alguns casos, porém não significativo, exceto para o Cu, que se mostra em maior concentração na RR quando comparado à RI ($p<0,05$). Neste sentido, a tabela 4 do anexo I apresenta os níveis de metais que constituem o $PM_{2.5}$ das regiões de estudo, destacando a RR, que alcançou níveis superiores às RI dos metais K, Ca, V, Cr, Ni, Cu, Zn, Ag, Hg e Tl. Identificamos ainda, que as duas regiões (RI e RR) apresentam níveis equivalentes de alguns dos metais em suspensão (Tabela 4 anexo I). Todavia, o reflexo nos prejuízos gerados nos grupos referentes às RR, podem estar atrelados a elevada poluição de atividades locais e vizinhas, como é o caso de Santa Cruz que está a ~20Km. Um importante fato a ser considerado é a capacidade do $PM_{2.5}$ de se deslocarem para longe das fontes de emissão, estando presentes mesmo distante dos locais de origem.

Ao identificar a constituição da poluição dos locais de nosso estudo, atentamos para os limites sugeridos pelas diretrizes da WHO para o $PM_{2.5}$, que deve estar na média de $10\mu g/m^3$ anualmente (WHO, 2006). A concentração de PM_{10} diária deve estar em $\sim 50\mu g/m^3$, porém, esta média é excedida em até 90% em alguns locais do Rio de Janeiro, como em Duque de Caxias, chegando até $150\mu g/m^3$, em especial nos meses compreendidos entre maio e setembro (GIODA *et al.*, 2011). No entanto, estudamos a poluição de regiões com pouca variação de temperatura,

com clima característico de verão e ao longo de poucos meses, a fim de não ter a influência da variação climática. Embora o período de coleta esteja relacionado ao inverno, destacamos que RJ é uma região de predomínio do clima quente. Neste sentido, fatores como a direção e intensidade dos ventos, bem como a temperatura são condições que alteram a constituição do PM, conforme aponta Das e colaboradores, (2011). Outro achado é destacado por Morishita *et al.*, (2006), onde seus estudos indicam haver maior incidência de asma em locais que apresentam a influência da umidade relativa do ar, sendo um fator de variação da constituição do PM. Porém, segundo Perrone e colaboradores, (2010), o verão e o inverno apresentam PM que causam diminuição da viabilidade celular, devido à indução de agentes pró inflamatórios e danos ao DNA. No entanto, o PM coletado em climas frios, apresenta maior capacidade deletéria sobre células epiteliais de carcinoma de pulmão humano (PERRONE *et al.*, 2010).

Para este estudo, utilizamos diluições seriadas, e controlamos a variação dos efeitos com base nos controles, que receberam injeções livres de PM. No entanto, um fato a se destacar é que mesmo a solução salina livre do filtro e/ou do PM apresentou algum grau de concentração de metal. Inclusive, alguns metais como Be, Co, Ag, Hg e Tl, estiveram presentes na mesma concentração a todas as soluções, independentemente do grau de diluição, conforme tabela 1. Contudo, foi analisado o potencial cumulativo dos metais contidos no PM_{2.5} quando em contato com o tecido cardíaco por via IP durante 25 dias. De acordo com este estudo, foi observado que alguns metais apresentam capacidade de se acumularem no tecido cardíaco (Tabela 2), gerando danos locais e potencializando os efeitos de oxidação direta do coração. Assim, conforme mostra a tabela 2, vemos que os metais Ag, Ba, Cd, Cu, Fe, Ga, Hg, Li, Rb, Sb, Ti, Tl e Zn, apresentaram significativo aumento da acumulação, especialmente no grupo RI_5X quando comparado ao grupo FB, indo de encontro aos achados de Chowdhury *et al.*, (2006), que apontam o As com alta capacidade de acumulação em tecido cardíaco de ratos, quando injetado por via intramuscular, o que não ocorreu em nosso estudo. Também, não tivemos a acumulação do Pb em nossos ensaios, mesmo tendo nosso grupo RR_SC sido injetado volumes próximos aos do estudo de Dewanjee *et al.*, (2013), este que aponta o Pb com capacidade de bioacumulação, vindo a ser tóxico, oxidando o tecido cardíaco, fragmentando o DNA, diminuindo enzimas hepáticas, bem como alterando parâmetros hemodinâmicos importantes. No entanto, outros metais se apresentaram acumulados em nosso estudo, e conforme Anderson e colaboradores (2012), um simples contato do PM com o tecido, já é o suficiente para ativar células inflamatórias, aumentando com isso a formação de ROS e consequente estresse oxidativo.

O PM de ambas as regiões em nosso estudo, apresentam toxicidade significativa para o tecido cardíaco, devido ao aumento da LPO (fig.2). Acreditamos na presença de fontes geradoras de ERONS, assim, justificando os danos lipídicos encontrados, visto que, houve aumento da capacidade antioxidante total. Portanto, nossos resultados vão ao encontro aos achados de, Yi *et al.*, (2014), os quais foram atribuídos à formação do OH^\bullet através da reação de Fenton, mediando estresse oxidativo, devido a grandes quantidades de Fe nas frações de PM_{10} . Vindo a corroborar com os achados de Steenhof e colaboradores, (2011), que encontraram o Fe e o Cu como os metais mais abundantes no PM, tendo sido atribuídos a estes, um potencial efeito oxidativo e pró inflamatório sobre a linhagem RAW264.7 de células macrofágicas de murinos. Além disso, Yi *et al.*, (2014), encontraram elevado nível de acumulação de H_2O_2 intracelular, que na presença do Fe, irá formar OH^\bullet .

Gurgueira e colaboradores (2002), destacam que apesar de seus estudos *in vitro* terem obtido significativa produção de ROS mediante exposição às concentrações de partículas ambientais, ainda assim não têm evidências que suportem este mesmo resultado *in vivo*. Mirowsky *et al.*, (2015) destaca, que seu comparativo entre zonas rurais e urbanas, sobre a produção de ROS e respostas inflamatórias *in vitro* e *in vivo*, apresentaram respostas diferenciadas. Destaca ainda, a exposição *in vitro* como a que apresentou maior influência de ROS, em contrapartida no modelo *in vivo*, a resposta mais evidente foi a inflamação pulmonar, apontando também a toxicidade dependente do tamanho do PM, que quanto menor, maior sua toxicidade (MIROWSKY *et al.*, 2015). Contudo, Emmerechts e colaboradores, (2011), indicam que através da indução da inflamação e estresse oxidativo os PM causam seus efeitos deletérios sobre o sistema cardiovascular e outros, e com isso, corroborando com nosso achados, onde todos os grupos tiveram aumento significativo na capacidade antioxidante contra o radical peróxido (fig.1), bem como LPO (fig.2), indicando que houve estresse oxidativo.

Wold *et al.*, (2006), evidenciou efeitos negativos do contato direto de UFP, em exposições tanto *in vivo* por via de administração arterial (carótida direita), com infusão de 1mL de solução salina contendo PM, quanto através de exposição *ex-vivo* do coração isolado. Com isso, Wold *et al.*, (2006), destacou que os efeitos do UFP não são dependentes da inalação ou passagem das partículas através das paredes alveolares, elucidando que podem ter efeitos tóxicos diretos sobre o sistema cardiovascular. E com isso, justificar os danos encontrados em nossos estudos, quanto à bioacumulação, gerando LPO e ativação dos sistemas antioxidantes e diminuição da atividade das proteínas do complexo MXR. Uma vez que a superfície de contato

do PM é um potencial agente ativador de células inflamatórias, aumentando com isso a formação de ROS e conseqüente estresse oxidativo, apresentando potencial de causar dano pulmonar em apenas uma exposição em ratos (ANDERSON *et al.*, 2012).

Com relação a capacidade antioxidante contra o radical peroxil, nossos estudos apontam haver diferença significativa dos grupos tratados com PM_{2.5}, quando comparados a ambos controles, conforme destacado na figura 1. Apontando que ambos os controles não apresentaram diferença significativa entre si, deixando claro que o uso do filtro limpo de PM não influenciou o resultado obtido nos demais grupos. Quanto aos grupos expostos ao PM da RR, bem como os expostos ao PM da RI, estes diferiram em suas respostas em todos os níveis de diluição, quando comparados com o FB. Com isso promovendo a ativação dos sistemas enzimáticos, que iniciaram uma cascata de eventos na tentativa de detoxificação e minimização do estresse oxidativo, visto através da atividade da GCL e GST (fig. 3A e 4), porém, inibindo o sistema MXR (fig.5), e com isso, contribuindo no agravamento dos efeitos tóxicos do PM_{2.5} das regiões de estudo. Segundo Sheweita & Tilmisany (2003), é bem conhecido na literatura que os metais provocam alterações significativas na atividade da GST e níveis de GSH, o que é uma possível justificativa para a depleção dos níveis de GSH, visto na figura 3B. Com base nos estudos de Nagalakshmi & Prasad (2001), Fe, Zn, Cu e compostos que reagem com grupos sulfidrilas (SH), tem capacidade de inativar a enzima GSSG-R, o que resulta na diminuição da disponibilidade de GSH. Então, a baixa dos níveis de GSH, em alguns dos grupos estudados, pode ter sido devido à inativação da enzima GSSG-R, reduzindo assim a velocidade de conversão da GSSG a GSH, e com isso, este importante antioxidante se apresentar significativamente diminuído em comparação aos grupos controles. Outra hipótese é que GSH estivesse formando complexos com os metais, diminuindo assim seus níveis devido à alta concentração de poluente intracelular.

Obtivemos também, informações de dano lipídico nos grupos expostos ao PM_{2.5}, conforme figura 2, onde notamos aumentos significativos em todos os grupos em especial nos grupos da RI, o que acreditamos ser um fator crucial no desencadeamento da resposta antioxidante. Resultado semelhante foi exposto por Li *et al.*, (2015), apontando um aumento da expressão do mRNA de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 e TNF-1 α , bem como um aumento de seus níveis em cardiomiócitos de ratos, dando importante atenção ao processo de LPO. Na tentativa de suprir os danos lipídicos apresentados na figura 2, o sistema antioxidante apresenta modulações de sua atividade (GCL, GSH e GST), como evidenciado nas figuras.3A, 3B e 4, dados estes que devem ser interpretados em paralelo, considerando sua

interdependência. A inibição da atividade da GST, associada à baixos níveis de GSH, é um fator de predisposição aos efeitos deletérios de contaminantes ambientais (SHEWEITA & TILMISANY, 2003). A exemplo disso, a figura 4 nos possibilita visualizar a atividade da GST, esta que se mostra significativamente elevada nos grupos RR_5X e RR_SC em relação ao FB, com isso, demonstrando estar ocorrendo maior conjugação da GSH com xenobióticos nestes grupos. Porém os grupos RI_5X e RI_SC, não mostraram aumento significativo na atividade da GST, o que nos leva a crer que nestes grupos outros meios de detoxificação estão sendo recrutados. É possível também, que a concentração de metais seja elevada a ponto de estar ocorrendo conjugação com a GSH, já que seus níveis estão significativamente reduzidos nestes grupos. Como isso, é possível notar o reflexo nos danos de LPO apresentados na figura 2, bem como a depleção dos níveis de GSH vistos na figura 3B.

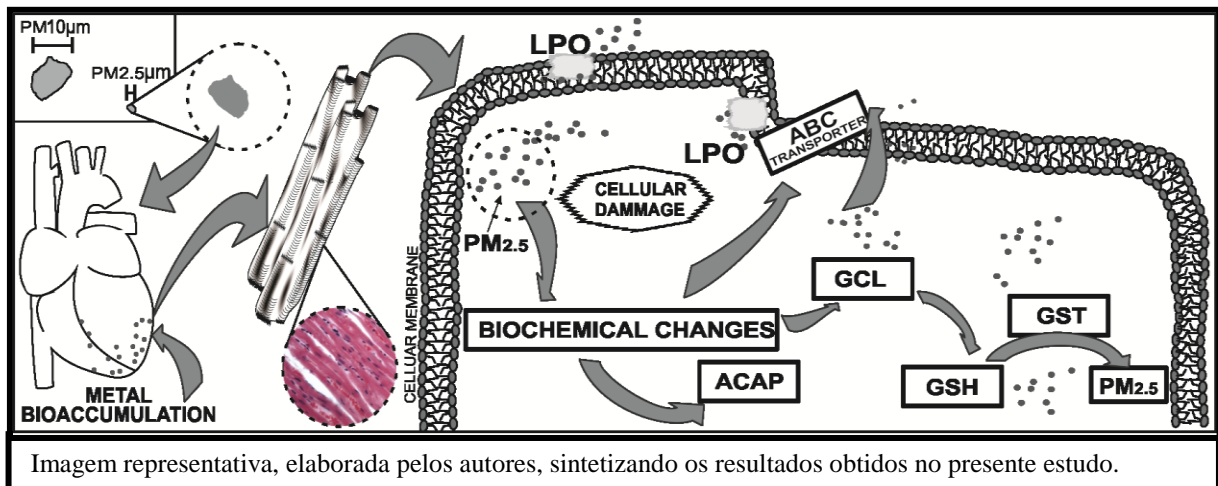
Ballatori e colaboradores, (2009), destacam que o aumento dos níveis de GSH em associação com o aumento da expressão da GST, potencializa a conjugação por xenobióticos, o que estaria contribuindo com o efluxo destes, aumentando assim a resistência celular, minimizando até os efeitos quimioterápicos. No entanto, em nossos achados, tivemos grupos onde os níveis de GSH diminuíram significativamente, e ainda assim, a atividade da GST não se mostrou alterada, como nos grupos RI_5X e RI_SC. Porém a atividade da GCL desses grupos esteve significativamente elevada, além disso, foi visto que estes foram os que também sofreram bioacumulação da maioria dos metais, conforme mostrado na tabela 2. Logo, recrutando sistemas que comumente são mais expressos em condições de grande risco para a célula, como as proteínas do sistema MXR, contudo, em nossos ensaios, se mostrou com atividade reduzida nos grupos RR_5X e RI_5X, evidenciado na figura 5. Destacando-se com isso, o potencial inibitório do PM_{2.5} sobre o sistema MXR, e gerando a conseqüente bioacumulação. Nossos resultados sugerem que a capacidade do mecanismo MXR tende a diminuir a medida que ocorre LPO e o conseqüente combate contra agentes oxidantes aumenta. Isso porque segundo Donaldson *et al.*, (2003), agentes oxidante são capazes de oxidar grupos sulfidrilas ou atacar sítios de ligação do ATP, inibindo bombas dependentes de trifosfato (ATPase), visto em sua revisão, conseguindo mostrar o potencial oxidativo e carcinogênico das UFP e PM₁₀. Assim, considerando que as proteínas do complexo MXR são dependentes de ATP, logo sua atividade é comprometida em condições de depleção deste, justificando a diminuição da atividade do complexo MXR nos grupos RR_5X e RI_5X. Outro importante ponto é que de acordo com Franke *et al.*, (2013), a extensa produção de ROS, diminui a translocação das proteínas do complexo MXR até a

membrana enquanto que, baixas produções de ROS estimulam sua expressão. Com isso, é correto afirmar que se em nossos estudos obtivemos a LPO gerada por agentes oxidantes do PM_{2.5}, logo, também obtivemos diminuição, ou não alteração da atividade MXR (fig.5), podendo correlacionar estes dois achados. Portanto, nossos dados refletem o potencial tóxico do PM de ambas as regiões, provavelmente por motivos distintos, considerando que a composição do PM coletados em diferentes locais é o que irá gerar respostas específicas, demonstrando sua heterogeneidade. Com isso, colaborando com os achados de Mirowsky *et al.*, (2015), que destaca a variabilidade do PM de zonas rurais e urbanas como um fator de dificuldade na precisão de sua caracterização.

Outro importante dado obtido em nossos estudos foi a análise histológica do tecido cardíaco, e neste resultado foi observado a diminuição do número de células, bem como um aumento de células acessórias, principalmente fibroblastos em todos os grupos expostos ao PM_{2.5}, quando comparados ao FB (fig.6). Estes resultados estão de acordo com os achados de Dewanjee *et al.*, (2013), que encontraram em seus estudos fibrose intersticial em células cardíacas, dando importante atenção à citotoxicidade promovida pelo estresse oxidativo e bioacumulação do Pb. Em contrapartida, notamos um significativo aumento no número de células acessórias totais, em todos os grupos expostos ao PM_{2.5} quando comparados ao FB. Nossos dados dividem similaridades com os achado de Wold *et al.*, (2012), que encontrou diminuição da relação citoplasma/núcleo nos cardiomiócitos de camundongos expostos cronicamente ao PM_{2.5}, quando comparados ao controle. Estamos também de acordo com Dagher *et al.*, (2006), que apontou os efeitos apoptóticos mediados pelas caspases-3 e 8, frente à exposição ao PM_{2.5}, que destacou também, a composição do PM com muita similaridade ao obtido por nosso grupo.

Por fim, nossos achados não demonstram a presença de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco em nenhum dos grupos estudados, no entanto, foram observadas a presença de elementos fibrinoides, o que aumentou o número total de células, porém não funcionais, pois estes fibroblastos são característicos do preenchimento de locais com grandes espaçamentos, inferindo a caracterização da insuficiência cardíaca. Contudo, as análises histopatológicas sugerem lesões por apoptose, além de terem sido vistas alterações morfológicas e presença de células acessórias, evidenciado na figura 6. Portanto, nossos achados histopatológicos apontam a diminuição significativa de cardiomiócitos nos grupos expostos ao PM_{2.5} de ambas as regiões, quando comparados ao FB ($p < 0,05$).

5. CONCLUSÕES



Concluimos que mesmo a grandes distâncias, o $PM_{2.5}$ apresenta capacidade migratória, sendo composto de partículas que se complexam e geram efeitos deletérios à saúde cardíaca. Estando diretamente relacionados ao desenvolvimento industrial local, além de serem altamente tóxicos ao tecido cardíaco, bem como, importantes agravantes patogênicos, vindo a causar reações oxidativas. E isso se agrava à medida que os metais modulam enzimas importantes na homeostase do estado redox, bem como na proporção em que o PM entra em contato direto com o tecido, oxidando lipídeos de membrana e prejudicando o funcionamento do complexo MXR. Podendo também ser sugerido que frações de PM diluídos em meios que facilitem sua entrada gradual nos tecidos podem apresentar efeitos ainda mais deletérios que altas concentrações de poluentes. Isso devido ao efeito da concentração intermediária obtida de nossas diluições para ambas as regiões, visto que em nosso estudo, foram estas quem reproduziram os maiores prejuízos, caracterizando um efeito hormético (curva não monotônica, ou em “U” invertido). Acreditamos contudo, que a cronicidade da exposição, pode alavancar ainda mais respostas de prejuízo, como uma maior acumulação dos metais no tecido cardíaco. Portanto, os metais encontrados no $PM_{2.5}$, tem potencial de estimular a capacidade antioxidante, alterar o equilíbrio redox e modular enzimas antioxidantes, bem como influenciar o sistema MXR, causando LPO e bioacumulação. Além disso, nosso estudo encontrou alterações morfológicas características da insuficiência cardíaca, com diminuição do número de miócitos, aumento de fibrose e provável apoptose, estando diretamente relacionado à poluição do ar.

Nosso próximo objetivo é tentar esclarecer de que forma o coração se comporta em termos de cardioproteção ao estresse gerado pelo PM de forma direta. Estando isolado e em

condições controladas de suporte energético, bem como tendo precisão do volume de PM ao qual o órgão será exposto. Além disso, saber se o exercício físico moderado pré-condicionado, pode ser um fator de contribuição na capacidade cardioprotetora, minimizando os efeitos deletérios, agudos do PM. Outra perspectiva é analisar os efeitos do PM_{2,5} sobre outros órgãos, a fim de comparar suas respostas com os dados que obtivemos no tecido cardíaco.

BIBLIOGRAFIA

ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 138, n. 4, p. 405–15, ago 2004.

AMADO, L. L.; GARCIA, M. L.; RAMOS, P. B.; *et al.* A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 6, p. 2115–2123, 2009.

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**, v. 8, n. 2, p. 166–175, 2012.

ANDRE, L.; BOISSIÈRE, J.; REBOUL, C.; *et al.* Carbon monoxide pollution promotes cardiac remodeling and ventricular arrhythmia in healthy rats. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 181, n. 6, p. 587–95, 15 mar 2010.

ARAUJO, J. A.; BARAJAS, B.; KLEINMAN, M.; *et al.* Ambient particulate pollutants in the ultrafine range promote early atherosclerosis and systemic oxidative stress. **Circulation research**, v. 102, n. 5, p. 589–596, 14 mar 2008.

BAGATE, K.; MEIRING, J. J.; GERLOFS-NIJLAND, M. E.; *et al.* Ambient particulate matter affects cardiac recovery in a Langendorff ischemia model. **Inhalation toxicology**, v. 18, n. 9, p. 633–643, 2006.

BAI, N.; KHAZAEI, M.; EEDEN, S. F. VAN; LAHER, I. The pharmacology of particulate matter air pollution-induced cardiovascular dysfunction. **Pharmacology & therapeutics**, v. 113, n. 1, p. 16–29, jan 2007.

BALLATORI, N.; KRANCE, S. M.; NOTENBOOM, S.; *et al.* Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **October**, v. 390, n. 3, p. 191–214, 2009.

CAMPEN, M. J.; NOLAN, J. P.; SCHLADWEILER, M. C.; *et al.* Cardiovascular and thermoregulatory effects of inhaled PM-associated transition metals: a potential interaction between nickel and vanadium sulfate. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 64, n. 2, p. 243–52, dez 2001.

CARSON, F. L.; HLADIK, C. C. **Histotechnology: A Self-Instructional Text**. 3. ed. [S.l.]: American Society for Clinical Pathology, 2009.

CASALINO, E.; SBLANO, C.; LANDRISCINA, V.; CALZARETTI, G.; LANDRISCINA, C. Rat liver glutathione S-transferase activity stimulation following acute cadmium or manganese intoxication. **Toxicology**, v. 200, n. 1, p. 29–38, 2004.

CAVALETTO, M.; GHEZZI, A; BURLANDO, B.; *et al.* Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. cavalett@unipmn.it. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 131, n. 4, p. 447–55, abr 2002.

CHIN, K. V; TANAKA, S.; DARLINGTON, G.; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M. M. Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 265, n. 1, p. 221–226, 1990.

CHOWDHURY, U. K.; ZAKHARYAN, R. A; HERNANDEZ, A.; *et al.* Glutathione-S-transferase-omega [MMA(V) reductase] knockout mice: enzyme and arsenic species concentrations in tissues after arsenate administration. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 216, n. 3, p. 446–57, 1 nov 2006.

CIESLIK, K. A.; TRIAL, J.; CRAWFORD, J. R.; TAFFET, G. E.; ENTMAN, M. L. Adverse fibrosis in the aging heart depends on signaling between myeloid and mesenchymal cells; role of inflammatory fibroblasts. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 70, p. 56–63, 2013.

COBAN, A. T.; MURAT, S.; CIFTCI, M.; KUFREVIOGLU, O. I. Effects of some analgesic anaesthetic drugs on human erythrocyte glutathione reductase: an in vitro study. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 420–424, abr 2007.

COBBINA, S. J.; CHEN, Y.; ZHOU, Z.; *et al.* Interaction of four low dose toxic metals with essential metals in brain, liver and kidneys of mice on sub-chronic exposure. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 1, p. 280–291, 2015.

COSTANTINI, D. Redox physiology in animal function: the struggle of living in an oxidant environment. **Curr. Zool**, v. 56, n. 6, p. 687–702, 2010.

DAGGETT, D. A.; OBERLEY, T. D.; NELSON, S. A.; *et al.* Effects of lead on rat kidney and liver: GST expression and oxidative stress. **Toxicology**, v. 128, n. 3, p. 191–206, 1998.

DAGHER, Z.; GARÇON, G.; BILLET, S.; *et al.* Activation of different pathways of apoptosis by air pollution particulate matter (PM_{2.5}) in human epithelial lung cells (L132) in culture. **Toxicology**, v. 225, n. 1, p. 12–24, 2006.

DAIGLE, C. C.; CHALUPA, D. C.; GIBB, F. R.; *et al.* IN HUMANS DURING REST AND EXERCISE. **Inhalation toxicology**, p. 539–552, 2003.

DAS, N.; DAS, R.; DAS, S. N.; *et al.* Comparative studies of chemical composition of particulate matter between sea and remote location of eastern part of India. **Atmospheric Research**, v. 99, n. 2, p. 337–343, 2011.

DEWANJEE, S.; SAHU, R.; KARMAKAR, S.; GANGOPADHYAY, M. Toxic effects of lead exposure in Wistar rats: Involvement of oxidative stress and the beneficial role of edible jute (*Corchorus olitorius*) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 78–91, 2013.

DONALDSON, K.; MACNEE, W. Potential mechanisms of adverse pulmonary and cardiovascular effects of particulate air pollution (PM₁₀). **International journal of hygiene and environmental health**, v. 203, n. 5-6, p. 411–415, 2001.

DONALDSON, K.; STONE, V.; BORM, P. J. A.; *et al.* **Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM₁₀)**. **Free Radical Biology and Medicine**. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584903001503>>. , jun 2003

EMMERECHTS, J.; JACOBS, L.; HOYLAERTS, M. F. Air Pollution and Cardiovascular Disease. **The Impact of Air Pollution on Health, Economy, Environment and Agricultural Sources**, p. 69–92, 2011.

FRANKE, K.; KETTERING, M.; LANGE, K.; KAISER, W. A.; HILGER, I. The exposure of cancer cells to hyperthermia, iron oxide nanoparticles, and mitomycin C influences membrane multidrug resistance protein expression levels. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 351–363, 2013.

FUENTES-MATTEI, E.; RIVERA, E.; GIODA, A.; *et al.* Use of human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) to study immunological markers resulting from exposure to PM_{2.5} organic extract from Puerto Rico. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 243, n. 3, p. 381–9, 15 mar 2010.

GILL, E. A; CURL, C. L.; ADAR, S. D.; *et al.* Air pollution and cardiovascular disease in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 53, n. 5, p. 353–60, 2011.

GILMOUR, P. S.; BROWN, D. M.; LINDSAY, T. G.; *et al.* Adverse health effects of PM₁₀ particles: involvement of iron in generation of hydroxyl radical. **Occupational and environmental medicine**, v. 53, n. 12, p. 817–822, 1996.

GIODA, A.; AMARAL, B. S.; MONTEIRO, I. L. G.; SAINT'PIERRE, T. D. Chemical composition, sources, solubility, and transport of aerosol trace elements in a tropical region. **Journal of environmental monitoring : JEM**, v. 13, n. 8, p. 2134–42, ago 2011.

GOLD, D. R.; LITONJUA, A; SCHWARTZ, J.; *et al.* Ambient pollution and heart rate variability. **Circulation**, v. 101, n. 11, p. 1267–1273, 2000.

GONZÁLEZ-FLECHA, B. Oxidant mechanisms in response to ambient air particles. **Molecular aspects of medicine**, v. 25, n. 1-2, p. 169–82, 2004.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 1, p. 48–58, 2002.

GUERRERO-CASTILLA, A.; OLIVERO-VERBEL, J.; MARRUGO-NEGRETE, J. Heavy metals in wild house mice from coal-mining areas of Colombia and expression of genes related to oxidative stress, DNA damage and exposure to metals. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 762, p. 24–29, mar 2014.

GURGUEIRA, S. A.; LAWRENCE, J.; COULL, B.; KRISHNA MURTHY, G. G.; GONZÁLEZ-FLECHA, B. Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 8, p. 749–755, 2002.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. **Methods in Enzymology**, *Methods in Enzymology*. v. 77, p. 398–405, 1981.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases (rat and human). **Methods in enzymology**, v. 77, p. 218–31, jan 1981.

HASLAM, I. S.; EL-CHAMI, C.; FARUQI, H.; *et al.* Differential expression and functionality of ATP-binding cassette transporters in the human hair follicle. **British Journal of Dermatology**, v. 172, n. 6, p. 1562–1572, 2015.

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 30, n. 6, p. 445–600, 1995.

HIPFNER, D. R.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. C. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1461, n. 2, p. 359–376, 1999.

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

INT PANIS, L.; GEUS, B. DE; VANDENBULCKE, G.; *et al.* Exposure to particulate matter in traffic: A comparison of cyclists and car passengers. **Atmospheric Environment**, v. 44, n. 19, p. 2263–2270, jun 2010.

Ji, L. L. Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 928, p. 236–47, abr 2001.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, n. 2-3, p. 65–87, 2011.

KAI, H.; MORI, T.; TOKUDA, K.; *et al.* Pressure overload-induced transient oxidative stress mediates perivascular inflammation and cardiac fibrosis through angiotensin II. **Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 29, n. 9, p. 711–718, 2006.

KIM, J.-B.; KIM, C.; CHOI, E.; *et al.* Particulate air pollution induces arrhythmia via oxidative stress and calcium calmodulin kinase II activation. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 259, n. 1, p. 66–73, 15 fev 2012.

KIM, K.; KABIR, E.; KABIR, S. A review on the human health impact of airborne particulate matter. **Environment International**, v. 74, p. 136–143, 2015a.

KIM, K.; KABIR, E.; KABIR, S. A review on the human health impact of airborne particulate matter. **Environment International**, v. 74, p. 136–143, jan 2015b.

KONTAS, A. Trace metals (Cu, Mn, Ni, Zn, Fe) Contamination in Marine Sediment and Zooplankton Samples from Izmir Bay. (Aegean Sea, Turkey). **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 188, n. 1-4, p. 323–333, 3 nov 2007.

KRISHNA, R.; MAYER, L. D. Multidrug resistance (MDR) in cancer. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 4, p. 265–283, 2000.

KUNJACHAN, S.; RYCHLIK, B.; STORM, G.; KIESSLING, F.; LAMMERS, T. Multidrug resistance: Physiological principles and nanomedical solutions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 13-14, p. 1852–1865, 2013.

KURELEC, B.; SMITAL, T.; PIVÈVIÆ, B.; EUFEMIA, N.; EPEL, D. Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein, and chemosensitizers. **Ecotoxicology**, v. 9, n. 5, p. 307–327, 2000.

LESLIE, E. M.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. C. Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. **Toxicology**, v. 167, n. 1, p. 3–23, 2001.

LI, R.; KOU, X.; GENG, H.; *et al.* Mitochondrial damage: An important mechanism of ambient PM_{2.5} exposure-induced acute heart injury in rats. **Journal of Hazardous Materials**, v. 287, n. 92, p. 392–401, 2015.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 101, n. 1, p. 13–30, 17 jan 2011.

MARCHINI, T.; MAGNANI, N.; D'ANNUNZIO, V.; *et al.* Impaired cardiac mitochondrial function and contractile reserve following an acute exposure to environmental particulate matter. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 3, p. 2545–2552, 2013.

MARTINELLI, N.; OLIVIERI, O.; GIRELLI, D. Air particulate matter and cardiovascular disease: A narrative review. **European Journal of Internal Medicine**, v. 24, n. 4, p. 295–302, 2013.

MATEUS, V. L.; MONTEIRO, I. L. G.; ROCHA, R. C. C.; SAINT'PIERRE, T. D.; GIODA, A. Study of the chemical composition of particulate matter from the Rio de Janeiro metropolitan region, Brazil, by inductively coupled plasma-mass spectrometry and optical emission spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 86, p. 131–136, 2013.

MÉNDEZ-ARMENTA, M.; NAVA-RUIZ, C.; FERNÁNDEZ-VALVERDE, F.; SÁNCHEZ-GARCÍA, A.; RIOS, C. Histochemical changes in muscle of rats exposed subchronically to low doses of heavy metals. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 107–112, 2011.

MIROWSKY, J. E.; JIN, L.; THURSTON, G.; *et al.* In vitro and in vivo toxicity of urban and rural particulate matter from California. **Atmospheric Environment**, v. 103, p. 256–262, 2015.

MOLINAS, A.; SICARD, G.; JAKOB, I. Functional evidence of multidrug resistance transporters (MDR) in rodent olfactory epithelium. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

MORISHITA, M.; KEELER, G. J.; WAGNER, J. G.; HARKEMA, J. R. Source identification of ambient PM_{2.5} during summer inhalation exposure studies in Detroit, MI. **Atmospheric Environment**, v. 40, n. 21, p. 3823–3834, 2006.

NAGALAKSHMI, N.; PRASAD, M. N. V. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. **Plant Science**, v. 160, n. 2, p. 291–299, 2001.

NAIR, P. M. G.; PARK, S. Y.; CHUNG, J. WOONG; CHOI, J. Transcriptional regulation of glutathione biosynthesis genes, γ -glutamyl-cysteine ligase and glutathione synthetase in response to cadmium and nonylphenol in *Chironomus riparius*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 2, p. 265–273, 2013.

OAKES, K. D.; KRAAK, G. J. VAN DER. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. **Aquatic Toxicology**, v. 63, n. 4, p. 447–463, 2003.

PERRONE, M. G.; GUALTIERI, M.; FERRERO, L.; *et al.* Seasonal variations in chemical composition and in vitro biological effects of fine PM from Milan. **Chemosphere**, v. 78, n. 11, p. 1368–1377, 2010.

PETERS, A; DOCKERY, D. W.; MULLER, J. E.; MITTLEMAN, M. A. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. **Circulation**, v. 103, n. 23, p. 2810–2815, 2001.

POLICHETTI, G.; COCCO, S.; SPINALI, A.; TRIMARCO, V.; NUNZIATA, A. Effects of particulate matter (PM10, PM2.5 and PM1) on the cardiovascular system. **Toxicology**, v. 261, n. 1-2, p. 1–8, 30 jun 2009.

POPE, C. A. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: Biologic mechanisms and who's at risk? **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. SUPPL. 4, p. 713–723, 2000.

POPE, C. A.; RENLUND, D. G.; KFOURY, A. G.; MAY, H. T.; HORNE, B. D. Relation of Heart Failure Hospitalization to Exposure to Fine Particulate Air Pollution. **American Journal of Cardiology**, v. 102, n. 9, p. 1230–1234, 2008.

POPE III, A. C.; BURNETT, R. T.; THUN, M. J.; *et al.* Lung Cancer, Cardiopulmonary Mortality, and Long-term Exposure to Fine Particulate Air Pollution. **American Medical Association**, v. 287, n. 9, p. 1132–1141, 2002.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-Induced Oxidative Stress : Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. p. 1243–1276, 2008.

PULIDO, M. D.; PARRISH, A. R. **Metal-induced apoptosis: Mechanisms. Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.** [S.l.: s.n.]. , 2003

PUNTARULO, S. Iron, oxidative stress and human health. **Molecular aspects of medicine**, v. 26, n. 4-5, p. 299–312, 2005.

QUIG, D. Cysteine metabolism and metal toxicity. **Alternative Medicine Review**, v. 3, n. 4, p. 262–270, 1998.

QUITERIO, S. L.; SOUSA DA SILVA, C. R.; ARBILLA, G.; ESCALEIRA, V. Metals in airborne particulate matter in the industrial district of Santa Cruz, Rio de Janeiro, in an annual period. **Atmospheric Environment**, v. 38, n. 2, p. 321–331, 2004.

RAJNEESH, C. P.; MANIMARAN, A; SASIKALA, K. R.; ADAIKAPPAN, P. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. **Singapore medical journal**, v. 49, n. 8, p. 640–643, 2008.

RISOM, L.; MØLLER, P.; LOFT, S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. **Mutation research**, v. 592, n. 1-2, p. 119–137, 2005.

RODRIGUEZ, R. J. Cardiac Toxicology. p. 1211–1224, 2001.

RODRÍGUEZ-COTTO, R. I.; ORTIZ-MARTÍNEZ, M. G.; RIVERA-RAMÍREZ, E.; *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**, v. 194, p. 112–120, 2014.

ROMIEU, I.; CASTRO-GINER, F.; KUNZLI, N.; SUNYER, J. Air pollution, oxidative stress and dietary supplementation: A review. **European Respiratory Journal**, v. 31, n. 1, p. 179–196, 2008.

SAEZ, G.; JONG, L. DE; MOREAU, X.; *et al.* Evaluation of pollutant exposure by chemical and biological markers in a Mediterranean French urban stream: A step for in situ calibration of multixenobiotic resistance transporter expression as biomarker in Chironomidae larvae. **Environmental Research**, v. 107, n. 3, p. 351–361, 2008.

SAÏDI, S. A.; AZAZA, M. S.; WINDMOLDERS, P.; PELT, J. VAN; EL-FEKI, A. Cytotoxicity evaluation and antioxidant enzyme expression related to heavy metals found in tuna by-products meal: An in vitro study in human and rat liver cell lines. **Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie**, v. 65, n. 7-8, p. 1025–33, 2013.

SCHUETZE, K. B.; MCKINSEY, T. A.; LONG, C. S. Targeting cardiac fibroblasts to treat fibrosis of the heart: Focus on HDACs. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 70, p. 100–107, 2014.

SEILER, C.; BERENDONK, T. U. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. DEC, p. 1–10, 2012.

SHEWEITA, S. A.; TILMISANY, A. K. Cancer and phase II drug-metabolizing enzymes. **Current drug metabolism**, v. 4, n. 1, p. 45–58, 2003.

SHI, H.; HUDSON, L. G.; LIU, K. J. **Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. Free Radical Biology and Medicine.** [S.l: s.n.]. , 2004

SOBERANES, S.; GONZALEZ, A.; URICH, D.; *et al.* Particulate matter Air Pollution induces hypermethylation of the p16 promoter Via a mitochondrial ROS-JNK-DNMT1 pathway. **Scientific Reports**, v. 2, p. 1–8, 2012.

STEENHOF, M.; GOSENS, I.; STRAK, M.; *et al.* In vitro toxicity of particulate matter (PM) collected at different sites in the Netherlands is associated with PM composition, size fraction and oxidative potential - the RAPTES project. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 8, n. 1, p. 26, 2011.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 2, p. 321–336, 1995.

TABIMA, D. M.; FRIZZELL, S.; GLADWIN, M. T. Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. **Free radical biology & medicine**, v. 52, n. 9, p. 1970–86, 1 maio 2012.

TAYLOR, A. E.; JOHNSON, D. C.; KAZEMI, H. Environmental tobacco smoke and cardiovascular disease. A position paper from the Council on Cardiopulmonary and Critical Care, American Heart Association. **Circulation**, v. 86, n. 2, p. 699–702, 1 ago 1992.

TOOMEY, B. H.; EPEL, D. Multixenobiotic resistance in *Urechis caupo* embryos: Protection from environmental toxins. **Biological Bulletin**, v. 185, n. 3, p. 355–364, 1993.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7369–7375, 2003.

UCHIDA, M.; SUGAYA, M.; KANAMARU, T.; HISATOMI, H. Alternative RNA splicing in expression of the glutathione synthetase gene in human cells. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 4, p. 2105–2109, 2010.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, n. 1-2, p. 41–54, 2003.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, 2006.

VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; CAVALETTO, M.; *et al.* Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **The American journal of physiology**, v. 277, n. 6 Pt 2, p. R1612–R1619, 1999.

VILLARREAL-CALDERON, R.; REED, W.; PALACIOS-MORENO, J.; *et al.* Urban air pollution produces up-regulation of myocardial inflammatory genes and dark chocolate provides cardioprotection. **Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie**, v. 64, n. 4, p. 297–306, maio 2012.

WALLENBORN, J. G.; SCHLADWEILER, M. J.; RICHARDS, J. H.; KODAVANTI, U. P. Differential pulmonary and cardiac effects of pulmonary exposure to a panel of particulate matter-associated metals. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 241, n. 1, p. 71–80, 2009.

WANG, X.; WANG, H.; LI, J.; *et al.* Evaluation of Bioaccumulation and Toxic Effects of Copper on Hepatocellular Structure in Mice. **Biological Trace Element Research**, v. 159, n. 1-3, p. 312–319, 2014.

WARHOLM, M.; GUTHENBERG, C.; MANNERVIK, B.; BAHR, C. VON. Purification of a new glutathione S-transferase (transferase mu) from human liver having high activity with benzo(alpha)pyrene-4,5-oxide. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 98, n. 2, p. 512–519, 1981.

WHITE, C. C.; VIERNES, H.; KREJSA, C. M.; BOTTA, D.; KAVANAGH, T. J. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate–cysteine ligase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 318, n. 2, p. 175–180, 15 jul 2003.

WOLD, L. E.; SIMKHOVICH, B. Z.; KLEINMAN, M. T.; *et al.* In vivo and in vitro models to test the hypothesis of particle-induced effects on cardiac function and arrhythmias. **Cardiovascular toxicology**, v. 6, n. 1, p. 69–78, 2006.

WOLD, L. E.; YING, Z.; HUTCHINSON, K. R.; *et al.* Cardiovascular remodeling in response to long-term exposure to fine particulate matter air pollution. **Circulation: Heart Failure**, v. 5, n. 4, p. 452–461, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide: global update 2005: summary of risk assessment. **Geneva: World Health Organization**, p. 1–22, 2006.

YI, S.; ZHANG, F.; QU, F.; DING, W. Water-insoluble fraction of airborne particulate matter (PM10) induces oxidative stress in human lung epithelial A549 cells. **Environmental Toxicology**, v. 29, n. 2, p. 226–233, 2014.

ZUURBIER, M.; HOEK, G.; HAZEL, P.; BRUNEKREEF, B. Minute ventilation of cyclists, car and bus passengers: an experimental study. **Environmental Health**, v. 8, n. 1, p. 48, 2009.

TABELAS COMPLEMENTARES (ANEXO I)

Tabela 3. Tabela de vazão média, concentração e desvio padrão da média e tamanho do PM encontrado nos filtros. Concentração média de PM_{2.5} µg/m³ em filtros com vazão média 1,1 m³/min. Diferença significativa entre as concentrações de PM_{2.5} entre as regiões (p<0,05 – t-studet).

Local	Tabela de vazão média, concentração/DPM e tamanho do PM		
	Tamanho	[] Média de PM/DPM	Méd.Vazão (m ³ /min.)
Região Industrial (RI)	PM _{2.5}	14,4±4.1	1,139±0.004
Região Rural (RR)	PM _{2.5}	8,5±4.0	1,146±0.002

Tabela 4. Concentração de metais, obtido através de extrato ácido do PM_{2.5}. Média da concentração de metais dos filtros (mg/L), coletados nos meses compreendidos entre janeiro a agosto de 2012. Locais identificados como região industrial/urbana (RI) e região rural Seropédica (RR). Os elementos correspondentes são o (Li) lítio, (Be) berílio, (Na) sódio, (Mg) magnésio, (Al) alumínio, (K) potássio, (Ca) cálcio, (Ti) titânio, (V) vanádio, (Cr) cromo, (Mn) manganês, (Fe) ferro, (Co), cobalto, (Ni) níquel, (Cu) cobre, (Zn) zinco, (Ga) gálio, (As) arsênio, (Se) selênio, (Cd) cádmio, (Sb) antimônio, (Ba) bário, (Hg) mercúrio, (Tl) tálio e (Pb) chumbo, que foram encontrados nos filtros utilizados. Em destaque (vermelho) aqueles que estiveram iguais ou em maior concentração na RR em comparação a RI. Tendo feito o teste *t-student* para verificar diferenças estatísticas, apresentado com * $p < 0,05$.

Metal	Média da [] de metais dos filtros (mg/L)	
	Região Industrial (RI)	Região Rural (RR)
Li	0.985±0.226	0.875±0.397
Be	0.043±0.028	0.041±0.026
Na	8097.105±30.595	7783.097±46.595
Mg	255.971±1.007	241.762±1.552
K	3371.182±7.002	3391.577±10.383
Ca	3617.502±9.476	3655.554±16.406
Ti	3.278±0.568	2.764±1.140
V	0.916±0.316	0.941±0.501
Cr	1.712±0.288	1.726±0.610
Mn	3.173±1.038	2.543±0.997
Fe	217.044±3.048	205.323±5.389
Co	0.080±0.017	0.065±0.025
Ni	0.881±0.126	1.426±1.290
Cu	4.000±1.480	18.158±9.962*
Zn	4468.403±1.273	4748.434±2.540
Ga	56.506±2.906	50.156±2.422
As	0.547±0.089	0.443±0.154
Se	0.704±0.731	0.548±0.422
Rb	3.416±0.879	3.198±1.489
Sr	44.234±1.203	40.274±1.188
Ag	0.120±0.030	0.152±0.063
Cd	2.287±1.432	1.606±0.465
Sb	0.1970.093	0.105±0.065
Ba	3450.378±1.897	3301.691±1.570
Hg	0.097±0.037	0.113±0.044
Tl	0.058±0.015	0.068±0.061
Pb	24.656±2.756	7.486±0.603