

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Influência do processo inflamatório sobre a genotoxicidade em expostos
ocupacionalmente aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

ANELISE BARTH

Porto Alegre, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Influência do processo inflamatório sobre a genotoxicidade em expostos
ocupacionalmente aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

Dissertação apresentada por **Anelise Barth**
para obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Solange Cristina Garcia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e aprovada em 22.04.2015 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Adriana Gioda

Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio)

Prof^a. Dr^a. Andreia Buffon

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof^a. Dr^a. Mirna Leal

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

CIP - Catalogação na Publicação

Barth, Anelise

Influência do processo inflamatório sobre a genotoxicidade em expostos ocupacionalmente aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos / Anelise Barth. -- 2015.
113 f.

Orientadora: Solange C. Garcia.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Genotoxicidade. 2. Inflamação. 3. Exposição ocupacional aos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. I. Garcia, Solange C., orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Prof^a. Dr. Solange Cristina Garcia no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A pesquisa foi financiada pelo projeto FAPERGS e CNPq. Anelise Barth recebeu bolsa de mestrado CNPq.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela saúde e por permitir que eu tenha pessoas maravilhosas ao meu redor.

À Professora Solange Garcia, pela confiança depositada em mim. Por sempre ter acreditado no meu potencial e pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, o qual eu considero uma família.

À família, por todo o apoio, amor e carinho. Aos meus pais, Ana Iris e Anselmo, pela minha vida e pelas oportunidades que sempre me proporcionaram. Ao meu irmão André Henrique pelo companheirismo e amizade. Obrigada por todo o amor e cuidado que sempre dedicou a mim.

Ao meu namorado, melhor amigo, Gleison, pelo amor, amizade e companheirismo. Obrigada por fazer parte de mais uma etapa importante da minha vida.

Aos meus amigos. Obrigada por todos os sorrisos e bons momentos compartilhados. Em especial, às minhas amigas de infância, de cursinho pré-vestibular e àqueles que conquistei na Faculdade de Farmácia da UFSM. Saibam que minha vida não teria o mesmo valor sem a presença de vocês. Vocês estarão comigo por toda minha vida.

A todos os amigos e colegas do grupo LATOX. Obrigada pela amizade, pelos momentos de descontração e também de muito trabalho. Em especial: Rafael, Sabrina, Gabi, Marília, Mariele, Nati e Angela.

Às colegas de LATOX, Dr^a Natália Brucker e Dr^a Angela Moro, pelas correções e considerações feitas para a melhoria desse trabalho.

Aos Professores Adriana Gioda, Andréia Buffon e Mirna Leal por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

À todos os taxistas que colaboraram com o trabalho.

Ao Banco do Estado do Rio Grande do Sul (Banrisul) pela parceria e disponibilidade em nos ajudar no recrutamento do grupo controle.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por me proporcionar a oportunidade de cursar a graduação e pós-graduação e por ser o meu segundo lar.

Ao CNPq pelo fomento através da concessão de bolsa. A Fapergs e CNPq pelo suporte financeiro ao desenvolvimento deste trabalho.

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil da molécula relacionada à inflamação (ICAM-1), citocinas e da atividade das NTPDases como potencial influência sobre a genotoxicidade em trabalhadores expostos ocupacionalmente a HPA. Este estudo incluiu 45 taxistas e 40 indivíduos com atividades administrativas (não-expostos ocupacionalmente), ambos não fumantes. O monitoramento biológico foi realizado pela quantificação do 1-hidroxipireno (1-pireno OH) urinário. A expressão de ICAM-1 (CD54) em neutrófilos foi realizada por citometria de fluxo. O perfil de hidrólise das NTPDases em plaquetas foi determinada pelo método colorimétrico. Além disso, os níveis de malondialdeído no plasma (MDA), citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ) e o dano ao DNA (ensaio cometa e do micronúcleo) foram também avaliados. Os resultados demonstraram que os níveis de 1-OH pireno foram significativamente aumentados nos motoristas de táxi em comparação com o grupo não exposto ocupacionalmente ($p < 0.0001$); também foi positivamente correlacionada com neutrófilos ICAM-1, níveis de MDA e biomarcadores de danos no DNA. A expressão de ICAM-1 em neutrófilos foi significativamente elevado em motoristas de táxi ($p < 0.05$), bem como os níveis de MDA ($p < 0.01$), sendo a última positivamente correlacionada com a % de DNA na Cauda e frequência de MN. Aumento da hidrólise de ATP e ADP forma encontrados nos taxistas. Concentrações dos marcadores pró-inflamatórios foram aumentadas e anti-inflamatórias (IL-10) diminuída no grupo exposto. Para o teste de ensaio de micronúcleos e cometa, houve aumento significativo em motoristas de táxi, inclusive depois da adição de enzimas de reparo. Correlações positivas foram encontradas entre IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ e preditores de danos no DNA (% de DNA na cauda e frequência de MN), enquanto que a IL-10 está negativamente correlacionada com os biomarcadores de lesão ao DNA. Em resumo, a exposição ocupacional à poluição do ar pode levar a anormalidade homeostática como potencial contribuição para o processo aterosclerótico. Este estudo mostrou também que a exposição crônica à poluição do ar pode causar danos no DNA relacionado com a peroxidação lipídica e processo inflamatório.

Palavras-chave: 1-OH pireno; taxistas; ICAM; atividade das NTPDases.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the profile of inflammatory molecule (ICAM-1), cytokines and the NTPDases activity as potential influence on genotoxicity process in workers exposed occupationally to PAH. This study included 45 taxi drivers and 40 non-occupationally exposed subjects, both non smokers. Biological monitoring was performed by quantification of urinary 1-hydroxypyrene (1-OH pyrene). The expression of ICAM-1 (CD54) in neutrophil was performed and the hydrolysis profile of the NTPDases in platelets was determined. Plasma malondialdehyde (MDA) levels, inflammatory cytokines and DNA damage (comet and micronucleus assays) were also evaluated. The results demonstrated that the 1-OH pyrene levels were significantly increased in taxi drivers ($p < 0.0001$); were also positively correlated to neutrophil ICAM-1 expression, MDA levels and biomarkers of DNA damage. ICAM-1 expression in neutrophil was significantly elevated in taxi drivers ($p < 0.05$), as well as MDA levels ($p < 0.01$), being the last positively correlated with % Tail DNA and MN frequency. ATP and ADP hydrolysis was increased in taxi drivers. Pro-inflammatory markers concentrations were increased and anti-inflammatory (IL-10) was decreased in exposed group. For the comet assay and micronucleus test, increase was significant in taxi drivers, inclusive after repair enzymes. Positively correlations were found between IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ and predictors of DNA damage (%Tail DNA and MN frequency), while IL-10 is negatively correlated with the biomarkers of DNA lesion. In summary, occupational exposure to air pollution, especially to PAHs, may be related with homeostatic abnormality as potential contribute to atherosclerosis process. This study showed also that the chronic exposure to outdoor air pollution may cause DNA damage related with lipid peroxidation and inflammatory process.

Key-words: 1-OH pyrene; taxi drivers; ICAM-1 expression; NTPDases activity.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada na forma de encarte de publicações submetidas e/ou publicadas e dividida em seções da seguinte maneira: Introdução, Objetivos, Revisão da Literatura, Artigo presente no Capítulo I, Discussão, Conclusões, Referências Bibliográficas e Anexos.

A Introdução apresenta de uma forma geral o embasamento teórico no qual a proposta deste trabalho foi construída. Os Materiais e Métodos, Resultados e as Referências Bibliográficas pertinentes à publicação específica encontram-se no Capítulo I.

A seção Discussão contém uma interpretação geral dos resultados obtidos. A seção Conclusões aborda as conclusões gerais da dissertação.

A seção Referências Bibliográficas lista a bibliografia utilizada nas seções Introdução e Discussão.

A seção “Anexos” contém o comprovante de submissão do artigo e o modelo do termo de consentimento livre esclarecido.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	Adenosina deaminase
ADP	Nucleotídeo de adenosina difosfato
ATP	Nucleotídeo de adenosina trifosfato
AVC	Acidente Vascular to/difosfatoCerebral
BaP	Benzo[a]pireno
CYP-450	Citocromo P-450
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
Ecto-NPP	Nucleosídeo ecto pirofosfatase/fosfodiesterase
EDTA	Ethylene Diamine Tetracetic
ELISA	Enzyme liked immunosorbent assay
ENDO III	Endonuclease III
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
HAP	Hidrocarboneto Aromático Policíclico
FPG	Formadino pirimidina DNA glicosilase
1-OH pirenene	1-hidroxipireno
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular – 1
INF- γ	Interferon-gama
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK quinase	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
MN	Micronúcleo
MP	Material Particulado
NOx	Óxidos de Nitrogênio
NTPDase	Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
OMS	Organização Mundial de Saúde
O ₃	Ozônio

RNA

Ácido ribonucléico

TNF- α

Fator de necrose tumoral

WHO

World Health Organization

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
OBJETIVOS	25
Objetivo geral.....	27
Objetivos específicos.....	27
REVISÃO DA LITERATURA	29
1. Poluição atmosférica e saúde.....	31
2. Fontes e poluentes atmosféricos.....	32
3. Exposição ocupacional aos poluentes atmosféricos.....	35
4. Biomonitoramento.....	36
5. Area de estudo.....	38
6. Mecanismos da toxicidade dos poluentes atmosféricos.....	39
6.1. Relação da exposição aos poluentes atmosféricos com inflamação sistêmica	41
6.1.1. Molécula de Adesão Intracelular-1 (ICAM-1).....	42
6.1.2. Adesão plaquetária	43
7. Genotoxicidade e poluição atmosférica.....	44
8. Inter-relação entre dano de DNA e inflamação	46
CAPÍTULO I: ARTIGO	49
ICAM-1, cytokines and NTPDases activity contributing to homeostatic abnormalities and genotoxicity in taxi drivers.....	50
DISCUSSÃO	67
CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXOS	101
ANEXO I: Questionário de Avaliação.....	102
ANEXO II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	106
ANEXO III: Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).....	108
ANEXO IV: Comprovante de submissão do artigo.....	112

As doenças agravadas ou desencadeadas pela exposição ocupacional e/ou ambiental resultantes do contato crônico com xenobióticos do ambiente interno ou poluentes do ambiente externo, estão cada vez mais presentes. Esses xenobióticos podem provocar intoxicações exógenas, que podem ser agudas e/ou crônicas, e desenvolver sintomas e sinais que contribuem em médio e longo prazo para a queda na qualidade de vida dos indivíduos expostos (Schenck *et al.*, 2008). Segundo a Organização Mundial da Saúde 3,7 milhões de mortes em 2012 foram associados à poluição do ar (WHO, 2012).

A contaminação atmosférica por poluentes ambientais, tem se tornado um agravante para a saúde humana, acarretando em infecções respiratórias, disfunções cardiovasculares, alergias e câncer de pulmão (Batalha *et al.*, 1999; Brauer *et al.*, 2002; Brunekreef *et al.*, 2002, Hoek *et al.*, 2013; Brook *et al.*, 2010; Krishnan, Kaufman and Hoek, 2011; yang *et al.*, 2015). O material particulado, formado por partículas sólidas ou líquidas suspensas no ar (POPE, 2002), juntamente com o monóxido de carbono, o ozônio, o óxido de nitrogênio, o dióxido de enxofre e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) constituem importantes poluentes ambientais. Dentre os HPAs, especialmente, o benzopireno (BaP) importante poluente no desenvolvimento da carcinogênese, desempenhando papel embriotóxico e teratogênico (IARC, 2002) decorrente da ação de alguns dos seus metabólitos intermediários serem intercalantes de DNA (Boffetta *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 2000).

A poluição do ar mostrou-se estar associada com morbidade e mortalidade cardiovascular e respiratória em vários estudos epidemiológicos. Vários estudos apoiam a hipótese de que os mecanismos responsáveis pela morbidade e mortalidade associadas com exposição à poluição envolvem inflamação e estresse oxidativo induzido pelo potencial pró-oxidante dos componentes químicos (Pope *et al.*, 2006; Brook *et al.*, 2010).

O aumento do dano oxidativo pode desencadear a modificação de macromoléculas: proteínas e/ou enzimas, como, por exemplo, a perda de função biológica; a peroxidação lipídica, que aumenta a perda da integridade de membranas celulares; e ainda, o dano ao DNA (Junqueira e Ramos, 2005). A inalação de poluentes ambientais pode ocasionar uma inflamação pulmonar,

levando posteriormente a uma inflamação sistêmica, isto é, o aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) como descrito por Pope e Dockery, 2006.

Alguns estudos mostram que os poluentes no meio ambiente, causam diversos efeitos tóxicos em vários órgãos e sistemas tais como cardiovascular, imunológico/hematopoiético (Kelly and Fussell, 2015). Um dos mecanismos envolvidos na doença cardiovascular é a hipercoagulação (Davies *et al.*, 2009). As plaquetas expressam um complexo enzimático em sua superfície, incluindo as enzimas nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase (NTPDase) e 5'-nucleotidase. As NTPDases hidrolisam ATP e ADP em AMP, o qual é subsequentemente hidrolisado à adenosina pela 5'-nucleotidase. Alterações em suas atividades têm sido demonstradas em várias doenças e intoxicações, sugerindo que estas enzimas podem ser importantes parâmetros fisiológicos e patológicos (Bhatt & Topol, 2007; Kaizer *et al.*, 2007; Spanevello *et al.*, 2007; Mazzanti *et al.*, 2007; Schetinger *et al.*, 2007; Bagatini *et al.*, 2008; Schmatz *et al.*, 2009). Contudo, não há estudos sobre a atividade destas enzimas nas plaquetas de indivíduos ocupacionalmente expostos à poluição atmosférica, destacando-se assim a importância deste estudo a fim de verificar se esta exposição está desencadeando mecanismos de inibição de agregação plaquetária.

Em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foi evidenciado que os motoristas de táxi estão mais expostos aos poluentes atmosféricos e, portanto, apresentam efeitos tóxicos pela maior e cumulativa exposição aos HPAs no local de trabalho (Brucker *et al.*, 2013). Brucker e colaboradores em 2014 consideraram que a exposição ocupacional aos poluentes atmosféricos está relacionada ao desenvolvimento de efeitos pró-inflamatório e pró-oxidativos, sendo esses motoristas profissionais mais suscetíveis para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Esses resultados obtidos anteriormente pelo nosso grupo de estudo levaram ao que esta dissertação se propõe: uma investigação mais aprofundada sobre eventos de disfunção vascular e efeitos sistêmicos que a exposição aos HPAs pode desencadear, utilizando parâmetros de imunotoxicidade e de desequilíbrio da cascata de coagulação; além de verificar se o mecanismo de estresse oxidativo e o processo inflamatório desencadeado pela exposição aos poluentes atmosféricos podem estar relacionados ao desenvolvimento de dano ao DNA.

A avaliação dos riscos causados pela exposição ocupacional frente à xenobióticos, através do monitoramento ambiental e monitorização biológica, aliado aos conhecimentos relativos dos efeitos na saúde, permitem estabelecer as prioridades e as formas efetivas de intervenção para proteger precocemente uma população dos riscos. Vários são os parâmetros biológicos que podem estar alterados em decorrência da interação do organismo com xenobióticos. A quantificação destes parâmetros, usados como biomarcadores é de extrema importância na avaliação da intensidade da exposição e o efeito provocado pela substância (AMORIM, 2003).

1. Objetivo geral

Avaliar o perfil da maior molécula relacionada à inflamação (ICAM-1), citocinas e da atividade das NTPDases como potencial influência sobre a genotoxicidade em trabalhadores expostos ocupacionalmente ao HPA.

1.1. Objetivos específicos

- Quantificar o biomarcador de exposição à hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs): 1-hidroxipireno.
- Avaliar genotoxicidade e imunotoxicidade causadas pela exposição ocupacional frente aos xenobióticos, através de diferentes biomarcadores de efeito;
- Estudar possíveis correlações entre os níveis de exposição e os diferentes biomarcadores de danos causados pela exposição ao HPAs;
- Avaliar a taxa de hidrólise de ATP e ADP em plaquetas dos indivíduos para observar os efeitos de formação de pró-trombos com níveis de poluição;
- Avaliação dos biomarcadores de inflamação sistêmica nos trabalhadores expostos aos xenobióticos;
- Investigar a correlação dos marcadores inflamatórios com o dano de DNA.

1. Poluição Atmosférica e Saúde

A poluição do ar é um grave problema ambiental que afeta as pessoas, estando relacionada com 3,7 milhões de mortes prematuras em todo o mundo em 2012 (WHO, 2014).

Os efeitos nocivos da poluição do ar vêm sendo mais claramente relatados desde a primeira metade do século passado, durante episódios de alta concentração de poluentes como os observados no Vale Meuse, na Bélgica, (Firket, 1931) em 1930; em Donora, na Pensilvânia, (Ciocco e Thompsom, 1961) em 1948; e em Londres, Inglaterra, no inverno de 1952-1953. A partir destes e outros episódios menos famosos, organizações governamentais tomaram uma série de medidas visando controlar os níveis ambientais de poluição do ar em diversos centros urbanos, principalmente em países da América do Norte e Europa (Cançado *et al.*, 2006).

Mais recentemente, vários estudos vêm demonstrando a existência da associação dos poluentes atmosféricos com efeitos nocivos à saúde, mesmo quando os níveis médios de poluentes não são tão altos (Zhang *et al.*, 2010). Esses efeitos têm sido observados por causas específicas como doenças cardiovasculares e respiratórias (Nishiwaki *et al.* 2013; Brucker *et al.*, 2013; Saldiva *et al.*, 1994; Peters *et al.*, 2004; Zanobetti e Schwartz, 2005; Brook, 2008; Franchini e Mannucci, 2012), bem como podem exacerbar doenças pré-existentes e, conseqüentemente, o aumento nos atendimentos hospitalares (Lin *et al.*, 2004; Farhat *et al.*, 2005; Dubowsky *et al.*, 2006). Estudos recentes têm demonstrado que a diabetes pode ser adicionada a lista de doenças associadas à exposição à poluentes da atmosfera (CHEN *et al.*, 2013).

Estudos realizados no Brasil (Saldiva *et al.*, 1994; Bakonyi *et al.*, 2004; Dumas *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2004; Farhat *et al.*, 2005; Andre *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2012) assim como em outros países (Alves, Scotto e Freitas, 2010; Chen *et al.*, 2010; Tonne *et al.*, 2010; Samoli *et al.*, 2011) têm associado ambientes poluídos com mortes prematuras, doenças respiratórias, irritação ocular e aumento de internações hospitalares. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 60 % das doenças respiratórias agudas e 50 % das doenças respiratórias crônicas estão associadas à exposição aos poluentes atmosféricos.

Além dos danos ao sistema respiratório, o material particulado presente no ar tornou-se um fator de risco para eventos cardiovasculares (Brook *et al.*, 2004; Kunzli *et al.*, 2005; Brook, 2008; Kunzli *et al.*, 2010; Franchini e Mannucci, 2012). Na realidade as alterações induzidas pela poluição atmosférica, especialmente por partículas finas e ultra-finas, em casos de exposição crônica contribuirão para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose e, no curto prazo poderão contribuir para a instabilização das placas de ateroma e acidentes cardiovasculares agudos (AVC, enfarte agudo do miocárdio, arritmias e morte súbita) (Kunzli *et al.*, 2005; Suwa *et al.*, 2005; Araujo *et al.*, 2008). Além disso, Tonne e colaboradores correlacionaram à exposição crônica ao tráfego com um maior número de ocorrências de infarto agudo do miocárdio (Tonne *et al.*, 2009).

Adicionalmente, a Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) tem classificado a exposição à poluição do ar como carcinogênico (IARC, 2013). Esta classificação foi baseada em evidências consistentes de estudos epidemiológicos, além de fortes estudos sobre mecanismos (Loomis *et al.*, 2013; Raaschou-Nielsen *et al.*, 2013; Krewski *et al.*, 2009; Turner *et al.*, 2011) .

No Brasil, o desenvolvimento tecnológico e econômico norteados pelo aumento do parque industrial, crescimento da frota veicular leve e pesada, e expansão da fronteira produtiva acarretou novos desafios para a determinação dos impactos da poluição à saúde humana. Assim, a expansão dessas fontes proporcionou a expansão de problemas de poluição atmosférica a áreas desprovidas de capacidade de monitoramento e gestão do risco (Colombini, 2008). Sendo um dos requisitos básicos da saúde humana e bem-estar é o ar limpo, a exposição à poluição atmosférica é considerada uma ameaça significativa para a saúde humana, principalmente em áreas urbanas de países em desenvolvimento.

2. Fontes e poluentes atmosféricos

A atmosfera dos grandes conglomerados urbanos é um complexo sistema constituído por gases e partículas que podem se tornar poluentes quando excedem as concentrações naturais (Teixeira *et al.*, 2009).

A poluição é parte integrante da sociedade industrial, isto é, uma das conseqüências da geração de energia útil pelo processo de combustão. Seus efeitos

no meio ambiente estão ligados a problemas de ordem política, social e econômica (Carvalho e Lacava, 2003). A poluição atmosférica, entretanto, não é recente e de inteira responsabilidade do homem, tendo a própria natureza se encarregado, durante milhares de anos, de participar ativamente com o lançamento de gases e material particulado originários de atividades vulcânicas e tempestades, dentre algumas fontes naturais de poluentes. A atividade antropogênica, por sua vez, acaba por intensificar a poluição do ar com o lançamento contínuo de grandes quantidades de substâncias poluentes (Teixeira, 2008 *et al.*; Teixeira *et al.*, 2009).

Os poluentes podem ser classificados de acordo com sua origem como: poluentes primários, emitidos diretamente na atmosfera e secundários, que são formados na atmosfera a partir de reações químicas e/ou fotoquímicas entre dois ou mais poluentes, como o ozônio (O₃), que tem como precursores os hidrocarbonetos e os óxidos de nitrogênio (NO_x) (Brasil, 2006).

Substâncias sólidas ou líquidas podem ser agrupadas como particulado ou material particulado desde que princípios físicos sejam freqüentemente utilizados para sua remoção e suas densidades sejam aproximadamente três vezes maiores do que a do ar onde estão diluídos. Dependendo do seu tamanho aerodinâmico, as partículas são classificadas em partículas grossas com diâmetro aerodinâmico menor que 10 µm e partículas finas, apresentando diâmetro aerodinâmico igual ou inferior a 2,5 µm, designando-se por MP10 e MP2,5, respectivamente. O material particulado fino (MP2,5) tem sido amplamente estudado, pois essas partículas apresentam a capacidade de atingir as regiões mais distais do sistema respiratório gerando efeitos adversos (Pope *et al.*, 2002).

O material particulado apresenta em sua composição química uma variabilidade complexa de substâncias tóxicas, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e metais que estão adsorvidos em sua superfície (Quiterio *et al.*, 2004; Dallarosa *et al.*, 2005; Manalis *et al.*, 2005; Vallius *et al.*, 2005; Valavanidis *et al.*, 2006; Fang, Cassidy e Christiani, 2010; Gupta, Salunkhe e Kumar, 2010; Paulino *et al.*, 2010). Portanto, além de serem poluentes, essas partículas atuam como um veículo de disseminação de outros compostos químicos (Lodovici *et al.*, 2003; Gioda, 2006; Valavanidis *et al.*, 2006; Colombini, 2008).

Os gases e vapores formam outro grupo, sendo poluentes moleculares com existência permanente (Boubel *et al.*, 1984). Os HPAs são poluentes orgânicos de

grande persistência ambiental e contem mais de 100 tipos diferentes de produtos químicos (ATSDR, 2006). Dentre os HPAs, os pirenos, especialmente, o benzo[a]pireno é um dos principais componentes (Castano-Vinyals *et al.*, 2004).

Assim como os demais HPAs, o benzo[a]pireno é um produto proveniente da combustão incompleta de matéria orgânica, podendo ser emitido por motores a diesel e a gasolina, estar presente na fumaça do cigarro e da madeira, sendo um dos componentes da poluição atmosférica (Takaishi *et al.*, 2009). Em regiões urbanas, há uma maior concentração de HPAs na atmosfera. As vias de contaminação por HPAs nos seres humanos são por meio da inalação de vapores ou material particulado com vapores adsorvidos, e pela ingestão de alimentos grelhados ou contaminados por deposições atmosféricas (Pereira Netto *et al.*, 2000). Em virtude de suas propriedades físico-químicas, o risco de contaminação é significativo, pois apresentam característica lipofílica, podendo ser absorvido por inalação e ingestão (Pereira Netto *et al.*, 2000). Após a absorção, o benzo[a]pireno é biotransformado por uma série de enzimas (fase I e II) que catalisam as reações de hidrólise, oxidação, redução (oxigenases, citocromo P-450 como as CYP1A1 e CYP1B1 e NADPH-citocromo-redutase) e conjugação por meio das enzimas sulfotransferase, epóxido hidrolase, glutathione-S-transferase e UDP-glicotransferase. A biotransformação tende a transformar em um metabólito mais hidrofílico que o seu precursor e, com isso, facilitar a sua excreção (Klaassen e Watkins, 2012). O benzo[a]pireno, assim como outros HPAs, pode ser biotransformado por três diferentes vias. A primeira via é a formação de diol-epóxidos eletrofílicos por meio da ação do citocromo P-450 formando óxidos de areno, e estes, por sua vez, podem sofrer rearranjo formando fenóis ou reagir covalentemente com a glutathione (espontaneamente ou catalisada pela glutathione-S-transferase) formando diolépóxido (Xue e Warshawsky, 2005). Alguns fenóis são oxidados a quinonas e outros podem sofrer nova epoxidação formando os dihidrodiolepóxidos. A segunda via é a formação do radical cátion por meio do citocromo P-450 e das peroxidases, sendo esta outra classe de formação de metabólitos reativos e carcinogênicos. A terceira via é a formação de o-quinonas, com reação de oxidação de fenóis. As o-quinonas apresentam alta reatividade com os grupamentos tiólicos (glutathione e cisteína), formando os conjugados hidrossolúveis (Xue e Warshawsky, 2005). A via de formação de o-quinonas pode liberar espécies reativas de oxigênio quebrando o

equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes (IARC, 2010). O processo de oxidação enzimática seguida de hidrólise com a formação de diolepóxidos é a via mais aceita na bioativação dos HPAs, na qual metabólitos reativos são intercalantes de DNA (ATSDR, 2006; Xue e Warshawsky, 2005). O polimorfismo genético das isoenzimas do sistema CYP-450 é conhecido como um fator de influência na biotransformação de xenobióticos (Strickland e Kang, 1999).

3. Exposição ocupacional aos poluentes da atmosfera

O termo “exposição” denota o contato com qualquer atributo que possa ser relevante para a saúde do indivíduo, sejam fatores ambientais, biológicos ou relacionados à situação socioeconômica, atuando isoladamente ou em interação com fatores genéticos (Armstrong, White and Saracci, 1992). São situações nas quais os indivíduos estão expostos à determinada substância, mistura de substâncias, ou a processo de trabalho, que aumentam o risco de incidência de neoplasias malignas (Hunter, 1989).

O risco de o trabalhador desenvolver doenças devido à exposição a diferentes substâncias presentes no ambiente de trabalho é conhecido desde a antiguidade. Na exposição ocupacional, a intensidade da exposição depende, entre outros fatores, da concentração do agente tóxico no local de trabalho, do tipo e intensidade do trabalho, da duração diária da exposição ao longo da vida profissional, da frequência da exposição pelo trabalhador e das condições de temperatura, umidade e ventilação (Salgado e Fernicola, 1989).

Porém, também devem ser considerados os fatores inerentes ao indivíduo, como idade, gênero, etnia, suscetibilidade genética, estado nutricional e doenças crônicas (Klaassen e Watkins, 2012). Estes fatores podem interferir na gravidade dos efeitos adversos ocasionados pelos agentes tóxicos presentes no ambiente de trabalho, já que os indivíduos podem desenvolver patologias relacionadas por condições adversas ao exercício de sua profissão (Oga, Carvalho e Batistuzzo, 2008; Manno *et al.*, 2010).

A Agência Internacional para a Pesquisa sobre Câncer (International Agency for Research on Cancer – IARC) da Organização Mundial da Saúde reconhece atualmente 88 agentes como cancerígenos para os humanos, dos quais 23 são

encontrados principalmente em ambientes ocupacionais e 13 constituem-se em processos de trabalho (IARC, 2002).

Dentre os grupos ocupacionalmente expostos à poluição atmosférica, destacam-se os motoristas profissionais. Esta categoria de trabalhadores possui uma longa jornada de trabalho diário e está exposta a uma mistura heterogênea de compostos tóxicos (Zagury, le Moullec e Momas, 2000; Burgaz *et al.*, 2002; Lewne *et al.*, 2006; Manini *et al.*, 2006; Bagryantseva *et al.*, 2010; Millerschulze *et al.*, 2010). Os motoristas de taxi não possuem um ponto e local definido durante a sua jornada de trabalho. Diferentemente de outras categorias, que desempenham suas funções em ambientes climatizados e relativamente confortáveis, os motoristas profissionais passam horas do seu dia no trânsito e são expostos a variações climáticas, às condições do tráfego, bem como aos fatores psicossociais (Battiston, Cruz e Hoffmann, 2006; Alquimim *et al.*, 2012). Alguns estudos têm sugerido que excessivas horas de trabalho diário estão associadas ao desenvolvimento de diversas patologias, como distúrbios psíquicos, diabetes e infarto agudo do miocárdio (Knibbs e Morawska, 2012).

4. Biomonitoramento

O biomonitoramento tem como objetivo principal a gestão de avaliação de risco por meio dos níveis individuais de exposição, utilizando biomarcadores de exposição e biomarcadores de efeito para a detecção precoce, e preferencialmente reversível de sinais biológicos, para prevenir em médio e longo prazo danos à saúde do trabalhador (Oga, Carvalho e Batistuzzo, 2008; Manno *et al.*, 2010). A vantagem do biomonitoramento reside no fato de que o marcador biológico de exposição estar relacionado ao efeito adverso à saúde do trabalhador, considerando a exposição ao agente químico pelas vias respiratória, oral e dérmica (Klaassen e Watkins, 2012).

Os biomarcadores de exposição são considerados como ferramentas importantes, pois permitem estimar o nível das substâncias químicas a que o indivíduo está exposto, pela quantificação da substância tóxica e/ou metabólitos em fluidos biológicos (Amorim, 2003). Além disso, a quantificação de biomarcadores de exposição contribuem para a elucidação dos mecanismos tóxicos, da biotransformação e dos efeitos dos compostos químicos (Angerer, Ewers e Wilhelm,

2007). Em relação aos biomarcadores de efeito, estes são caracterizados como biomarcadores que refletem a interação entre os xenobióticos e os receptores biológicos do organismo, e a quantificação destes biomarcadores indicam as modificações precoces, reversíveis ou não, que precedem danos estruturais ou funcionais progressivos em nível molecular e celular (Amorim, 2003; Prista e Uva, 2006).

A suscetibilidade individual a xenobióticos ambientais é modelada por diferenças na capacidade de metabolização/detoxificação dos xenobióticos e também pela eficiência dos diferentes sistemas de reparo de dano ao DNA (Nordberg, 2010). Estudos de polimorfismos podem fornecer informações importantes quanto ao papel da suscetibilidade genética individual e sua relação com a exposição aos xenobióticos, bem como podem influenciar diretamente sobre os fatores de risco associados a patologias (Amorim, 2003). Sendo assim, o biomarcador de suscetibilidade indica a capacidade inata ou adquirida do indivíduo exposto em responder à dose da substância absorvida (Prista e Uva, 2006).

Deve-se considerar a caracterização do potencial risco de toxicidade do xenobiótico, a duração e a frequência da exposição, bem como a suscetibilidade do indivíduo exposto. O xenobiótico na sua forma original ou os seus metabólitos formados após a biotransformação podem ligar-se a moléculas desencadeando os efeitos adversos. Essa interação poderá resultar em danos reversíveis ou lesões pré-clínicas em uma primeira fase e, posteriormente, em manifestações clínicas se a exposição ao xenobiótico persistir (Prista e Uva, 2006). A quantificação de biomarcadores pode não prevenir o desenvolvimento de todas as doenças do trabalhador, mas sua aplicação contribui para a melhoria da proteção da saúde dos trabalhadores (Schulte e Hauser, 2012). Os biomarcadores utilizados como indicadores de exposição individual a poluição do ar é um método emergente no campo da avaliação da exposição ambiental, estabelecendo as ligações entre os efeitos na saúde e agentes ambientais (Zou *et al.*, 2009).

O controle biológico da exposição aos HPAs pode ser realizado pela quantificação de biomarcadores de exposição que geram informações quanto ao nível de absorção do xenobiótico (Angerer, Mannschreck e Gundel, 1997). O 1-hidroxipireno (1-OH pireno) urinário é o principal metabólito do pireno e tem sido utilizado como um biomarcador de exposição aos HPAs (Jongeneelen *et al.*, 1988;

Sellappa, Mani e Keyan, 2011; Demetriou *et al.*, 2012), bem como para estimar a exposição aos HAPs presente nas emissões veiculares (Merlo *et al.*, 1998; Castano-Vinyals *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2008; Ciarrocca *et al.*, 2013). Na avaliação de exposição ocupacional, é importante também considerar os hábitos de vida do trabalhador, como a alimentação e o fumo ativo e/ou passivo, uma vez que a concentração de 1-OH pireno presente na urina reflete a exposição total aos HPAs (Marie *et al.*, 2009).

5. Área de estudo

O crescimento da frota de veículos, o desenvolvimento industrial e a expansão populacional, quando associados a fatores meteorológicos, têm contribuído significativamente para a elevação dos níveis de poluentes em suspensão, diminuindo a qualidade do ar. Os veículos automotores são um dos grandes agentes contribuidores para a emissão de diversos poluentes atmosféricos que podem representar riscos à saúde (Cançado *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2008; Texeira *et al.*, 2009). Pesquisas evidenciaram que, durante os meses de inverno, ocorre um maior acúmulo de poluentes ambientais devido ao predomínio de inversões térmicas (Teixeira *et al.*, 2008; Texeira *et al.*, 2009). A inversão térmica é um fenômeno meteorológico que consiste na presença de uma camada de ar frio próximo ao solo, ficando a camada de ar quente acima, a qual impede a dispersão e a movimentação de massas de ar, acarretando um acúmulo de poluentes ambientais (Oga, Carvalho e Batistuzzo, 2008).

A poluição emitida pela frota veicular é a principal fonte de poluentes que agem na degradação da qualidade do ar, principalmente em regiões metropolitanas (Teixeira *et al.*, 2008). Segundo os dados do DETRAN (Departamento Nacional de Trânsito), a frota total de Porto Alegre é de 797.951 veículos licenciados e uma população de 1.472.482 habitantes. O uso do transporte motorizado no Brasil tem aumentado a cada ano. Este crescimento da frota de veículos é acompanhado por problemas ambientais, incluindo a poluição do ar e o congestionamento do tráfego, que representam ameaças para a saúde e o bem-estar da população (Andre *et al.*, 2012). Mesmo sendo reconhecida a ação toxicológica e carcinogênica de alguns

compostos emitidos na atmosfera, no Rio Grande do Sul, ainda não há monitoramento ambiental contínuo desses poluentes.

6. Mecanismos da toxicidade dos poluentes atmosféricos

Podem ser relacionados diferentes efeitos adversos da poluição do ar sobre a saúde humana, alguns deles manifestando-se de forma aguda – horas ou dias após a exposição – enquanto outros são evidenciados somente após longos períodos de exposição – os chamados efeitos crônicos. Os efeitos da exposição a curto prazo incluem exacerbação de doenças respiratórias pré-existentes (especialmente asma e Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica) e doença cardiovascular pré-existente (incluindo isquemia e arritmias), com o aumento das internações hospitalares. A exposição a longo prazo à poluição do ar está associada com um aumento da mortalidade, maior incidência de câncer de pulmão e pneumonia, e desenvolvimento da aterosclerose (Abelsohn e Stieb, 2011).

Os indivíduos variam em sua resposta a diferentes poluentes atmosféricos. Alguns polimorfismos genéticos contribuem para o aumento de suscetibilidade (London, 2007; Sandstrom and Kelly, 2009; Gilliland, 2009). Acredita-se que até mesmo os níveis relativamente baixos de poluição comumente encontrados no Brasil têm implicações para a saúde (Gouveia *et al.*, 2006).

Efeitos sobre o sistema respiratório incluem inflamação pulmonar, obstrução das vias aéreas, e aumento da suscetibilidade à infecção e à sensibilidade aos alérgenos. Efeitos cardiovasculares associados com a exposição a curto prazo incluem mudanças na variabilidade da frequência cardíaca, pressão sanguínea, tônus vascular e coagulabilidade, enquanto exposição a longo prazo pode acelerar a progressão da aterosclerose (Brook *et al.*, 2010). Muitos destes efeitos são mediados através de vias pró-inflamatórias e a geração de espécies reativas de oxigênio como demonstrado na figura 1.

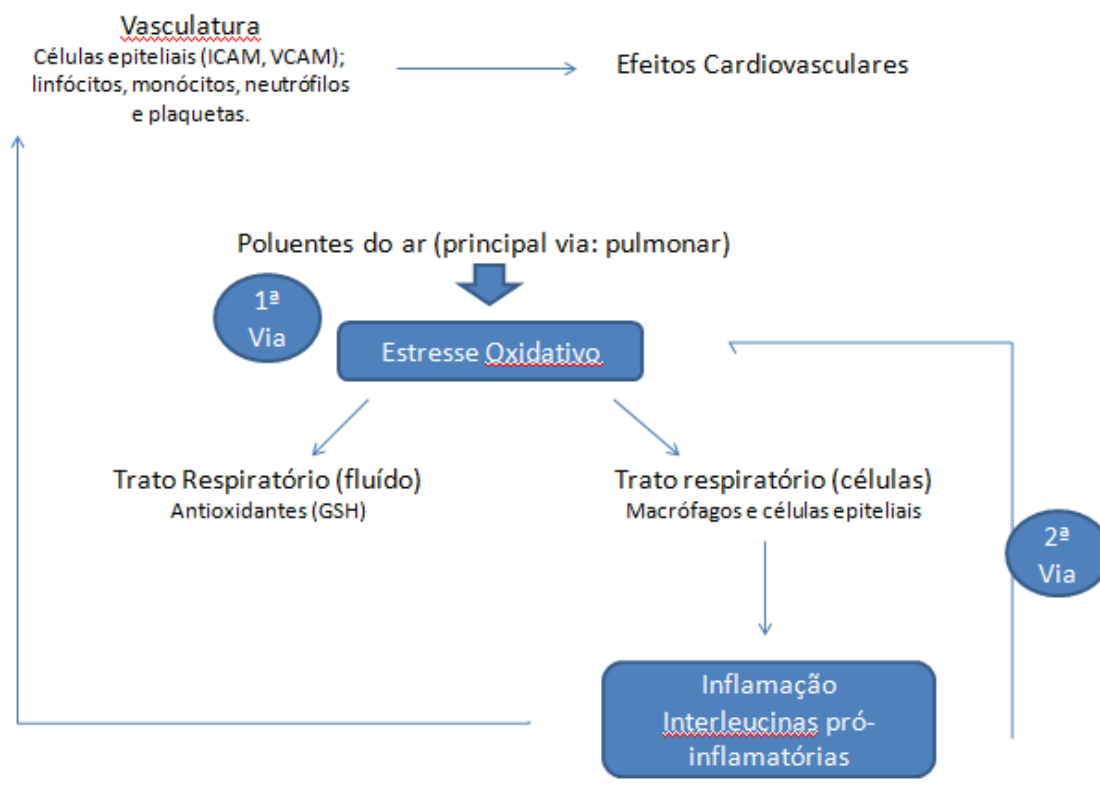


Fig 1. Efeitos sistêmicos da poluição do ar na saúde humana. Alfaro-Moreno et al, 2007.

Há evidências suficientes para o papel fundamental do estresse oxidativo em efeitos adversos associados à poluentes atmosféricos (Hou *et al.* 2013; Michael *et al.* 2013). Investigações anteriores sugerem que ROS formados a partir da exposição aos poluentes atmosféricos pode implicar na ativação de membros da família da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK quinase) e fatores de transcrição (Wang *et al.* 2010). Estas vias de sinalização estão envolvidas em processos de proliferação, transformação, diferenciação, inflamação e apoptose (Liu *et al.*, 2015). O estresse oxidativo pode induzir a apoptose das células pulmonares e desencadear o processo inflamatório pulmonar. A resposta inflamatória sistêmica ocorre por meio do aumento de citocinas pró-inflamatórias na circulação (IL-1, IL-6, TNF- α), alteração nos fatores da coagulação sanguínea, aumento da adesividade plaquetária e progressão do processo aterosclerótico desencadeando complicações cardiovasculares ateroscleróticas (Cançado *et al.*, 2006; Zeka *et al.*; Brook, 2008; Simkhovich, Kleinman e Kloner, 2008; Delfino *et al.*, 2009; Huttunen *et al.*, 2012).

6.1. Relação da exposição aos poluentes atmosféricos com inflamação sistêmica

Estudos epidemiológicos têm associado o consistente aumento da morbidade e mortalidade do risco cardiovascular, com variações nas concentrações de índices de poluição atmosférica. Pacientes idosos, pessoas com suscetibilidade a doenças cardíacas e pulmonares, doenças crônicas como diabetes, obesidade são geralmente de maior risco (Brook, *et al.* 2004).

Segundo Brook e colaboradores (2002), o material particulado fino MP2,5 pode alterar a reatividade e o tônus arterial em humanos expostos. Vermlyen e colaboradores 2005 demonstram algumas implicações patofisiológicas do infarto do miocárdio e poluição atmosférica. Tal estudo descreve algumas cidades da Europa, relacionando períodos de picos agudos de poluição atmosférica com o aumento da mortalidade cardiovascular.

Em relação à exposição crônica estudos referentes a cidades dos Estados Unidos, Holanda e Brasil mostraram relação direta entre doenças cardiovasculares e poluição atmosférica (Hoek *et al.*, 2002; Brucker *et al.*, 2014). Sendo assim, nos últimos anos, muitos trabalhos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado a participação direta e/ou indireta da poluição na progressão da aterosclerose (Lippmann *et al.*; 2005; Sun *et al.*, 2005; Goto e *et al.*, 2003; Suwa *et al.*, 2002, Donaldson *et al.*, 2003).

A aterosclerose é atualmente considerada uma doença inflamatória, com perfil patofisiológico complexo (Ross, 1999; Libby, Ridker e Maseri 2002; Hansson, 2005). No Brasil, a doença da artéria coronária é considerada a principal causa de mortalidade na população adulta, sendo responsável atualmente por cerca de 30% dos óbitos no país (Ministério da Saúde, 2011; WHO, 2010). O processo aterosclerótico tem início quando o endotélio dos vasos sofre algum tipo de lesão, induzindo um processo inflamatório (Hansson, 2005).

Estudos anteriores demonstraram que a exposições ao material particulado ligado a combustão de combustíveis fósseis, está associada com inflamação sistêmica em sujeitos com doença arterial coronariana (Delfino *et al.*, 2009; Delfino *et al.*, 2010). Essa relação foi vista principalmente para os marcadores de exposição

a poluição do ar relacionada ao tráfego, tais como HPAs, e para a fração ultrafina do material particulado (Delfino *et al.*, 2010).

Como consequência do processo inflamatório, ocorrem alterações na permeabilidade vascular, levando à saída de macromoléculas e à migração de neutrófilos, monócitos e linfócitos T e B para a região subendotelial (Roos, 1999; Hansson, 2005). A consequente alteração na estrutura da parede endotelial leva ao aumento da adesão plaquetária, contribuindo para a formação de trombos. Além disso, células musculares lisas e fibroblastos, que são produtoras de matriz extracelular, também passam a proliferar na área da lesão, constituindo o maior volume da placa aterosclerótica no estado avançado (Libby, Ridker e Maseri, 2002).

6.1.1 Molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1)

Os neutrófilos são extremamente importantes no processo inflamatório, assumindo funções que incluem o rolar ao longo do endotélio, a aderência ao endotélio e a migração transendotelial nos tecidos. Após a ligação às células endoteliais, os neutrófilos tornam-se ativados e liberam vários mediadores inflamatórios, que estão envolvidos no aumento da permeabilidade do endotélio. Os neutrófilos aderidos migram através do endotélio e contribuem para a inflamação dos órgãos. Esse processo é iniciado e mantido por interações dos leucócitos circulantes e por interações dos neutrófilos com o endotélio via moléculas de adesão específicas (Boldt *et al.*, 1995).

As lisofosfatidilcolinas e os esteróis oxidados podem ativar macrófagos e células endoteliais para gerarem radicais de oxigênio e expressarem moléculas de adesão. Várias moléculas de adesão vêm sendo investigadas como fundamentais nesse processo, dentre as quais pode se citar a ICAM-1 (Frostegard *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 2000).

A ICAM-1 é uma glicoproteína da superfamília imunoglobulina que participa na adesão dos neutrófilos às células endoteliais e na migração extravascular dos neutrófilos. É expressa na superfície de vários tipos celulares, incluindo leucócitos e células endoteliais (Videm e Albrigtsen, 2008).

A expressão dessas moléculas é resultado do processo de ativação do endotélio que ocorre em condições de lesão tecidual, na presença de subprodutos

de microorganismo (e.c., lipopolissacarídeos –LPS) ou mediante contato com fatores provenientes da resposta inflamatória como componentes das cascatas do complemento, coagulação, citocina (IL-1, TNF- α) e mediadores como a histamina e o leucotrieno B4. ICAM-1 demanda estimulação de horas para sua síntese (Golias *et al.*, 2007).

Estes marcadores são, independentemente e em conjunto, associadas com um risco aumentado de doença cardiovascular (Pradhan *et al.*, 2002; Rana *et al.*, 2011; Ridker *et al.*, 2003). Estudos recentes têm demonstrado a associação entre marcadores inflamatórios e exposição à poluição do ar (Delfino *et al.*, 2008; madrigano *et al.* 2010; zeka *et al.*, 2006).

Alguns estudos têm demonstrado um forte nível de expressão de ICAM-I após a exposição a partículas da exaustão de combustíveis e nanopartículas (Mikkelsen *et al.*, 2011; Forchhammer *et al.*, 2012).

6.1.2. Adesão Plaquetária

Estudos prévios revelaram que a poluição influencia em marcadores de coagulação, inflamação, e função endotelial (Chuang *et al.*, 2007; Alexeeff *et al.*, 2011; Madrigano *et al.*, 2010; O'neill *et al.*, 2010).

As plaquetas se acumulam dentro da lesão aterosclerótica, e pode recrutar plaquetas adicionais para formar trombos, indicando que a parede arterial pode assumir tanto um fenótipo inflamatório e pro-trombogênico (Massberg *et al.*, 2005).

As plaquetas são um dos componentes mais importantes do sangue que participam e regulam a formação de trombos. Nucleotídeos de adenina extracelulares, tais como ATP, ADP e adenosina regulam a resposta vascular à lesão endotelial interagindo com receptores específicos nas plaquetas e células endoteliais (Leon *et al.*, 1997). ADP é um promotor principal de agregação de plaquetas e o seu metabolismo é importante para a regulação da ativação e recrutamento de plaquetas. Em contraste, a adenosina é um potente inibidor desta agregação que é conhecido por possuir propriedades anti-inflamatórias e analgésicas e influenciam na proliferação, sobrevivência e apoptose de muitas células diferentes, funcionando como um potente supressor no sistema imune (Marcus *et al.*, 2005). Os estudos têm sugerido um papel complexo ao ATP na

regulação da agregação plaquetária (Birk *et al.*, 2002). Estudos *in vitro* mostraram que altas concentrações de ATP inibem adesão plaquetária induzida por ADP (Park *et al.*, 1997). As plaquetas expressam um complexo multienzimático na sua superfície, que é responsável pela hidrólise de nucleótidos extracelulares. Este complexo incluem enzimas como a NTPDase (Nucleosídeo trifosfato de difosfolidase), Ecto-NPP (nucleotídeo ecto- pirofosfatase/fosfodiesterase), ecto-5'-nucleotidase e adenosina-desaminase (ADA) (Fürstenau *et al.*, 2006).

NTPDases são um grupo de ectoenzimas capazes de hidrolisar trinucleosídeo e / ou difosfatos para monofosfato de adenosina, e requerem concentrações milimolares de Ca^{+2} e Mg^{+2} para máxima atividade. E-NPPs hidrolisam ligações 5'-fosfodiéster em nucleotídeos e seus derivados, liberando 5'monofosfatos de nucleotídeos (Bigonnesse *et al.*, 2004). Em conjunto, estas enzimas constituem uma cascata enzimática altamente organizada, que é capaz de regular as concentrações extracelulares de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, tendo um papel importante para manter a homeostase normal e na prevenção de excessiva agregação plaquetária (Yegutkin *et al.*, 2008).

Nucleotídeos extracelulares tornaram-se reconhecidos pelo significativo papel que desempenham na modulação de uma variedade de processos relacionados com a inflamação vascular e trombose (Burnstock *et al.*, 2002; Atkinson *et al.*, 2006; Seye *et al.* 2003). Neste contexto, na literatura não encontram-se relatos que demonstram a atividade das NTPDases em indivíduos ocupacionalmente expostos aos poluentes atmosféricos.

7. Genotoxicidade e Poluição Atmosférica

Os HPAs, especialmente, o BaP, têm sido demonstrado como importante poluente no desenvolvimento da carcinogênese, desempenhando papel embriotóxico e teratogênico (Takaishi *et al.*, 2009). A potente ação carcinogênica do BaP é decorrente da ação de alguns dos seus metabólitos intermediários que são intercalantes de DNA e, portanto, agentes mutagênicos/oncogênicos (Who, 2008; Boffetta *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 2000).

Muitas substâncias as quais o ser humano se expõe, como o BaP, geram intracelularmente espécies reativas de oxigênio, favorecendo a ocorrência de lesões em macromoléculas, como os lipídios, proteínas e o DNA (Kazantsev, 2007).

O ensaio cometa é uma técnica bioquímica, simples que detecta quebras no DNA e corresponde a um ensaio citogenético. Este ensaio é aplicável em qualquer suspensão de células eucarióticas, independentemente de estarem em proliferação ou não (Collins *et al.*, 1997; Collins, 2004; Hartmann *et al.*, 2001). Detecta danos primários no DNA, induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (Lee e Steinert, 2003; Villela *et al.*, 2007). Logo, detecta em células individuais, quebras simples e duplas de fita de DNA, eventos de reparo por excisão incompleta, lesões alcalilábeis, danos oxidativos em bases do DNA e crosslinks entre DNA-DNA, DNA-proteína e DNA-droga, possibilitando quantificar o dano, mas não identificar com clareza qual desses eventos foi responsável pela indução deste (Singh, 2000).

Os micronúcleos são estruturalmente pequenos núcleos representando o material genético que foi perdido pelo núcleo principal, como consequência de um dano genético que pode ser causado por agentes físicos, químicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam induzir a perda do material genético (cromossomos inteiros ou fragmentados). O teste de micronúcleos, portanto, detecta mutagênese cromossômica em eucariotos do tipo clastogênese, aneugênese e danos no fuso mitótico (Villela *et al.*, 2006). A presença de micronúcleo pode ser tomada como indicação da existência prévia de aberração cromossômica. O micronúcleo aparece pela primeira vez no final da primeira divisão mitótica, após clastogênese ou aneugênese, porém micronúcleos adicionais podem se formar nas divisões seguintes (Maluf e Erdtman, 2003).

O DNA é uma complexa molécula orgânica responsável pelas informações genéticas das células dos organismos. Para que estas informações sejam transmitidas com sucesso geração para geração, a manutenção da integridade do material genético deve ser mantida, sendo esta essencial para a sobrevivência dos organismos vivos. Apesar da sua considerável estabilidade química, uma exposição constante a vários agentes podem gerar uma variedade de lesões bastante grande na estrutura (Friedberg, 2003). Estas lesões podem atingir mecanismos como replicação do DNA e transcrição em RNA. Como consequência, danos no DNA

podem produzir na célula efeitos genotóxicos (mutagênese) ou citotóxicos (morte celular) (Berra, 2008).

Uma das maiores ameaças à integridade do genoma é a oxidação de bases nitrogenadas, gerada principalmente por EROs. Essa lesão é particularmente deletéria por fazer com que a guanina oxidada possa parear erroneamente com uma adenina, levando a uma mutação por transversão do par de bases (Slupphaug, Kavli and Krokan, 2003).

8. Inter-relação entre dano de DNA e Inflamação

Estudos demonstraram que os poluentes do ar podem causar efeitos adversos à saúde no pulmão, que é o principal alvo da exposição. A indução de estresse oxidativo e inflamação são mecanismos importantes para desencadear os efeitos na saúde causados por partículas inaladas (Mazzoli-rocha *et al*, 2010;. Van Berlo *et al*, 2010). Sendo assim, nesse estudo, a geração de lesões oxidativas do DNA e sua interrelação com a inflamação, foi estudada.

Totlandsdal *et al.* (2010) relatou que a presença de frações orgânicas dos componentes da poluição atmosférica pode ser responsável pela formação de ROS levando a inflamação e dano ao DNA, devido ao estresse oxidativo. Em um estudo *in vitro*, a exposição à partículas de escape automotivo induz estresse oxidativo significativo, em conjunto com, peroxidação lipídica e inflamação, os quais podem ser a razão para o dano no DNA (Durga, 2014).

Entender a interação entre vias de resposta do dano ao DNA e inflamação tem dominado as investigações nos últimos anos. Tudo suporta a hipótese de uma cascata inflamação mundial impulsionado por ROS e danos ao DNA. A perda da homeostase imune e inflamação gerado pela exposição aos poluentes do ar induzem a produção de ROS, que leva ao dano oxidativo ao DNA, reduzindo a capacidade de reparação lançando assim mais DNA oxigenado (nuclear e mitocondrial), através da morte de células danificadas. Isto, por sua vez, induz secundariamente e conseqüentemente inflamação em células espectadoras distantes intactas como sinais de estresse, o que acelera em um processo de inflamação aguda sistêmica ou câncer. O equilíbrio entre estas vias é evitar a inflamação crônica e a perda da integridade genômica através da promoção de

reparo do DNA, ou induzir apoptose para eliminar as células com mutações não reparadas pro-tumorigênicos acumuladas (Palmai-Pallag and Bachrati, 2014; Wang *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2007).

CAPÍTULO I (ARTIGO):
**ICAM-1, cytokines and NTPDases activity contributing to homeostatic
abnormalities and genotoxicity in taxi drivers**

Artigo submetido para publicação na revista *Toxicology Research*

ICAM-1, cytokines and NTPDases activity contributing to homeostatic abnormalities and genotoxicity in taxi drivers

Anelise Barth,^a Natália Brucker,^a Angela Moro,^a Sabrina Nascimento,^a Gabriela Göethel,^a Caroline Souto,^a Rafael Fracasso,^a Elisa Sauer,^a Louise Altknecht,^a Bárbara da Costa,^a Marta Duarte,^b Camila B. Menezes,^c Tiana Tasca,^c Solange C. Garcia^a.

Among the many compounds that are present in the environment, the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are considering the most toxic. The present study aimed to evaluate the profile of major inflammatory molecule (ICAM-1), cytokines and the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDases) activity as potential influence on genotoxicity in taxi drivers. This study included 45 taxi drivers and 40 non-occupationally exposed subjects, both groups non-smokers. Biological monitoring was performed by quantification of urinary 1-hydroxypyrene (1-OH pyrene). The expression of ICAM-1 (CD54) and the NTPDase activity were performed. Additionally, malondialdehyde (MDA) levels, inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ) and DNA damage (comet and micronucleus assays) were also evaluated. The results demonstrated that the 1-OH pyrene levels were significantly increased in taxi drivers ($p < 0.0001$) comparing with the non-occupationally exposed group and were also positively correlated to ICAM-1 expression, MDA levels and biomarkers of DNA damage. ICAM-1 expression was significantly elevated in taxi as well as MDA levels, being the last positively correlated with DNA damage biomarkers. The NTPDase activity on platelets was increased in taxi drivers such as comet assay and micronucleus test, inclusive after repair enzymes. Positively correlations were found between cytokines and predictors of DNA damage, while IL-10 is negatively correlated with the biomarkers of DNA lesion. In summary, occupational exposure to air pollution, especially to PAHs, may be related with increase in ICAM-1 expression as well as the increase of NTPDases activity, showing homeostatic abnormality. This disbalance may cause DNA damage related with lipid peroxidation and inflammatory process.

^a Laboratory of Toxicology (LATOX), Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Department of Health Sciences, Lutheran University of Brazil, Santa Maria, RS, Brazil

^c Laboratory of Research in Parasitology, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Introduction

Traffic is the major source of chemical health stressors and its possible adverse effects on human health have caused great concern worldwide¹. Several studies have related that the exposure to outdoor air pollution has been associated with a risk factor in the morbidity and mortality of respiratory, cardiovascular, diabetes and cancer diseases^{2, 3, 4, 5, 6, 7}.

Compounds emissions by vehicles are the main causing agent of air pollution and consist in a complex mixture of particles and gases derived from a variety of sources. These mixtures of hazardous substances contains carbon monoxide, particulate matter (PM), volatile organic compounds (VOCs), metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)^{8, 9, 10, 11}. PAHs are a product of incomplete combustion of organic materials and 1-hydroxypyrene (1-OH pyrene), a major metabolite of pyrene, has been widely used as an indicator of internal exposure to PAHs in humans.^{12, 13, 14, 15, 16, 17} In recent decades, air pollution studies have attracted the attention because it causes harmful health effects^{18, 19, 20}.

Researchers have suggested that the toxicity of PAHs is associated with their biotransformation into reactive metabolites leading to generation of reactive oxygen species (ROS) and pro-inflammatory status^{6, 18, 19, 21, 22}. Systemic inflammatory plays an important role in blood clotting and atherogenesis^{23, 24}. In this process, the expression of cell adhesion molecules (CAMs) is one of the initial responses²⁵. Leukocyte adhesion and migration are induced by CAMs. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), belonging to the immunoglobulin family, is a marker of inflammation and endothelial function^{26, 27}. This adhesion molecule, constitutively expressed on leukocytes and endothelial cells, is synthesized after stimulation by cytokines^{28, 29}. Toxicological studies have shown that traffic related to air pollution is associated with increased systemic inflammatory cytokines^{30, 31} and that high ICAM-1 level was an independent predictor of future risk event cardiovascular³².

Additionally, endothelial dysfunction is also a key event in the initiation of atherosclerotic process, injury and activation of the endothelium, increasing the adhesion of leukocytes and leading to changes on coagulation profile^{33, 34}. In this context, platelets are important component for the haemostatic process. Extracellular adenine nucleotides such as ATP and/or ADP regulate the vascular response to endothelial damage by interacting with specific receptors in platelets and endothelial cells^{35, 36, 37}. Studies have suggested a complex role of ATP and ADP in the regulation of platelet aggregation^{38, 39, 40}.

In 2013, the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified outdoor air pollution as carcinogenic to humans (Group 1)⁴¹. In addition, many studies have shown that PAHs induce genotoxicity and carcinogenicity through the direct interaction of their metabolites with DNA⁴² and/or through the ROS, produced during their biotransformation, which can also destroy DNA structure, causing alterations and mutations in several genes^{43, 44, 45}.

In this line, it is well-known that the production of ROS in xenobiotic biotransformation is closely related to pro-inflammatory profile and DNA damage⁴⁶. Thus, the present study aimed to evaluate the relationship between inflammatory profile and DNA damage in taxi drivers, which are routinely exposed to urban pollutants. Additionally, we investigated the potential effects of modification inflammatory profile (cytokines and ICAM-1), coagulation disbalance (NTPDase activity), and detection of DNA lesions by comet assay and micronuclei test.

Results

Headings should Characteristics of the studied groups

General characteristics of the studied groups are in Table 1. No significant differences were found regarding the age between the groups ($p > 0.05$). Furthermore, occasional alcohol drinking did not show significant differences between the groups ($p > 0.05$).

Biomarker of exposure

The urinary 1-OH pyrene was analyzed as exposure biomarker to PAHs. Avoiding the confounding factor of smoking all the subjects included in this study are non-smokers. The urinary levels of 1-OH pyrene were significantly higher in taxi drivers ($0.15 \pm 0.01 \mu\text{mol/molcreatinine}$) compared with non-occupationally exposed group ($0.07 \pm 0.004 \mu\text{mol/molcreatinine}$) ($p < 0.0001$) (Figure 1).

Oxidative stress biomarker

In addition, the MDA, lipoperoxidation biomarker, was quantified in plasma and showed a significant increase in taxi drivers ($8.36 \pm 0.39 \mu\text{M}$) when compared to the non-occupationally exposed group ($6.27 \pm 0.15 \mu\text{M}$) ($p < 0.01$).

Inflammatory biomarkers

In Table 2 was observed a significant increase in serum pro-inflammatory markers concentrations and a decrease in anti-inflammatory IL-10 comparing the groups enrolled in this study, ($p < 0.001$).

In this context, the results showed a modify profile in the expression of the ICAM-1 in circulating cells. The study showed an increase in the expression of ICAM-1 in neutrophils ($p < 0.0001$), however this difference was not found in monocytes when comparing the taxi drivers ($23.08 \pm 1.39 \%$) with the non-occupationally exposed group ($23.04 \pm 1.85 \%$), ($p > 0.05$).

ATP and ADP hydrolysis

The NTPDases activity was evaluated by incubating the platelets with ATP and ADP as substrates. As shown in Figure 2, ATP hydrolysis rates were significantly increased in taxi drivers (1.60 ± 0.06 (Pi)/min/mg of protein) when compared to non-occupational exposed control group (1.24 ± 0.10 (Pi)/min/mg of protein), demonstrating that in exposed subjects the enzyme activity was altered. Concerning ADP hydrolysis, the rates were also significantly enhanced in taxi drivers (1.50 ± 0.12 (Pi)/min/mg of protein) when compared to non-occupational exposed control group (1.04 ± 0.16 (Pi)/min/mg of protein). According to these results, the NTPDase activity was enhanced and promoted a significant increase in the extracellular rates of ATP and ADP in the occupationally exposed group.

DNA damage biomarkers

Table 3 shows the % Tail DNA and Tail Moment of exposed group and non-occupationally exposed group. In order to identify the type of DNA damage, two repair-specific enzymes (FPG and ENDO III) were employed. First, there was a significant difference in % tail DNA without enzymes between the groups. Analyzing FPG and ENDO III treated cells, the % Tail DNA and Tail Moment had a significantly increase in taxi drivers comparing the comet assay without enzymes. However, no difference was found between FPG and ENDO III treatment in taxi drivers.

The MN frequency in mucosa cells showed a significant difference between exposed 1.56 (1.16 - 1.97) and control groups 0.21 (0.04 - 0.38) ($p < 0.0001$). The results are expressed by median (lower bound-upper bound).

Correlations between exposure biomarker, lipoperoxidation, DNA damage and inflammatory biomarkers.

The Spearman's correlation showed that urinary 1-OH pyrene levels were positively correlated with MDA levels ($r = 0.274$; $p = 0.016$), neutrophil ICAM-1 expression ($r = 0.248$; $p = 0.024$), Tail Moment ($r = 0.509$; $p = 0.0001$) and MN ($r = 0.260$; $p = 0.022$). Positively correlation was found between 1-OH pyrene urinary and %Tail DNA ($r = 0.262$; $p = 0.016$).

Spearman's correlation reveals that MDA is positively correlated with % Tail DNA ($r = 0.464$; $p < 0.0001$) and MN frequency ($r = 0.466$; $p < 0.0001$).

Correlations among biomarker of exposure, 1-OH pyrene, and oxidative stress as well as inflammatory biomarkers are show in Table 2. Although, in Table 4 positively correlations were found between IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ and predictors of DNA damage (%Tail DNA and MN frequency) but, anti-IL10 is negatively correlated with the biomarkers of DNA lesion.

Multivariate analysis

For the multiple regression analysis (Table 5), factors that may influence the % Tail DNA were selected. This model accounted 25.4 % of the increased % Tail DNA levels. Among the independent variables analyzed, IL-6 (β estimate= 0.262; $p = 0.033$) and MDA (β estimate= 0.245; $p = 0.035$) influenced the % Tail DNA. The best model in which MN was the dependent variable is shown in Table 4. Among the variables analyzed, IL-6 could be highlighted as the one that better explained the MN increase (β estimate=0.651; $p = 0.0001$) are routinely.

Discussion

Epidemiological studies have shown the involvement of air pollution in carcinogenesis process^{41, 47}, cardiovascular and pulmonary disease^{1, 48, 49}. To our knowledge this is the first study that investigates the influence between traffic-related inflammation process and pro-coagulation status on genotoxicity.

Previous study of our research group³¹ show that the registered PM 2.5 concentrations in Porto Alegre were below the international standard established by the World Health Organization⁵⁰; and the concentration of benzo(a)pyrene was near to the recommended level established by the Directive, 2004/107/EC⁵¹. Other studies showed results comparable to PM2.5 and benzo[a]pyrene levels in Porto Alegre^{52, 53}. However, stationary monitoring of these pollutants may not be representative of the personal exposure of the subjects.

In this context, the urinary 1-OH pyrene appears as a reliable tool in the assessment of exposure to PAHs, most widely used biomarker of internal dose of PAHs⁵⁴ and used to assess exposure to traffic-related air pollution^{17, 55}. In this study, the 1-OH pyrene levels of individuals exposed to traffic were higher than the non-occupationally exposed group, demonstrating the occupational exposure in the taxi-drivers. The increase of 1-OH pyrene concentration in taxi-drivers is probably caused by occupational exposure to outdoor air pollution. The urinary 1-OH pyrene levels found in our study are similar to those related in the literature^{56, 57, 58, 59, 60}. Exposure to outdoor air pollution was indicated to be one cause of a series of adverse health effects and indicate that the mechanism of air pollution-induced these effects involves inflammation cascade and oxidative stress^{61, 62, 63, 64, 65, 66}. Our research group recent showed a pro-inflammatory and pro-oxidant status in individuals occupationally exposed to air pollution³¹. It is known that inflammation starts as a protective mechanism which removes the injurious stimuli and generates ROS²². In the context, our study showed increase of lipoperoxidation in taxi drivers and the increase of this biomarker lipid damage was directly relate to serum markers of inflammation and ICAM-1 demonstrating the involvement of oxidative stress in the inflammatory process and endothelial dysfunction.

Development of atherosclerosis involves both innate and adaptive immune mechanisms and the potential pathways for these outcomes include systemic inflammation, endothelial dysfunction and oxidative stress, and these are link with traffic-related pollution^{67, 68, 69, 70, 71}. Changes on the innate immune response may be displayed employing different parameters, among which stands out cytokine production^{72, 73}. The results obtained in our study corroborate with previous data for the inflammation biomarkers in the serum and cytokines have a correlation with urinary 1-OH pyrene³¹.

Furthermore, endothelial dysfunction is an important event in the initiation of atherosclerotic process and the possibility of air pollution exposure could impair cell adhesion molecules expression⁷⁴. In this context, was evaluated the expression of ICAM-1 on polymorphonuclear leucocytes. Our results demonstrated alteration in ICAM-1 expression in the taxi drivers. Our findings are in agreement with Neophytou et al.⁷⁵, who observed that the traffic is related to the increase of ICAM-1 expression in subjects occupationally exposed to air pollutants. Furthermore, *in vitro* studies have shown that exposure to outdoor air particles increased the expression of ICAM-1^{76, 77}.

Additionally, it is known that platelets are responsible to maintenance of endothelial integrity and homeostasis. In early atherosclerosis lesions, platelets are one of the most important blood components that participate in and regulate thrombus³³. They are present in inflammatory responses and events that lead to thrombus formation⁷⁸. Exacerbate platelet aggregation can appear in injured vasculature, as a consequence of inflammation⁷⁹. ATP and ADP are extracellular nucleotides that regulate the vascular response to endothelial dysfunction by modulating different effects on platelets. ADP is the major promoter of platelet aggregation and contributes to thrombus formation. On the other hand, adenosine, the final product of nucleotide hydrolysis, inhibits this aggregation⁸⁰. The enzymes involved in extracellular nucleotide hydrolysis include a group of ectoenzymes known as ectonucleotidases, including the NTPDase family that hydrolyses nucleoside tri and diphosphates⁸¹. Changes in NTPDases can be present in many diseases, such as inflammation process, vascular and neurodegenerative disease, turning this important parameter to evaluate^{82, 83, 84}.

This is the first study on the hydrolysis profile of extracellular adenine nucleotides in platelets isolated from taxi drivers and our results showed a change on ATP and ADP hydrolysis profile. According to Becker et al.³⁴, these findings could be related to a chronic immune-inflammatory disease. Taking all these evidence together, the present study suggests that occupational exposure to urban environmental pollutants may alter the rate of platelet nucleotide hydrolysis. Probably, even the number of platelets being within the reference value, the systemic inflammation induces an increase in platelet ATP and ADP hydrolysis as a compensatory organic response, in order to inhibit platelet aggregation and decrease thrombus formations in the occupationally exposed group.

On the other hand, it is known that individuals with neoplastic diseases present a series of physiological alterations, including the occurrence of thrombotic and inflammatory processes^{85, 86, 87, 88}. In this context, this study investigated the genotoxic potential of occupational air pollution exposure in taxi drivers using the comet assay and MN test. Our results showed a genotoxic and mutagenic effects in taxi drivers.

PAHs can contribute for DNA lesions by metabolic activation to diol-epoxides, which bind covalently to DNA^{89, 90}, forming adducts⁹¹. If DNA repair mechanisms are exacerbated by the adduct formation rate the result is an accumulation of lesions in DNA that may induce carcinogenesis⁹². Excessive generation of ROS that overwhelms the antioxidant defense system can oxidize cellular biomolecules, such as DNA. Oxidative DNA damage is repaired for base excision enzymes^{93, 94, 95, 96}. The comet assay is commonly used to evaluate the recent exposure and measures the single- and double-stranded breaks, labile sites and apurinic/aprimidinic sites when repair-specific enzymes are used⁹⁷. Comet assay can be detected in individual cells. To characterize the lesion, the literature reports the addition of the repair enzymes Endo III and FPG. The presence of FPG- and Endo III-sensitive DNA lesions revealed oxidized purine and pyrimidine bases^{98, 99}. Furthermore, MN test is an indicated method to assess mutagenicity in occupational exposure to air pollution^{97, 100}.

Several experimental in vitro studies have demonstrated that air pollution particles induce oxidative DNA base damage^{101, 102, 103, 104, 105, 106, 107}. Additionally, Goethel et al.¹⁰⁸ suggested that occupationally exposure to atmosphere pollutants was linked to genotoxicity and oxidative damage in taxi drivers and gas station attendants.

In this study, we compared the ability of environmental pollutants induce DNA damage in taxi drivers using repair enzymes FPG and Endo III in the comet assay. In this context, it was observed the increase of the % Tail DNA and Tail moment in the occupationally exposed to air pollution group. Besides, % Tail DNA and Tail moment showed a positively correlation with 1-OH pyrene, biomarker of exposure, concluding that high concentrations of urinary 1-OH pyrene were associated with more extensive DNA damage. The results comparing comet assay with and without repair enzymes in taxi drivers, indicated that PAHs induced oxidative damage to purine and pyrimidine bases and in the same proportion.

MN is another biomarker used to demonstrate genetic damage. Micronuclei originate from acentric fragments or whole chromosomes that lag behind at anaphase during nuclear division^{96, 109, 110}. The oxidative DNA damage may lead to mutagenic processes, thus the MN test indicates the persistent lesions or occurrence of incorrect repairs¹¹¹. In relation to MN frequency, significant difference between groups was detected. Elevation of MN frequency was observed in taxi drivers when compared with controls, suggesting that the evaluation of MN in buccal cells has the potential to demonstrate the effects of exposure to genotoxic agents.

Many studies have shown the involvement of air pollution with inflammatory processes and a propensity to develop cardiovascular disease¹¹². However, in this study it was demonstrated the inflammatory and carcinogenic potential of the atmosphere pollutants. Furthermore, statistical methods were used in order to detect whether the inflammation is closely linked with the DNA damage. Moreover, the results showed that interleukins are a determining factor for the increase in % Tail DNA, thus more complex modifications of the DNA structure can also be catalysed by inflammation process^{113, 114, 115}. The connection between DNA mutations, genome instability and tumors development is well established¹¹⁶. The hypothesis supported is that a global inflammation cascade propels DNA damage. In this context, inflammation process can be a cancer susceptibility factor also in occupational exposure.

Experimental

Studied Group

This study involved a total of eighty-five male non-smokers participants. The exposed group consisted of 45 workers occupationally exposed to outdoor air pollution on the traffic streets of Porto Alegre, RS, Brazil. The non-exposed control group consisted of 40 individuals that have administrative occupation and lived in the same city of the exposed group. The groups simultaneously underwent equivalent examinations and procedures.

Porto Alegre is the capital of Rio Grande do Sul, a state located in the extreme south of the country, which borders Argentina and Uruguay. This city has 1.472.482 inhabitants and 797.951 licensed vehicles¹¹⁷.

Recruitment of the subjects was by advertising and leafletting. The selection of the groups was determined by adhesion of the participants. All individuals in the study were required to answer a questionnaire, which included questions concerning medical issues, lifestyle and chronic diseases. Subjects were excluded from the study for the following criteria: smokers, chronic disease, taking vitamin supplementation or who had failed to collect samples. This study was approved by the Committee on Research Ethics at Federal University of Rio Grande do Sul (983018/2015). All the participants were informed about the study and signed a consent form according to the guidelines of the local committee.

The recruitment and biological material collections were performed during the winter. Blood, urine samples and buccal cell were obtained from all participants. Urine samples were collect and store in polyethylene bottles at -80 °C until 1-OH pyrene analysis. Blood venous samples were collect by venipuncture using vacuum tubes. EDTA-blood tube was collected and centrifuged at 1500×g for 10 min at 4 °C. Aliquots of EDTA-plasma were stored at -80 °C until analysis of the oxidative stress biomarker (MDA). Citrate-plasma was obtained to determine the NTPDase activity in platelets. A blood heparin tube was collect for adhesion molecule expression and comet assay analysis. To avoid any damage associated with storage, the samples were processed immediately. Serum was obtain by centrifugation at 1500×g for 10 min and stored at -80 °C until measurement of inflammatory markers. Additionally, buccal cells were collect for the micronucleus assay and processed immediately.

Quantification of urinary 1-hydroxypyrene

The urine samples were stored at -80° C and under shelter of light until analysis. Briefly, aliquot amount of 2.5 mL of thawed urine was hydrolyzed with β -glucuronidase (Sigma) in 37 °C for 2 h. Subsequently, the samples were purified using solid-phase extraction (SPE) on C18 columns using 500 mg cartridges (Chromsbond® MN) that were pre-conditioned with 2 mL of methanol and 5 mL of Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA). After loading the samples, the cartridges were rinsed with 6 mL of 40 % methanol. The elution was carried out with 2 mL of isopropanol and evaporated under a stream of compressed air at 37 °C. The extract was reconstituted with 200 μ L of methanol and analyzed by using high performance liquid chromatography (HPLC) equipped with a fluorescence detector. The mobile phase was a mixture of Milli-Q water, acetonitrile and methanol (30:35:35,v/v/v). A reverse-phase C18 column (LiChosphers100;150mm; 4.6mm,5 mm) was used for 1-OH pyrene separation. The flow rate was maintained isocratically at 1.0 mL/min and the total run time was 15 min. The excitation and emission wavelengths were 242 and 388 nm, respectively. The 1-OH pyrene levels were adjusted by urinary creatinine excretion and the concentrations of 1-OH pyrene were presented in units of μ mol/mol creatinine.

Urinary creatinine levels were measured using commercial laboratory kits (Doles reagents®, Goiânia, GO, Brazil).

Biomarker of oxidative stress

Plasma MDA levels were quantified according to the method previously developed in our laboratory¹¹⁸. This method consists in measure of oxidative lipid damage utilizing HPLC with visible detection.

Serum inflammatory markers

Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines quantification was assessed by ELISA using commercial kits for human interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) (R&D Systems Inc®, Minneapolis, Minnesota, USA), was according to manufacturer's instructions. The results were expressed as pg mL⁻¹. Sensitivity of the assay was 2.0 pg mL⁻¹ for IL-1 β , IL-6 and IL-10 and 4.0 pg mL⁻¹ for TNF- α and IFN- γ .

Expression of Intracellular Adhesion Molecule

ICAM-I expression in neutrophil was analyzed by flow cytometry. The samples were processed within 24 hours. Erythrocytes lysis was performed using an ammonium chloride solution (0.13 M) and the leukocytes were resuspended with PBS buffer. 10⁶ leukocytes were incubated in the dark with PE-conjugated anti-CD54. Following this, the cells were analyzed in a FACSCalibur Flow Cytometer (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA). Data from 10.000 events were obtained and only the morphologically viable polymorphonuclear cells were considered for analysis. Flow cytometry standard (FCS) files were analysed using FlowJo software 8.7.1 (Treestar, Ashland, OR, USA). Neutrophil cells were identified by manual gating according to side scatter and size.

NTPDases activity determination in platelets

Platelet-rich plasma (PRP) was prepared as previously described by Pilla et al.¹¹⁹ modified by Lunkes et al.¹²⁰. The platelet-rich plasma was centrifuged at low rotate for 30 minutes and washed three times with 3.5 mM HEPES buffer containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose. The washed platelets were resuspended in HEPES buffer and protein was adjusted to 30 μ g/tube and used to determine enzymatic activities. Total protein concentration in platelets was measured by Bradford method¹²¹. The NTPDase activity assay was carried out in a reaction medium containing 5.0 mM CaCl₂ and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2), at a final volume of 200 μ L. The platelet preparation (30 μ g of protein) was added to the reaction mixture and the pre-incubation proceeded for 10 min at 37 °C. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP at a final concentration of 1.0 mM and the samples were incubated for 60 minutes. Reactions were stopped by the addition of 200 μ L of 10% trichloroacetic acid (TCA) and the tubes were chilled on ice for 10 min. Released inorganic phosphate (Pi) was assayed spectrophotometrically using malachite green as the colorimetric reagent and KH₂PO₄ as standard¹²². Controls were carried out by including protein added to the reaction mixtures containing TCA in order to correct nonenzymatic hydrolysis of substrates, and the averages of control values were subtracted from the test samples. The time of incubation and protein concentration were chosen based in curves previously determined for linearity of the reactions. Enzyme-specific activities are reported as nmol phosphate inorganic (Pi)/min/mg of protein.

Comet Assay

The standard procedure for the alkaline version of the comet assay is based on a slightly modified protocol of da Silva et al.¹¹⁰. Oxidative DNA damage was evaluated using a slightly modified protocol of Collins et al.^{98, 123}. By adding the

bacterial enzymes endonuclease (Endo III) and formamidopyrimidine-DNA glycosylase (FPG) after the lysis, modified the alkaline version of the comet assay so that it could be used to monitor oxidative damage by converting oxidized pyrimidines or purines to strand breaks.

The slides preparation was performed according to Moro et al.¹²³. For the comet with repair enzymes, after lysis, the slides were washed 3 times, for 5 min each, in enzyme buffer (40 mM HEPES, 0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 mg/ml bovine serum albumin, pH 8.0) and then drained before being covered with 60 μ l with enzyme (1 μ g/ml of Endo III or FPG) in buffer. The slides were incubated with the enzymes for 30–45 min at 37 °C in humidified atmosphere. Subsequently, the slides were incubated in freshly made alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 12.6) for 20 min. The DNA was electrophoreses for 20 min at 25 V (0.90 V/cm) and 300 mA, and the buffer was neutralized with 0.4 M Tris (pH 7.5).

Ethidium bromide-stained nucleoids were examined at 500 magnification in a fluorescence microscope (Olympus BX60F-3, Olympus Optical, Japan). One hundred comets per slide, with or without Endo III or FPG were captured randomly avoiding the edges and damaged parts of the gel. Negative and positive controls were used for each electrophoresis assay in order to ensure procedure reliability. Each electrophoresis run was considered valid only if the negative and positive controls yielded the expected results. Damage score is based on the tail moment and on the amount of DNA in the tail and is considered a sensitive measure of DNA damage¹²⁵. Comet data has been analyzed using average Tail moments and % Tail DNA.

Micronucleous test

For the MN, buccal cells were collected at the end of the work shift. Subjects were asked to wash their oral cavities with water before sampling. Small brushes were used to collect samples from buccal mucosa. Cells were fixed with acetic acid: methanol (75:25, v/v), transferred into clean microscope slides in duplicates and stained with Fast green. One thousand cells were counted for each sample. Results were expressed as the micronucleus frequency per 1000 cells (MN frequency/1000cells).

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics software (version 19). All study variables were tested for normality by the Shapiro–Wilk test. Comparisons between groups were achieved by Student's t-test or Mann–Whitney U-test. The results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) or median (interquartile range), according to variables distribution. Correlation tests were performed according to Pearson's correlation coefficient or Spearman's rank according to each variable. Multiple linear regression models were applied to investigate the influence of age, 1-OH pyrene, MDA and IL-6 levels on DNA damage. Values of $p \leq 0.05$ were considered significant.

Conclusions

In summary, occupational exposure to air pollution, especially to PAHs, may be, in fact, associated with increase in ICAM-1 expression on neutrophil as well as the increase of cytokines and NTPDases activity, showing homeostatic abnormality and directing lead to the form DNA lesions.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), INCT/CNPq-MCTI. S.C. Garcia. S.C. Garcia is recipient of CNPq research fellowship.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- 1 Health Effects Institute. *Health Effects Institute*, 2010, Boston, MA, USA.
- 2 B. Brunekreef, S.T. Holgate. *Lancet*, 2002, 360:1233–42
- 3 L. Calderón-Garcidueñas, R.R. Maronpot, R. Torres-Jardon, C. Henríquez-Roldán, R. Schoonhoven, H. Acuña–Ayala, A. Villarreal-Calderón, J. Nakamura, R. Fernando, W. Reed, B. Azzarelli and J.A. Swenberg. *Toxicol. Pathol.*, 2003, 31:524–38.
- 4 G.I. Banauch, C. Hall, M. Weiden, H.W. Cohen, T.K. Aldrich, V. Christodoulou, N. Arcentales, K.J. Kelly and D.J. Prezant. *Am. Respir. Crit. Care. Med.*, 2006, 174:312–19.
- 5 E. Chen, H.M.C. Schreier, R. Strunk and M. Brauer. *Environ. Health Perspect*, 2008, 116:970–975.
- 6 R.D. Brook, S. Rajagopalan, C.A. Pope III, J.R. Brook; A. Bhatnagar, A.V. Diez-Roux, F. Holguin, Y. Hong, R.V. Luepker, M.A. Mittleman, A. Peters, D. Siscovick, S.C. Smith, L. Whitsel and J.D. Kaufman. *Circulation*, 2010, 121:2331–78.
- 7 A. Villarreal-Calderón, H. Acuña, J. Villarreal-Calderón, M. Garduño, C.F. Henríquez-Roldán, L. Calderón-Garcidueñas, G. and Valencia-Salazar. *Arch. Environ. Health*, 2002, 57:450–60
- 8 L. Curtis, W. Rea, P. Smith-Willis, E. Fenyves and Y. Pan. *Environ. Int.*, 2006, 32:815–830
- 9 A. Sancini, M. Fioravanti, M. Ciarrocca, P. Palermo, M. Fiaschetti, M.P. Schifano, G. Tomei and F. Tomei. *Environ. Res.*, 2010, 110:519–525.
- 10 D.M. DeMarini. *Mutagenesis*, 2013, 28(5).
- 11 J. Tuakuila, M. Kabamba and H. Mata. *Arch. of Public Health*, 2013, 71:14.
- 12 F.J. Jongeneelen, R.B.M. Anzion and P.T. Henderson. *J. Chromatogr.*, 1987, 413:227–232.
- 13 K. Boos, J. Lintelmann and A. Kettrup. *J. Chromatogr.*, 1992, 600:189–94.
- 14 C.J. Smith, W. Huang, C.J. Walcott, W. Turner, J. Grainger and D.G. Patterson. *Anal Bioanal. Chem.*, 2002, 32:216–20.
- 15 E. Elovaara, V. Väänänen and J. Mikkola. *Arch. Toxicol.*, 2003, 77:183–93.
- 16 E. Elovaara, J. Mikkola, M. Mäkelä, B. Paldanius and E. Priha. *Toxicol. Lett.*, 2006, 162:158–63.
- 17 A.M. Hansen, L. Mathiesen, M. Pedersen and L.E. Knudsen. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 2008, 211:471–503.
- 18 M. Sorensen, H. Autrup, P. Moller, O. Hertel, S.S. Jensen, P. Vinzents, L.E. Knudsen and S. Loft. *Mutat. Res.*, 2003, 544:255–71.
- 19 P. Rossner Jr, V. Svecova, A. Milcova, Z. Lnenickova, I. Solansky and R.J. Sram. *Mutat. Res.*, 2008, 642:21–7.
- 20 Y.C. Hong, E.Y. Park, M.S. Park, J.A. Ko, S.Y. Oh, H. Kim, K.H. Lee, JH Leem, E.H. Ha. *Toxicol. Lett.*, 2009, 184:139–44.
- 21 N.L. Mills, K. Donaldson, P.W. Hadoke, N.A. Boon, W. MacNee, F.R. Cassee, T. Sandström, A. Blomberg, D.E. Newby. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.*, 2009, 6:36–44.
- 22 M. Lodovici, E. Bigagli. *J. Toxicol.*, 2011, 48:70–74.
- 23 I. Kullo, G. Gau G and A. Tajik. *Mayo Clin. Proc.*, 2000, 75:369–80.
- 24 R.J. Delfino, N. Staimer and N.D. Vaziri. *Air Quality, Atmosphere & Health*, 2011, 4: 37–52.
- 25 N.V. Narizhneva, O.V. Razorenova, E.A. Podrez, J. Chen, U.M. Chandrasekharan, P.E. DiCorleto, E.F. Plow, E.J. Topol and T.V. Byzova. *FASEB J.*, 2005, 19:1158–1160.
- 26 C.F. Krieglstein and D.N. Granger. *Am. J. Hypertens*, 2001, 14: 44S–54S.
- 27 J. Shoenfelt, R.J. Mitkus, R. Zeisler, R.O. Spatz, J. Powell, M.J. Fenton, K.A. Squibb and A.E. Medvedev. *J. Leukoc. Biol.*, 2009, 86:303–12.
- 28 A.R. Burns, C.W. Smith and D.C. Walker. *Physiol. Rev.*, 2003, 83(2):309–36.
- 29 S.I. Simon and C.E. Green. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2005, 7:151–85
- 30 S. Panasevich, K. Leander, M. Rosenlund, P. Ljungman, T. Bellander, U. de Faire, G. Pershagen and F. Nyberg. *Occup. Environ. Med.*, 2009, 66:747–53.
- 31 N. Brucker, A.M. Moro, M.F. Charão, J. Durgante, F. Freitas, M. Baierle, S. Nascimento, B. Gauer, R.P. Bulcão, G.B. Bubols, P.D. Ferrari, F.V. Thiesen, A. Gioda, M.M. Duarte, I. de Castro, P.H. Saldiva and S.C. Garcia. *Sci. Total. Environ.*, 2013, 1:463–464;884–93.
- 32 S. Blankenberg, S. Barbaux and L. Tiret. *Atherosclerosis*, 2003, 170:191–203.
- 33 J.A. Vitta and J.F. Jr Keaney. *Circulation*, 2002, 106:640–2.
- 34 L.V. Becker, S. Cintia, Rosa B., Viviane C.G., Souza D., Margarete D., Bagatini B., E.A. Casali, C.A. Leal, J.C. da Silva, M.B. Moretto, F. de V. Pinheiro, V.M. Morsch, M.R. Schetinger and D.B. Leal. *Clinical Biochemistry*, 2010, 43:1096–1100.
- 35 C. Leon, B. Hechler, C. Vial, C. Leray, J.P. Cazenave, C. Gachet. *FEBS Lett*, 1997, 403:26–30.
- 36 R.B. Gayle III, C.R. Malliszewski, S.D. Gimpel, M.A. Schoenborn, R.G. Caspary, C. Richards, K. Brasel, V. Price, J.H. Drosopoulos, N. Islam, T.N. Alyonycheva, M.J. Broekman and A.J. Marcus. *J. Clin. Invest.*, 1998, 101(9):1851–9.
- 37 A.J. Marcus, M.J. Broekman, J.F.H. Drosopoulos, N. Islam, D.J. Pinsky, C. Sesti and R. Levi. *J. Thromb. Haemost.*, 2003, 1:2497–2509.

- 38 P.J. Sharis , C.P. Cannon and J. Loscalzo. *Ann. Intern. Med.*, 1998, 1;129(5):394-405.
- 39 A.V. Birk, J. Broekman, E.M. Gladek, H.D. Robertson, J.H. Drosopoulos, A.J. Marcus and H.H. Szeto. *J. Lab. Clin. Med.*, 2002, 140:166–75.
- 40 P. Savi and J.M. Herbert. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2005, 31(2):174-83.
- 41 International Agency for Research on Cancer (IARC), 2013.
- 42 Q. Zhai , H. Duan, Y. Wang, C. Huang, Y. Niu, Y. Dai, P. Bin, Q. Liu, W. Chen, J. Ma and Y Zheng. *Toxicol. In Vitro*, 2012, 26(5):752-8.
- 43 F. Esen, Y. Tasdemir and N. Vardar. *Atmospheric Res.*, 2008, 88:243–255.
- 44 L. Wang, L. Lin and S. Lai. *J. Hazard Mater.*, 2009, 168:438–444.
- 45 F. Alkurdi, F. Karabet and M. Dimashki. *Environ. SciPollut. Res.*, 2014, 21(8):5747-59.
- 46 S. Reuter, C.G. Subash , M.C. Madan and B.A. Bharat. *Free Radic. Biol. Med.*, 2011.
- 47 G. Matullo, A.M. Dunning, S. Guarrera, C. Baynes, S. Polidoro, S. Garte, H.C. Malaveille, M. Peluso, L. Airolidi, F. Veglia, E. Gormally, G. Hoek, M. Krzyzanowski, K. Overvad, R.O. Raaschou-Nielsen, F. Clavel-Chapelon, J. Linseisen, H. Boeing, A. Trichopoulou, D. Palli, V. Krogh, R. Tumino, H.B. Bueno-De-Mesquita, P.H. Peeters, E. Lund, G. Pera, C. Martinez, M. Dorransoro, A. Barricarte, M.J. Tormo, J.R. Quiros, N.E. Day, T.J. Key, R. Saracci, R. Kaaks, E. Riboli, P. Vineis. *Carcinogen.*, 2006, 27(5):997–1007.
- 48 S. Mena, A. Ortega and J.M. Estrela. *Mutat. Res.*, 2009, 674(1–2):36–44.
- 49 K.F. Chung and J.A. Marwick. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2010 1203:85–91.
- 50 World Health Organization (WHO). http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0005/78638/E90038.pdf, 2005.
- 51 Directive 2004/107/EC of the European Parliament and of the Council of 15 December 2004 relating to arsenic, cadmium, mercury, nickel and PAH in ambient air.
- 52 M.D. Andrade, R.M. de Miranda, A. Fornaro, A. Kerr, B. Oyama, P.A. de Andre. *Air Qual. Atmos. Health*, 2012, 5:79–88.
- 53 R.M.de Miranda RM, M. de Fatima Andrade, A. Fornaro, R. Astolfo, P.A. de Andre, P. Saldiva. *Air Qual. Atmos. Health*, 2012, 5:63–77.
- 54 F.J. Jongeneelen. *Ann Occup. Hyg.*, 2001, 45(1):3-13.
- 55 C. Freire, A. Abril, M.F. Fernandez, R. Ramos, M. Estarlich, A. Manrique, A. Aguirre, J. Ibarluzea and N. Olea. *Sci. Total. Environ.*, 2009, 407:1562-9.
- 56 A.M. Hansen, H. Wallin, M.L. Binderup, M. Dybdahl, H. Autrup, S. Loft and L.E. Knudsen. *Mutat. Res.*, 2004, 557(1):7-17.
- 57 T. Chetianukornkul, A. Toriba, T. Kameda and N. Tang. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, 386(3):712-8.
- 58 C.Y. Chuang and C.C. Chang. *J. Occup. Health*, 2007, 49(2):140-51.
- 59 K. Petchpoung, S. Kaojarern, K. Yoovathaworn, T. Sura and J. Sirivarasai. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2011, 31(1):160-4.
- 60 A. Kamal , A. Cincinelli, T. Martellini, I. Palchetti, F. Bettazzi, R.N. Malik. *Int J Environ. Health Res.*, 2015, 5:1-21.
- 61 Y. Bai, A.K. Suzuki and M. Sagai. *FreeRadical Biology and Medicine*, 2001, 30(5):555–562.
- 62 A.J. Ghio, C. Kim and R.B. Devlin. *Am. J. of Res. and Critic. Care Med.*, 2001, 162(3):981–988.
- 63 K. Donaldson and V. Stone. *Annalidell'IstitutoSuperiore di Sanita*, 2003, 39(3):405-410.
- 64 S. Hirano, A. Furuyama, E. Koike and T. Kobayashi. *Toxicol.*, 2003, 187(2-3):161–170.
- 65 L.E. Wold, B.Z. Simkhovich, M.T. Kleinman, M.A. Nordlie, J.S. Dow, C. Sioutas, R.A. Kloner. *Cardiovasc. Toxicol.*, 2006(1):69–78.
- 66 C. Yang , A. Chen, R. Chen, Y. Qi, J. Ye, S. Li, W. Li, Z. Liang, Q. Liang, D. Guo, H. Kan and X. Chen. *Int. J. Cardiol.*, 2014, 177(2):436-41.
- 67 M. Iversen and R. Dahl. *Eur. Respir. J.*, 2000, 16(3): 404–408.
- 68 K. Radon, E. Monso, C. Weber, B. Danuser, M. Iversen, U. Opravil, K. Donham, J. Hartung, S. Pedersen, S. Garz, D. Blainey, U. Rabe and D. Nowak. *Ann Agric. Environ. Med.*, 2002, 9(2): 207–213.
- 69 B.M. Sundblad, B.M. Larsson, L. Palmberg and K. Larsson. *Eur. Respir. J.*, 2002, 20(2): 426–431.
- 70 E. Tufvesson and L. Bjermer. *Respir Med.*, 2006, 100(1): 34–38.
- 71 R. Do, K.H. Bartlett, H. Dimich-Ward, W. Chu and S.M. Kennedy. *Am J Respir. Crit. Care Med.*, 2008, 178(10): 1048-1054.
- 72 S.F. van Eeden, W.C. Tan, T. Suwa, H. Mukae, T. Terashima, T. Fujii, D. Qui, R. Vincent, J.C. Hogg. *Am. J. of Respir. and Critic. Care Med.*, 2001, 164(5):826–830.
- 73 J.C. Hogg and S. Van Eeden. *Respir.*, 2009, 14(3):336–346, 2009.
- 74 J. Steffel and T.F. Lüscher. *Circulation*, 2009, 119:919-92.
- 75 A.M. Neophytou, E.H. Jaime, M.C. Jennifer, J.S. Thomas, W.D. Douglas, A.C. Brent, G. Eric and L. Francine. *Environ. Health*, 2013, 12:105.
- 76 A. Montiel-Davalos, E. Alfaro-Moreno and R. Lopez-Marure. *Inhal. Toxicol.*, 2009, 19(Suppl. 1):91–98
- 77 M.A. Bind, A. Baccarelli, A. Zanobetti, L. Tarantini, H. Suh, P. Vokonas and J. Schwartz. *Epidemiology*, 2012, 23:332-340

- 78 A.J. Marcus, M.J. Broekman, J.H. Drosopoulos, N. Islam, T.N. Alyonycheva, L.B. Safier, K.A. Hajjar, D.N. Posnett, M.A. Schoenborn, K.A. Schooley, R.B. Gayle and C.R. Maliszewski. *J. Clin. Invest.*, 1997, 99:1351–60.
- 79 S. Massberg, K. Brand, S. Gruner, S. Page, E. Müller, I. Müller, W. Bergmeier, T. Richter, M. Lorenz, I. Konrad, B. Nieswandt and M. Gawaz. *J. Exp. Med.*, 2002, 196:887–96.
- 80 S. Rex and J.E. Freedman. *Platelets*, 2007:251–79.
- 81 H. Zimmermann. *Drug Develop Res.*, 2001, 52:44–56.
- 82 M.D. Bagatini, C.C. Martins, V. Battisti, R.M. Spanevello, D. Gasparetto, C.S. Rosa, J.F. Gonçalves, M.R. Schetinger, R.B. dos Santos and V.M. Morsch. *Clin. Biochem.*, 2008, 41:1181–5.
- 83 P.A. Maldonado, M.C. Corrêa, L.V. Becker, C. Flores, B. Moretto, V. Morsch and M.R. Schetinger. *Clin. Biochem.*, 2008, 41:400–6.
- 84 R. Schmatz, M.R.C. Schetinger, R.M. Spanevello, C.M. Mazzanti, N. Stefanello, P.A. Maldonado, J. Gutierrez, Mde C. Corrêa, E. Giroto, M.B. Moretto and V.M. Morsch. *Life Sci.*, 2009, 84:345–50.
- 85 M.B. Donati and A. Falanga. *Acta Haematologica*, 2001, 106:18–24.
- 86 P.A. Thodiyil and A.K. Kakkar. *Acta Haematologica*, 2001, 106:18–73.
- 87 G. Burnstock. *Clin. Med.*, 2002, 2:45–53.
- 88 M.R.C. Schetinger, V.M. Morsch, C.D. Bonan and A.T.S. Wyse. *Biofactors*, 2007, 31:77–98.
- 89 A.D. Pereira-Netto, J.C. Moreira, A.E.X.O. Dias, G. Arbilla, L.F.V. Ferreira, A.S. Oliveira and J. Barek. *Química Nova*, 2000, 23: 765–773.
- 90 R. Singh, R.J. Sram, B. Binkova, I. Kalina, T.A. Popov, T. Georgieva, S. Garte, E. Taioli and P.B. Farmer. *Mutat. Res.*, 2007, 620(1–2):83–92.
- 91 W.M. Baird, L.A. Hooven and B. Mahadevan. *Environ. Mol. Mutagen.*, 2005, 45(2–3):106–14.
- 92 B. Muñoz and A. Albores A. Prof. Clark Chen, 2011 (Ed.). ISBN: 978-953-307-606-5.
- 93 J. Cadet, S. Bellon, M. Berger, A.G. Bourdat, T. Douki, V. Duarte, S. Frelon, D. Gasparutto, E. Muller, J.L. Ravanat and S. Sauvaigo. *Biol. Chem.*, 2002, 383:933–943.
- 94 M. Dizdaroğlu, P. Jaruga, M. Birincioglu and H. Rodriguez. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, 32:1102–1115.
- 95 S. Bjelland and E. Seeberg. *Mutat. Res.*, 2003, 531:37–80.
- 96 M. Fenech, M. Kirsch-Volders, A.T. Natarajan, J. Surrallés, J.W. Crott, J. Parry, H. Norppa, D.A. Eastmond, J.D. Tucker and P. Thomas. *Mutagenesis*, 2011, 26:125–32.
- 97 M.E. Rosenfeld. *Current Opinion in Pharmacology* 2013:13:154–160.
- 98 A.R. Collins, S.J. Duthie and V.L. Dobson. *Carcinogenesis*, 1993, 14: 1733–1735.
- 99 R. Tice, E. Agurell and D. Anderson. *Environ. Mol. Mutagen.*, 2000, 35:206–221.
- 100 M. Hayashi, J.T. MacGregor, D.G. Gatehouse, A. Ilse-Dore, D.H. Blakey and S.D. Dertinger. *Environ. Mol. Mutagen.*, 2000, 35(3):234–52.
- 101 K. Hanzalova, P. Rossner and R.J. Sram. *Mutat. Res.*, 2010, 696:114–121.
- 102 A. Tarantini, E. Maitre, M. Lefebvre, C. Marques and J.L. Marie. *Mutat. Res.*, 2009, 671:67–75.
- 103 S. Bonetta, V. Gianotti, S. Bonetta, F. Gosetti, M. Oddone, M.C. Gennaro and E. Carraro. *Chemosphere*, 2009, 77:1030–1034.
- 104 W. Wessels, C. Birmili, B. Albrecht, E. Hellack, G. Jermann, R.M. Wick and R.P. Harrison. *Environ. Sci. Technol.*, 2010, 44:3539–3545.
- 105 V. Andre, S. Billet, D. Pottier, G.J. Le, I. Pottier, G. Garçon, P. Shirali and F. Sichel. *J. Appl. Toxicol.*, 2011, 31:131–138.
- 106 P.H. Danielsen, P. Møller, K.A. Jensen, A.K. Sharma, H. Wallin, R. Bossi, H. Autrup, L. Molhave, J.L. Ravanat, J.J. Briede, T.M. de Kok and S. Loft. *Chem. Res. Toxicol.*, 2011, 24: 168–184.
- 107 M. Gualtieri, J. Ovrevik, S. Møllerup, N. Asare, E. Longhin, H.J. Dahlman, M. Camatini and J.A. Holme. *Mutat. Res.*, 2011, 713:18–31.
- 108 G. Göethel, N. Brucker, A.M. Moro, M.F. Charão, R. Fracasso, A. Barth, G. Bubols, J. Durgante, S. Nascimento, M. Baierle, P.H. Saldiva and S.C. Garcia. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 2014, 770:61–5.
- 109 J.D. Tucker and R.J. Preston. *Mutat. Res.*, 1996, 365:147–159.
- 110 G. Krishna and M. Hayashi. *Mutat. Res.*, 2000, 455:155–166.
- 111 J. da Silva, T.R. de Freitas, V. Heuser, J.R. Marinho and B. Erdtmann. *Environ Mol. Mutagen.*, 2000, 35:270–278.
- 112 N. Brucker, M.F. Charão, A.M. Moro, P. Ferrari, G. Bubols, E. Sauer, R. Fracasso, J. Durgante, F.V. Thiesen, M.M. Duarte, A. Gioda, I. Castro, P.H. Saldiva and S.C. Garcia. *Environ. Res.*, 2014, 131:31–8.
- 113 H. Ishikawa, Z. Ma and G.N. Barber. *Nature*, 2009, 461:788–92.
- 114 T. Saitoh, N. Fujita, T. Hayashi, K. Takahara, T. Satoh, H. Lee, K. Matsunaga, S. Kageyama, H. Omori, T. Noda, N. Yamamoto, T. Kawai, K. Ishii, O. Takeuchi, T. Yoshimori, and S. Akira. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106:20842–6.
- 115 T. Abe, A. Harashima, T. Xia, H. Konno, K. Konno, A. Morales, J. Ahn, D. Gutman and G.N. Barber. *MolCell.*, 2013, 50:5–15.

- 116 P. Timea and Z.B. Csanad. *Microbes and Infection*, 2014, 16:822-832.
- 117 DETRAN/RS. Departamento de trânsito do estado do Rio Grande do Sul. Frota do RS. <http://www.detran.rs.gov.br/conteudo/27453/frota-do-rs> Accessed 27 January 2015.
- 118 D. Grotto, L.D. SantaMaria, S. Boeira, J. Valentini, M.F. Charao, A.M. Moro, P.C. Nascimento, V.J. Pomblum and S.C. Garcia. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 2007, 43:619-24.
- 119 C. Pilla, T. Emanuelli, S.S. Frassetto, A.M.O. Battastini, R.D. Dias and J.J.F. Sarkis. *Platelets*, 1996, 7:225-230.
- 120 G.I. Lunkes, D. Lunkes, F. Stefanello, A. Morsch, V.M. Morsch, C.M. Mazzanti and M.R. Schetinger. *Thromb. Res.*, 2003, 109:189-94.
- 121 M. Bradford. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72:248-254.
- 122 K.M. Chan, D. Delfert and K.D. Junger. *Anal. Biochem.*, 1986, 157(2):375-80.
- 123 A.R. Collins, M. Dusinska, C.M. Gedik and R. Stetina. *Environ. Health Perspect.*, 1996, 104(Suppl 3): 465-469.
- 124 A.M. Moro, M.F. Charão, N. Brucker, J. Durgante, M. Baierle, G. Bubols, G. Goethel, R. Fracasso, S. Nascimento, R. Bulcão, B. Gauer, A. Barth, G. Bochi, R. Moresco, A. Gioda, M. Salvador, S. Farsky and S.C. Garcia. *Mutat. Res.*, 2013, 754(1-2):63-70.
- 125 B. Hellman, H. Vaghef and B. Boström. *Mutat. Res.*, 1995, 336(2):123-31.

TABLES

Table1. Characteristics of study subjects.

	Non-occupationally exposed group (n=40)	Taxi Drivers (n=45)
Age (years)	44.9 ± 1.49	47.5 ± 1.34
Time of exposure (years)	-	17.6 ± 1.51
Occasional alcohol drinking (n) (%)	13 (32.5)	16 (35.5)

The values are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM).

(n) (%): Total number found per group and in parenthesis the perceptual.

Table 2. Concentrations of inflammation cytokines and ICAM-1 expression, additionally, associations between these biomarkers with the biomarker of exposure to PAH (urinary 1-OH pyrene) and MDA and are presented.

	TDG (n=45)	NEG (n=40)	Correlations	
			1-OH pyrene (µmol/mol creatinine)	MDA (µM)
IFN-δ (pg/ml)	160.36± 7.83*	98.10±2.45	r=0.380; p<0.0001	r=0.322; p<0.005
IL-1β (pg/ml)	114.86± 7.49*	53.44± 1.59	r=0.369; p<0.001	r=0.367; p<0.005
IL-6 (pg/ml)	128.45± 7.32*	65.90±1.68	r=0.378; p<0.0001	r=0.324; p<0.005
TNF-α (pg/ml)	147.59 ±7.41*	83.26±1.95	r=0.392; p<0.0001	r=0.366; p=0.001
IL-10 (pg/ml)	70.75 ±4.42*	109.97±3.26	r=-0.377; p<0.001	r=-0.286; p=0.013
ICAM-1 neutrophils (%)	30.82±4.13*	8.70±1.06	r=0.248; p=0.024	r=0.346; p=0.002

The values are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM).

TDG: Taxi driver group. NEG: Non-occupationally exposed group.

Abbreviations: IL-1β: interleukin-1β, IL-6: interleukin-6, IL-10: interleukin-10, TNF-α: tumour necrosis factor-α, IFN-γ: interferon-γ.

*p<0.0001 comparing non-occupationally exposed group

Table 3. DNA migration in the study groups cells by alkaline comet assay.

	Without enzyme		FPG		ENDOIII	
	In % Tail DNA	In T Mom	In % Tail DNA	In T Mom	In % Tail DNA	In T Mom
TDG	11.58 ±0.35*	2.64±0.17*	27.42±1.39**	8.05±0.61**	28.12±1.49***	9.03±0.78***
NEG	8.28 ±0,21	1.83 ± 0.20	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected

Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM).

TDG: Taxi driver group. NEG: Non-occupationally exposed group.

*Significative difference between TDG (n=45) and NEG (n=37) (p<0.0001).

**Significative difference between comet assay without enzyme and with FPG in taxi drivers (n=30). (p<0.001)

***Significative difference between comet assay without enzyme and with ENDOIII in taxi drivers (n=30). (p<0.001)

Table 4. Correlations between inflammation biomarkers and DNA damage predictors.

	% Tail DNA	MN/1000 cells
IFN- δ (pg/ml)	r=0.377; p<0.001	r=0.585, p<0,001
IL-1 β (pg/ml)	r =0.415; p<0.001	r = 0.617; p<0.001
IL-6 (pg/ml)	r=0.418; p<0.0001	r=0.604; p<0.0001
TNF- α (pg/ml)	r=0.403; p<0.001	r = 0.617; p<0.001
IL-10 (pg/ml)	r=-0.312; p<0.01	r = 0.617; p<0.001

Significant Pearson's correlations for TDG (n=44) and NEG (n=36) between %Tail DNA vs.: INF- γ ; IL-1 β ;

IL-6; TNF- α and IL-10. Significant Pearson's correlations for TDG (n=44) and NEG (n=32) between MN Frequency/1000cells vs.: INF- γ ; IL-1 β ; IL-6; TNF- α and IL-10. Abbreviations: IL-1 β : interleukin-1 β , IL-6: interleukin-6, IL-10: interleukin-10, TNF- α : tumour necrosis factor- α , IFN- γ : interferon- γ . TDG: Taxi driver group. NEG: Non-occupationally exposed group.

Table 5. Multiple regression linear analysis of factors affecting levels of DNA damage biomarkers for other potential confounders.

	% Tail DNA		MN/1000 cells	
	R square=0.254		R square=0.521	
	B	p-values	β	p-values
Age (years)	0.250	0.060	0.380	0.667
1-OHP ($\mu\text{mol/mol}$ creatinine)	0.072	0.548	0.093	0.346
MDA ($\mu\text{g/l}$)	0.245	0.035	0.074	0.437
IL-6 (pg/ml)	0.262	0.033	0.651	0.000

FIGURE CAPTIONS

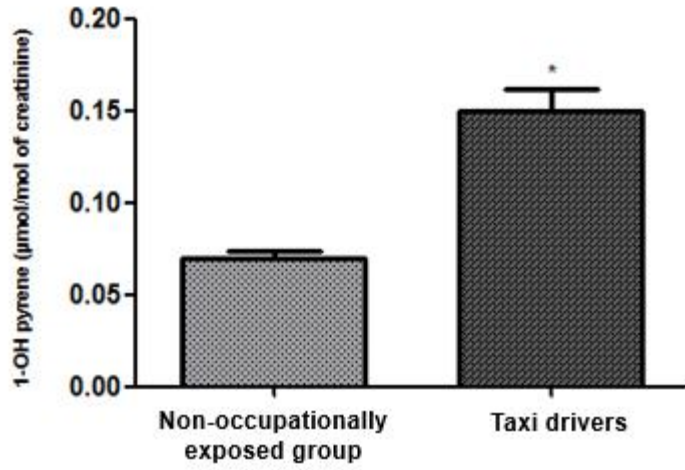


Figure 1. Urinary 1-hydroxypyrene levels (1-OHP) in non-occupationally exposed group (n = 40) and taxi drivers (n=45). Data are expressed as mean \pm SEM. *p<0.0001

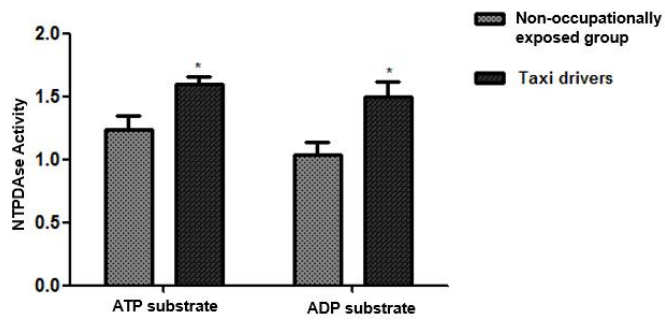


Figure 2. NTPDase activity in platelets in taxi drivers using ATP (n=45) and ADP (n=45) as substrate comparing with the non-occupationally exposed group for ATP (n=39) and ADP (n=27) hydrolysis. Bars represent mean \pm SEM (*p < 0.01). Enzyme activity is expressed in mM inorganic phosphate (Pi) released/min/mg protein.

DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos têm demonstrado o envolvimento da poluição do ar no processo de carcinogênese (IARC, 2013), doença cardiovascular e pulmonar (Mena, Ortega e Estrela 2009; Chung e Marwick 2010). Em nosso conhecimento este é o primeiro estudo que se propôs em investigar a relação entre o processo de inflamação relacionada com o estado pró-coagulante e dano ao DNA.

O 1-OH pireno urinário aparece como uma ferramenta confiável na avaliação da exposição aos HPAs, mais amplamente utilizado como biomarcador de dose interna dos HPAs (Jongeneelen, 2001) e utilizado para avaliar a exposição à poluição do ar relacionada com o tráfego (Freire *et al*, 2009; Hansen *et al*, 2008; Merlo *et al*, 1998). Neste estudo, os níveis de 1-OH pireno dos indivíduos expostos ao tráfego foram mais elevados em comparação ao grupo de profissionais não expostos. O aumento da concentração de 1-OH pireno em motoristas de táxi é provavelmente causado pela exposição ocupacional à poluição do ar exterior. Os níveis de 1-OH pireno urinário encontrados em nosso estudo são semelhantes aos relatados na literatura (Chuang e Chang 2007; Chetiyakornkul *et al*, 2006;. Petchpoung *et al*, 2011; Hansen *et al*, 2004; merlo *et al*, 1998; kamal *et al*, 2015).

A exposição à poluição do ar é apontada como causadora de uma série de efeitos adversos para a saúde e o mecanismo envolvido e está relacionada com a inflamação e o estresse oxidativo (Yang *et al*, 2014;. Hirano *et al*, 2003; Bai, 2001; Donaldson e Stone 2003; Ghio, Kim and Devlin, 2001). Nosso grupo de pesquisa recentemente mostrou um estado pró-inflamatório e pró-oxidante em indivíduos expostos à poluição do ar (Brucker *et al*, 2013). A cascata de inflamação pode ser ativada por um mecanismo de proteção que remove os estímulos lesivos e gera EROs (Lodovici e Bigagli, 2011). Nesse contexto, o nosso estudo mostra um aumento da lipoperoxidação em motoristas de táxi, representado pelos elevados níveis de MDA. Além disso, observou-se que os aumentos deste biomarcador lipídico foi relacionado diretamente as citocinas e ICAM-1, fatos que demonstram o envolvimento do estresse oxidativo no processo inflamatório e disfunção endotelial.

O desenvolvimento de aterosclerose envolve os mecanismos de imunidade inata e adaptativa (Hansson, 2005) e as possíveis vias incluem inflamação sistêmica, disfunção endotelial e estresse oxidativo. (Iversen e Dahl,

2000; Radom *et al.*, 2002; Sundblad *et al.*, 2002; Do, 2008). As alterações na resposta imune inata podem ser visualizadas empregando diferentes parâmetros, entre os quais se destaca a produção de citocinas (Van eeden *et al.*, 2001). Os resultados obtidos no nosso estudo corroboram com dados anteriores para os biomarcadores de inflamação no soro, bem como o fato das citocinas apresentarem correlação com o 1-OH pireno urinário (BRUCKER *et al.*, 2013).

Além disso, a disfunção endotelial é um acontecimento importante na iniciação do processo aterosclerótico e a exposição à poluição do ar poderia exacerbar a expressão de moléculas de adesão celular (Steffel e lüscher, 2009). Neste contexto, foi avaliada a expressão da ICAM-1 em leucócitos polimorfonucleares. Este estudo demonstrou alteração na expressão de ICAM-1 nos taxistas. Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com Neophyou e colaboradores (2013), que observou o aumento de ICAM-1 em indivíduos ocupacionalmente expostos aos poluentes atmosféricos. Além disso, estudos *in vitro* têm demonstrado que a exposição a partículas de ar aumenta a expressão de ICAM-1 (Montiel-Davalos, Alfaro-Moreno e Lopez-Marure, 2007; Bind *et al.*, 2012).

Além disso, sabe-se que as plaquetas são responsáveis pela manutenção da integridade endotelial e a homeostase. Em lesões de aterosclerose precoce, as plaquetas são um dos componentes mais importantes do sangue que participam e regulam o trombo (Vitta e Keaney, 2002). As plaquetas estão presentes nas respostas inflamatórias e eventos que levam à formação de trombos (Marcus *et al.*, 2005). A agregação de plaquetas pode aparecer em vasculatura lesada, como consequência de inflamação (Massberg *et al.*, 2002). ATP e ADP são nucleotídeos extracelulares que regulam a resposta vascular à disfunção endotelial por executar um grande número de efeitos sobre as plaquetas. ADP é o principal promotor da agregação de plaquetas e contribui para a formação de trombos. Por outro lado, a adenosina é um inibidor da agregação (Rex e Freedman, 2007). A enzima que hidrolisa e regula os nucleosídeos extracelulares são as NTPDases (Bigonnesse *et al.*, 2004). Mudanças na atividade das NTPDases podem estar presentes em muitas doenças, como o processo inflamatório, vascular e

doença neurodegenerativa, tornando este um parâmetro importante para ser avaliado (Maldonado *et al.*, 2008; Bagatini *et al.*, 2008; Schmatz *et al.*, 2009).

A hidrólise dos nucleotídeos da adenina extracelulares nunca foi pesquisada no grupo investigado neste trabalho. Nesta linha, os nossos resultados mostraram um aumento na hidrólise de ATP e ADP. De acordo com Becker e colaboradores (2010), estes resultados podem estar relacionados a uma doença imune-inflamatória crônica. Analisando estes achados, o presente estudo sugere que a exposição ocupacional a poluentes ambientais urbanos pode alterar a taxa de hidrólise dos nucleotídeos em plaquetas. Provavelmente, a inflamação sistêmica induz um aumento na hidrólise de ATP e ADP nas plaquetas como uma resposta orgânica compensatória para inibir a agregação de plaquetas e diminuir a formação de trombo no grupo ocupacionalmente expostos à poluição atmosférica.

Por outro lado, sabe-se que os indivíduos com doenças neoplásicas apresentam uma série de alterações fisiológicas, incluindo a ocorrência de processos inflamatórios e trombóticos (Schetinger *et al.*, 2007;. Burnstock *et al.*, 2002; Thodiyil e Kakkar, 2001). Neste contexto, o presente estudo investigou o potencial genotóxico da exposição ocupacional à poluição do ar em motoristas de táxi usando o ensaio do cometa e o teste MN. Nossos resultados mostraram efeitos genotóxicos e mutagênicos em motoristas de táxi.

Os HPAs podem contribuir para as lesões no DNA pela ativação metabólica de diol-epóxidos, os quais se ligam covalentemente ao DNA (Pereira-Netto *et al.*, 2000;. Singh *et al.*, 2007), formando adutos (Baird, Hooven e Mahadevan, 2005). Se os mecanismos de reparo do DNA são exacerbados pela taxa de formação de adutos o resultado é um o acúmulo de lesões no DNA que podem induzir a carcinogênese (Muñoz e Albores, 2011). Geração excessiva de EROS sobrecarrega o sistema de defesa antioxidante podendo oxidar biomoléculas celulares, tais como o DNA. O dano oxidativo ao DNA é reparado por enzimas de excisão de bases (Cadet *et al.*, 2002; Bjelland e Seeberg, 2003; Fenech *et al.*, 2011). O ensaio do cometa é comumente usado para avaliar a exposição recente e mede as quebras simples e de dupla fita, locais instáveis e sítiosapurínicos / apirimidínicos quando as enzimas específicas de reparação são utilizadas. Para caracterizar a lesão, a literatura sugere a adição de enzimas de reparo como a endonuclease-III (Endo III) e

formamidopirimidina DNA-glicosilase (FPG). A presença de lesões no DNA detectados no teste cometa com FPG e Endo III revela bases purinas e pirimidinas oxidadas (Tice *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 1997). Além disso, o teste de micronúcleo é um método indicado para avaliar a mutagenicidade para exposição ocupacional à poluição do ar (Hayashi *et al.*, 2000).

Vários estudos experimentais *in vitro* demonstraram que partículas de poluição do ar induzem dano oxidativo à bases do DNA (Danielsen *et al.*, 2011; Bonetta *et al.*, 2009; Gualtieri *et al.*, 2011; Andre *et al.*, 2012). Além disso, Goethel e colaboradores (2014) sugerem que a exposição ocupacional a poluentes da atmosfera está ligada à genotoxicidade e dano oxidativo em taxistas e frentistas.

Neste estudo, foi analisada a capacidade dos poluentes ambientais induzirem danos oxidativos no DNA em taxistas, utilizando as enzimas de reparo FPG e Endo III no ensaio cometa. Neste contexto, observa-se o aumento da % de DNA na cauda e Momento de cauda no grupo exposto à poluição do ar. Além disso, % de DNA na cauda e Momento de cauda mostraram uma correlação positiva com o biomarcador de exposição 1-OH pirene, concluindo que altas concentrações urinárias de 1-OH pirene foram associadas com danos mais extensos ao DNA.

Os resultados comparando o teste do cometa com e sem enzimas de reparo em motoristas de táxi, indicaram que os HAPs induzem dano oxidativo à bases de purina e pirimidina, e na mesma proporção.

Adicionalmente, o teste MN é um biomarcador utilizado para demonstrar dano genético. Micronúcleos se originam a partir de fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros que se encontram atrasados em anáfase durante a divisão nuclear. (Tucker e Preston, 1996; Fenech *et al.*, 2011). O dano oxidativo ao DNA pode levar a processos mutagênicos, assim, o teste MN indica as lesões persistentes ou ocorrência de falha no reparo (da Silva *et al.*, 2000). A elevação da frequência de MN foi observada em motoristas de táxi, quando comparado com os controles, sugerindo que a avaliação de MN em células epiteliais, tem o potencial para demonstrar os efeitos da exposição a agentes genotóxicos.

Muitos estudos têm demonstrado o envolvimento da poluição do ar com processos inflamatórios e uma propensão a desenvolver doença cardiovascular

(Brucker *et al.*, 2014). No entanto, o foco deste estudo foi avaliar o potencial inflamatório e carcinogênico induzido pelos poluentes da atmosfera em motoristas de táxi. Para isto, os métodos estatísticos foram utilizados a fim de detectar se a inflamação estava intimamente ligada com o dano ao DNA. Os resultados mostraram que as interleucinas são um fator determinante para o aumento da % de DNA na cauda. Portanto, as modificações mais complexas da estrutura do DNA também podem ser catalisada pelo processo de inflamação (Ishikawa, Ma e Barber 2009; Abe *et al.*, 2013).

A conexão entre mutações no DNA, instabilidade do genoma e desenvolvimento de tumores está bem estabelecido (Palmai-Pallag e Bachrati, 2014). Suportada-se a hipótese de uma cascata global de inflamação impulsiona danos ao DNA. Neste contexto, o processo inflamatório pode ser um fator de suscetibilidade ao câncer.

CONCLUSÕES

- ✓ Foi evidenciando a disfunção edotelial através do aumento da expressão da ICAM-I em neutrófilos nos indivíduos ocupacionalmente expostos à poluição atmosférica.
- ✓ Evidenciou-se alterações na atividade da enzima NTPDase nas plaquetas dos indivíduos expostos ocupacionalmente aos poluentes ambientais.
- ✓ O teste de cometa e micronúcleo mostraram um perfil genotóxico nos taxistas expostos aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Essas lesões no DNA podem gerar mutações no genoma.
- ✓ A exposição ocupacional aos poluentes atmosféricos pode ativar a cascata de inflamação, alterando as funções biológicas que levam às lesões que atingem o DNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, T. et al. STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense. **Mol Cell**, v. 50, p. :5-15, 2013.

ABELSOHN, A.; STIEB, D. M. Health effects of outdoor air pollution. **Can Fam Physician**, v. 57, n. 8, p. 881–887 2011.

ALEXEEFF, S. E. et al. Medium-term exposure to traffic-related air pollution and markers of inflammation and endothelial function. **Environ Health Perspect**, v. 119, p.481-6, 2011.

ALQUIMIM, A. F. et al. Evaluation of labor-related and physical risk factors for cardiovascular disease in drivers of urban transport buses in Montes Claros in the state of Minas Gerais. **Cien Saude Colet**, v. 17, n. 8, p. 2151-8, 2012.

ALVES, C.; SCOTTO, M.; FREITAS, M. Air pollution and emergency admissions for cardiorespiratory diseases in Lisbon. **Quím Nova**, v. 33, n. 2, p. 337-344 2010.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, p. 158-170, 2003.

ANDRE, P. A. et al. Lean diesel technology and human health: a case study in six Brazilian metropolitan regions. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 67, n. 6, p. 639-46, 2012.

ANGERER, J.; EWERS, U.; WILHELM, M. Human biomonitoring: state of the art. **Int J Hyg Environ Health**, v. 210, n. 3-4, p. 201-28, 2007.

ARAÚJO, J. A. et al. Ambient Particulate Pollutants in the Ultrafine Range Promote Early Atherosclerosis and Systemic Oxidative Stress. **Circ Res**, v. 102, p. 589-96, 2008.

ARMSTRONG, B. K.; WHITE, E.; SARACCI, R. Principles of exposure measurements in epidemiology. **Oxford University Press**, 1992.

ATKINSON, B. et al. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. **Blood Cells Mol.** v. 36, n. 2, p. 217-22, 2006.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 2006. Disponível em <<http://www.atsdr.cdc.gov>>.

BAGATINI, M. D. et al. Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 1181–1185, 2008.

BAGRYANTSEVA, Y. et al. Oxidative damage to biological macromolecules in Prague bus drivers and garagemen: impact of air pollution and genetic polymorphisms. **Toxicol Lett**, v. 199, n. 1, p. 60-8, 2010.

BAIRD, W. M.; HOOVEN, L. A.; MAHADEVAN B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. **Environ Mol Mutagen**, v. 45, n. 2-3 p.106-14, 2005.

BAKONYI, S. M. et al. Air pollution and respiratory diseases among children in the city of Curitiba, Brazil. **Rev Saude Publica**, v. 38, n. 5, p. 695-700, 2004.

BATTISTON, M.; CRUZ, R.; HOFFMANN, M. Condições de trabalho e saúde de motoristas de transporte urbano coletivo. **Estud Psicol (Natal)**, v. 11, n. 3, p. 333-343, 2006.

BECKER, L. V. et al. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from patients with rheumatoid arthritis. **Clinic Biochem**, v. 43, p. 1096–1100, 2010.

BJELLAND, S.; SEEBERG, E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. **Mutat. Res**, v. 531, p. 37–80, 2003.

BERRA, M. C. Estudos de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos em lesões oxidativas em células de mamíferos. **Instituto de Ciências Biomédicas**, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

BHATT, D. L.; TOPOL, E. J. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. **Nature Reviews**, v. 2, p. 15-28, 2002.

BIGONNESSE, F. et al. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. **Biochem**, v. 43, p. 5511Y9, 2004.

BIND, M. A. et al. Air pollution and markers of coagulation, inflammation, and endothelial function. **Epid**, v. 23, p. 332-340, 2012.

BIRK, A.V. et al. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. **J Lab Clin Med**, v. 140, p. 166–75, 2002.

BOFFETTA, P.; JOURENKOVA, N.; GUSTAVSSON, P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Cancer Causes & Control**, v. 8, p. 444-472, 1997.

BOLDT, J. et al. Aprotinin in pediatric cardiac operations: Platelet function, blood loss and use off homologous blood. **Ann Thorac Surg**, v. 66, p. 1460-6, 1995.

BONETTA, S. et al. DNA damage in A549 cells exposed to different extracts of PM(2.5) from industrial, urban and highway sites. **Chemosphere**, v. 77, p. 1030–1034, 2009.

BOUBEL, R. W. et al. Fundamental of Air Pollution. San Diego, Academic Press Inc. 1984.

BRAGA, A. et al. Association between air pollution and respiratory and cardiovascular diseases in Itabira, Minas Gerais State, Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 23, n. 4, p. 570-8, 2007.

BRASIL. RESOLUÇÃO Nº 382, DE 26 DE DEZEMBRO DE 2006. Estabelece os limites máximos de emissão de poluentes atmosféricos para fontes fixas. Diário oficial da União, Brasília, 27 de Dezembro de 2006.

BROOK, R. D. et al. Inhalation of fine particulate air pollution and ozone causes acute arterial vasoconstriction in healthy adults. **Circulation**, v. 105, n. 13 p. 1534-6, 2002.

BROOK, R. D. et al. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. **Circulation**, v. 109, n. 21, p. 2655-71, 2004.

BROOK, R. D. Cardiovascular effects of air pollution. **Clin Sci (Lond)**, v. 115, n. 6, p. 175-87, 2008.

BROOK, R. D. et al. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: an update to the scientific statement from the American heart association. **Circulation**, v. 121, n. 5, p. 2331–2378, 2010.

BRUCKER, N. et al. Atherosclerotic process in taxi drivers occupationally exposed to air pollution and co-morbidities. **Environ Res**, v. 131, p. 31-8, 2014.

BRUCKER, N. et al. Biomarkers of occupational exposure to air pollution, inflammation and oxidative damage in taxi drivers. **Sci Total Environ**, v. 463-464, p. 884-93, 2013.

BURGAZ, S. et al. Chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of traffic policemen and taxi drivers exposed to urban air pollution. **Chemosphere**, v. 47, n. 1, p. 57-64, 2002.

BURNSTOCK, G. Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signaling. **Clin Med**, v. 2, p.45–53, 2002.

CADET, J. et al. Ravanat, S.Sauvaigo, Recent aspects of oxidative DNA damage: guaninelesions, measurement and substrate specificity of DNA repairglycosylases, **Biol. Chem**, v. 383, p. 933–943, 2002.

CANÇADO, J. et al. Repercussões clínicas da exposição à poluição atmosférica. **J Bras Pneumol**, v. 32, p. S5-S11, 2006.

CARVALHO JÚNIOR, J. A.; LACAVALA, P. T. Emissões em processos de combustão. **São Paulo: UNESP**, 2003.

CASTANO-VINYALS, G. et al. Biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental air pollution. **Occup Environ Med**, v. 61, n. 4, p. e12, Apr 2004.

CHEN, C. J. et al. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. **Nat Med**, v. 13, p. 851–856, 2007.

CHEN, R. et al. Ambient air pollution and hospital admission in Shanghai, China. **J Hazard Mater**, v. 181, n. 1-3, p. 234-40, 2010.

CHEN, H. et al. Risk of incident diabetes in relation to long-term exposure to fine particulate matter in Ontario, Canada. **Environ Health Perspect**, v. 121, p. 804–810, 2013.

CHETIYANUKORNKUL, T. et al. Simultaneous determination of urinary hydroxylated metabolites of naphthalene, fluorene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene as multiple biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Anal Bioanal Chem**, v. 386, n. 3, p. 712-8, 2006.

CHUANG, K. J. et al. The effect of urban air pollution on inflammation, oxidative stress, coagulation, and autonomic dysfunction in young adults. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 176, p. 370–6, 2007.

CHUANG, C. Y.; CHANG, C. C. Urinary 1-hydroxypyrene level relative to vehicle exhaust exposure mediated by metabolic enzyme polymorphisms. *J Occup Health*, v. 49, n. 2, p. 140-51, 2007.

CHUNG, K. F.; MARWICK, J. A. Molecular mechanisms of oxidative stress in airways and lungs with reference to asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1203, p. 85–91, 2010.

CIARROCCA, M. et al. Is urinary 1-hydroxypyrene a valid biomarker for exposure to air pollution in outdoor workers? A meta-analysis. **J Expo Sci Environ Epidemiol**, 2013.

CIOCCO, A.; Thompson, D. J. A follow-up on Donora ten years after: methodology and findings. **Am J Public Health**, v. 51, p. 155-164, 1961.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. **Mol Biotechnol**, v. 26, p. 249-61, 2004.

COLLINS, A. et al. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **J Exp Med**, v. 191, n. 1, p. 189-94, 2000.

COLLINS, A. et al. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications. **Environ Mol Mutagen**, v.30, p.139-146, 1997.

COLOMBINI, M. Poluição atmosférica e seu impacto no sistema cardiovascular. **Einstein (São Paulo)**, v. 6, n. 2, p. 221-226, 2008.

DALLAROSA, J. et al. Study of the profile of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particles (PM10) using multivariate methods. **Atmos Environ**, v. 39, p. 6587-6596, 2005.

DANIELSEN, P. H. et al. Oxidative stress, DNA damage, and inflammation induced by ambient air and wood smoke particulate matter in human A549 and THP-1 cell lines. **Chem. Res. Toxicol**, v. 24, p. 168–184, 2011.

da SILVA, J. et al. Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by Comet assay and micronucleus test. **Environ Mol Mutagen**, v. 35, p. 270–278, 2000.

DAUMAS, R. P. et al. Air pollution and mortality in the elderly in Rio de Janeiro: a time-series analysis. **Cad Saude Publica**, v. 20, n. 1, p. 311-9, 2004.

DAVIES, H. W. et al. Correlation between co-exposures to noise and air pollution from traffic sources. **Occup Environ Med**, v. 66, n. 5, p. 347-50, 2009.

DELFINO, R. J. et al. Air pollution exposures and circulating biomarkers of effect in a susceptible population: clues to potential causal component mixtures and mechanisms. **Environ Health Perspect**, v. 117, n. 8, p. 1232-8, 2009.

DELFINO, R. J.; STAIMER, N.; VAZIRI, N. D. Air pollution and circulating biomarkers of oxidative stress. **Air Qual Atmos Health**, v. 4, n. 1, p. 37-52, 2011.

DEMETRIOU, C. A. et al. Biomarkers of ambient air pollution and lung cancer: a systematic review. **Occup Environ Med**, v. 69, n. 9, p. 619-27, 2012.

DETRAN/RS. Departamento de trânsito do estado do Rio Grande do Sul. Frota do RS. <http://www.detran.rs.gov.br/conteudo/27453/frota-do-rs> Acessado dia 27/01/2015.

DO, R. et al. Biomarkers of airway acidity and oxidative stress in exhaled breath condensate from grain workers. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 178, n. 10, p. 1048–1054, 2008.

DONALDSON, K.; STONE, V. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, vol. 39, n. 3, p. 405–410, 2003.

DUBOWSKY, S. D. et al. Diabetes, obesity, and hypertension may enhance associations between air pollution and markers of systemic inflammation. **Environ Health Perspect**, v. 114, n. 7, p. 992-8, 2006.

DURGA, M. et al. Effects of ultrafine exhaust particles on cytotoxicity, oxidative stress generation and inflammation in human A549 cells and murine RA W 264.7 macrophages. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 38, n. 2, p. 518-30, 2014.

FANG, S. C.; CASSIDY, A.; CHRISTIANI, D. C. A systematic review of occupational exposure to particulate matter and cardiovascular disease. **Int J Environ Res Public Health**, v. 7, n. 4, p. 1773-806, 2010.

FARHAT, S. C. et al. Effect of air pollution on pediatric respiratory emergency room visits and hospital admissions. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 2, p. 227-35, 2005.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, p. 125–32, 2011.

FIRKET J. The cause of the symptoms found in Meusa Valley during the fog of December 1930. **Bulletin of the Academy of Royal Medicine of Belgium** 1931, v.11, p.683-741, 1931.

FORCHHAMMER, L. et al. Controlled human wood smoke exposure: oxidative stress, inflammation and microvascular function. **Part Fibre Toxicol**, p. 9:7, 2012.

FRIEDBERG, E.C. DNA damage and repair. **Nature**, v. 421, p.436-40, 2003.

FREIRE, C. et al. Urinary 1-hydroxypyrene and PAH exposure in 4-year-old Spanish children. **SciTotalEnviron**, v. 407, p. 1562–9, 2009.

FROSTEGÅRD, J. et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. **Atherosclerosis**, v. 145, n. 1, p. 33-43, 1999.

FÜRSTENAU, C. R. et al. Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase as part of a multiple system for nucleotide hydrolysis by platelets from rats: kinetic characterization and biochemical properties. **Platelets**, v. 17, n. 2, p. 84–91, 2006.

GHIO, A. J.; KIM, C.; DEVLIN, R. B. Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers. **Am J of Res and Critic Care Med**, v. 162, n. 3 I, p. 981–988, 2001.

GILLILAND, F. D. Outdoor air pollution, genetic susceptibility, and asthma management: opportunities for intervention to reduce the burden of asthma. **Pediatrics**, v. 123, n 3, p. S168-73, 2009;

GIODA, A. A influência da qualidade do ar nas doenças respiratórias. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, n. 1, p. 7, 2006.

GOLIAS, C. H. et al. Leukocyte and Endothelial Cell Adhesion Molecules in Inflammation Focusing on Inflammatory Heart Disease. **In vivo**, v.21, p. 757-770, 2007.

GOTO, C. et al. Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans role of endotheliumdependent nitric oxide and oxidative stress. **Circulation**, v. 108, p. 530-535, 2003.

GOUVEIA, N. et al. Hospitalizações por causas respiratórias e cardiovasculares associadas à contaminação atmosférica no Município de São Paulo, Brasil. **Cad Saúde Pública**, v.22, p. 2669-77, 2006.

GUALTIERI, M. et al. Airborne urban particles (Milan winter-PM2.5) cause mitotic arrest and cell death: effects on DNA, mitochondria, AhR binding and spindle organization. **Mutat. Res**, v. 713, p. 18–31, 2011.

GUPTA, I.; SALUNKHE, A.; KUMAR, R. Modelling 10-year trends of PM10 and related toxic heavy metal concentrations in four cities in India. **J Hazard Mater**, v. 179, n. 1-3, p. 1084-95, 2010.

HANSEN, A. M. et al. Urinary 1-hydroxypyrene (1-HP) in environmental and occupational studies-a review. **Int J Hyg Environ Health**, v. 211, n. 5-6, p. 471-503, 2008.

HANSSON G. K. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease The new england journal of medicine. **N Engl J Med**, v. 352, p. 1685-95, 2005.

HARTMANN, A.; KISKINIS E.; FJÄLLMAN, A E SUSTER, W. Influence of cytotoxicity and compound precipitation on test results in the alkaline comet assay. **Mutat Res**, v.497, p.199-212, 2001.

HAYASHI, M. et al. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. IISome aspects of protocol design including repeated treatmentsintegration with toxicity testing, and automated scoring. **Environ Mol Mutagen**. v. 35, n. 3, p. 234-52, 2000.

HIRANO, S. et al. Oxidative-stress potency of organic extracts of diesel exhaust and urban fine particles in rat heart microvessel endothelial cells. **Toxicol**, v. 187, n. 2-3, p. 161–170, 2003.

HOEK, G. et al. Long-term air pollution exposure and cardio-respiratory mortality: a review. **Environ Health**, v. 12, p. 43. 2013.

HOU, L. et al. Inhalable particulate matter and mitochondrial DNA copy number in highly exposed individuals in Beijing, China: a repeated-measure study. **Part Fibre Toxicol**, v. 10, p. 17, 2013.

HUNTER, W. J. Carcinogenic substances. **Encyclopaedia of occupational health and safety**, v.1, n. 3, p. 401-4, 1989.

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

IARC (*International Agency for Research on Cancer*). Complete List of Agents, Mixtures and Exposures Evaluated and Their Classification. 2002.

IARC (*International Agency for Research on Cancer*). Outdoor air pollution a leading environmental cause of cancer deaths. 2013.

ISHIKAWA, H.; MA, Z., BARBER, G. N. STING regulates intracellular DNA mediated, type I interferon-dependent innate immunity. **Nature**, v. 461, p. 788-92, 2009.

IVERSEN, M.; DAHL, R. Working in swine-confinement buildings causes an accelerated decline in FEV1: a 7-yr follow-up of Danish farmers. **Eur Respir J**, v. 16, n. 3, p. 404–408, 2000.

JONGENEELLEN, F. J. Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Ann Occup Hyg**, v. 45, n. 1, p. 3-13.

JONGENEELLEN, F. J. et al. 1-Hydroxypyrene in urine as a biological indicator of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in several work environments. **Ann Occup Hyg**, v. 32, n. 1, p. 35-43, 1988.

JUNQUEIRA, V.; RAMOS, L. R. Estresse Oxidativo. In: RAMOS, L. R.; NETO, J. T. *Geriatrics e gerontologia*. Barueri : Manole Ltda, 2005. Cap. 24, p. 315-324.

KAIZER, R. R.; MALDONADO, P. A.; SPANEVELLO, R. M. et al. The effect of aluminium on NTPDase and 5'-nucleotidase activities from rat synaptosomes and platelets. **Int J of Dev Neurosci**, v.25, p. 381–386, 2007.

KAMAL, A. et al. Health and carcinogenic risk evaluation for cohorts exposed to PAHs in petrochemical workplaces in Rawalpindi city (Pakistan). **Int J Environ Health Res**, 2015.

KAZANTSEV, A. G. Cellular pathways leading to neuronal dysfunction and degeneration. **Drug News Perspect**, v. 20, n. 8, p. 501-9, 2007.

KELLY, F. J.; FUSSELL, J. C. Linking ambient particulate matter pollution effects with oxidative biology and immune responses. **Ann NY Acad Sci**, 2015.
FRANCHINI, M.; MANNUCCI, P. M. Air pollution and cardiovascular disease. **Thromb Res**, v. 129, n. 3, p. 230-4, 2012.

KLASSEN, C. D., WATKINS, J. B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull** (Lange). 2° ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

KNIBBS, L. D.; MORAWSKA, L. Traffic-related fine and ultrafine particle exposures of professional drivers and illness: an opportunity to better link exposure science and epidemiology to address an occupational hazard? **Environ Int**, v. 49, p. 110-4, 15 2012.

KREWSKI, D. et al. Extended follow-up and spatial analysis of the American Cancer Society study linking particulate air pollution and mortality. **Health Effects Inst**, v. 140, p. 1-154, 2009.

KRISHNAN, R. M.; KAUFMAN, J. D.; HOEK G. Chronic effects of air pollution on cardiovascular health. In Cardiovascular effects of inhaled ultrafine and nanosized particles. **New Jersey Inc**; 2011.

KUNZLI, N. et al. Ambient Air Pollution and Atherosclerosis in Los Angeles. **Environ Health Perspect**, v. 113, p. 201-206, 2005.

LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutat Res**, v. 544, p. 43-64, 2003.

LEON, C. et al. The P2Y1 receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells. **FEBS Lett**, v. 403, p. 26-30 1997.

LEWNE, M. et al. Exposure to particles and nitrogen dioxide among taxi, bus and lorry drivers. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 79, n. 3, p. 220-6, 2006.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v. 105, n. 9, p. 1135-43, 2002.

LIN, C. A. et al. Air pollution and neonatal deaths in Sao Paulo, Brazil. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 5, p. 765-70, 2004.

LIPPMANN, M. M. et al. PM Source Apportionment for Short-Term Cardiac Function Changes in ApoE. **Environ Health Perspect.**, v. 113, n. 11, p. 1575–1579, 2005.

LIU, Y. et al. Oxidative stress, apoptosis, and cell cycle arrest are induced in primary fetal alveolar type II epithelial cells exposed to fine particulate matter from cooking oil fumes. **Environ Sci Pollut Res**, 2015.

LODOVICI, M. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons air levels in Florence, Italy, and their correlation with other air pollutants. **Chemosphere**, v. 50, n. 3, p. 377-82, Jan 2003.

LODOVICI, M.; BIGAGLI, E. Oxidative stress and air pollution exposure. **J Toxicol**, v. 2011, p. 487074, 2011.

LONDON, S. J. Gene–air pollution interactions in asthma. **Proc Am Thorac Soc**, v. 4, n. 3, p. 217-20, 2007.

LOOMIS, D. et al. International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group IARC. The carcinogenicity of outdoor air pollution. **Lancet Oncol**, v. 14, p. 1262– 1263, 2013.

MADRIGANO, J. et al. Air pollution, obesity, genes and cellular adhesion molecules. **Occup Environ Med**, v. 67, p. 312–7, 2010.

MALDONADO, P. A. et al. Ectonucleotidepyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in patientswith uterine cervix neoplasia. **ClinBiochem**, v. 41, p. 400–6, 2008.

MALUF, S.W.; ERDTMANN B. Biomonitorização do dano genético em humanos. **Genética Toxicológica**, p. 183-205, 2003.

MANALIS, N. et al. Toxic metal content of particulate matter (PM10), within the Greater Area of Athens. **Chemosphere**, v. 60, n. 4, p. 557-66, 2005.

MANINI, P. et al. Environmental and biological monitoring of benzene exposure in a cohort of Italian taxi drivers. **Toxicol Lett**, v. 167, n. 2, p. 142-51, 2006.

MANNO, M. et al. Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). **Toxicol Lett**, v. 192, n. 1, p. 3-16, 2010.

MARCUS, et al. Role of CD39 (NTPDase1) in thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 31, n. 2, p. 234–246, 2005.

MASSBERG, S. et al. Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprogession and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb. **Circulation**, v.112, n.8, p.1180- 1188, 2005.

MASSBERG, S. et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. **J Exp Med**, v. 196, p.887–96, 2002.

MARIE, C. et al. Urinary levels of oxidative DNA and RNA damage among workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in silicon production: comparison with 1-hydroxypyrene. **Environ Mol Mutagen**, v. 50, n. 2, p. 88-95, 2009.

MAZZANTI, C. M.; SPANEVELLO, R. M.; MORSCH, A. et al. Previous treatment with ebselen and vitamin E alters adenine nucleotide hydrolysis in platelets from adult rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. **Life Sciences**, v. 81, p. 241–248, 2007.

MAZZOLI-ROCHA, F. et AL. Roles of oxidative stress in signaling and inflammation induced by particulate matter. **Cell Biol Toxicol**, v. 5, p. 481-98, 2010.

MENA, S.; ORTEGA, A.; ESTRELA, J. M. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. **Mutat. Res**, v. 674, p. 36–44, 2009.

MERLO, F. et al. Urinary excretion of 1-hydroxypyrene as a marker for exposure to urban air levels of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 7, n. 2, p. 147-55, 1998.

MICHAEL, S.; MONTAG, M.; DOTT, W. Pro-inflammatory effects and oxidative stress in lung macrophages and epithelial cells induced by ambient particulate matter. **Environ Pollut**, v. 183, p. 19–29, 2013.

MILLER-SCHULZE, J. P. et al. Exposures to particulate air pollution and nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons among taxi drivers in Shenyang, China. **Environ Sci Technol**, v. 44, n. 1, p. 216-21, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil 2011-2012. **Brasilia**; 2011

MOLLER, P. et al. Hazard identification of particulate matter on vasomotor dysfunction and progression of atherosclerosis. **Crit Rev Toxicol**, v. 41, p. 339-368, 2011.

MONTIEL-DAVALOS, A.; ALFARO-MORENO, E.; LOPEZ-MARURE, R. PM2.5 and PM10 induce the expression of adhesion molecules and the adhesion of monocytic cells to human umbilical vein endothelial cells. **Inhal. Toxicol**, v. 19 , n. 1, p. 91–98, 2007.

MUÑOZ, B.; ALBORES, A. DNA Damage Caused by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Mechanisms and Markers, Selected Topics in DNA Repair. **ISBN**, 2011.

NEOPHYTOU, A. M. et al. Traffic-related exposures and biomarkers of systemic inflammation, endothelial activation and oxidative stress: a panel study in the US trucking industry. **Environ Health**, v. 12, p.105, 2013.

NISHIWAKI, Y. et al. Long-term exposure to particulate matter in relation to mortality and incidence of cardiovascular disease: the JPHC Study. **J Atheroscler Thromb**, v. 20, p. 296–309, 2013.

NORDBERG, G. F. Biomarkers of exposure, effects and susceptibility in humans and their application in studies of interactions among metals in China. **Toxicol Lett**, v. 192, n. 1, p. 45-9, 2010.

OGA, S.; CARVALHO, M.; BATISTUZZO, J. **Fundamentos de Toxicologia**. 3° ed. São Paulo:Atheneu, 2008.

O'NEILL, M. S. et al. Air pollution and inflammation in type 2 diabetes: a mechanism for susceptibility. **Occup Environ Med**, v. 64, p. 373–9, 2007.

PALMAI-PALLAG T.; BACHRATI, C. Z. Inflammation-induced DNA damage and damage-induced inflammation: a vicious cycle. **Microbes and Infection**, v.16, p. 822-832, 2014.

PARK, S. K. et al. Cloning and characterization of phospholipase D from rat brain. **J. Biol. Chem.** v. 272, p. 29263–29271, 1997.

PAULINO, S. A. et al. Evolution of particulate matter and associated metal levels in the urban area of Rio de Janeiro, Brazil. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 84, n. 3, p. 315-8, 2010.

PEREIRA, A. D. et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): Uma revisão metodológica. **Quím Nova**, v. 23, p. 765-773, 2000.

PEREIRA NETTO, A. et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Quím Nova**, v. 23, n. 6, p. 765-773, 2000.

PETCHPOUNG, K. et al. The influence of metabolic gene polymorphisms on urinary 1-hydroxypyrene concentration in Thai bus drivers. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 31, n. 1, p. 160-4, 2011.

PETERS, A. et al. Exposure to traffic and the onset of myocardial infarction. **N Engl J Med**, v. 351, n. 17, p. 1721-30, 2004.

POPE, C A. et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long term exposure to fine particulate air pollution. **Journal of American Medical Association**, v. 287, p.1132-1141, 2002.

POPE, C. A.; MUHLESTEIN, J. B., MAY, H. T. et al. Ischemic heart disease events triggered by short-term exposure to fine particulate air pollution. **Circulation**, v. 114, p. 2443–2448, 2006.

POPE, C. A.; DOCKERY, D. W. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. **J Air Waste Manag Assoc**, v. 56, n. 6, p. 709-42, 2006.

PRISTA, J.; UVA, A. S. A utilização de indicadores biológicos em saúde ocupacional. **Rev Port Sau Pub**, v.6, p.45-54, 2006.

QUITERIO, S. L. et al. Metals in airborne particulate matter in downtown Rio de Janeiro, Brazil. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 72, n. 5, p. 916-22, 2004.

RAASCHOU-NIELSEN, O. et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). **Lancet Oncol**, v. 14, p. 813-822, 2013.

RADON, K. et al. Prevalence and risk factors for airway diseases in farmers--summary of results of the European Farmers' Project. **Ann Agric Environ Med**, v. 9, n. 2, p. 207–213, 2002.

REX, S.; FREEDMAN, J. E. Inhibition of platelet function by the endothelium. **Platelets**, p. 251–79, 2007.

ROSENFELD, M. E. Inflammation and atherosclerosis: direct versus indirect mechanisms. **Curr Opin in Pharmacol**, v. 13, p. 154–160, 2013.

ROSS, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. **N Engl J Med**, v. 340, n. 2, p. 115-26, 1999.

SALDIVA, P. H. et al. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in Sao Paulo, Brazil: a preliminary report. **Environ Res**, v. 65, n. 2, p. 218-25, 1994.

SALGADO, P. E. T.; FERNICOLA, N. A. G. G. Noções básicas de toxicologia ocupacional. **São Paulo: Opas**; Ed. Unesp, 1989.

SAMOLI, E. et al. Acute effects of air pollution on pediatric asthma exacerbation: evidence of association and effect modification. **Environ Res**, v. 111, n. 3, p. 418-24, 2011.

SANDSTRÖM, T., KELLY, F. J. Traffic-related air pollution, genetics and asthma development in children. **Thorax**, v. 64, n. 2, p. 98-9, 2009.

SCHENCK, L. et al. Risk assessment and occupational exposure limits. **Toxicology Letters**, v.180, p. 232-246, 2008.

SCHETINGER, M. R. C. et al. NTPDase and 5`-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. **Biofactors**, v. 31, p. 77–98, 2007.

SCHMATZ, R. et al. Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. **Life Sciences**, v. 84, p. 345–350, 2009.

SCHULTE, P. A.; HAUSER, J. E. The use of biomarkers in occupational health research, practice, and policy. **Toxicol Lett**, v. 213, n. 1, p. 91-9, 2012.

SELLAPPA, S.; MANI, B.; KEYAN, K. S. Cytogenetic biomonitoring of road paving workers occupationally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 12, n. 3, p. 713-7, 2011.

SEYE, C. I. et al. The P2Y2 nucleotide receptor mediates UTP-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in coronary artery endothelial cells. **J Biol Chem**, v. 27, p. 24960 – 24965, 2003.

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H. E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutat Res**, v. 531, p. 231-51, 2003.

SIMKHOVICH, B. Z.; KLEINMAN, M. T.; KLONER, R. A. Air pollution and cardiovascular injury epidemiology, toxicology, and mechanisms. **J Am Coll Cardiol**, v. 52, n. 9, p. 719-26, 2008.

SINGH, R. et al. The relationship between biomarkers of oxidative DNA damage, polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, antioxidant status and genetic susceptibility following exposure to environmental air pollution in humans. **Mutat Res**, v. 620, n. 1-2, p. 83-92, 2007.

SOUSA, S. I. et al. Short-term effects of air pollution on respiratory morbidity at Rio de Janeiro--Part II: health assessment. **Environ Int**, v. 43, p. 1-5, 2012.

SPANVELLO, R. M. et al. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon. **Life Sciences**, v. 80, p. 1109–1114, 2007.

STEFFEL, J.; LÜSCHER, T. F. Predicting the development of atherosclerosis. **Circulation**, v. 119, p. 919-92, 2009.

STRICKLAND, P.; KANG, D. Urinary 1-hydroxypyrene and other PAH metabolites as biomarkers of exposure to environmental PAH in air particulate matter. **Toxicol Lett**, v. 108, n. 2-3, p. 191-9, 1999.

SUN, Q. et al. Long-term air pollution exposure and acceleration of atherosclerosis and vascular inflammation in an animal model. **JAMA**, v. 294, n. 23, p. 3003-10, 2005.

SUNDBLAD, B. M. et al. Exhaled nitric oxide and bronchial responsiveness in healthy subjects exposed to organic dust. **Eur Respir J**, v. 20, n. 2, p. 426–431, 2002.

SUWA, T. et al. Particulate Air Pollution Induces Progression of Atherosclerosis. **J Am Coll Cardiol**, v. 39, p. 935-42, 2002.

TAKAISHI, M. et al. Protective role of methallothionein in benzo[a]pyrene-induced DNA damage. **J Toxicol Sci**, v.34, p. 449-458, 2009.

TEIXEIRA, E. et al. Estudo das emissões de fontes móveis na região metropolitana de Porto Alegre. **Quím Nova**, v. 31, n. 2, p. 244-248, 2008.

TEIXEIRA, E. et al. Chemical composition of PM10 and PM2.5 and Seasonal Variation in South Brazil. **Water Air Soil Pollut** v. 199, p. 261–275, 2009.

THODIYIL, P. A., KAKKAR A. K. Thromboprophylaxis in the cancer patients, **Acta Haematologica**, v. 106, p. 18 – 73, 2001.

TICE, R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen**, v. 35, p. 206–221, 2000.

TONNE, C. et al. An approach for estimating the health effects of changes over time in air pollution: an illustration using cardio-respiratory hospital admissions in London. **Occup Environ Med**, v. 67, n. 6, p. 422-7, 2010.

TONNE, C. et al. Traffic particles and occurrence of acute myocardial infarction: a case-control analysis. **Occup and Environ Med**, v. 66, n. 12, p. 797–804, 2009.

TOTLANDSDAL, A. I. et al. Diesel exhaust particles induce CYP1A1 and pro-inflammatory responses via differential pathways in human bronchial epithelial cells. **Part. Fibre Toxicol**, v. 7, p. 41, 2010.

TUCKER, J. D.; PRESTON, R. J. Chromosome aberrations, micronuclei aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. **Mutat. Res**, v. 365, p.147–159, 1996.

TURNER, M. C. et al. Long-term ambient fine particulate matter air pollution and lung cancer in a large cohort of never-smokers. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 184, p. 1374-1381, 2011.

UNECE. Manual on methodologies and criteria for mapping load and levels and air pollution effects, risks and trends. 2004. http://www.oekodata.com/pub/mapping/map-man_2004.pdf

VALAVANIDIS, A. et al. Characterization of atmospheric particulates, particle-bound transition metals and polycyclic aromatic hydrocarbons of urban air in the centre of Athens (Greece). **Chemosphere**, v. 65, n. 5, p. 760-8, 2006.

VALLIUS, M. et al. Sources and elemental composition of ambient PM(2.5) in three European cities. **Sci Total Environ**, v. 337, n. 1-3, p. 147-62, 2005.

VAN BERLO, D. et al. NF-kappaB dependent and independent mechanisms of quartz-induced proinflammatory activation of lung epithelial cells. **Fibre Toxicol**, v. 7, p. 13, 2010.

VAN EEDEN, S. F. et al. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM10). **Am J of Respir and Critic Care Med**, v. 164, n. 5, p. 826–830, 2001.

VERMYLEN, J. et al. Ambient air pollution and acute myocardial infarction. **J Thromb Haemost**, v. 3, n. 9, p. 1955-61, 2005.

VIDEM, V.; ALBRIGTSEN, M. Soluble ICAM-1 and VCAM-1 as markers of endothelial activation. **Scand J Immunol**, v. 67, n. 5, p. 523-31, 2008.

VILLELA, I.V.; OLIVEIRA, I.M; SILVA, J E HENRIQUES, J.A.P. DNA damage and repair in Haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) Exposed to Environmental contaminants. **Mutat Res**, v. 697, p.78-86, 2006.

VILLELA, I.V.; OLIVEIRA, I.; SILVEIRA, J.C.; DIAS,J.; HENRIQUES, J.A.P.; E SILVA, J. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. **Mutat Res**, v. 628, p.76-86, 2007.

VITTA, J. A.; KEANEY, J. R. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? **Circulation**, v. 106, p. 640–2, 2002.

WANG, T. et al. Particulate matter disrupts human lung endothelial barrier integrity via ROS- and p38 MAPK-dependent pathways. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 42, p. 442– 449, 2010.

WANG, H. et al. DNA damage checkpoint recovery and cancer development. **Exp Cell Res**, v. 15, p. S0014-4827, 2015.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Primary health care, now more than ever. World Health Organization, Geneva: WHO, 2008.

World Health Organization .(WHO). Global status report on noncommunicable diseases. Geneva ;2010.

World Health Organization (WHO). Air guidelines for Europe. 2.ed. Copenhagen, 2000.
http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0005/74732/E71922.pdf Acessado em 28/01/ 2012.

WHO. Ambient (outdoor) air quality and health. Fact sheet N°313. Updated March 2014. Available online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/en/>

XUE, W.; WARSHAWSKY, D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 206, n. 1, p. 73-93, 2005.

YANG, W.S. et al. An evidence-based assessment for the association between long-term exposure to outdoor air pollution and the risk of lung cancer. **Eur J Cancer Prev**, 2015.

YANG, C. et al. Acute effect of ambient air pollution on heart failure in Guangzhou, China. **Int J Cardiol**, v. 177, n. 2, p. 436-41, 2014.

YEGUTKIN, G. G. et al. Metabolism of circulating ADP in the bloodstream is mediated *via* integrated actions of soluble adenylylase-1 and NTPDase1/CD39 activities. **FASEB J**, v. 9, p. 3875–3883, 2012.

ZAGURY, E.; LE MOULLEC, Y.; MOMAS, I. Exposure of Paris taxi drivers to automobile air pollutants within their vehicles. **Occup Environ Med**, v. 57, n. 6, p. 406-10, 2000.

ZANOBETTI, A.; SCHWARTZ, J. The effect of particulate air pollution on emergency admissions for myocardial infarction: a multicity case-crossover analysis. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 8, p. 978-82, 2005.

ZEKA, A. et al. Inflammatory markers and particulate air pollution: characterizing the pathway to disease. **Int J Epidemiol**, v. 35, n. 5, p. 1347-54, 2006.

ZHANG, J. et al. Environmental health in China: progress towards clean air and safe water. **Lancet**, v. 375, p. 1110-1119, 2010.

ZOU, B. et al. Air pollution exposure assessment methods utilized in epidemiological studies. **J Environ Monit**, v. 11, n. 3, p. 475-90, 2009.

ANEXO I

QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO

Data: ___/___/___

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____
Telefone: _____
Idade: _____ Data de nascimento: ____/____/____
Etnia: _____
Entrevistador: _____

DADOS GERAIS

Profissão: _____

Função: _____

Local de trabalho (posto/ponto): _____

Tempo que exerce a função: _____

Número de horas diárias de permanência no trabalho? _____

Turno: (1) Manhã (2) Tarde (3) Noite

Jornada de Trabalho Semanal: _____

Função Anterior: _____

Tempo da função anterior: _____

AVALIAÇÃO DO AMBIENTE DE TRABALHO

1. Estação do ano

() Inverno () Verão () Primavera () Outono

2. Temperatura

() Confortável () Desconfortável () Estável

3. Movimento do ar

() Muito parado () Médio () Bastante movimento

4. Qualidade do ar

Seco	1	2	3	4	5	6	7	Úmido
Fresco	1	2	3	4	5	6	7	Abafado
Inodoro	1	2	3	4	5	6	7	Mal cheiroso
Satisfatório em geral	1	2	3	4	5	6	7	Insatisfatório em geral

DADOS DE DIAGNÓSTICO

Como você acha que está o seu estado geral de saúde?

() Muito bom () Bom () Mau () Muito mau

Portador de doenças crônicas?

() Sim () Não

Se sim, qual(ais) delas:

- () Hipertensão
- () Diabetes
- () Câncer
- () Doenças respiratórias
- () Doenças Auto-imunes
- () Tuberculose
- () Sífilis
- () HIV
- () Hepatite

Faz uso de medicamentos? Quais? Por quanto tempo?

Faz uso de Polivitamínicos? _____

Apresenta alguns destes sintomas?

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> dor de cabeça | <input type="checkbox"/> tontura |
| <input type="checkbox"/> vertigem | <input type="checkbox"/> dor de estômago |
| <input type="checkbox"/> dor pernas | <input type="checkbox"/> irritação olhos |
| <input type="checkbox"/> irritação nariz | <input type="checkbox"/> irritação pele |
| <input type="checkbox"/> lesão nas mãos | <input type="checkbox"/> coceira |
| <input type="checkbox"/> alergia | <input type="checkbox"/> palpitações |
| <input type="checkbox"/> bronquite | <input type="checkbox"/> falta de ar |
| <input type="checkbox"/> rinite alérgica | <input type="checkbox"/> dor coluna |
| <input type="checkbox"/> cansaço | <input type="checkbox"/> problemas auditivos |
| <input type="checkbox"/> dor muscular | <input type="checkbox"/> sonolência |
| <input type="checkbox"/> alteração salivação | <input type="checkbox"/> tremores |
| <input type="checkbox"/> insônia | <input type="checkbox"/> alteração humor |
| <input type="checkbox"/> distúrbios respiratórios | |
| <input type="checkbox"/> outros sintomas : | |

HISTÓRICO FAMILIAR

Hipertensão arterial: (1) Sim (2) Não

Infarto do miocárdio: (1) Sim (2) Não

Derrame cerebral: (1) Sim (2) Não

Diabetes mellitus: (1) Sim (2) Não

HÁBITOS DE VIDA

FUMO: () Nunca fumou () Fumante () Ex-fumante

Se sim, quantos cigarros por dia? ____

Com que idade começou a fumar? _____ anos

Ex-fumante

Se sim, quantos cigarros por dia? _____

Há quanto tempo parou de fumar? _____ anos ____ meses

Mora com alguém que é fumante? () SIM () NÃO

ETILISMO

Faz uso de bebidas alcoólicas? () SIM () NÃO

Qual a frequência, a quantidade e o tipo de bebida (por semana)? _____

Fez uso de bebidas alcoólicas nos últimos 2 dias? Qual? _____

REINCIDÊNCIA DE INFECÇÕES? ()SIM ()NÃO

Quais:

ATIVIDADES FÍSICAS

Pratica regularmente atividades físicas () SIM () NÃO

Qual atividade e com que frequência?

ANEXO II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu,.....fui convidado(a) pela professora Dr^a. Solange Cristina Garcia (UFRGS) e pela aluna de mestrado do Programa de Pós Graduação da UFRGS Anelise Barth, a fazer parte de um trabalho científico com o título “**Biomonitoramento de trabalhadores expostos ocupacionalmente a xenobióticos**”. Neste trabalho serão realizados exames clínico-laboratoriais com o objetivo de avaliar possíveis alterações inflamatórias e cardiovasculares através de exames laboratoriais e por imagem. Além de analisar outros parâmetros que possam ser relacionados a exposição ambiental. Além destes exames serão realizadas entrevistas com questionário sobre o uso de medicamentos e o estado de saúde.

Fui esclarecido que minha participação é de livre e espontânea vontade e que caso aceite, podendo ocorrer algum desconforto para o deslocamento até o local de realização da pesquisa.

Para a coleta de sangue venoso o material utilizado é único para cada indivíduo. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele. Complicações da coleta de sangue são raras, podendo ocorrer mal-estar e até mesmo desmaios. Se houver pequena perda de sangue da veia no local da punção poderá aparecer hematomas que desaparecem em alguns dias.

Quanto à coleta de urina, apresenta como riscos inerente o desconforto ao procedimento de coleta, uma vez que o indivíduo irá urinar em um pequeno frasco coletor de urina. Será informado que o voluntário deverá ir urinar quantidade que for capaz no momento da coleta, desprezando o primeiro jato para não ocorrer contaminação microbiológica e o volume não deve exceder 10 mL.

Quanto à coleta de células da mucosa bucal para análise de dano ao DNA, os indivíduos participantes poderão sofrer de algum desconforto do procedimento e o risco eventual, embora pequeno, de lesão da mucosa, uma vez que se constitui de uma coleta simples, realizada com uma pequena escova de coleta de células endocervicais através de movimentos circulares contra o interior de cada bochecha. Anteriormente à coleta de células da mucosa, o indivíduo será orientado a realizar bochecho com água mineral disponibilizada pela equipe de pesquisa, minimizando os riscos de contaminação.

Estou ciente de que receberei os resultados dos exames sem custo, mas não receberei nenhuma outra forma de pagamento e que poderei desistir de fazer parte da pesquisa a qualquer momento, sem qualquer tipo de constrangimento, restrições ou conseqüências.

Eu terei garantia da não identificação e do caráter confidencial dos resultados. Terei garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, aos profissionais responsáveis pela mesma, para esclarecimento de eventuais dúvidas sobre os procedimentos, riscos e benefícios, contatando a Prof^a Dr^a Solange Cristina Garcia (51) 33085297, responsável pelo projeto. Também pode contatar a

secretaria do Comitê de Ética em pesquisa da UFRGS (51) 33083629 para apresentar recursos ou reclamações em relação ao estudo. Também possui a possibilidade de, se assim o desejar, obter informações junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS – telefone (51) 3308-3738.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas por mim, descrevendo o estudo.

Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer hora, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Porto Alegre, ____ de _____ de 20__.

_____ Data:
Assinatura do paciente ou responsável

_____ Data:
Assinatura do responsável pela pesquisa

ANEXO III

PARECER CONSUBSTANCIADO UFRGS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL / PRÓ- REITORIA DE
PESQUISA -

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Pesquisador: Solange Cristina Garcia

Título da Pesquisa: Biomonitoramento de trabalhadores expostos ocupacionalmente a xenobióticos

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Versão: 4

CAAE: 35357414.9.0000.5347

Área Temática:

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Número do Parecer: 983.018

Data da Relatoria: 26/02/2015

DADOS DO PARECER

Trata-se de projeto de pesquisa vinculado a Dissertação de Mestrado do PPG Ciências Farmacêuticas da UFRGS, tendo como coparticipante o Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul.

O projeto de pesquisa tem como tema o risco à saúde da exposição ocupacional a solventes orgânicos, destacando-se os hidrocarbonetos aromáticos – benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros de xileno (BTEX), agentes químicos potencialmente tóxicos no ambiente ocupacional. Paralelamente, aborda a contaminação atmosférica por poluentes ambientais, o que também pode acarretar doenças. O material particulado, formado por partículas sólidas ou líquidas, suspensas no ar, juntamente com outras substâncias, tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), constituem importantes poluentes ambientais. Estudos têm mostrado que HPA podem contribuir para o desenvolvimento de câncer, além de apresentarem efeitos embriotóxico e teratogênico. O estudo insere-se em ‘uma proposta em toxicologia clínico-laboratorial ocupacional’. Pretende estudar indivíduos

expostos ocupacionalmente a essas substâncias, compreendendo frentistas de postos de gasolina e taxistas.

Apresentação do Projeto:

Objetivo da Pesquisa: Este estudo tem, como objetivo, 'avaliar as alterações imunológicas e o dano genético em trabalhadores ocupacionalmente expostos a diferentes níveis de BTX e aos HPAs e sua inter-relação com os danos cardiovasculares

Patrocinador Principal:

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria -
Campus Centro

Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060

Telefone: (51)3308-3738

UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE

Fax: (51)3308-4085

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foram descritos riscos e benefícios da pesquisa para os participantes, nos diferentes documentos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo observacional. Serão analisados dados obtidos de 3 grupos. O primeiro será constituído por atendentes de postos de combustíveis e/ou frentistas de Porto Alegre (n=50), representando indivíduos expostos ocupacionalmente, de forma crônica, a solventes presentes na gasolina e poluentes atmosféricos. O segundo grupo será constituído por motoristas de táxis da cidade de Porto Alegre (n=50), correspondendo a indivíduos expostos ocupacionalmente, de forma crônica, a poluentes ambientais. O terceiro grupo, considerado controle (n=50), será composto por indivíduos com atividades laborais administrativas, sem exposição ocupacional frente a xenobióticos. Os voluntários serão pareados por sexo, idade e hábitos de vida. O recrutamento

desses indivíduos se dará por meio de fixação de cartazes em locais nos quais transitam. Foi anexado modelo de cartaz. Será aplicado questionário, abordando hábitos de vida, zona da cidade em que se localiza o ambiente de trabalho e aspectos voltados à predisposição hereditária. Será realizada quantificação de compostos orgânicos voláteis BTX (Benzeno, Tolueno e Xileno) e de biomarcadores urinários dos compostos BTX. Para avaliação de biomarcadores de genotoxicidade, serão realizados Ensaio Cometa por fluorescência e com enzimas de reparo de DNA, Ensaio de Micronúcleo e avaliação do marcador biológico 8-oxoguanina (ELISA). Serão, ainda, realizados hemograma completo, quantificação de marcadores inflamatórios, expressão de moléculas de adesão, dosagem de NTPDases e ecto-5`nucleotidase, avaliação de polimorfismo enzimático, estresse oxidativo, parâmetros de nefro e hepatotoxicidades. Os indivíduos serão submetidos a avaliação clínica e cardiovascular, incluindo a realização de ecocardiograma bidimensional, com Doppler a cores, e ecografia das carótidas.

Segundo os pesquisadores, o pagamento dos custos dos referidos exames e do deslocamento dos participantes (ressarcimento de despesas de transporte) será realizado por meio de proventos vindos de projetos e apoio da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Foi realizado cálculo amostral, tendo sido estimada amostra de 110 participantes, compreendendo 42 frentistas, 42 taxistas e 26 indivíduos controle. Medidas de biossegurança a serem adotadas para realização das análises laboratoriais previstas e para descarte de materiais e resíduos foram mencionadas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram anexados: (a) Parecer Consubstanciado de Aprovação pela Comissão de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, datado de 16 de setembro de 2013, (b) Protocolo para Avaliação de Projetos Científicos do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul / Fundação Universitária de Cardiologia, datado de dezembro de 2013, (c) Termo de Concordância do médico do Instituto de Cardiologia que realizará a avaliação clínica e cardiovascular dos participantes, datado de outubro de 2012, (d) Folha de rosto, datada de 25 de agosto de 2014, (e) TCLE.

Recomenda-se aprovação pelo CEP-UFRGS.

Recomendações:

O presente projeto atende ao que está previsto na Resolução do Conselho Nacional de Saúde número 466, de 12 de dezembro de 2012, sendo, portanto, recomendada sua aprovação pelo CEP/UFRGS.

Salienta-se que o projeto deverá ser encaminhado à instituição coparticipante, a saber, o Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Não

Necessita Apreciação da CONEP:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

PORTO ALEGRE, 12 de Março de 2015

Assinado por:

MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

ANEXO IV

Carta de Confirmação da Submissão do Artigo

From: <toxres@rsc.org>

Date: 2015-05-26 8:03 GMT-03:00

Subject: Acknowledgement of your Submission to Toxicology Research - TX-ART-05-2015-000157

To: solange.garcia@ufrgs.br

Cc: anebarth.88@gmail.com, natalia.brucker@gmail.com, angelammoro@yahoo.com.br, sabrinascimento@hotmail.com, goethel_63@hotmail.com, caro_souto@hotmail.com, rafael.fra@hotmail.com, elisa-sauer@hotmail.com, lualtk@gmail.com, basdacosta@hotmail.com, duartmm@hotmail.com, camilabrazm@gmail.com, tiana.tasca@ufrgs.br, solange.garcia@ufrgs.br

26-May-2015

Dear Professor Garcia:

TITLE: ICAM-1, cytokines and NTPDases activity contributing to homeostatic abnormalities and genotoxicity in taxi drives

Thank you for your submission to Toxicology Research, published by the Royal Society of Chemistry. This is an automatic acknowledgement that you have uploaded your files to our online submission system. Your manuscript ID is: TX-ART-05-2015-000157

Your manuscript will be passed to an editor for initial assessment as soon as possible. If there are any problems with your submission we will contact you.

Please indicate the above manuscript ID when you contact us about this submission. You can check the status of your manuscript by logging into your Author Centre (<https://mc.manuscriptcentral.com/tx>).

The Royal Society of Chemistry is a member of CrossCheck. Your submission may be compared against the CrossCheck database using the iThenticate plagiarism detection software. For further information, please see

here: <http://www.rsc.org/Publishing/Journals/guidelines/EthicalGuidelines/CrossCheck/CrossCheck.asp>

Please contact us if we can be of any assistance.

Yours sincerely,

Toxicology Research Editorial Office

toxres@rsc.org