



**JULIANA SMELAN WILSON**

**Influência do material particulado do diesel (DEP) junto aos hormônios sexuais femininos estrogênio e progesterona em células do brônquio humano.**

**São Paulo**

**2024**

**JULIANA SMELAN WILSON**

**Influência do material particulado do diesel (DEP) junto aos  
hormônios sexuais femininos de estrogênio e progesterona em  
células do brônquio humano**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental  
Orientadora: Dra. Mariangela Macchione

**São Paulo**

**2024**

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

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

©reprodução autorizada pelo autor

Wilson, Juliana Smelan

Influência do material particulado do diesel (DEP) junto aos hormônios sexuais femininos de estrogênio e progesterona em células do brônquio humano / Juliana Smelan Wilson; orientadora, Mariangela Macchione. -- São Paulo, 2024.

Tese (Doutorado) - Programa de Fisiopatologia Experimental, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2024.

1. Poluição do ar 2. Material particulado 3. Células de pulmão 4. Estrogênios 5. Progesterona 6. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. I. Macchione, Mariangela, orient. II. Título

USP/FM/DBD-006/24

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: Wilson, Juliana Smelan

Título: Influência do material particulado do diesel (DEP) junto aos hormônios sexuais femininos de estrogênio e progesterona em células do brônquio humano.

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_

**Ao meu filho Gabriel que é minha força motriz de todos os dias e me faz ser uma mulher forte, estudante, professora, cientista e em especial MÃE!**

## AGRADECIMENTOS

A Dra. Mariangela Macchione por desde o início acreditar em mim e me autorizar a fazer os experimentos mais malucos possíveis. Pela confiança, carinho, dedicação e amizade que você transborda a seus alunos.

As professoras Naomi, Regiani, Juliana, e as amigas Camila e Geisa da “salinha” que dividiram comigo este momento com uma linda amizade e tornou tudo mais ameno.

A todos os outros colegas e alunos que passaram pelo lab e me ensinaram muito como a Kelly, Kevin, Gabis, e muitos os outros que passaram por aqui. Em especial a Juliane por ser meu braço direito nos experimentos e principalmente pelo toque especial de nossas conversas espiritualistas, científicas, apocalípticas e pelos milhares de cafés. E também a maravilhosa Dani por ser a companheira e amiga de laboratório mais competente que conheço e por estar sempre lá formulando teorias e estratégias de investigação comigo, no momento que o experimento parecia perdido.

Por colaboradores de fora do nosso laboratório que contribuíram muuuito com meu trabalho, como as queridas Dra. Walcy e Dra. Paula, Dra. Elia, Dr. Ari, Dr. Laura, Dr. Bryan, Dr. Fernanda, Dra. Monique, Pedro, Dra. Valéria e Dra. Carolina.

À CAPES e a FAPESP, pela concessão da bolsa de doutorado direto e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A toda a minha família e amigos que me ajudaram direta e indiretamente, em especial aos meus irmãos Luis, Walter e Renata pelo amor e união que criamos com os acontecimentos da vida. E pelos meus pais, que onde quer que estejam, sei que estão nos guiando e emanando um amor incondicional por nós e por fim, o mais que especial meu filho Gabriel, que é maravilhoso e me torna uma mulher mais forte e mão mais coruja a cada dia de minha vida.

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido.  
Agora é hora de compreender mais para temer menos."

**(Marie Curie)**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1. POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA	3
2.2. MATERIAL PARTICULADO DE DIESEL E SEUS COMPOSTOS ORGÂNICOS	6
<b>2.3 VIA CELULAR DOS XENOBIÓTICOS</b>	<b>8</b>
<b>2.4 HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS</b>	<b>10</b>
2.5 VIA DO ESTROGÊNIO	12
2.6 VIA DA PROGESTERONA	14
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>17</b>
<b>4.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DO DIESEL</b>	<b>17</b>
4.2 CULTURA CELULAR DE BEAS-2B	17
4.2.1 <i>Cultura celular de A549</i>	18
4.3 CITOTOXICIDADE DO DEP EM CÉLULAS BEAS-2B E A549	19
4.4 PADRONIZAÇÃO DOS HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS	20
4.5 EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS AO DEP E HORMÔNIOS	20
4.6 EXTRAÇÃO DE RNA	21
4.7 RT-PCR (CONVENCIONAL)	21
4.9 ENSAIO COM GENE REPÓRTER POR LUCIFERASE	23
<b>5. LUMINEX®</b>	<b>26</b>
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>28</b>
5.2 CITOTOXICIDADE DO DEP EM CÉLULAS BEAS-2B	30
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
<b>9. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>61</b>
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>62</b>
<b>ANEXOS</b>	



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A549	Célula do epitélio pulmonar de carcinoma humano
Ace	Acenaftaleno
AhR	Receptor de aril hidrocarboneto
AKT	Serina treonina quinase
Ant	Antraceno
AP-1	Proteína ativadora 1
AR	Receptor de andrógeno
ARNT	Translocador nuclear do receptor de aril hidrocarboneto
BaA	Benzo(a)antraceno
BaP	Benzo(a)pireno
BbF	Benzo(f)fluoranteno
BEAS-2B	Células imortalizadas do epitélio brônquico humano
BkF	Benzo(k)fluoranteno
cDNA	DNA complementar
CETESB	Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental
cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico
CO	Monóxido de carbono
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CT	Controle
CYP	Citocromo P450
CYP1A1	Citocromo P450, família1, subfamília A, polipeptideo 1
DBA	Cromógeno 3,3 Diamenobenzidine
DEP	Material particulado do Diesel
DMEN-F12	Meio Eagle modificado por Dulbecco e nutrientes F-12

DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
E2	17 $\beta$ -estradiol
EDTA	Solução de etileno-diamino-tetracetato de tetrasódio
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ERE	Elemento responsivo do estrogênio
ER $\alpha$	Receptor de estrogênio alpha
ER $\beta$	Receptor de estrogênio beta
FC	Fibrose cística
Fe	Fenantreno
FMC	Fumaça
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GUS $\beta$	Beta-glucuronidase
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
Hsp90	proteína de choque térmico 90
IFN $\gamma$	Interferon gama
IGF-I	Fator de crescimento tipo insulina I
IL-17	Interleucina 17
IL-1b	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
InP	Indeno (1,2,3-cd) pireno
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
MCF-7	Célula de câncer de mama humano
mRNA	RNA mensageiro

NFK- $\beta$	Fator nuclear kappa beta
NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrogênio
O <sub>3</sub>	Ozônio
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PKA	Proteína Quinase A
PM <sub>10</sub> e PM <sub>2,5</sub>	Material particulado com diâmetro de 10 e de 2,5
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PRE	Elemento responsivo da progesterona
PRG OU P <sub>4</sub>	Progesterona
PR $\alpha$	Receptor de progesterona alpha
PR $\beta$	Receptor de progesterona beta
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RPL13a	Proteína ribossômica 60S L13a
SFB	Soro fetal bovino
SO <sub>2</sub>	Dióxido de enxofre
Sp1	Fator de transcrição sp1
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
TBS	Solução Salina Tamponada com Tris
TGF $\alpha$	Fator de transformação do crescimento alpha
TGF $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alpha
VEGF	Factor de crescimento endotelial vascular
WHO	World Health Organization
XAP2	Proteína de interação do receptor de aril
XRE	Elemento responsivo dos xenobióticos

## LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	Celsius
$\mu\text{g}/\text{m}^3$	micrograma por metro cúbico
$\mu\text{g}/\text{ml}$	micrograma por mililitro
$\mu\text{l}$	microlitro
$\mu\text{m}$	micrometro
$\mu\text{M}$	micro molar
g	grama
M	molar
$\text{mg}/\text{ml}$	miligrama por mililitro
ml	mililitro
$\text{ng}/\text{m}^3$	nanograma por metro cúbico
nM	nano molar
nm	nanomêtro
pM	pico molar
rpm	rotação por minuto

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estruturas moleculares de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) semelhantes a molécula do 17 $\beta$ -estradiol (1). Na seqüência as moléculas de HPAs são: 1-hidroxonaftaleno (2), 2- hidroxonaftaleno (3), 2-hidroxifenatrene (4), 2 -hidroxocris (Adaptado de Clemons et. al., 1998)..... 7
- Figura 2:** Esquema da via dos xenobióticos. (Fijten et.al. 2021). ..... 9
- Figura 3:** Esquema das sete principais classes de esteroides que são derivadas da estrutura do colestano. (Adaptado de: Norman & Litwack, 1997)..... 11
- Figura 4:** Esquema das vias de sinalização estrogênica. (Zon et. al. 2023). ..... 13
- Figura 5:** Esquema simplificado das vias da progesterona. (Adaptado de: Pedroza et. al.,2020)..... 15
- Figura 6:** Etapas de expansão das células do epitélio brônquico humano ..... 18
- Figura 7:** Esquema da placa para exposição a diferentes concentrações de DEP por 8 horas. .... 19
- Figura 8 :** Esquema da placa de exposição de 3 dias aos hormônios (E2 e PRG) e após este período por 2 horas ao DEP..... 21
- Figura 9:** Vetor recombinante com *luciferase "firefly"* e a região promotora ERE feita no vectorbuilder.com. .... 244
- Figura 10:** Vetor recombinante com *luciferase "firefly"* e região promotora XRE feita no vectorbuilder.com. .... 244
- Figura 11:** Vetor recombinante com luciferase "firefly" e região promotora PRE feita no vectorbuilder.com. .... 25
- Figura 12:** Análise da porcentagem de células vivas expostas apenas ao meio (CT); 10  $\mu$ g/mL de DEP; 50  $\mu$ g/mL de DEP e 100  $\mu$ g/mL de DEP..... 30
- Figura 13:** Resultado da contagem de células BEA-2B pelo contador de células *CountessII Live/Dead* da *Invitrogen*® após exposição de 10  $\mu$ g /ml de DEP por 8 horas. .... 31

<b>Figura 14:</b> Análise das concentrações de 17β-estradiol (E2) em células BEAS-2B (100pM, 1nM e 10nM).....	32
<b>Figura 15:</b> Análise dos tempos de exposição ao 17β-estradiol (E2) em células BEAS-2B (100pM, 1nM e 10nM). .....	33
<b>Figura 16:</b> Porcentagem (0 a 10 no eixo x) de RNAm do receptor de AhR em células BEAS-2B expostas depois de 2 horas aos hormônios e ao DEP à .....	34
<b>Figura 17:</b> Porcentagem (0 a 10 no eixo x) de RNAm do receptor de ERβ em células BEAS-2B expostas depois de 2 horas aos hormônios e ao DEP à .....	35
<b>Figura 18 :</b> Porcentagem (0 a 10 no eixo x) de RNAm do receptor de PR em células BEAS-2B expostas depois de 2 horas aos hormônios e ao DEP à .....	35
<b>Figura 19:</b> Receptor de AhR em células BEAS-2B x400. ....	36
<b>Figura 20:</b> Receptor de ERβ em células BEAS-2B x400 .....	37
<b>Figura 21:</b> Receptor de PR em células BEAS-2B x400 .....	38
<b>Figura 22:</b> Imagens que mostram a translocação dos receptores de AhR, ERβ e PR do citoplasma para o núcleo em células BEAS-2B (X400).....	39
<b>Figura 23:</b> Atividade dos promotores de interesse associadas ao gene da “ <i>luciferase</i> ” em células BEAS-2B geneticamente modificadas.....	40
<b>Figura 24:</b> Atividade dos promotores de interesse associadas ao gene da “ <i>luciferase</i> ” em células A549 geneticamente modificadas.. .....	40
<b>Figura 25:</b> Representação gráfica em blox-plot mostrando o efeito sobre as citocinas GM-CSF, IL-10, IL-1β, IL-6, RANTES e TNF-α, quando células BEAS-2B foram expostas a: Meio de cultura (CT), Particulado da exaustão de diesel (DEP), Estrogênio (E2), Progesterona (P4), E2+DEP, P4+DEP. ....	42
<b>Figura 26:</b> Representação gráfica em blox-plot mostrando o efeito sobre as citocinas GM-CSF, IL-10, IL-1β, IL-6, RANTES e TNF-α, quando células A549 foram expostas a: Meio de cultura (CT), Particulado da exaustão de diesel (DEP), Estrogênio (E2), Progesterona (P4), E2+DEP, P4+DEP. ....	43
<b>Figura 27:</b> Ação do estrógeno no sistema imune .....	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Padrões do Estado de São Paulo para a qualidade do ar.....	5
<b>Tabela 2:</b> Sequências dos oligonucleotídeos estudadas. <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
<b>Tabela 3:</b> Teor de HPAs na amostra de DEP.....	45
<b>Tabela 4:</b> HPAs em maiores concentrações na amostra de DEP.....	46
<b>Tabela 5:</b> HPAs mais carcinogênicos na amostra de DEP.....	46

## RESUMO

Wilson JS. Influência do material particulado do diesel (DEP) junto aos hormônios sexuais femininos de estrogênio e progesterona em células do brônquio humano [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

Este estudo tem como objetivo investigar se as partículas de escapamento de diesel (DEP) sozinhas ou associadas aos hormônios 17 $\beta$ -estradiol (E2) e progesterona (P4) podem interagir e alterar as respostas celulares nas vias hormonais e xenobióticas em células brônquicas humanas (BEAS-2B) e carcinoma pulmonar humano (A549) nas seguintes condições: controle (CT); 10  $\mu$ g/ml DEP; 1 nM E2; 10 nM P4; 1 nM E2 + 10  $\mu$ g/ml DEP e 10 nM P4 + 10  $\mu$ g/ml DEP, com 72 horas para os hormônios e 8 horas para DEP. Foram estudadas a expressão e localização dos receptores ER $\beta$ , PR $\beta$  e AhR, utilizando a técnica de imunofluorescência; a ativação das regiões promotoras ERE, PRE e XRE foi avaliada usando o ensaio do gene "repórter" luciferase e foram mensuradas as seguintes citocinas: GM-CSF, IL-6, IL-10, IL-1B, RANTES e TNF- $\alpha$  para determinar a resposta inflamatória usando o ensaio multiplex. Os resultados mostraram a translocação de ER $\beta$ , PR $\beta$  e AhR do citoplasma para o núcleo na presença de E2 e E2+DEP, em ambas as células, mas o mesmo não ocorreu quando BEAS-2B foram expostas a P4 + DEP. Os resultados relacionados a XRE e PRE mostraram ativação de suas regiões promotoras quando as células foram expostas a DEP e uma resposta de inibição do promotor para DEP + P4. ERE não apresentou nenhuma resposta significativa. A exposição a E2 e E2+DEP aumentou citocinas pró-inflamatórias em BEAS-2B, enquanto DEP e E2+DEP aumentaram citocinas pró-inflamatórias em A549 e a citocina anti-inflamatória IL-10 respondeu a E2 em ambas as células. BEAS-2B apresentaram respostas celulares mais intensas quando expostas a E2 + DEP, com aumento na expressão dos receptores ER $\beta$  e PR, juntamente com um aumento concomitante nas citocinas inflamatórias GM-CSF, IL-6 e TNF- $\alpha$ . A região promotora ERE não foi ativada, mas isso não indica que DEP não interfira na via estrogênica, talvez por outro caminho. Como conclusão, este estudo corrobora a hipótese de que a poluição do ar interfere nas vias dos hormônios sexuais femininos, potencialmente afetando a saúde da população, especialmente das mulheres.

**Palavras Chaves:** Poluição do ar. Material particulado. Células de pulmão. Estrogênios. Progesterona. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.



## ABSTRACT

Wilson JS. Influence of diesel particulate matter (DEP) on female sex hormones estrogen and progesterone in human bronchial cells [thesis]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2024.

This study aims to investigate whether diesel exhaust particles (DEP) alone or associated with the hormones 17 $\beta$ -estradiol (E2) and progesterone (P4) can interact and alter cellular responses in the hormones and xenobiotic pathways in human bronchial cells (BEAS-2B) and human lung carcinoma (A549) in the following conditions: control (CT); 10  $\mu$ g/ml DEP; 1 nM E2; 10 nM P4; 1 nM E2+ 10  $\mu$ g/ml DEP and 10 nM P4+ 10  $\mu$ g/ml DEP with 72 hours for hormones and 8 hours for DEP. Were studied the expression and localization of ER $\beta$ , PR $\beta$  and AhR receptors, using the immunofluorescence technique; the activation of the promoter regions ERE, PRE and XRE was using the luciferase "reporter" gene assay and were measured the following cytokines: GM-CSF, IL-6, IL-10, IL-1B, RANTES and TNF- $\alpha$  to determine the inflammatory response using the multiplex assay. The results showed ER $\beta$ , PR $\beta$  and AhR translocation from cytoplasm to nucleus in the presence of E2 and E2+DEP, to both cells, but the same did not occur when BEAS-2B were exposed P4 + DEP. The results related with XRE and PRE-showed activation of their promoter region when cells were exposed to DEP and showed a promoter inhibition response to DEP + P4. ERE did not show any significant response. The exposition of E2 and E2+DEP increased pro-inflammatory cytokines in BEAS-2B while DEP and E2+DEP increased pro-inflammatory cytokines in A549 and the anti-inflammatory cytokine IL-10 responded to E2 in both cells. BEAS-2B present their cellular responses more intensely when exposed to E2 + DEP and an increase in the expression of ER $\beta$  and PR receptors with concomitant increase in inflammatory cytokines GM-CSF, IL-6 and TNF- $\alpha$ . ERE promoter region was not activated, but it does not indicate that DEP does not interfere with the oestrogen pathway, maybe for another way. As conclusion, this study corroborates the hypothesis that air pollution interferes with the pathways of female sex hormones, potentially interfering with the health of the population, especially women.

Keywords: Air pollution. Particulate matter. Lung cells. Estrogens. progesterone. Polycyclic aromatic hydrocarbons.

## 1. INTRODUÇÃO

Os estudos relacionados a poluição atmosférica são de extrema relevância, para que haja um maior conhecimento sobre seus impactos na saúde humana.

Frente a esta realidade, nos últimos anos, diversos estudos apontam para uma maior prevalência e gravidade destas doenças entre as mulheres do que nos homens (Sathish et al., 2015). Nos Estados Unidos foi observado que 60% dos pacientes adultos com asma eram do sexo feminino e além disso, houve um aumento no número de mulheres com DPOC e uma menor expectativa de vida em pacientes deste sexo que apresentavam um quadro de fibrose cística (Tam et. al, 2011).

Se sugere então, que a patogênese e a incidência de doenças pulmonares possam ser influenciadas por fatores sexuais, existindo evidências epidemiológicas consideráveis para um papel do sexo na suscetibilidade e gravidade de uma série de doenças pulmonares (Sathish et al., 2015). Os grandes responsáveis por uma maior suscetibilidade dos sexo feminino às doenças respiratórias podem ser os hormônios sexuais. Embora os esteroides sexuais sejam produzidos principalmente pelas gônadas, há evidências que mostram a produção local deles em tecidos periféricos de órgãos não reprodutivos, como o coração, múltiplos leitos vasculares, mama, cérebro e até mesmo o pulmão (Labrie et. al., 2003; Labrie et al., 1991; Luu-The & Labrie, 2010).

A importância dos efeitos dos esteroides sexuais no epitélio brônquico reside na modulação de sua função de barreira, suas respostas a estímulos externos, incluindo patógenos e alérgenos, e como um modulador do tônus das vias aéreas. No entanto, poucos estudos têm examinado o efeito dos esteroides sexuais no epitélio brônquico. Em via aérea imortalizada em linhagens epiteliais, tanto ER $\alpha$  (Ivanova et al., 2010; Kirsch et al., 1999) e ER $\beta$  (Ivanova et al., 2010) foram relatados, com ER $\beta$  sendo a isoforma predominante. No entanto, estudos recentes têm encontrado em tecido epitelial brônquico humano isolado, bem como em células individuais, a expressão abundantemente comparável de ER $\alpha$  e ER $\beta$  (Townsend et al., 2011).

Por outro lado, a poluição atmosférica apresenta em sua constituição o material particulado, composto por partículas grossas, finas e ultrafinas que tem 40% de sua composição de descarga de motores a Diesel (Diesel Exhaust Particles – DEP), que são formados por partículas ultrafinas (0,05 a 0,1  $\mu\text{m}$ ) capazes de alcançar porções mais profundas das vias respiratórias (Hartz et. al., 2008; Pierdominici et. al., 2014). Esse material particulado da exaustão à Diesel (DEP), está associado a diversos compostos orgânicos e inorgânicos que estão adsorvidos na superfície de um núcleo central de carbono. Alguns exemplos são, metais, enxofres, nitrato, monóxido de carbono, aldeídos e vários hidrocarbonetos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), oxi-HPAs e nitro-HPAs (Saldiva et al.; 2002; Laks et. al., 2008; Wichmann, 2007).

Devido a essa característica o DEP pode atuar como um liberador endócrino e levar a liberação de esteroides gonodais como os estrógenos (KUIPER et al., 1998), podendo causar um desequilíbrio hormonal e gerar um quadro desfavorável à saúde. A premissa por trás da ruptura do equilíbrio endócrino é que estas substâncias, os HPAs, apresentam similaridade estrutural com o estrogênio e a progesterona (Clemons et al., 1998; Wang et al. 2004; Klein et al., 2006). E esta semelhança têm demonstrado possuir atividade estrogênica (Hayakawa et al., 2007). E por fim, um estudo feito por Yoshizaki et. al (2016) observaram que o material particulado da exaustão de diesel (DEP) possui compostos orgânicos, que podem interferir nas vias metabólicas do estrogênio e da progesterona, além de atuarem na via dos xenobióticos (via aril-hidrocarboneto - AhR).

Sendo assim, este projeto visa estudar de que forma estes compostos orgânicos presentes no DEP podem influenciar nas vias metabólicas dos hormônios sexuais femininos (estrogênio e progesterona) de forma isolada ou associado a estes esteroides.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA

A poluição atmosférica tem aumentado de forma desenfreada especialmente em grandes centros urbanos ao redor do mundo. A *World Health Organization* (WHO) (2016), mostra que 91% da população mundial vive em lugares que a qualidade do ar, excedem os limites de poluentes de acordo com as diretrizes estabelecidas pela organização e como consequência aproximadamente 4,2 milhões de pessoas morrem todo ano devido a poluição atmosférica ambiental. Muitos estudos já mostram claramente que a poluição atmosférica decorrida de ações antropogênicas é emitida por fontes como a queima incompleta de combustíveis fósseis; atividades agrícolas e industriais, e atividade de usinas térmicas (Santos, 2004). A poluição atmosférica formada a partir dessas fontes pode ser classificada em duas categorias: poluentes primários - que são lançados diretamente para a atmosfera e os poluentes secundários - que se formam na atmosfera por reações químicas entre os poluentes primários e substâncias já presentes no ar (Galvão-Filho, 1989; CETESB, 2016). As substâncias derivadas destes poluentes podem ser principalmente: partículas inaláveis grossas (PM<sub>10</sub>), partículas inaláveis finas (PM<sub>2,5</sub>), fumaça (FMC), ozônio (O<sub>3</sub>), monóxido de carbono (CO), dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>) e dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>). Além dessas substâncias a presença de metais pesados, compostos halogenados, compostos orgânicos, compostos orgânicos voláteis, gases e vapores que são resultantes da queima incompleta e evaporação de combustíveis (CETESB, 2016).

No Brasil, a cidade de São Paulo é um dos maiores centros urbanos e conseqüentemente um dos locais que concentram a maior quantidade de poluentes atmosféricos ambientais. Desde a década de 60, com o aumento da poluição, medidas começaram a ser tomadas para que a qualidade do ar fosse monitorada. Atualmente a CETESB faz esse monitoramento na região metropolitana com estações para medições diárias dos níveis de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), fumaça, material particulado inalável (PM<sub>10</sub> e PM<sub>2,5</sub>), ozônio (O<sub>3</sub>), óxidos de nitrogênio – (NO, NO<sup>2</sup> e NO<sub>x</sub>), monóxido de carbono – (CO), oxidantes fotoquímicos e compostos halogenados, além dos parâmetros meteorológicos

como direção e velocidade do vento, temperatura e umidade relativa do ar. Essas medições seguem o decreto estadual nº 59113/2013 que estabelece os seguintes critérios:

1. Metas Intermediárias – (MI) estabelecidas como valores temporários a serem cumpridos em etapas, visando à melhoria gradativa da qualidade do ar no Estado de São Paulo, baseada na busca pela redução das emissões de fontes fixas e móveis, em linha com os princípios do desenvolvimento sustentável;

2. Padrões Finais (PF) – Padrões determinados pelo melhor conhecimento científico para que a saúde da população seja preservada ao máximo em relação aos danos causados pela poluição atmosférica.

(CETESB, 2016)

A partir desses critérios, os padrões da qualidade do ar vigentes no momento estão distribuídos por  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  de acordo com cada tipo de poluente na como na (Tabela 1) abaixo:

**Tabela 1:** Padrões do Estado de São Paulo para a qualidade do ar.

Padrões Estaduais de Qualidade do Ar (Decreto Estadual nº 59113 de 23/04/2013)					
Poluente	Tempo de Amostragem	MI1 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	MI2 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	MI3 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	PF ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
partículas inaláveis (MP <sub>10</sub> )	24 horas MAA <sup>1</sup>	120 40	100 35	75 30	50 20
partículas inaláveis finas (MP <sub>2,5</sub> )	24 horas MAA <sup>1</sup>	60 20	50 17	37 15	25 10
dióxido de enxofre (SO <sub>2</sub> )	24 horas MAA <sup>1</sup>	60 40	40 30	30 20	20 -
dióxido de nitrogênio (NO <sub>2</sub> )	1 hora MAA <sup>1</sup>	260 60	240 50	220 45	200 40
Ozônio (O <sub>3</sub> )	8 horas	140	130	120	100
monóxido de carbono (CO)	8 horas	-	-	-	9 ppm
fumaça* (FMC)	24 horas MAA <sup>1</sup>	120 40	100 35	75 30	50 20
partículas totais em suspensão* (PTS)	24 horas MGA <sup>2</sup>	-	-	-	240 80
Chumbo** (Pb)	MAA <sup>1</sup>	-	-	-	0,5

Poluentes como óxido de nitrogênio e compostos orgânicos voláteis tem como principal fonte antropogênica o tráfego rodoviário, que representa uma média de 40% de todas as fontes poluentes. O transporte rodoviário inclui automóveis, ônibus, caminhões, aviões, equipamentos agrícolas e de construção civil, trens e navios. Dentre esses, os transportes que possuem

motores a diesel, são diretamente a maior fonte de poluente capaz de provocar riscos à saúde humana (Air Quality Expert Group, 2005; Galvão-Filho, 1989; Wichmann, et. al. 2007).

## **2.2. MATERIAL PARTICULADO DE DIESEL E SEUS COMPOSTOS ORGÂNICOS**

O diesel é constituído por elevados níveis de material particulado, que se formam a partir de altas temperaturas durante a queima deste combustível (Braun; Appel; Schmal, 2004). Essas partículas da exaustão de motores a diesel (Diesel Exhaust Particles – DEP) geram partículas ultrafinas provenientes de sólidos ou líquidos, na forma de poeira, neblina, aerossol, fumaça, fuligem etc., que podem permanecer suspensa no ar e percorrer longas distâncias. A faixa de tamanho dessas partículas podem variar de partículas inaláveis grosseiras de 10  $\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{10}$ ) a 2,5  $\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2,5}$ ) de diâmetro, partículas inaláveis finas menores que 2,5  $\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2,5}$ ) em seu diâmetro aerodinâmico e partículas com tamanho, denominadas partículas ultrafinas (UFP ou  $\text{PM}_{0,1}$ ), que possuem um diâmetro inferior a 0,1  $\mu\text{m}$  (CETESB, 2016; Ghelfi, 2011; Cançado et al., 2006). Todas elas, podem causar danos à vegetação, deteriorar a visibilidade, contaminar o solo e a água e alcançar porções mais profundas das vias respiratórias dos seres vivos (CETESB, 2016; Hartz et. al., 2008).

Os danos causados pelas partículas de DEP estão associados a diversos compostos orgânicos e inorgânicos que estão adsorvidos na superfície de um núcleo central de carbono. Metais, enxofres, nitrato, monóxido de carbono, aldeídos e vários hidrocarbonetos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), oxi-HPAs e nitro-HPAs são substâncias presente no DEP (Saldiva et al.; 2002; Laks et. al., 2008; Wichmann, 2007).

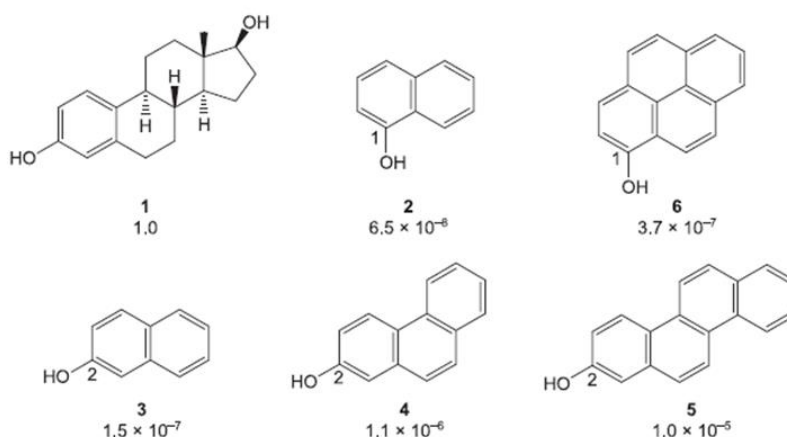
A presença de HPAs no material particulado foi relatada por alguns autores como Martins et. al, (2002), Vasconcellos et. al (2003) e Seriani et. al. (2016). Eles relacionaram altos valores desses compostos ao aumento do tráfego urbano de veículos a diesel na cidade de São Paulo.

Os hidrocarbonetos possuem uma alta toxicidade e a capacidade de se bioacumular no organismo, ou seja, essas substâncias podem ficar retidas e serem absorvidas pelos seres vivos. A bioacumulação dos HPAs pode causar

danos no material genético até a incidência de cancer (U.S. Environmental Protection Agency, 2010).

Outra característica muito interessante, é que eles também podem atuar como disruptores endócrino ambientais, e amplamente definidos como agentes exógenos que interferem com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais que são responsáveis pela manutenção da homeostasia e reprodução (Clemons et. al, 1998).

Alguns estudos *in vitro* afirmam que compostos hidroxilados como o benzo[a]pireno, hidroxonaftaleno, hidroxifenantrene e o criseno apresentam similaridades estruturais com hormônios esteroides (**Figura 1**) como por exemplo, a molécula do 17 $\beta$  estradiol e que além disso, elas + atividade estrôgenica (Clemons et. al, 1998; Wang et al.; 2004; Klein et. al. 2006; Hayakawa et al., 2007).



**Figura 1:** Estruturas moleculares de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) semelhantes a molécula do 17 $\beta$ -estradiol (1). Na sequência as moléculas de HPAs são: 1-hidroxonaftaleno (2), 2- hidroxonaftaleno (3), 2-hidroxifenantrene (4), 2 -hidroxocris (Adaptado de Clemons et. al., 1998).

Embora os HPA possam funcionar como agonistas de ER, espera-se que eles se liguem preferencialmente ao AhR e desencadeiem a indução de genes como por exemplo, os relacionados ao citocromo P450, que atuam na metabolização destes xenobióticos.

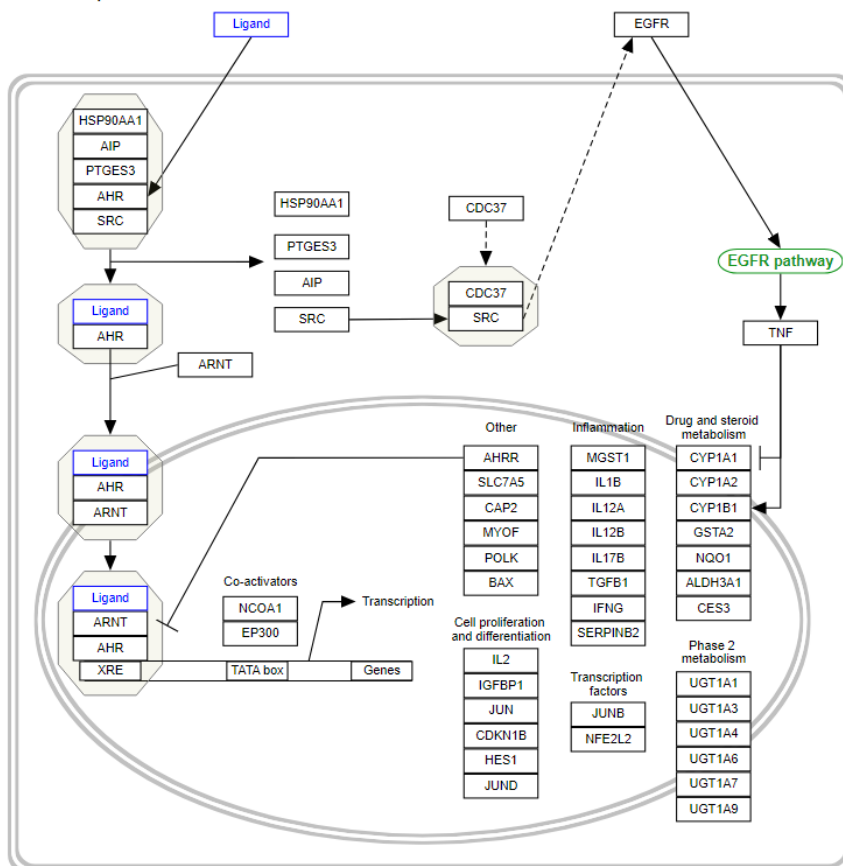


### 2.3 VIA CELULAR DOS XENOBIÓTICOS

A via celular dos xenobióticos é responsável por metabolizar agentes externos que podem ser absorvidos no organismo de diversos animais e dos seres humanos. Dentre estes agentes externos se podem incluir alguns constituintes de plantas, drogas, pesticidas, cosméticos, aromatizantes, fragrâncias, aditivos de alimentos, químicos industriais e poluentes ambientais (Patterson et. al.,2020). A sinalização desta via ocorre principalmente com a atuação de algumas enzimas do citocromo P450 que permitem que as células se adaptem às mudanças químicas em seu ambiente, sua indução enzimática inibe a carcinogênese química porque aumenta a taxa de desintoxicação carcinogênica. Esta indução é um mecanismo de proteção pelo qual a célula pode degradar compostos lipofílicos, que, de outra forma, poderiam se acumular em níveis prejudiciais (Whitlock, 1999).

A entrada dos xenobióticos a esta via se dá pelo receptor aril-hidrocarboneto (AhR), um receptor altamente expresso nos pulmões, no timo, no rim e no fígado (Tirona & Kim, 2005). O AhR pertence a uma família de reguladores transcricionais, sendo predominantemente citosólico. De início ele forma um complexo com as proteínas Hsp90, XAP2 e p23. No momento em que ocorre a ligação desse receptor a um xenobiótico, sua conformação é alterada expondo um sítio amino-terminal com uma sequência de localização nuclear, resultando na sua translocação para o núcleo onde se dissocia do complexo Hsp90 para então formar um heterodímero com sua molécula parceira Arnt (AhR/Arnt). Assim o heterodímero formado AhR/Arnt reconhece o gene de transcrição chamado Elemento Responsivo Xenobiótico (XRE) (Figura 2), remodelando a estrutura da cromatina e facilitando a transcrição de várias proteínas (Pollenz et al, 1994; Mimura, 2003), muitas das quais são enzimas antioxidantes, do citocromo P450 e que são responsáveis por metabolizar os xenobióticos, que constituem seus ligantes.

Name: Aryl hydrocarbon receptor pathway  
 Last Modified: 20220704054409  
 Organism: Homo sapiens



**Figura 2:** Esquema da via dos xenobióticos. (Fijten et.al. 2021).

A resposta aos xenobióticos geralmente relacionadas às enzimas do citocromo P450, podem ocorrer em duas fases diferentes: Fase I e Fase II. A Fase I é mediada em grande parte pelas enzimas do citocromo P450 (CYP), que são uma família de enzimas de xenobióticos responsáveis pela desintoxicação da fumaça de cigarros e outros irritantes ambientais em metabólitos intermediários. Estes metabólitos, por sua vez, são conjugados por enzimas de Fase II e excretados. O passo limitante é na Fase II, assim se houver sub-expressão de enzimas da Fase II ou saturação completa de seus locais de ligação, os metabólitos que não foram processados no CYP acumulam-se no pulmão. Sendo alguns metabólitos intermediários mais tóxicos do que seus constituintes, os pulmões podem sofrer danos oxidativos, um processo chamado

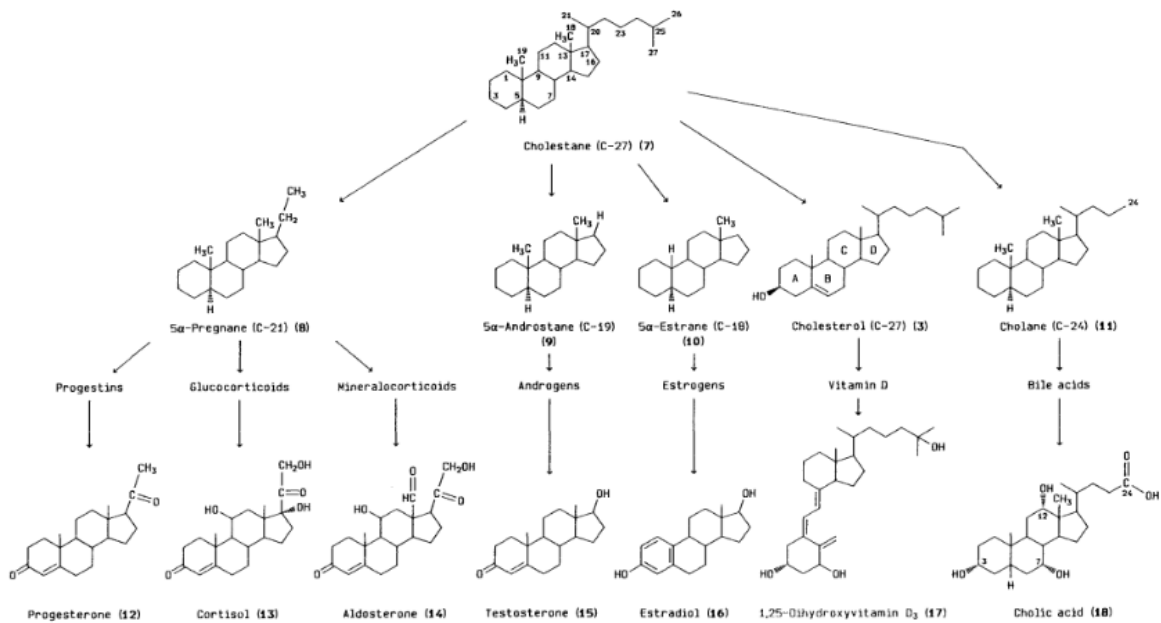
de bioativação, a menos que haja uma coordenação excelente das enzimas da Fase I e da Fase II (Tam, 2011).

Além dos genes relacionados ao citocromo P450, a via dos xenobióticos pode gerar respostas como por exemplo, as de alterações no fator de transformação de crescimento ( $TGF\alpha$ ,  $TGF\beta$ ), fator de necrose tumoral ( $TNF\alpha$ ), interleucina (IL) -1b, IL-2, IL-6, IL-8 e taxas de expressão de interferon-gama ( $IFN\gamma$ ) como foram observados em exposição ao TCDD em alguns estudos (Haarmann-Stemmann, T., Bothe, H., & Abel, J., 2009).

E em estudos *in vivo* Saldiva et al. (1995) demonstraram haver diferença entre camundongos machos e fêmeas em relação ao clearance mucociliar e reologia do muco após a exposição ao material particulado. Yoshizaki et al. (2016) observaram diferentes respostas em relação ao muco ácido, na expressão de CYPs e na expressão dos receptores de  $Er\beta$  e de AhR ao comparar machos e fêmeas expostos à poluição do ar. Observaram também que camundongos fêmeas apresentam respostas inflamatórias crônicas, enquanto os machos apresentam respostas inflamatórias mais agudas.

## **2.4 HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS**

No organismo dos mamíferos existe seis famílias de hormônios esteroides que são classificados por suas bases estruturais e biológicas. São eles os estrógenos, progesteronas (esteroides sexuais femininos), andrógenos (esteroides sexuais masculinos), mineralocorticoides, glicocorticoides e vitamina D. Os hormônios esteroides, são compostos de ciclopentanofenantreno de ocorrência natural cuja síntese começa com o colesterol. (Figura 3) (Norman & Litwack, 1997).



**Figura 3:** Esquema das sete principais classes de esteroides que são derivadas da estrutura do colestano. (Adaptado de: Norman & Litwack, 1997).

Os hormônios estrogênio e progesterona são encontrados em maior quantidade nos indivíduos do sexo feminino e em menor quantidade no masculino, de forma geral esses hormônios regulam o crescimento, a proliferação e a diferenciação celular e o funcionamento de órgãos reprodutores e outros diversos tecidos-alvo, como por exemplo, o pulmão (Mollerup et al., 2002; Slowikowski, et al, 2017).

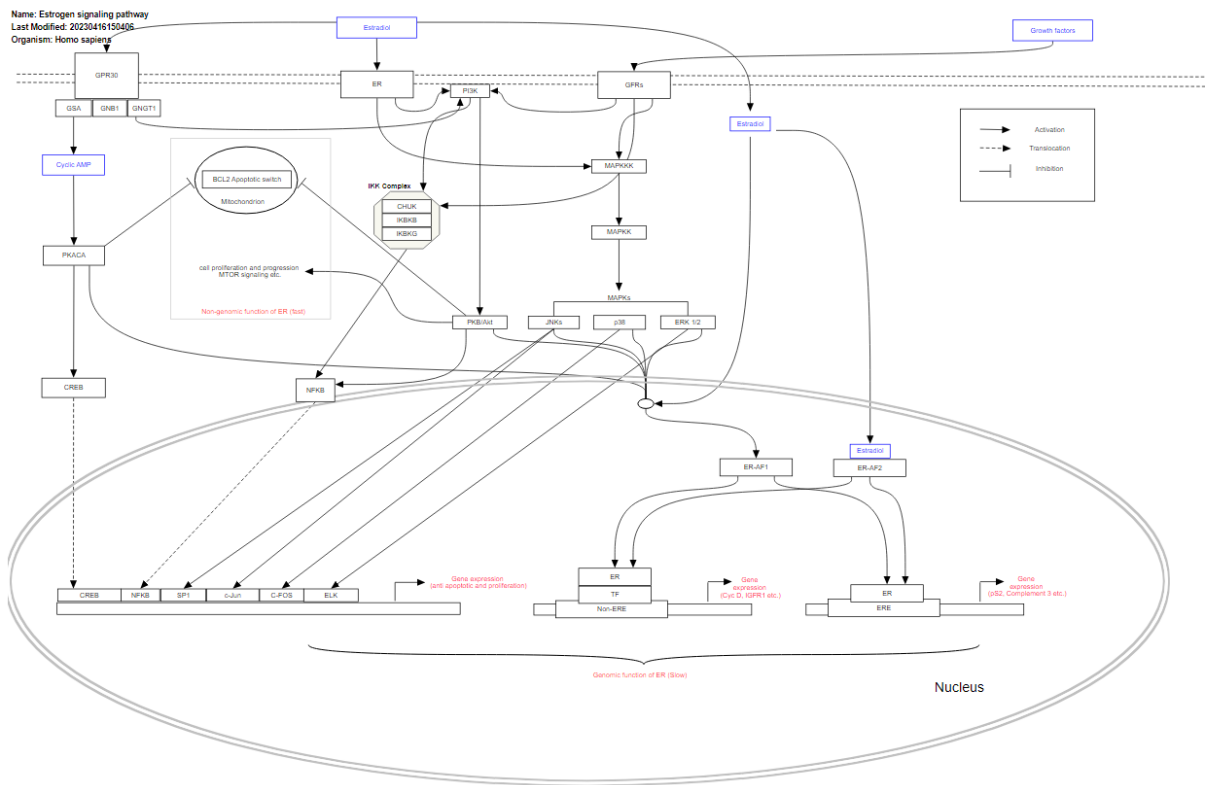
A estrutura molecular da progesterona é  $C_{21}H_{30}O_2$ . Ela é produzida no corpo lúteo, ovário e placenta (Norman & Litwack, 1997).

Já o estrogênio tem a estrutura molecular  $C_{18}H_{24}O_2$  e sua forma mais dominante em humanos é o 17 $\beta$ -estradiol (E2), mas outras formas como a estrona e o estriol também estão presentes (Ascenzi et. al., 2006).

Poucos estudos relatam sobre a atuação destes hormônios no sistema respiratório, mas a maior parte deles tem relacionado o estrogênio e a progesterona ao câncer de pulmão (Slowikowski et al., 2017; Zhang et. al., 2009; Pedroza et. al., 2020). A maior parte destes estudos mostra a existência dos receptores de ER e de PR no tecido pulmonar e em células do brônquio (Mollerup et. al, 2002; Jain et. al. 2012; Grott et. al., 2013).

## 2.5 VIA DO ESTROGÊNIO

A via do estrogênio é responsável por metabolizar hormônios derivados do próprio estrogênio e da progesterona. Seus efeitos biológicos ocorrem inicialmente por meio de dois subtipos de receptores de estrogênio (ER), ER- $\alpha$  e ER- $\beta$  (Ascenzi et. al, 2006). No modelo clássico de ação estrogênica, que ocorre no nível nuclear, os ERs estão em uma conformação inativa e são sequestrados em um complexo multiprotéico. A ligação deste complexo induz uma alteração conformacional no receptor, resultando na dissociação de proteínas e co-repressores e recrutamento de coativadores com atividades de modificação de histonas (Mathews & Gustafsson, 2003). Assim, pela ligação de ERs aos elementos de resposta estrogênica (EREs) nas regiões promotoras de genes alvo, a regulação transcricional ocorre de maneira dependente de ligante. Entretanto, em outros casos os ERs também podem modular genes que não se encontram localizado no ERE, interagindo com os fatores de transcrição ligados a outra parte do DNA, como AP-1, Sp1 e fator nuclear-KB (NF-KB) (Figura 4) (Zhang et. al, 2009).



**Figura 4:** Esquema das vias de sinalização estrogênica. (Zon et. al. 2023).

Além da ativação transcricional no núcleo, a ação estrogênica ocorre na superfície celular em poucos minutos após a administração de  $17\beta$ -estradiol. Esta função não-genômica do ER envolve a ativação rápida de muitas moléculas sinalizadoras, como os receptores do IGF-I e do fator de crescimento epidérmico (EGF), MAPK, Akt, proteína quinase C e liberação de cálcio e óxido nítrico (Zhang et. al, 2009).

Com relação ao tecido pulmonar saudável e cancerígeno, a forma mais ativa do receptor de estrógeno é a  $ER\beta$ . Alguns estudos, demonstram diferenças entre os níveis de mRNA de  $ER\alpha$  e  $ER\beta$  em tecidos humanos durante o desenvolvimento fetal e outros mostram que  $ER\beta$  é a única forma expressa de ER nos pulmões tanto por testes *in vivo*, como *in vitro* do epitélio dos pulmões (Slowikowski et al., 2016).

Estudos mostram ainda que os estrogênios promovem o crescimento de células de câncer de pulmão e podem ser potencialmente responsáveis por maior suscetibilidade ao câncer de pulmão em mulheres (Zhang et. al, 2009).

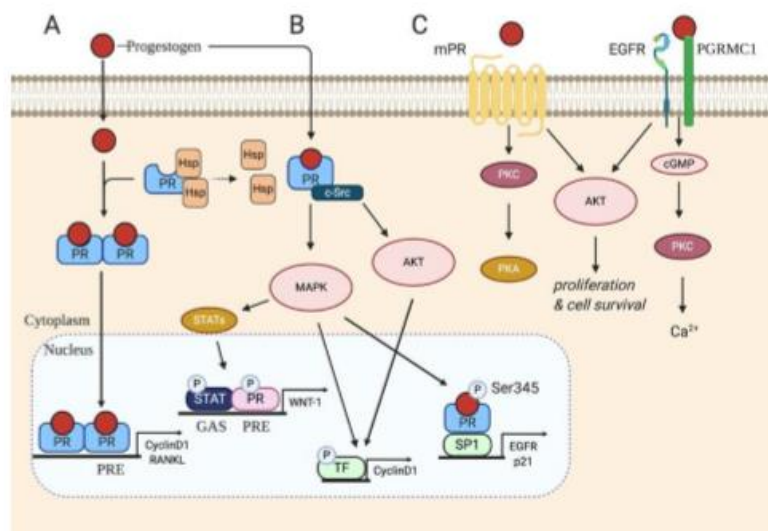
Outros estudos também mostram que o sexo feminino apresenta desvantagens em relação a doenças respiratórias, como asma e bronquiectasias (Jain et. al., 2012).

## 2.6 VIA DA PROGESTERONA

A progesterona é um hormônio sexual, capaz de promover a diferenciação e inibir a proliferação celular (Clarke & Sutherland, 1990). Ela é um regulador crítico da função reprodutiva feminina, mas também pode atuar no sistema cardiovascular, nos ossos, no sistema nervoso central e até mesmo nos pulmões (Scarpin et al., 2009).

Tanto em órgãos reprodutivos, quanto em não reprodutivos como mencionados acima, este hormônio atua de dois modos pela via clássica e não clássica (Pedroza et. al., 2020). Nas vias clássicas, ela pode se ligar inicialmente a receptores de progesterona (PR), reconhecidos como membros da superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição, que são constituídos de um domínio de ligação ao terminal amina e um domínio de ligação ao terminal carboxila. As duas principais isoformas destes receptores são o receptor de progesterona alpha ( $PR\alpha$ ) e o receptor de progesterona beta ( $PR\beta$ ). Estes PRs permanecem no citoplasma até que sejam ativados por seu ligante, a progesterona ( $P_4$ ), e forme um complexo multiproteico. Após essa ativação, o PR altera o complexo conformacionalmente, incluindo a dimerização. Esta localizam se no núcleo acoplado se especificamente aos elementos de resposta à progesterona (PREs). A interação entre o complexo do receptor PR com o fatores de transcrição (PRE), leva à formação de um complexo de iniciação de transcrição funcional (Goldman & Shalev, 2007). Já nas vias não clássicas ocorre uma sinalização rápida, após o ligante entrar direto pela membrana celular ou atuar por receptores de PR localizados na própria membrana, conforme Figura 5. Destas duas maneiras, elas podem ativar proteínas como: o proto-oncogene tirosina-proteína Src (c-Src), proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK), proteína quinase A (PKA), proteína quinase B (AKT), proteína quinase C (PKC) e monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) a

fim de atuar na proliferação e sobrevivência celular (Faivre et. al., 2008; Hanna et. al., 2006).



**Figura 5:** Esquema simplificado das vias da progesterona. (Adaptado de: Pedroza et. al.,2020).

Em estudo com células do epitélio pulmonar, analisando um dos efeitos do receptor de progesterona (PR) juntamente com seu ligante, verificou que a progesterona, por meio de seu receptor, é capaz de atuar na frequência de batimento ciliar do epitélio das vias aéreas inibindo a frequência de batimentos ciliar e contribuir para a desvantagem feminina nas doenças das vias aéreas (Jain, 2012).

Marquez-Garban et. al., (2011) observaram a presença dos receptores de ER e de PR em células de pulmão e relataram que quando expostas ao estrogênio e a progesterona, se promoveu a secreção tumoral do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e angiogênese. A progesterona é também o regulador chave da proliferação e diferenciação em tecidos reprodutivos (Graham e Clarke, 1997).

Por fim, estes estudos sugerem que a prevalência de doenças respiratórias e câncer de pulmão em mulheres pode estar associado a uma maior concentração dos hormônios sexuais femininos e também, a capacidade de alguns compostos orgânicos presentes no material particulado de diesel (DEP) de mimetizarem estes esteroides.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar se o material particulado do diesel pode influenciar nos mecanismos de respostas celulares das vias dos xenobióticos, do estrogênio e da progesterona em células de pulmão humano quando associado aos hormônios sexuais femininos (estrogênio e progesterona).

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a citotoxicidade do DEP nas células imortalizadas do epitélio de brônquio humano (BEAS- 2B) e nas células de carcinoma do epitélio pulmonar humano (A549);
- Quantificar a expressão do receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e do receptor de aril hidrocarboneto (AhR) nessas células por RT-qPCR;
- Localizar os receptores ER $\beta$ , PR e AhR por ensaio de imunofluorescência em células BEAS-2B e A549, após a exposição ao DEP e aos hormônios sexuais femininos;
- Identificar a ativação dos fatores de transcrição (ERE, PRE e XRE) em suas respectivas vias através do ensaio de “gene reporter” por luciferase;
- Medir as possíveis respostas inflamatórias e anti-inflamatórias de citocinas como GM-CSF, IL-10, IL-6, IL-beta, RANTES e TNF-alfa das células de pulmão expostas ao DEP e hormônios sexuais femininos.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

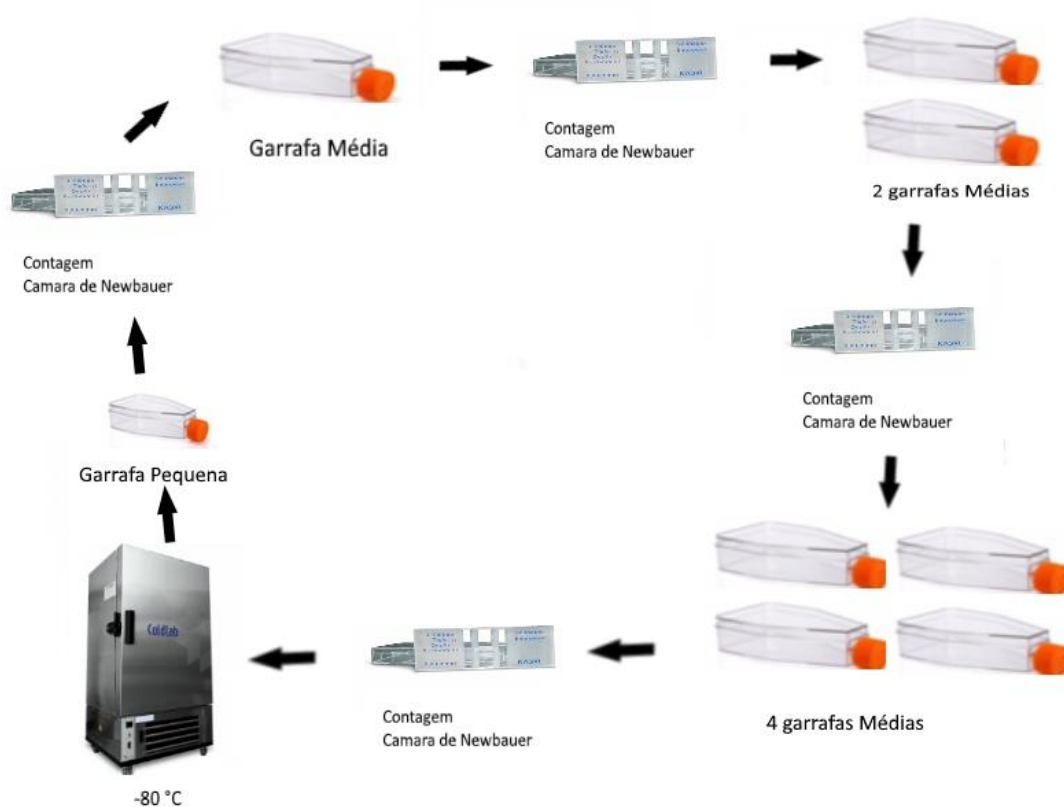
### **4.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DO DIESEL**

O DEP utilizado nesse estudo foi coletado a partir de um motor a diesel, com o auxílio de um retentor de partículas acoplado ao escapamento do veículo. Esse equipamento foi desenvolvido pelo Prof. Paulo Roberto da Conceição. O retentor de partículas consiste de um filtro bi-metálico que cria um campo capaz de reter o PM emitido a partir do escapamento e foi desenvolvido pelo físico Paulo Roberto. Após a coleta, o DEP foi dissolvido em solução salina a 10 mg/mL durante 2 horas através de agitação magnética e colocada em um misturador ultrasonicado durante 60 min, sendo deixadas em repouso por 24 horas. Após este período a suspensão foi centrifugada por 20 minutos a 1800 rpm (rotações por minuto) a 5°C e posteriormente por 10 minutos a 5000 rpm a 10°C. O precipitado foi então coletado e seco a 57°C por 48 horas antes de sua utilização. Esse material foi então, caracterizado pelo Dr. João Paulo Amorim do Laboratório de Química e Manufaturados/Bionanomanufatura do Instituto de Pesquisas Tecnológicas – IPT, para determinar os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) presentes na amostra.

### **4.2 CULTURA CELULAR DE BEAS-2B**

As células do epitélio brônquico humano - BEAS-2B (Sigma Aldrich) foram cultivadas em um frasco de cultura de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio de cultura DMEM-F12 (Gibco, Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB); 1% de antibiótico. Para expandir a linhagem celular, uma vez atingida a confluência de 80% a 90% no frasco de cultura, foi feita a passagem das células para um frasco médio, de modo que as células foram lavadas com PBS e incubadas com tripsina - EDTA 0,5% (Gibco-BRL, USA) a 37°C até se destacarem da placa. Para inativar a ação da tripsina foram adicionados soro fetal bovino (SFB) na mesma proporção. As células foram então centrifugadas a 5000 rpm por 3 minutos, em seguida o sobrenadante foi removido e o pellet foi

ressuspendido em meio de cultura completo. O meio contendo as células em suspensão foi distribuído para 2 novos frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup>. Isso foi feito novamente para dividir as células novamente em mais 4 frascos médios como na Figura 6. Então foram congeladas em tubos criogênicos, utilizando meio congelante (50% SFB; 40% LHC-9; 10% DMSO). Os tubos foram mantidos por 24h a -80°C e depois foram transferidos para nitrogênio líquido. A linhagem expandida foi utilizada para os estudos, ou seja, todas as células estudadas possuem o mesmo número de passagens ao final.



**Figura 6:** Etapas de expansão das células do epitélio brônquico humano

#### 4.2.1 CULTURA CELULAR DE A549

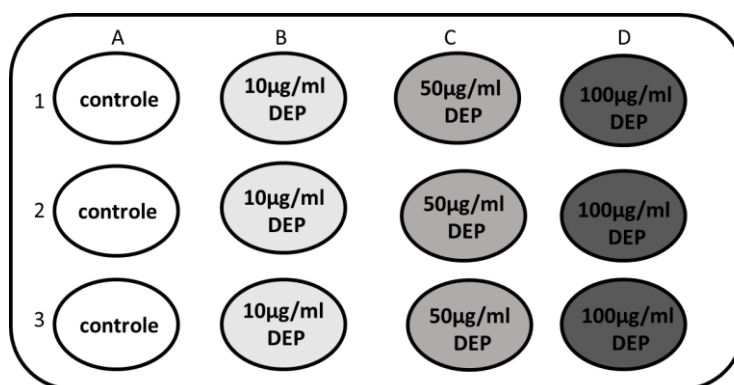
As células de carcinoma do epitélio de pulmão humano (A549) foram cedidas pela Dr. Daniela Basseres do Instituto de Química da USP e cultivadas

com os mesmos procedimentos que as células BEAS-2B. A diferença no cultivo foi que as células A549 cresceram em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB); 1% de antibiótico.

#### 4.3 CITOTOXICIDADE DO DEP EM CÉLULAS BEAS-2B E A549

As células foram cultivadas em uma placa de 12 poços e expostas ao material particulado em três concentrações diferentes (10, 50 e 100 µg/ml) e o controle, pelo período de 8 horas, conforme (Figura 7).

Transcorrido os tempos de exposição as placas foram lavadas com PBS 1x e tripsinizadas com 500 µL de tripsina em cada poço por 3 minutos, para que se soltassem da placa. A tripsina foi neutralizada com 500 µL de soro fetal bovino e as células foram recolhidas em um tubo falcon® estéril. As células foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm em 25°C e em seguida seu sobrenadante foi descartado e as células foram misturadas em 1 ml de meio LHC-9 e RPMI1640 para as células BEAS-2B e A549 respectivamente. Para a contagem, foram retirados 10 µL da solução de células e misturados com 10 µL do corante *Trypan Blue*. Então, 10 µL dessa mistura foi colocado em uma câmara de Neubauer para auxiliar na contagem das células. Os dados foram coletados em triplicata para cada concentração e tempo.



**Figura 7:** Esquema da placa para exposição a diferentes concentrações de DEP por 8 horas.

Após determinar a concentração de DEP, foram feitos testes de LIVE/DEAD durante as exposições com DEP, pelo contador de células *Countess II* da Invitrogen®.

#### **4.4 PADRONIZAÇÃO DOS HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS**

Os hormônios utilizados para as exposições celulares foram o 17 $\beta$ -estradiol (E2) (Sigma-Aldrich CAS 50-28-2-Calbiochem) e a progesterona (P4) (Sigma-Aldrich CAS 57-83-0-Calbiochem). As concentrações desses hormônios foram definidas de acordo com a literatura de Mollerup et. al. (2002) e Sun et. al. (2014). As quantidades sugeridas na literatura citada acima foram de 1nM para o E2 e 10nM para a P4.

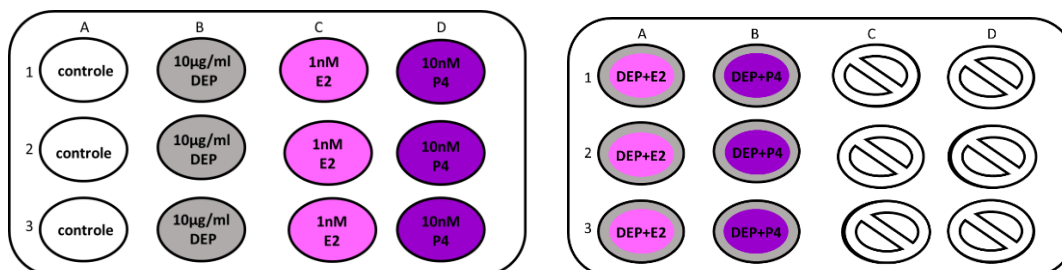
Além disso, foi feito um teste de proliferação celular com o E2. No ensaio de proliferação celular, as células BEAS-2B foram expostas ao hormônio E2 em diferentes concentrações (Controle, 100pM, 1nM e 10nM) e por diferentes tempos (6hs, 24hs, 48hs, 72hs e 6 dias). As células foram cultivadas em meio de cultura DMEN-F12 sem vermelho fenol (essa substância interage com o E2) ((Gbc, Life Technologies), após aderirem na placa, foi seguido as exposições com E2, como descrito acima. Após o cultivo, foi feita uma análise de viabilidade com o *Trypan Blue* para observar a proliferação celular. Para a P4 não foi feito um teste de proliferação, apenas se seguiu a literatura, já que os resultados de E2 foram similares a outros estudos.

#### **4.5 EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS AO DEP E HORMÔNIOS**

As células BEAS- 2B e A549 foram expostas as seguintes condições: controle; 10 $\mu$ g/ml de DEP; 1nM de E2; 10nM de PRG; 10 $\mu$ g/ml DEP+1nM E2 e 10 $\mu$ g/ml DEP+10nM PRG. De início elas foram expostas por 72 horas apenas com os hormônios e após este período por 8 horas com os hormônios + o DEP conforme ilustrado na Figura 8.

Para as células BEAS-2B foi utilizado 3 ml de meio de cultura DMEM-F12 sem vermelho fenol (Gbc, Life Technologies) suplementado com 10% de SFB filtrado (2X) (para remover possíveis hormônios que estariam presentes no soro) e 1% de antibiótico. Após 24 horas de aderência as células foram expostas de acordo com os grupos de estudo e tempos como mencionado acima. Os hormônios e o DEP foram diluídos no meio de cultura utilizado.

O mesmo foi feito para as células A549, mas o meio utilizado durante a exposição foi RPMI 1640 sem vermelho fenol (Gbc, Life Technologies) suplementado com 10% de SFB (2X) e 1% de antibiótico.



**Figura 8 :** Esquema da placa de exposição de 3 dias aos hormônios (E2 e PRG) e após este período por 2 horas ao DEP.

#### 4.6 EXTRAÇÃO DE RNA

Após o tempo de exposição as células foram retiradas das placas e o RNA total foi extraído utilizando 700 µL do reagente Qiazol® (Qiagen) e coluna de extração (RNAeasy mini Kit Qiagen), conforme instruções do fabricante. A quantificação foi realizada usando o aparelho *NanoDrop*®, que indicou a quantidade e a qualidade precisa de cada amostra.

#### 4.7 RT-PCR (CONVENCIONAL)

Após a extração do RNA, os primers de interesse (Tabela 2) foram desenhados de acordo com as sequências genéticas de base de dados NIH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e com a ajuda do programa de PCR em tempo real (<http://www.idtdna.com/Scitools/Aplicativos/RealTimePCR>). Os primers utilizados foram da *Invitrogen*® – *Thermo Fisher Scientific*.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o kit *SUPERSCRIPT Vilo Master Mix* (Invitrogen®), conforme instruções da bula.

Nesta etapa, antes de ser usada a técnica de PCR convencional, o método escolhido foi PCR em tempo real: “*real time*”, mas após algumas

tentativas não foi possível definir uma curva para o E2 devido a sua baixa expressão em células BEAS-2B. Com isso, a expressão dos genes foi realizada por PCR convencional. As amostras dos grupos estudados foram preparadas com 500ng/μl de cDNA, 21μl de *Platinum PCR*, 1 μl do primer, respectivamente para cada amostra em triplicata. Os grupos eram: controle (CT), estrogênio (E2), progesterona (P4), DEP, DEP + E2 e DEP + P4. Elas foram colocadas no termociclador a 62°C pelo tempo estimado do aparelho. Por fim, as amostras foram submetidas a gel de eletroforese, feito com 1,5g de agarose ultrapura diluída em 100ml de tampão TBE juntamente com 10μl de Brometo de etídio, à 100 volts por 75 minutos.

**Tabela 2:** Sequências dos oligonucleotídeos estudadas.

GENE		Sequência
ER β	senso	5' – TGGCTTTTTGGACACCCACT -3'
	a-senso	5' – CCGGCCTTGCCTTCTCTAAA -3'
PR β	senso	5'- CAGCTGTCACTAATCGGGGT -3'
	a-senso	5'- CTCTCGGTACAGCCCATTCC -3'
AhR	senso	5' – CCACTTCAGCCACCATCCAT -3'
	a-senso	5' – AAGCAGGCGTGCATTAGACT -3'
RPL13A	senso	5' – CTCAAGGTGTTTGACGGCATCC -3'
	a-senso	5' – TACTTCCAGCCAACCTCGTGAG – 3'

Por fim, o gel foi observado no transiluminador *L-pix touch - Loccus®* para gel de eletroforese e quantificado pelo programa *Image J®*, que detecta a quantidade de pixels de cada banda presente no gel e calcula sua porcentagem.

#### 4.8 Imunofluorescência

Para imunofluorescência foi utilizada duas placas escuras com 96 poços, em cada placa foi cultivado os diferentes tipos de células utilizadas nesse estudo. Durante o cultivo foram feitas as exposições com DEP e com os hormônios sexuais femininos conforme descrito no item 4.5 da metodologia. Inicialmente foi

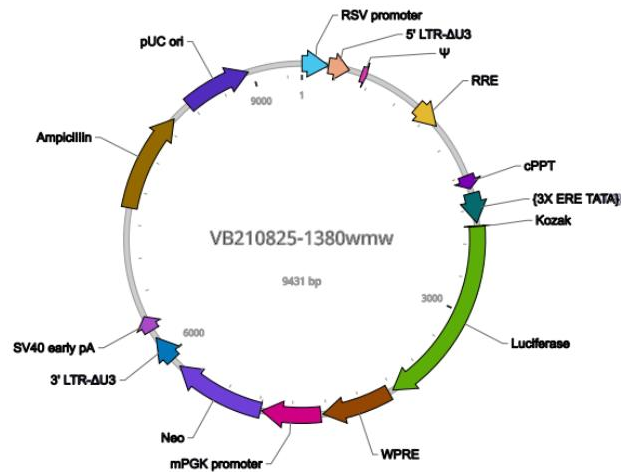
feito a fixação das células na placa. Para esse procedimento, foi retirado o meio de cultura de cada poço das placas, em seguida foi feito uma lavagem nas células com 100 µl de Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), retirou-se o DPBS dos poços e foi acrescentado 50 µl de Paraformaldeído 4% em cada poço. Neste momento as placas foram colocadas a 4°C por 2 horas. Após esse tempo, retirou-se o paraformaldeído e se adicionou novamente 100 µl de DPBS por duas vezes para fazer duas lavagens. Por fim, foi deixado 150 µl de DPBS em cada poço e se manteve as placas na geladeira até o momento das próximas etapas da imunofluorescência. Para a etapa de permeabilização desse experimento foi retirado o DPBS e adicionado 100 µl de Triton a 0,01% em cada poço. As placas com Triton foram deixadas na geladeira (4°C) por 15 minutos, se retirou o Triton dos poços e novamente foi adicionado 100 µl de DPBS. Para a etapa de bloqueio se adicionou 50 µl de BSA 5% em cada poço das placas que permaneceram por 40 minutos no agitador a temperatura ambiente. Após a incubação com BSA 5% adicionou se 50 µl do anticorpo primário em cada poço diluído nessa mesma solução. Manteve-se as placas na câmara fria sob agitação overnight. Para a marcação do anticorpo secundário, removeu o anticorpo primário e lavou-se duas vezes com 100 µl de DPBS cada poço. Fez-se a diluição do anticorpo secundário em DPBS junto com o Hoescht. Adicionou-se 100 µl em cada poço do anticorpo secundário, mantendo no agitador protegido da luz por 2 horas à temperatura ambiente. Após esse tempo, fez-se novamente as duas lavagens com DPBS dos poços, adicionou-se 100 µl dessa mesma solução nos poços e fez-se a leitura no equipamento *Slide/Plate da Molecular Device®*

#### **4.9 ENSAIO COM GENE REPÓRTER POR LUCIFERASE**

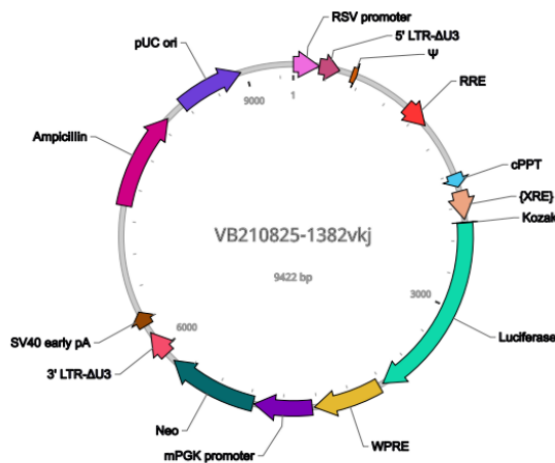
Foram adquiridos plasmídeos recombinantes pela empresa *Vector Builder®*, que foram construídos a partir de regiões promotoras específicas de nosso interesse. Esses vetores têm em sua construção os genes *estrogen responsive element* (ERE) pertencente à via do hormônio estrógeno, o gene *progesterone responsive element* (PRE) e o *xenobiotic responsive element* (XRE) pertencente à via do aril-hidrocarboneto. Além disso, tem a enzima



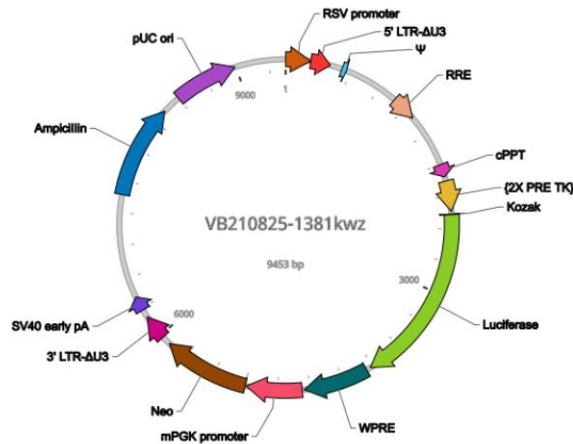
*luciferase* e um antibiótico, para o ensaio do gene repórter conforme Figura 9, 10 e 11.



**Figura 9:** Vetor recombinante com *luciferase* “firefly” e a região promotora ERE feita no vectorbuilder.com.



**Figura 10:** Vetor recombinante com *luciferase* “firefly” e região promotora XRE feita no vectorbuilder.com.



**Figura 11:** Vetor recombinante com *luciferase* “firefly” e região promotora PRE feita no vectorbuilder.com.

Todos os plasmídeos utilizados para transfecção foram purificados utilizando o kit *Qiagen EndoFree®* para remover endotoxinas nocivas. Esses plasmídeos recombinantes foram utilizados na produção de lentivirus com o auxílio do Laboratório de Vetores Virais do Instituto de Câncer do Estado de São Paulo (ICESP, laboratório coordenado pelo Dr. Bryan Strauss). As células BEAS-2B e A549 foram transduzidas com os lentivirus, sendo individualmente ou em combinação e posteriormente selecionadas para resistência com neomicina e/ou puromicina. Estes procedimentos seguiram as normas de Biossegurança para OGMs de classe de risco 2 conforme a Comissão Interna de Biossegurança (CIBio). Após a geração das novas linhagens, estas foram consideradas OGMS de classe de risco 1, sendo que as partículas virais não estão presentes. Em seguida, as células modificadas foram transferidas para o Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental do Departamento de Patologia da FMUSP, para manutenção e experimentação. Estas foram tratadas em quatro grupos experimentais: 1) células sem tratamento (CT); 2) células expostas ao DEP (DEP) 3) células expostas ao E2, 4) células expostas ao P4, 5) células expostas ao DEP+E2 e 6) células expostas ao DEP+P4. A partir desta etapa, a ativação das regiões promotoras do estrogênio, da progesterona e do aril-hidrocarboneto foram quantificadas pela atividade da luciferase que foi medida utilizando o reagente *One-Glo® Luciferase Assay System (Promega)* e um luminômetro *GloMax® 20/20* que foi cedido pelo Centro de Investigação Translacional em Oncologia do ICESP. As regiões promotoras em análise inseridas a montante do

gene repórter luciferase presente no vetor, controlou a taxa de transcrição e tradução destes genes. Os valores foram corrigidos para a concentração de proteína no lisado celular, segundo a metodologia de Bradford (1976) e foram apresentadas como a média entre 3 ensaios biológicos, cada um realizado em triplicatas. As atividades dos promotores envolvidos foram determinadas a partir do cálculo da atividade do “firefly” corrigida pelo teor de proteína nas amostras.

## **5. LUMINEX®**

O ensaio pela tecnologia xMAP (Multiple Analyte Profiling) da Luminex®, ou ensaio Luminex® é um método multiplex que possibilita quantificar vários biomarcadores ao mesmo tempo, em uma pequena quantidade de material biológico. A tecnologia xMAP da Luminex® possui o princípio similar ao ELISA sanduíche, porém utiliza microesferas coloridas fluorescentes (beads) que se ligam, de forma covalente, aos anticorpos de captura. As microesferas possuem comprimentos de onda distintos, permitindo a quantificação de diversos biomarcadores simultaneamente. Os anticorpos de captura são colocados diretamente contra o biomarcador desejado. Após uma série de lavagens, para remoção de proteínas não ligadas, anticorpos de detecção foram adicionados para criar o complexo sanduíche, e posteriormente adição do conjugado estreptavidina-ficoeritrina. As concentrações das amostras desconhecidas foram estimadas a partir da curva padrão, utilizando com concentração conhecida e fornecida na bula dos kits que foram utilizados. Os níveis das citocinas foram expressos em pg/mL de acordo com a curva padrão obtida na mesma placa. Os limites de detecção dos biomarcadores (citocinas) de interesse do estudo, analisados pela metodologia xMAP da Luminex® foram fornecidos pelo kit, de acordo com o fabricante. As amostras de sobrenadante das células BEAS-2B e A549 após serem tratadas com DEP e hormônios foram coletadas em tubo contendo 300 microlitros cada e congelado a -80°C. Para realização do ensaio, as amostras foram descongeladas e centrifugadas à 1000g, em temperatura ambiente por 10 minutos. Para dosagem das citocinas GM-CSF, IL-10, IL-6, IL1 beta, RANTES e TNF – alfa foi utilizado o kit MILLIPLEX® Map Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel – HCYTOMAG-60K. (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Resumidamente, foram pipetadas microesferas coloridas

revestidas com anticorpos de captura contra os biomarcadores de interesse em uma placa com 96 poços. A seguir, foram pipetadas as amostras dos pacientes, controles e curva padrão e branco e incubadas em agitador de placas (IKA MTS 2/4 digital). Após lavagens, o anticorpo de detecção foi adicionado à placa, que passou por novo período de incubação. As lavagens foram realizadas em uma lavadora magnética (Bio-plex PRO II Wash Station) e as microesferas permaneceram retidas na placa pela ação de um ímã. Posteriormente, foi adicionada a estreptavidina-ficoeritrina, que emitiu sinal fluorescente quando excitado pelos LEDs do equipamento de leitura, e então foi incubada por um breve período. Após a lavagem para remoção das proteínas não aderidas, foi adicionada aos poços uma solução tampão que possibilitou a análise pelo leitor de microesferas Magpix Milliplex (Luminex Corp, Austin, TX), onde 2 LEDs, um verde com comprimento de onda de 525 nm fez a identificação, e um LED vermelho (635nm) fez a quantificação desses biomarcadores. Uma câmera com dispositivo de carga acoplado (CCD, do inglês charge-coupled device) fez a captura dessas imagens e enviou ao software Xponent 4.2 (Luminex Corp, Austin, TX) e posterior análise dos dados foi realizada pelo software Milliplex Analyst 5.1 (EMD Millipore). As concentrações das amostras desconhecidas foram estimadas a partir da curva padrão, utilizando a concentração conhecida e fornecida na bula dos kits utilizados. Os níveis das citocinas foram expressos em pg/mL de acordo com a curva padrão obtida na mesma placa.

## 5.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo software *SigmaPlot* 15.0 (Califórnia, EUA). A princípio, foi feito o teste de normalidade dos dados através do método Kolmogorov-Smirnov. Após essa análise, os testes utilizados foram determinados a partir da variância nos valores das amostras, podendo ser paramétricos (*one way ANOVA*) e não paramétricos (*ANOVA on ranks*). Foram feitas análises de correlação entre os grupos de estudo comparados aos seus controles, em relação à viabilidade celular e as alterações nas vias metabólicas. O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Caracterização do DEP

A identificação e quantificação das frações de HPA foram observadas de acordo com a (Tabela 3). A amostra de DEP, coletada do escapamento de um ônibus e posteriormente analisada e caracterizada pelo Instituto de Química da USP, revelou a presença de 16 tipos diferentes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Dentre esses, foram identificados compostos orgânicos como naftaleno, fenantreno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno (BaA), criseno, benzo(b)fluoranteno (BbF), benzo(k)fluoranteno (BkF), Benzo[j]fluoranteno, benzo(a)pireno (BaP), Benzo[e]pireno, indeno(1,2,3-cd) pireno (InP) e dibenzoantraceno (DBA), benzo[g,h,i]perileno. A concentração total de todos os compostos nesta coleta foi de 32,46 µg/g.

**Tabela 3** – Teor de HPA na amostra de DEP.

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)	CAS	Concentração (µg/g)		
		MP-Diesel	Limite de detecção (LD)	Limite de Quantificação (LQ)
Naftaleno (C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> )	91-20-3	8,63 ± 0,04	0,01	0,1
Acenafteno (C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> )	83-32-9	0,69 ± 0,04	0,01	0,1
Fluoreno (C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> )	86-73-7	0,44 ± 0,02	0,01	0,1
Fenantreno (C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> )	85-01-8	9,22 ± 0,02	0,01	0,1
Fluoranteno (C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> )	208-44-0	4,28 ± 0,03	0,01	0,1
Pireno (C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> )	129-00-0	4,52 ± 0,04	0,01	0,1
Benzo[a]antraceno (C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> )	56-55-3	1,22 ± 0,04	0,01	0,1
Criseno (C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> )	0218-01-09	0,86 ± 0,05	0,01	0,1
Benzo[k]fluoranteno (C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> )	0207-08-09	0,82 ± 0,01	0,01	0,1
Benzo[b]fluoranteno (C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> )	205-99-2	< 0,1	0,01	0,1
Benzo[j]fluoranteno (C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> )	205-82-3	< 0,1	0,01	0,1
Benzo[e]pireno (C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> )	192-97-2	0,48 ± 0,02	0,01	0,1
Benzo[a]pireno (C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> )	50-32-8	1,12 ± 0,05	0,01	0,1
Indeno[1,2,3-cd]pireno (C <sub>22</sub> H <sub>12</sub> )	193-39-5	< 0,1	0,01	0,1
Dibenzo[a,h]antraceno (C <sub>22</sub> H <sub>14</sub> )	53-70-3	< 0,1	0,01	0,1
Benzo[g,h,i]perileno (C <sub>23</sub> H <sub>14</sub> )	191-24-2	< 0,1	0,01	0,1
<b>Total de HPAs</b>	-	<b>32,46</b>	-	-
<b>Recuperação média (%)</b>	-	<b>109</b>	-	-

Dentre os compostos orgânicos caracterizados acima, os presentes em maiores concentrações estão detalhados na (Tabela 4).

**Tabela 4:** HPAs em maiores concentrações na amostra de DEP

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em maior concentração na poluição atmosférica	
HPAs	Concentração (µg/g)
1° Fenantreno (C14H10)	9,22 ± 0,02
2° Naftaleno (C10H8)	8,63 ± 0,04
3° Pireno (C16H10)	4,52 ± 0,04
4° Fluoranteno (C16H10)	4,28 ± 0,03
5° Benzo[a]antraceno (C18H12)	1,22 ± 0,04
6° Benzo[a]pireno (C20H12)	1,12 ± 0,05

E devido ao alto potencial carcinogênico desses compostos, pode-se observar que os que possuem maior características carcinogênicas estão destacados na (Tabela 5).

**Tabela 5:** HPAs mais carcinogênicos na amostra de DEP

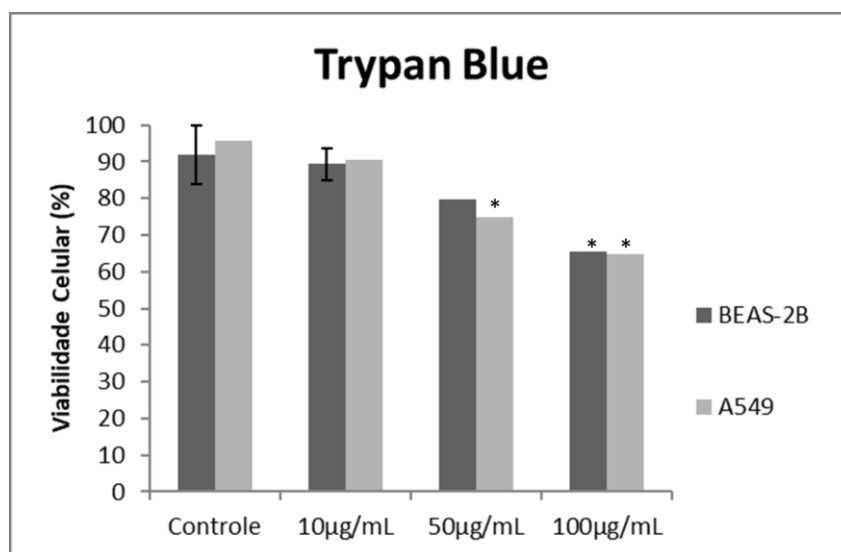
Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na poluição atmosférica que mais possuem características carcinogênicas	
HPAs	Concentração (µg/g)
1° Benzo[b]fluoranteno (C20H12)	< 0,1
2° Indeno[1,2,3-cd]pireno (C22H12)	< 0,1
3° Benzo[a]pireno (C20H12)	1,12 ± 0,05
4° Benzo[a]antraceno (C18H12)	1,22 ± 0,04
5° Benzo[k]fluoranteno (C20H12)	0,82 ± 0,01
6° Dibenzo[a,h]antraceno (C22H14)	< 0,1

De todos os compostos carcinogênicos, o benzopireno tem sido o mais estudado, pois se sugere que seja o que mais afeta a concentração de esteroides sexuais de maneira antiestrogênica e/ou estrogênica (Wen e Pan, 2015). Na amostra acima, o benzopireno se mostrou expressivo, por estar em alta concentração e ter um grande potencial carcinogênico.

## 6.2 CITOTOXICIDADE DO DEP EM CÉLULAS BEAS-2B

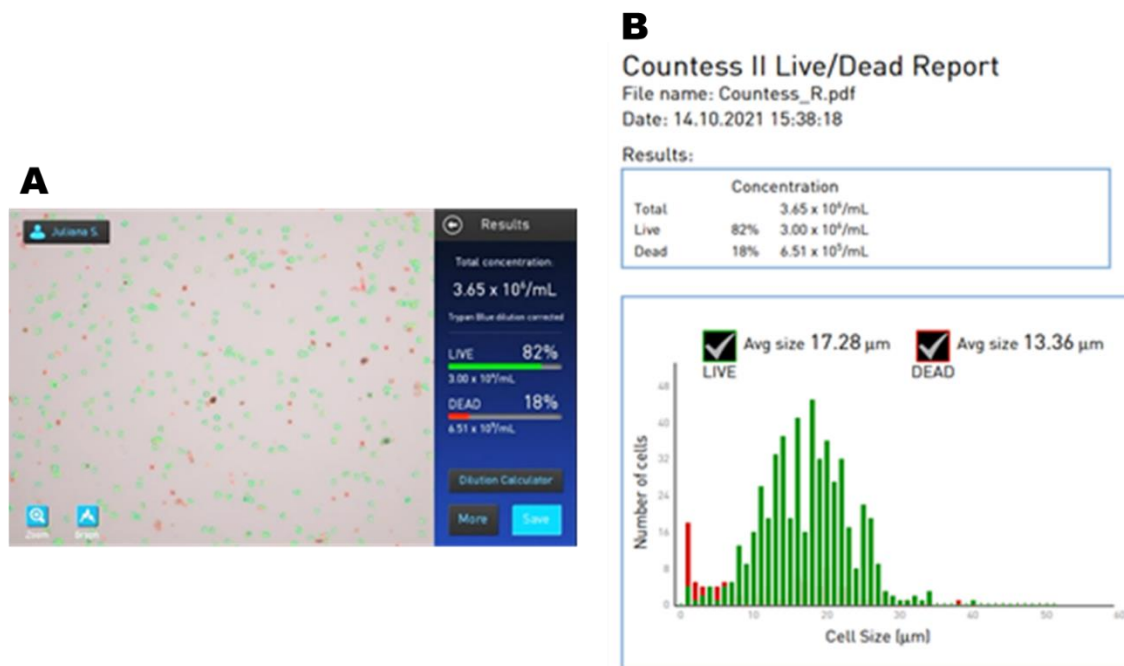
Este estudo, contabilizou a viabilidade celular da BEAS-2B e da A549 após a exposição ao DEP. As amostras foram medidas em triplicata e o número de células vivas foram obtidos em porcentagem. O resultado foi analisado pelo teste Two Way ANOVA que identificou as seguintes diferenças estatísticas entre os grupos ( $p=0,004$ ): CT vs 100  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  vs 100  $\mu\text{g/ml}$ , CT vs 50  $\mu\text{g/ml}$ ; 10  $\mu\text{g/ml}$  vs 50  $\mu\text{g/ml}$  e 50  $\mu\text{g/ml}$  vs 100  $\mu\text{g/ml}$ .

A menor concentração de DEP (10  $\mu\text{g/ml}$ ), não apresentou diminuição significativo nas células em relação ao controle quando expostas por 8 horas. (FIGURA 7). sendo assim, esse estudo sugere que as células BEAS-2B e A549 sejam expostas a 10  $\mu\text{g/ml}$  por 8 horas.



**Figura 12:** Análise da porcentagem de células vivas expostas apenas ao meio (CT); 10  $\mu\text{g/mL}$  de DEP; 50  $\mu\text{g/mL}$  de DEP e 100  $\mu\text{g/mL}$  de DEP. O teste estatístico Two Way ANOVA não apontou diferença significativas entre os tipos celulares ( $p=0,945$ ), mas houve diferença entre as concentrações ( $p=0,004$ ). O método Holm-Sidak mostrou diferença entre os grupos: 100  $\mu\text{g/mL}$  vs CT; 100  $\mu\text{g/mL}$  vs 10  $\mu\text{g/mL}$ ; 100  $\mu\text{g/mL}$  vs 50  $\mu\text{g/mL}$ ; 50  $\mu\text{g/mL}$  vs CT; e 50  $\mu\text{g/mL}$  vs 10  $\mu\text{g/mL}$ .

Após determinar a concentração de DEP que foi utilizada durante os experimentos, foram feitos também, testes de contagem Live/Dead em cada ensaio. Essa contagem foi feita com o auxílio de um contador de célula *CountessII Live/Dead* da *Invitrogen®*, a fim de comprovar a viabilidade das células estudadas conforme figura (Figura 13):



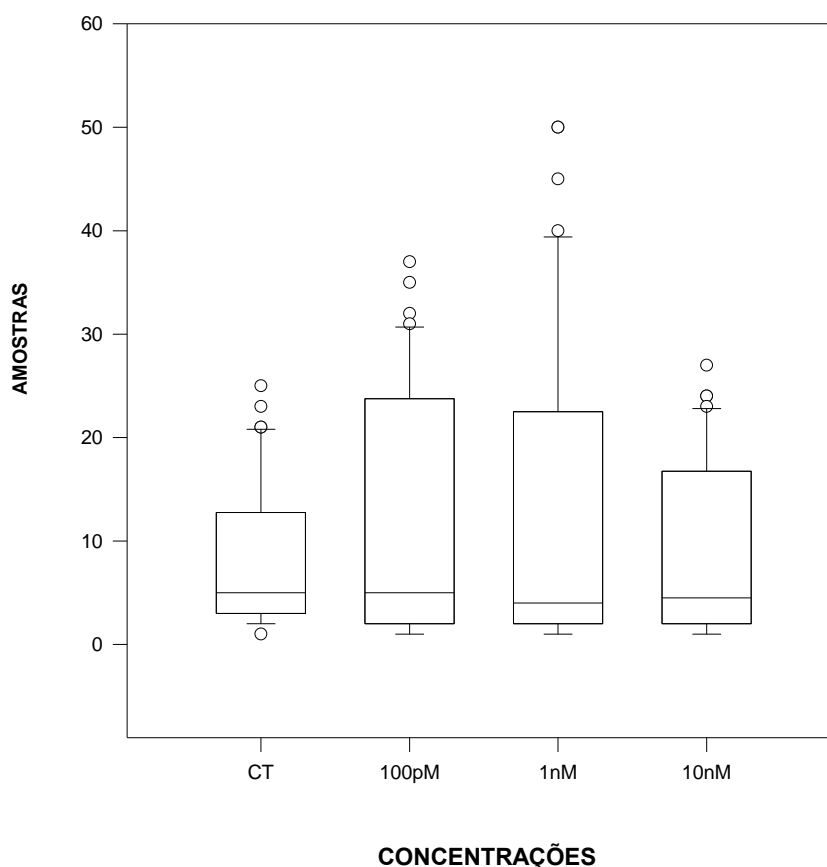
**Figura 13:** Resultado da contagem de células BEA-2B pelo contador de células *Countess II Live/Dead* da *Invitrogen*® após exposição de 10 µg /ml de DEP por 8 horas. A) O total de células apresentados em uma alíquota de 1 ml foi de 3,65X10<sup>6</sup>, em que 82% das células estavam vivas e 18% de células mortas; B) Gráfico feito pelo contador de células que mostra a quantidade de células mortas em vermelho e as células vivas em verde por tamanho das células e número de células.

### 6.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR COM E2

O ensaio de proliferação celular serviu para confirmar a atuação do E2 nas células, a concentração e o tempo ideal baseado a princípio na literatura. O primeiro resultado analisou as concentrações de E2 (100 pM, 1nM e 10nM) pelo teste não paramétrico ANOVA on Ranks, através do método de Kruskal-Wallis, o resultado da análise não apresentou diferença significativa entre os grupos em relação as concentrações de E2 (P = 0,856) (Figura 14).



## Concentração Ideal 17 $\beta$ -estradiol (E2)

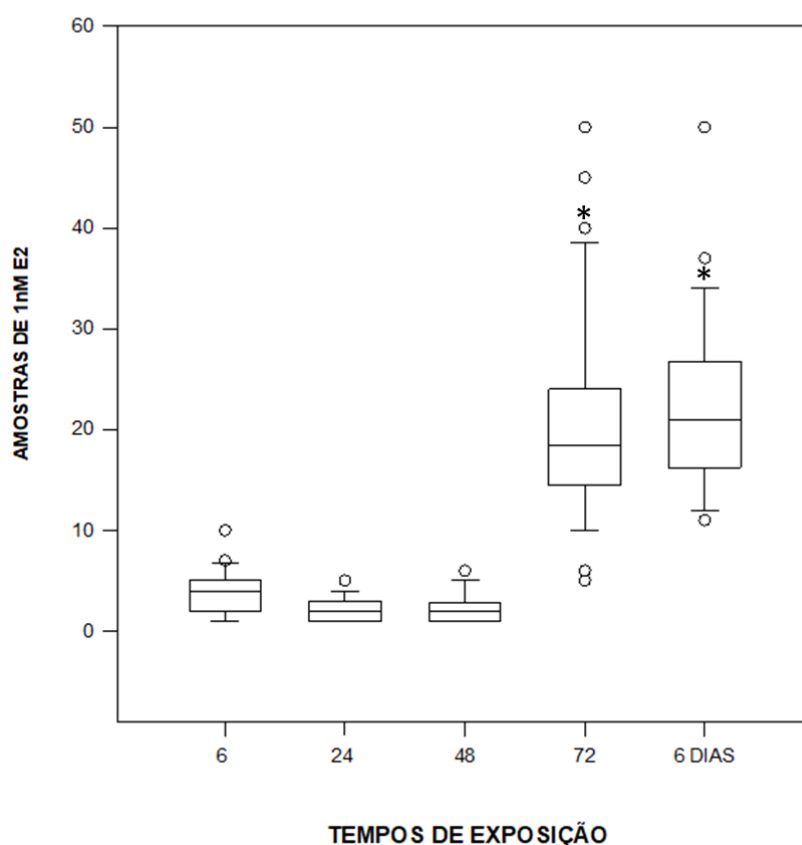


**Figura 14:** Análise das concentrações de 17 $\beta$ -estradiol (E2) em células BEAS-2B (100pM, 1nM e 10nM). O teste estatístico *ANOVA on Ranks (Kruskal-Wallis)* não apontou diferença significativas entre as concentrações ( $P = 0,856$ ).

O resultado apresentado para o tempo ideal de exposição foi analisado pelo teste não paramétrico *ANOVA on Ranks*, através do teste *Tukey*, que identificou as seguintes diferenças estatísticas entre os grupos ( $P = <0,001$ ): 6 DIAS vs 48hs, 6 DIAS vs 24hs, 6 DIAS vs 6hs, 72hs vs 48hs, 72hs vs 24hs e 72hs vs 6hs (Figura 15).

Sendo assim, a escolha da concentração ideal de E2 para as exposições desse estudo foi de 1nM e o tempo de exposição foi de 72 horas, conforme esse resultado e a literatura.

## Tempo Ideal 1nM de E2



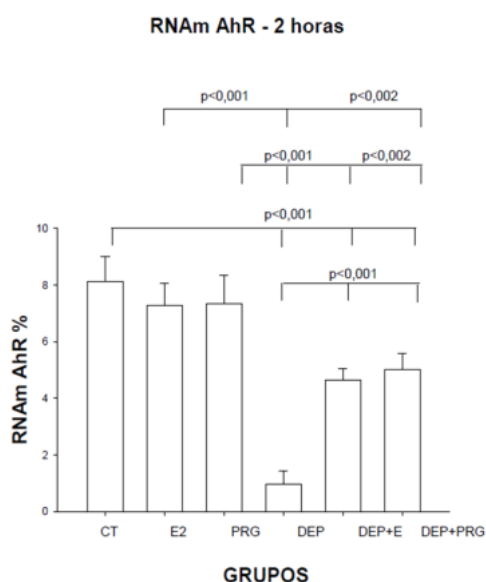
**Figura 15:** Análise dos tempos de exposição ao 17 $\beta$ -estradiol (E2) em células BEAS-2B (100pM, 1nM e 10nM). O teste estatístico ANOVA *on Ranks* (Tukey) apontou diferença significativa entre as concentrações: 6 DIAS vs 48hs, 6 DIAS vs 24hs, 6 DIAS vs 6hs, 72hs vs 48hs, 72hs vs 24hs e 72hs vs 6hs. (P = <0,001).

### 6.4 PCR

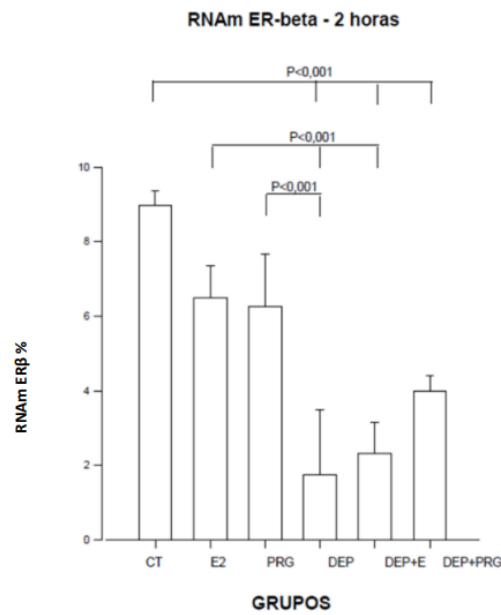
As células que foram utilizadas para analisar a presença dos receptores ER $\beta$ , PR $\beta$  e AhR pela técnica de PCR convencional, foram somente as BEAS-2B, já que inicialmente o trabalho seria feito apenas com elas. Além disso, não foi possível estabelecer a curva padrão pelo PCR *real time* para o ER $\beta$ , devido a sua baixa expressão nessas mesmas células. A análise então escolhida inicialmente, foi a de PCR convencional, que apresentou os seguintes resultados: **AhR:** (CT vs DEP); (CT vs DEP+E2), (CT vs DEP+PRG), (E2 vs DEP) (p<0,001); (E2 vs DEP+PRG) (p<0,002); (PRG vs DEP), (PRG vs DEP+E2) (p<0,001); (PRG vs DEP+PRG) (p<0,002). **ER $\beta$ :** (CT vs DEP), (CT vs DEP+E2), (CT vs DEP+PRG), (E2 vs DEP), (E2 vs DEP+E2), (PRG vs DEP) (p<0,001). **PR $\beta$ :**

(CT vs E2) ( $p=0,003$ ); (CT vs PRG), (CT vs DEP), (CT vs DEP+E2), (CT vs DEP+PRG) ( $p<0,001$ ); (E2 vs DEP+E2) ( $p=0,004$ ). Conforme (Figura 16, Figura 17 e Figura 18).

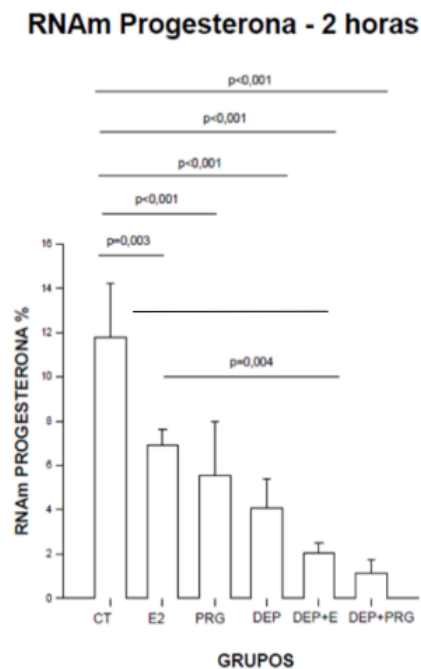
Mesmo obtendo um resultado significativo, se fez necessário a escolha de um outro tipo de célula de pulmão, que expressasse uma maior quantidade de receptores de ER e PR. Foi a partir dessa etapa que foram utilizadas as células A549, além da BEAS-2B e também foi escolhida a técnica de imunofluorescência, que demonstrou ter uma maior sensibilidade para a detecção desses receptores.



**Figura 16:** Porcentagem (0 a 10 no eixo x) de RNAm do receptor de AhR em células BEAS-2B expostas depois de 2 horas aos hormônios e ao DEP à: 1) Meio (Controle – CT); 2) 17 $\beta$ -estradiol (E2); 3) progesterona (P4); 4) Partícula da exaustão do diesel (DEP); 5) DEP + E2 e 6) DEP+P4. As análises estatísticas obtidas foram: CTxDEP; CTx DEP+E2; CTx DEP+P4 ( $p<0,001$ ); E2xP4; E2xDEP; E2xDEP+E2; E2xDEP+P4 ( $p<0,001$ ); P4xDEP; P4xDEP+E2; P4xDEP+P4 ( $p<0,001$ ).



**Figura 17:** Porcentagem (0 a 10 no eixo x) de RNAm do receptor de ER $\beta$  em células BEAS-2B expostas depois de 2 horas aos hormônios e ao DEP à: 1) Meio (Controle – CT); 2) 17 $\beta$ -estradiol (E2); 3) progesterona (P4); 4) Partícula da exaustão do diesel (DEP); 5) DEP + E2 e 6) DEP+P4. As análises estatísticas obtidas foram: CTxDEP; CTx DEP+E2; CTx DEP+P4 ( $p < 0,001$ ); E2xDEP; E2xDEP+E2 ( $p < 0,001$ ); P4xDEP ( $p < 0,001$ ).



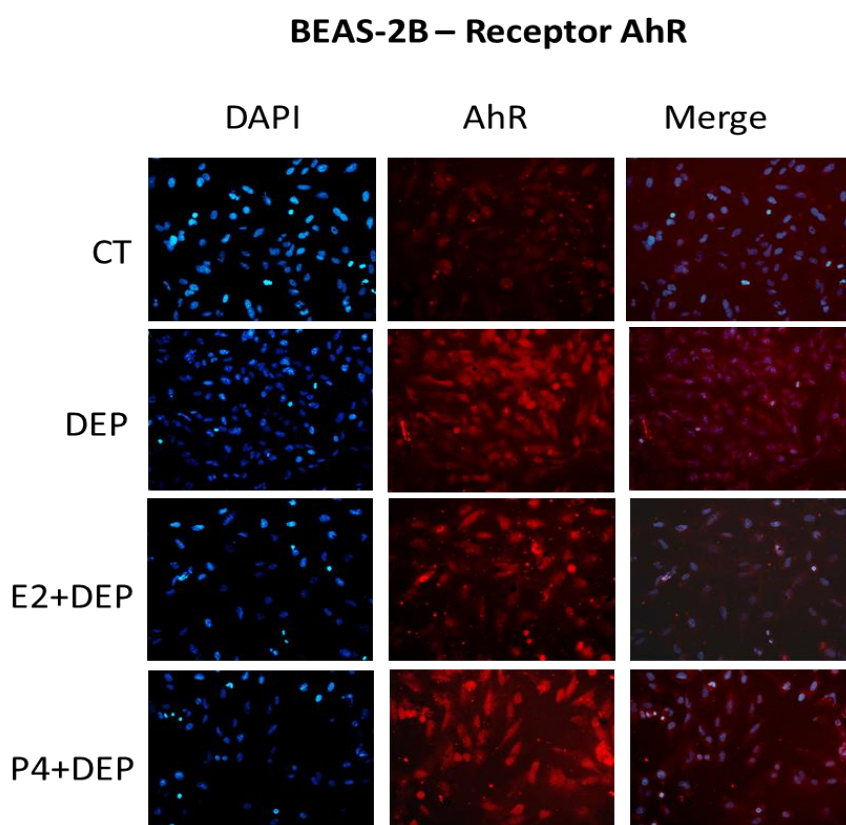
**Figura 18:** Porcentagem (0 a 10 no eixo x) de RNAm do receptor de PR em células BEAS-2B expostas depois de 2 horas aos hormônios e ao DEP à: 1) Meio (Controle – CT); 2) 17 $\beta$ -estradiol (E2); 3) progesterona (P4); 4) Partícula da exaustão do diesel (DEP); 5) DEP + E2 e 6)

DEP+PRG. As análises estatísticas obtidas foram: CTxE2; CTxP4; CTxDEP; CTx DEP+E2; CTx DEP+P4 ( $p<0,001$ ); E2xDEP+E2 ( $p<0,001$ ).

## 6.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA

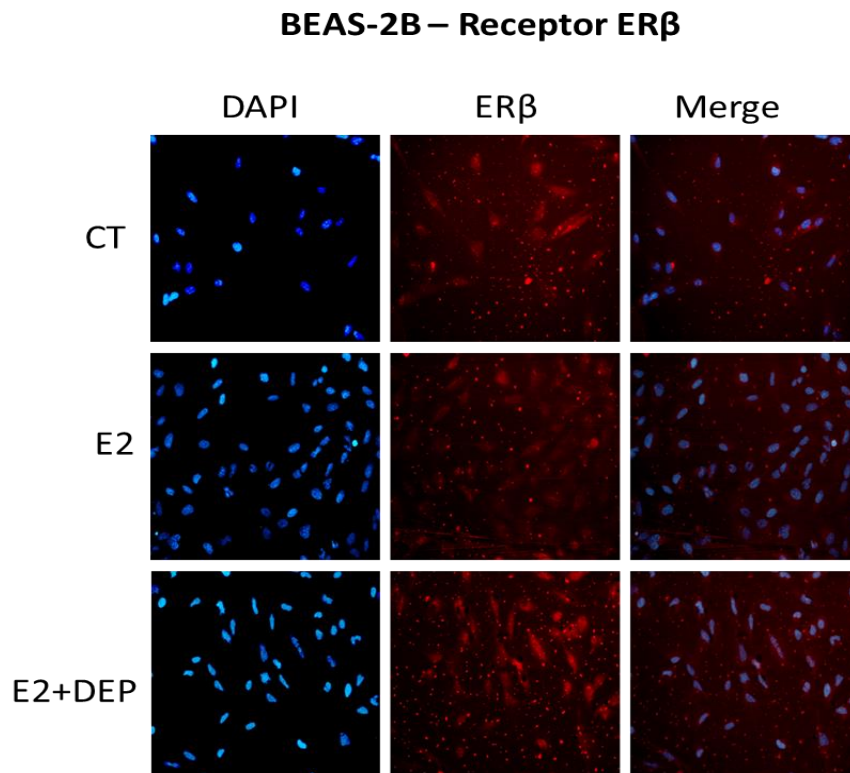
A imunofluorescência permitiu captar, quantificar e até mesmo localizar os receptores AhR, ER $\beta$  e PR com mais sensibilidade. A princípio se confirmou a presença dos receptores de hormônios sexuais femininos ER $\beta$  e PR nas células de pulmão (BEAS e A549). Ambos os tipos celulares apresentaram uma expressão muito similar de seus receptores. Com isso, apenas as imagens de BEAS-2B estão ilustradas abaixo.

O resultado do receptor de AhR demonstrou ter aumentado na presença do DEP isolado e também quando exposto ao P4+DEP. Além do aumento na quantidade de receptores, se observou claramente a translocação dele do citoplasma para o núcleo, quando as células BEAS-2B e A549 foram expostas ao DEP (Figura 19).



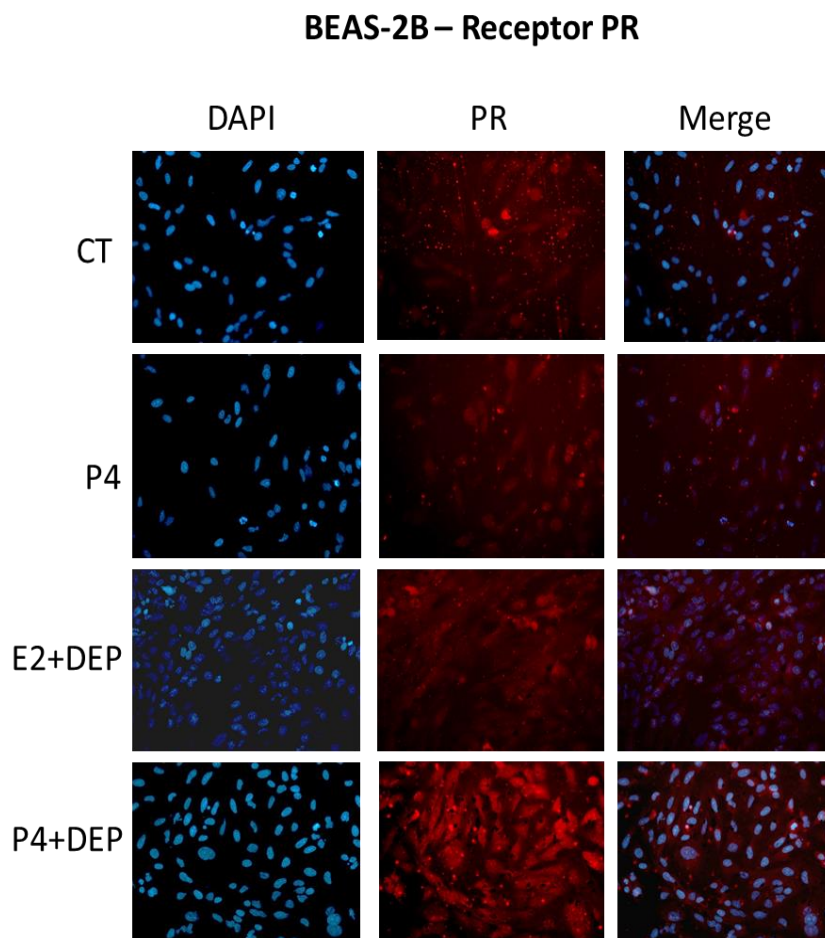
**Figura 19:** Receptor de AhR em células BEAS-2B x400: (A-C) Controle; (D-F) DEP; (G-I) E2+DEP; (J-L) P4+DEP em relação ao receptor de AhR. Houve um maior aumento na expressão de AhR quando as células foram expostas ao DEP; A exposição ao P4+DEP também demonstrou um aumento na expressão do receptor.

O resultado do receptor de ER $\beta$  demonstrou ter aumentado na presença do E2 isolado e também quando exposto ao E2+DEP. O ER $\beta$ , assim como o AhR apresentou a translocação dele do citoplasma para o núcleo, quando as células foram expostas principalmente ao E2+DEP (Figura 20).

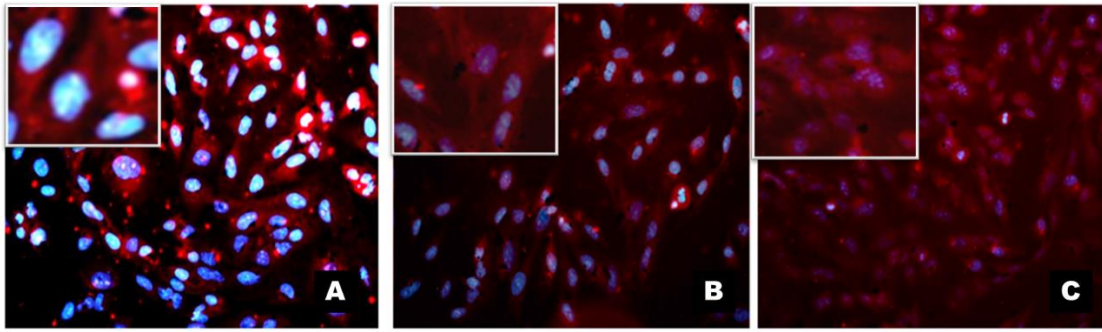


**Figura 20:** Receptor de ER $\beta$  em células BEAS-2B x400: (A-C) Controle; (D-F) E2; (G-I) E2+DEP; em relação ao receptor de ER $\beta$ . Houve um maior aumento na expressão de ER $\beta$  quando as células foram expostas ao E2+DEP; A exposição ao E2 isoladamente não apresentou um grande aumento em relação ao seu controle.

Em relação ao receptor de PR, o resultado apresentou um aumento em sua expressão quando as células foram expostas a P4 e expressou ainda mais quando as células BEAS-2B e A549 foram expostas a E2+DEP e P4+DEP (Figura 21). Já em relação a translocação do PR para o núcleo, se observou que PR se moveu para o núcleo na presença de P4 e de E2+DEP, mas não foi apresentado translocação quando as células BEAS-2B foram expostas ao P4+DEP (Figura 22).



**Figura 21:** Receptor de PR em células BEAS-2B x400: (A-C) Controle; (D-F) P4; (G-I) E2+DEP; (J-L) P4+DEP em relação ao receptor de PR. Houve um maior aumento na expressão de PR quando as células foram expostas ao P4+DEP e ao E2+DEP; A exposição ao P4 apresentou um menor aumento de sua expressão em relação as exposições com hormônios e DEP.

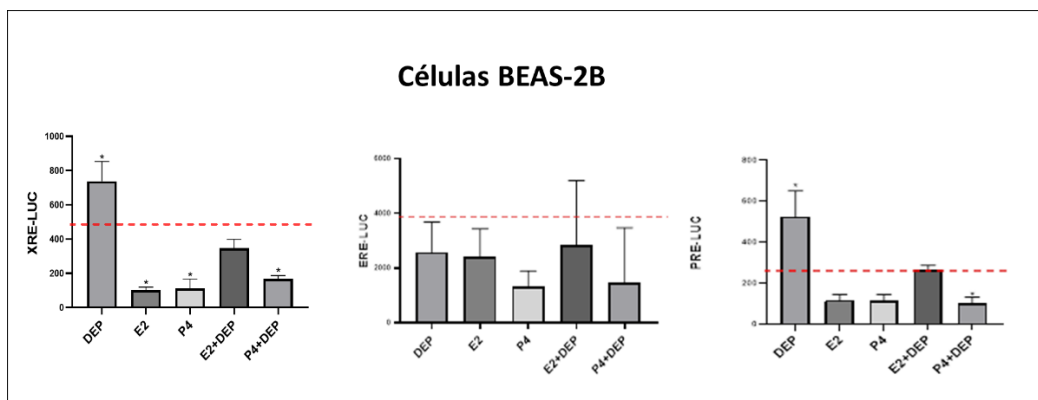


**Figura 22:** Imagens que mostram a translocação dos receptores de AhR, ER $\beta$  e PR do citoplasma para o núcleo em células BEAS-2B (X400). A) o receptor PR não migrou muito para o núcleo quando exposto a P4+DEP; B) o receptor Er $\beta$  migrou para o núcleo quando exposto ao E2+DEP; C) o receptor de AhR migrou para o núcleo principalmente quando exposto ao DEP sozinho.

## 6.6 GENE REPORTER

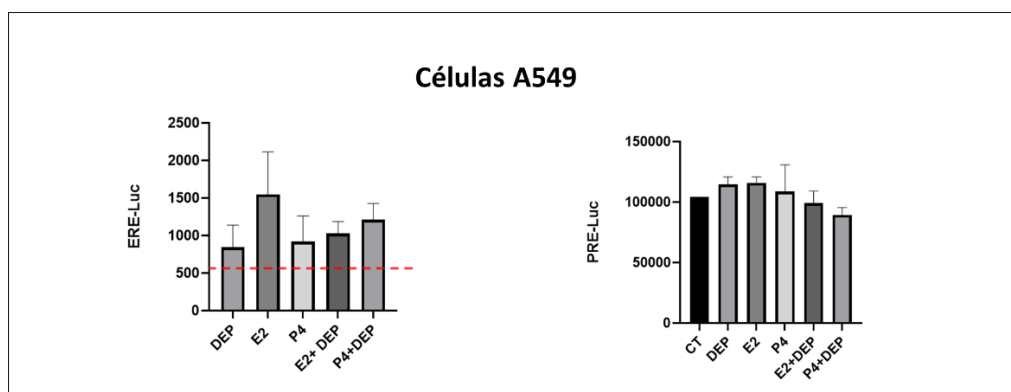
O ensaio do gene repórter com *luciferase* foi feito a partir do equipamento e software *GloMax®* da Promega. O intuito desse ensaio foi analisar uma possível ativação das regiões promotoras *estrogen responsive elemento* (ERE), *progesterone responsive elemento* (PRE) e *xenobiotic responsive element* (XRE) presente nas vias do estrogênio, progesterona e dos xenobióticos, respectivamente. Os resultados significativos em células BEAS-2B foram: diminuição das expressões do promotor (XRE) nos grupos expostos ao: E2, P4, P4+DEP e aumento na expressão do grupo exposto ao DEP; diminuição das expressões do promotor (ERE) nos grupos expostos ao: E2, P4, P4+DEP e diminuição das expressões do promotor (PRE) no grupo exposto ao P4+DEP e aumento na expressão do grupo exposto ao DEP, conforme (figura 23):





**Figura 23:** Atividade dos promotores de interesse associadas ao gene da “*luciferase*” em células BEAS-2B geneticamente modificadas. A) XRE o teste estatístico One way ANOVA pelo método Dunnett’s apontou diferenças significativas entre os grupos: CT vs. E2, CT vs. DEP, CT vs. P4 e CT vs. P4+DEP ( $P = <0,001$ ); B) ERE o teste estatístico One way ANOVA pelo método Dunnett’s apontou diferenças significativas entre os grupos: CT vs. P4+DEP, CT vs. P4 e CT vs. E2 ( $P = <0,001$ ); C) PRE o teste estatístico One way ANOVA pelo método Dunnett’s apontou diferenças significativas entre os grupos: CT vs. DEP e CT vs. P4+DEP ( $P = <0,001$ ).

E os resultados obtidos em células A549 foram: aumento das expressões do promotor (ERE) no grupo exposto ao: E2 e nenhuma diferença significativa entre os grupos do promotor (PRE), conforme (figura 24).



**Figura 24:** Atividade dos promotores de interesse associadas ao gene da “*luciferase*” em células A549 geneticamente modificadas. A) ERE o teste estatístico One way ANOVA pelo método Dunnett’s apontou diferenças significativas apenas para o grupo: CT vs. E2 ( $P = <0,001$ ); B) PRE o teste estatístico One way ANOVA não apontou diferenças significativas entre os grupos ( $P = 0,087$ ).

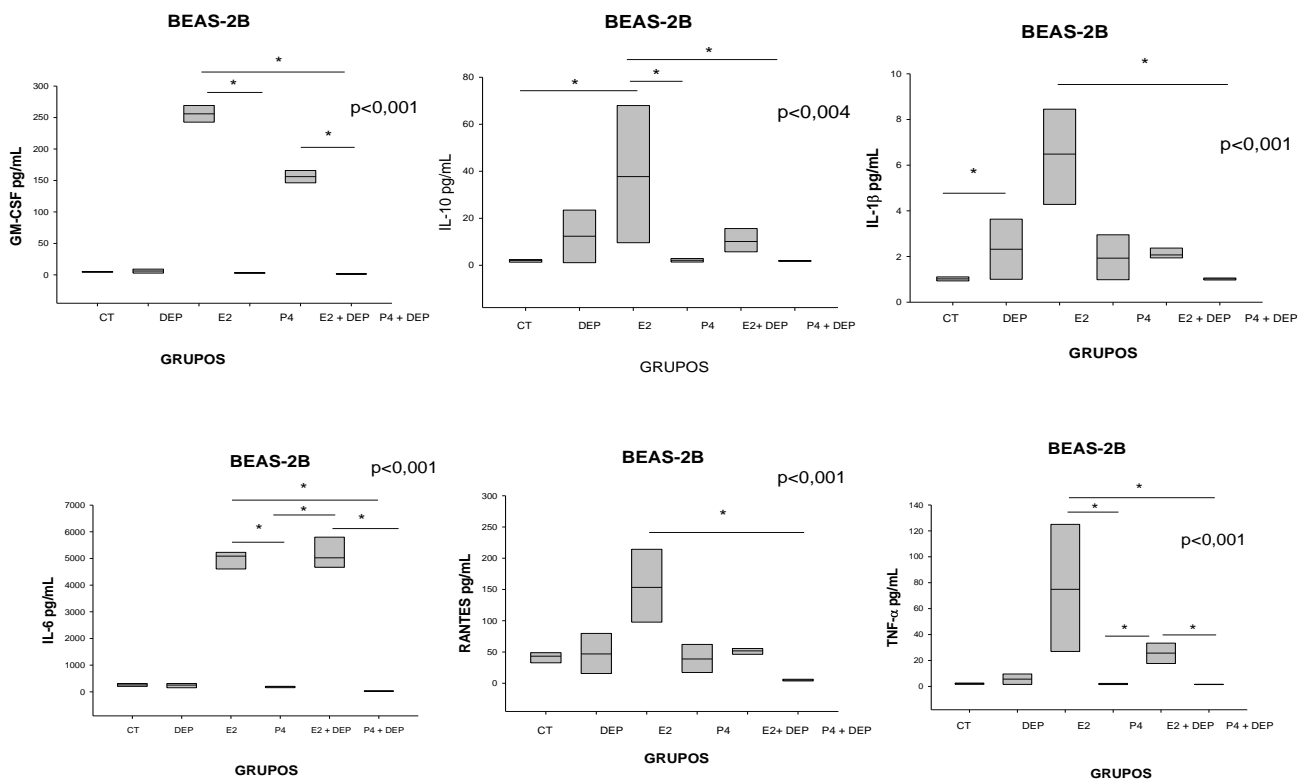
Ao compararmos os dois tipos celulares, se observa que as células BEAS-2B tiveram uma diminuição em seus promotores, principalmente, quando expostos aos hormônios, enquanto as células A549 teve um aumento da expressão do promotor ERE quando exposto ao E2.

## 6.7 LUMINEX®

Para avaliar algumas respostas inflamatórias frente as vias hormonais e de xenobióticos após os tratamentos ao DEP, E2, P4, E2+DEP, P4+DEP foram analisadas algumas citocinas como: GM-CSF, IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6, RANTES e TNF $\alpha$ , que são metabolizadas inicialmente pelas células de pulmão, com o objetivo de ativar o sistema imunológico. Os resultados obtidos pela técnica de multiplex em células BEAS-2B e A549 estão expressas na tabela 6 e nas figuras 25 e 26:

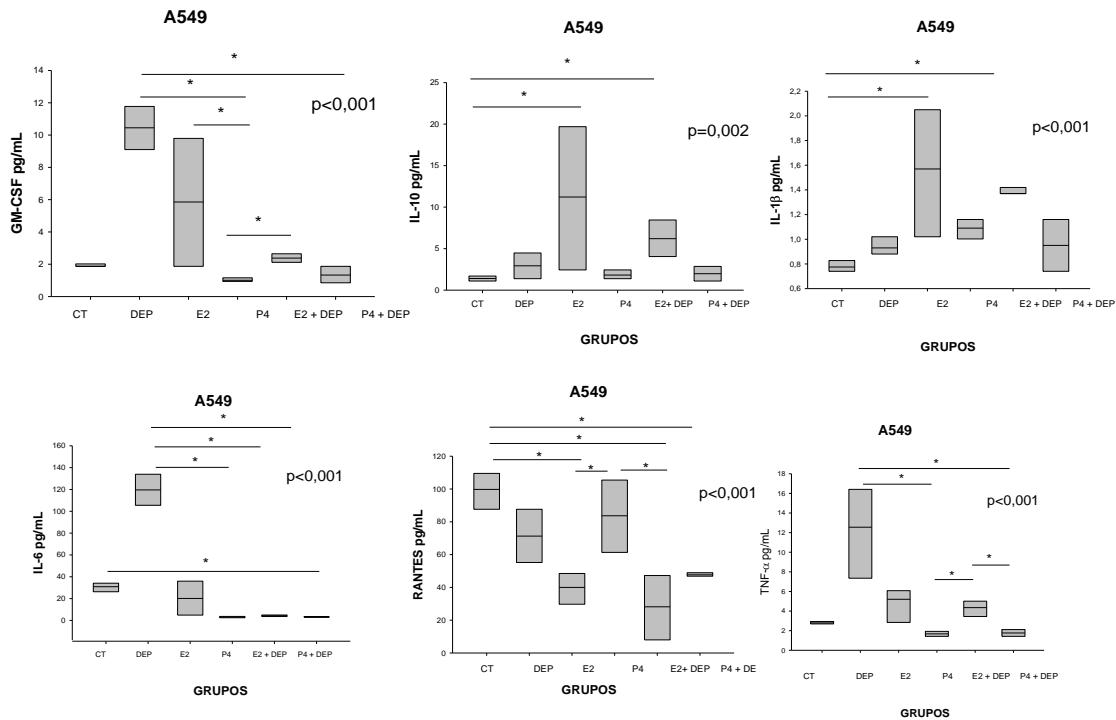
**Tabela 6:** Expressão de citocinas anti e pro-inflamatória de BEAS-2B e A549 expostas a DEP, E2, P4, E2+DEP, P4+DEP e controle.

Analyte Sample	GM-CSF pg/ml	IL-10 pg/ml	IL-1beta pg/ml	IL-6 pg/ml	RANTES pg/ml	TNF alfa pg/ml
Controle 1	157.75	142.65	146.29	165.89	178.81	157.75
Controle 2	731.43	989.08	850.55	976.72)	938.33	808.83
B CT1	4,18	1,38	0,92	205,42	34,32	1,81
BD1	2,94	1,19	0,99	174,44	15,49	1,58
BE1	267,5	9,72	4,27	4672	98,7	27,13
BP1	2,69	1,38	0,99	157,75	17,16	1,42
B E+D 1	146,29	15,6	2,29	4672	55,19	17,69
B P+D1	1,51	1,94	1,03	26,46	6,5	1,64
A CT1	1,91	1,7	0,81	26,46	88,27	2,89
AD1	9,17	1,38	0,88	105,49	55,74	6,66
AE1	1,91	2,58	1,04	4,82	30,87	3,92
AP1	0,93	1,38	0,99	2,43	61,78	1,42
AE+D1	2,16	4,09	1,41	3,62	8,49	3,5
AP+D1	1,85	2,86	1,16	3,13	47,94	2,11
B CT2	5,34	2,44	1,11	311,06	49,06	2,49
BD2	9,44	23,93	3,62	315	79,44	9,72
BE1	241,9	67,09	8,39	5087	217,06	125,8
BP2	3,5	2,86	2,9	208,02	61,78	2,33
B E+D 2	165,89	5,63	1,94	5836	47,38	33,18
B P+D2	1,43	1,76	1	29,26	3,75	1,42
A CT2	1,95	1,1	0,76	34,02	109,63	2,75
AD2	11,9	4,48	1	133,96	87,24	16,41
AE2	9,72	19,57	2,05	35,78	47,94	5,48
AP2	1,13	2,38	1,16	3,62	104,94	1,93
AE+D2	2,6	8,39	1,37	4,94	47,38	5,07
AP+D2	0,85	1,1	0,74	3,29	47,94	1,42



**Figura 25:** Representação gráfica em blox-plot mostrando o efeito sobre as citocinas GM-CSF, IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6, RANTES e TNF- $\alpha$ , quando células BEAS-2B foram expostas a: Meio de cultura (CT), Particulado da exaustão de diesel (DEP), Estrogênio (E2), Progesterona (P4), E2+DEP, P4+DEP. As diferenças significantes são as linhas que vão de um box-plot ao outro marcado com asterisco. As significâncias estão colocadas do lado direito de cada gráfico. GM-CSF = E2 vs P4+DEP; E2 vs P4; E2+DEP vs P4+DEP (p=0,001); IL-10 = E2 vs CT; E2 vs P4+DEP; E2 vs P4 (p=0,004); IL-1 $\beta$  = DEP vs CT; E2 vs CT; E2 vs P4+DEP (p<0,001); IL-6 = E2 + DEP vs P4+DEP; E2 + DEP vs P4; E2 vs P4+DEP; E2 vs P4 (p<0,001); RANTES = E2 vs P4+DEP (p<0,001); TNF- $\alpha$  = E2 vs P4+DEP; E2 vs P4; E2 + DEP vs P4 +DEP; E2 + DEP vs P4 (p<0,001).

As análises feitas em BEAS-2B demonstraram que quando estas foram tratadas com E2, elas aumentaram a expressão de todas as citocinas GM-CSF, IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6, RANTES e TNF- $\alpha$  e quando tratadas com E2+DEP aumentou a expressão em GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ .



**Figura 27:** Representação gráfica em blox-plot mostrando o efeito sobre as citocinas GM-CSF, IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6, RANTES e TNF- $\alpha$ , quando células A549 foram expostas a: Meio de cultura (CT), Particulado da exaustão de diesel (DEP), Estrogênio (E2), Progesterona (P4), E2+DEP, P4+DEP. As diferenças significantes são as linhas que vão de um box-plot ao outro marcado com asterisco. As significâncias estão colocadas do lado direito de cada gráfico. GM-CSF = DEP vs P4; DEP vs P4 + DEP; E2 + DEP vs P4; E2 vs P4 (p=0,001); IL-10 = E2 + DEP vs CT; E2 vs CT (p=0,002); IL-1 $\beta$  = E2 + DEP vs CT; E2 vs CT (p<0,001); IL-6 DEP vs P4+DEP; DEP vs P4+DEP; DEP vs E2+DEP; CT vs P4+DEP (p<0,001); RANTES = CT vs E2+DEP; CT vs E2; CT vs P4+DEP; P4 vs E2+DEP; P4 vs E2 (p<0,001); TNF- $\alpha$  = DEP vs P4; DEP vs P4+DEP; E2+DEP vs P4; E2+DEP vs P4+DEP; E2 vs P4; E2 vs P4+DEP (p<0,001).

Para as células A549, o maior aumento na expressão de citocinas, foi provocado pelo DEP, nas citocinas GM-CSF, IL-6 e TNF- $\alpha$ . Outro resultado obtido foi quando as células A549 foram tratadas com E2 e E2+DEP, aumentando a expressão das citocinas IL-10 e IL-1 $\beta$ . Curiosamente, a citocina RANTES apresentou como resultado a diminuição de sua expressão, quando exposta ao DEP, E2+DEP e P4+DEP.

## 7. DISCUSSÃO

É fundamental a compreensão dos mecanismos celulares dos vários tipos de doenças que acometem homens e mulheres, isto porque as mulheres são consideravelmente mais predispostas a doenças respiratórias e ao câncer relacionado a poluição atmosférica do que os homens (Townsend et. al., 2012; Zhang et. al., 1996; Jain et. al., 2011), e os resultados observados neste estudo apresentaram algumas confirmações da associação entre hormônios sexuais femininos e a poluição atmosférica aqui observada na presença do material particulado da exaustão do diesel (DEP).

Primeiro, a presença de HPAs na amostra de DEP foi confirmada por cromatografia gasosa e espectrometria de massa no laboratório de Química e Manufaturados/Bionanomanufatura do Instituto de Pesquisas Tecnológicas – IPT e compostos como benzo(k)fluoranteno, benzo(a)antraceno e benzo(a)pireno são estruturalmente muito semelhantes aos hormônios sexuais femininos (Wenger et. al., 2008; Santodonato, J., 1996). As células de pulmão, BEAS-2B e A549 que foram submetidas ao DEP com e sem os hormônios estradiol (E2) e progesterona (P4), apresentaram uma grande interação com as vias hormonais. A atuação de E2 associado ao DEP na via do estrogênio demonstrou haver uma sinergia entre hormônio e poluição, capaz de gerar um aumento nas respostas inflamatórias de células epiteliais de pulmão. Já a exposição do DEP quando associado ao P4 na via da progesterona teve em grande parte uma diminuição nas respostas celulares incluindo citocinas, sugerindo a possibilidade de ocorrer uma ação anti-inflamatória. E por fim a via dos xenobióticos metabolizou principalmente o DEP isoladamente, como esperado.

Estudos clínicos sobre doenças respiratórias apontam que ocorre o aumento de sintomas de rinite em mulheres que utilizam contraceptivos orais (Pelikan, 1978); há uma maior incidência de hipertensão pulmonar em mulheres jovens, e que vem sendo investigado (Satish et. al., 2015); Uma análise recente do proteoma solúvel de células da lavagem broncoalveolar de pacientes com DPOC revela mudanças distintas e abundantes em pacientes do sexo feminino (Kohler et al., 2013); E dados epidemiológicos sobre asma relatam um aumento

da doença em mulheres pós-puberal (período de aumento dos hormônios sexuais femininos) e uma diminuição de casos de asma, por volta da menopausa, indicando a ausência de diferença de gênero na asma além dessa faixa etária (Bonner, 1984; Skobeloff et al., 1992).

Para melhor compreensão das afirmações acima, os homens expressam níveis de estradiol e progesterona em concentrações muito baixas, enquanto que nas mulheres os níveis desses hormônios variam substancialmente de 20 pg/ml de estradiol e 0,3 ng/ml de progesterona na fase folicular em mulheres não grávidas e pós-menopausa, a 40 ng/ml de estradiol e 300 ng/ml de progesterona em mulheres grávidas. Esses hormônios têm grande importância no epitélio brônquico, pois tem a função de modulação de barreira, em suas respostas a estímulos externos, incluindo patógenos e alérgenos (Satish et. al., 2015).

Então, a exposição à poluição aliada aos hormônios endógenos sugere que haja o agravamento de doenças pulmonares, ainda mais porque os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) adsorvidos pelo material particulado do diesel presente na poluição atmosférica, são capazes de atuarem como mimetizadores endócrinos (Clemons et. al, 1998; Wang et al.; 2004; Klein et. al. 2006; Hayakawa et al., 2007).

Para uma compreensão mais detalhada, a primeira parte deste estudo foram caracterizados 16 diferentes tipos de HPAs adsorvidos no DEP, sendo eles: acenafitaleno (Ace), fenantreno (Fe), antraceno (Ant), pireno, benzo(a)antraceno (BaA), criseno, benzo(b)fluoranteno (BbF), benzo(k)fluoranteno (BkF), benzo(a)pireno (BaP), indeno(1,2,3-cd) pireno (InP) e dibenzo antraceno (DBA). A concentração total na amostra de estudo foi apresentada em uma unidade de medida ( $\mu\text{g/g}$ ). Geralmente, a concentração média de HPA individual, na poluição atmosférica, como na cidade de São Paulo varia de 1 a 30  $\text{ng/m}^3$ . Esses valores se alteram conforme a estação do ano, e áreas urbanas, (Vasconcellos et. al., 2003; Bourotte et. al., 2005). Além disso, cerca de 46-90% da massa de HPAs presente na atmosfera, estão presentes no material particulado que são emitidos por veículos motorizados. Eles são condensados e liberados durante o processo de combustão incompleta formando partículas ultrafinas menores que 0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Baek et. al., 1991; Miguel et. al., 2004). Essas partículas têm maior probabilidade de se depositarem no sistema respiratório mais profundo, após a inalação e

prejudicarem a saúde humana (Kameda et al., 2005). Segundo a organização *Environmental Protection Ambient* (EPA), se estima que um homem pode inalar ao máximo a média de 15,2 m<sup>3</sup>/dia de HPAs potencialmente carcinogênicos, enquanto as mulheres devem inalar 11, 3 m<sup>3</sup>/dia ao máximo.

Observando as tabelas do resultado de caracterização do DEP, se percebe que há grandes concentrações de BbF/BkF, criseno e DBA. Segundo Allen et. al (2008), esses hidrocarbonetos estão entre os que mais possuem características carcinogênicas (BaA, BbF, BkF, BaP, DBA and IND). Eles são conhecidos como carcinógenos químicos ambientais, e possuem ações mutagênicas, capazes de induzir tumores malignos, malformações e distúrbios fetais (Glushkov & Polenok, 2017).

Dentre todos os carcinogênicos ambientais, o benzo(a)pireno (BaP) e seus derivados são os hidrocarbonetos que apresentam mais estudos em relação a sua capacidade de se ligar ao receptor de estrogênio (ER) e ter atividade estrogênica e/ou antiestrogênica (Charles et al., 2000; Hirose et al., 2001). Amadou et. al. (2021), sugerem que um maior risco de câncer de mama está associado a mulheres que foram expostas por mais tempo ao BaP presente na poluição do ar. Artymuk et. al. (2021), sugerem que pacientes com endometriose apresentam níveis mais elevados de anticorpos IgA e IgG se expostos ao BaP.

Annibal, et. al. (2000) afirmou que a presença do BaP, por si só, não justifica toda a atividade carcinogênica em um indivíduo, ela pode também ser atribuída à presença conjunta de outros membros da família dos HPAs e de alguns de seus derivados, principalmente nitroderivados que quando oxidados levam a formação de epóxidos secundários (di-hidrodiolépóxidos), capazes de iniciar um processo mutagênico sem mesmo ser metabolizado. Já se tratando de metabolização dessas substâncias contidas na poluição atmosférica, elas atuam como produtos químicos desreguladores endócrinos (EDCs) que podem interferir nos sistemas endócrinos humanos e animais (Chen et al., 2022) e, assim, afetar adversamente os organismos. Geralmente são classificados em três grupos: compostos androgênicos (EDsA) que imitam ou bloqueiam a testosterona natural; compostos da tireóide (EDsT) que têm efeitos diretos e indiretos na glândula tireoide; e compostos de estrogênio (EDsE) que imitam ou

bloqueiam o estrogênio natural (Alvarez-Múnoz et al., 2018; Pamplona-Silva et al., 2018), sendo este último o de maior interesse nesse estudo.

De um modo geral, muitos estudos confirmam a relação dos HPAs e seus derivados com os esteroides endógenos femininos, como por exemplo, o estradiol, e demonstraram ter grande potencial para atividades estrogênicas, como a liberação do próprio estrogênio; atuação sobre os seus receptores (ER) e ativação da transdução de sinal intracelular, influenciando nas respostas inflamatórias (Kuiper et. al., 1998). O presente estudo, assim como no estudo anterior, também possibilitou observar uma interação do DEP em células de pulmão, que demonstraram a capacidade de atuar nas vias dos hormônios sexuais femininos, gerando perturbações moleculares e desequilíbrio hormonal.

Antes do início das exposições, foram feitas padronizações nas concentrações, citotoxicidade e eficiência dos hormônios 17 $\beta$ -estradiol (E2), progesterona (P4) e do material particulado de DEP. Essas padronizações foram testadas no decorrer do estudo em dois tipos de células do pulmão, sendo a BEAS-2B (célula imortalizada do epitélio brônquico) e a A549 (célula de adenocarcinoma humano alveolar do epitélio basal), já que de início a células BEAS-2B apresentaram uma menor eficiência em suas respostas aos testes iniciais.

As análises de citotoxicidade do DEP apresentaram mais que 25% de morte celular após a exposição de 8 horas nas concentrações de 100  $\mu$ g/ml e de 50  $\mu$ g/ml. De acordo com a *Organisation for Economic Cooperation and Development* (2018), a concentração letal de um agente químico no ambiente é equivalente a dose que pode matar 50% dos animais testados no período de observação de até 4 horas (*Lethal Concentration 50 – LC<sub>50</sub>*). Com isso, foi determinado o uso da concentração de 10  $\mu$ g/ml de DEP pelo período de 8 horas nos ensaios celulares, a fim de analisar melhor as interações moleculares. Além disso, Seriani et. al. (2015), utilizou 15  $\mu$ g/ml de DEP em células BEAS-2B a fim de avaliar os efeitos tóxicos do DEP nas vias aéreas e obteve resultados bem significativos na concentração próxima da escolhida nesse estudo.

Para a padronização dos hormônios, principalmente do E2, foi feito um ensaio de proliferação celular e também, uma análise bibliográfica das concentrações adequadas. A escolha do ensaio de proliferação com E2 está relacionada a influência desse hormônio no crescimento e diferenciação celular



(Mollerup et. al., 2002; Zhang et. al., 2009). Como resultado, o E2 apresentou um aumento significativo e adequado em células expostas a concentrações de 100 pM a 10 nM de E2 por 72 horas. Em relação a literatura, foi seguido os protocolos de Mollerup et. al. (2002) e Sun et. al. (2014) que indicavam concentrações de 1nM E2 e 10nM P4 respectivamente.

A primeiras exposições foram feitas em BEAS-2B com os hormônios e DEP, foram feitas para serem analisadas as expressões gênicas por RT-qPCR (*PCR real time*) dos receptores de estrogênio (ER $\beta$ ), do receptor de progesterona (PR) e do receptor de aril-hidrocarboneto (AhR). Ao definir a curva padrão de cada condição para analisar os resultados posteriormente, o ER $\beta$  não teve sua curva estabelecida na célula em condição basal e nem quando exposta a diferentes concentrações de E2, como esperado. A fim de encontrar uma solução para essa etapa do RT-qPCR, o teste foi refeito mais algumas vezes, com a troca dos primers e algumas modificações, mas apenas a expressão do gene constitutivo (GAPDH) e do gene do receptor de (AhR) obtiveram uma curva padrão correta. Para uma maior certeza da presença dos receptores de ER $\alpha$ , ER $\beta$  e PR nas células, foi feita ainda uma análise da expressão gênica por PCR convencional que apresentou uma baixa expressão de mRNA desses receptores nas células BEAS-2B.

De acordo com Mollerup et.al. (2002) a expressão do mRNA do receptor ER $\alpha$  encontrada por eles em células imortalizadas de pulmão são bem menores quando comparadas à expressão do mRNA de ER $\beta$  em tecido de pulmão normal, o que levou a ser analisado apenas as respostas do ER $\beta$  nesse estudo. Outros estudos de revisão sobre a via do estrogênio, afirmam que existe um baixo nível de expressão de seus receptores (ER $\alpha$  ER $\beta$ ) em alguns tipos de células imortalizadas e que se faz necessários testes bem sensíveis para que haja a detecção desses genes (Wang et. al., 2021; Musial et. al., 2021).

Mesmo com a baixa expressão do ER $\beta$  no ensaio qualitativo de PCR convencional, foi possível analisar as alterações de expressão nos mRNAs dos receptores de ER $\beta$ , PR e AhR.

As repostas encontradas pelo teste de PCR convencional, observaram de modo geral a diminuição da expressão dos mRNA dos receptores de interesse nesse estudo. Se sugere que este fato, pode estar relacionada ao tempo de exposição do DEP e dos esteroides nas células, onde as BEAS-2B tiveram

apenas tempo para sintetizar proteínas a partir da quantidade de mRNA basal, como ocorre com a biossíntese da mucina que leva 6-24h para ocorrer (Neutra & Fostner, 1987). Outro exemplo foi o estudo de Yoshizaki et. al. (2016) que observaram que a expressão do mRNA de ER $\beta$  no epitélio nasal de camundongos fêmeas expostas ao Concentrador de Partículas Ambientais (CPA), por um tempo de 40-51 dias diminuiu em comparação a fêmeas e machos expostos ao ar ambiente e em análise imunohistoquímica (proteína do receptor), o ER $\beta$  aumentou nessas mesmas condições. Supondo que neste estudo, os mRNA dos receptores de AhR, ER $\beta$  e de PR $\beta$  seriam traduzidos em proteínas, sugeri que, a resposta foi negativa porque não houve tempo hábil para recomeçar a biossíntese, e que houve uma proporcionalidade inversa entre a quantidade de mRNA e das proteínas sintetizadas por eles.

Em relação ao receptor AhR neste estudo, as respostas apresentaram diminuições significativa de sua expressão entre os grupos: CT vs DEP; CT vs DEP+E2; CT vs DEP+P4; E2 vs DEP; E2 vs DEP+P4; P4 vs DEP; P4 vs DEP+E2 e P4 vs DEP+P4. Como esperado, o AhR respondeu principalmente à exposição ao DEP. Ele apresentou uma significativa diminuição da expressão do seu mRNA, confirmando a participação dele na metabolização do material particulado. A resposta ao receptor de AhR também apresentou uma diminuição na expressão de seu mRNA quando exposto ao DEP associado aos hormônios. Isso pode ocorrer pois a via do AhR metaboliza diversos xenobióticos, mas também pode mediar a metabolização do 17 $\beta$ -estradiol (E2) e da estrona (E1) por genes do citocromo P450 (Lee et. al., 2003), indicando principalmente a ligação do estrogênio ao receptor de AhR. Mas, por outro lado, o AhR não alterou significativamente sua expressão na presença do E2 sozinho e sim apenas quando o DEP estava associado a ele. Ao relacionar que os HPAs adsorvidos no DEP possam mimetizar o E2 e que mulheres fumantes apresentam um aumento significativo nos níveis de expressão do gene CYP1A1, que codifica uma das principais enzimas na ativação metabólica dos HPAs (Ryberg et. al. 1994; Wenger et.al., 2009) se pode sugerir que exista uma maior interação do E2 com o receptor de AhR quando ele está associado aos HPAs existentes na mesma exposição. Segundo Vickers et. al. (1989) existe uma variação na quantidade dos ERs em câncer de mama associado à expressão das enzimas

metabolizadoras de xenobióticos nas fases I e II quando expostas ao benzo(a)pireno e ao agente antineoplásico elipticina.

O aril hidrocarboneto (AhR) tradicionalmente é considerado como um intermediário crítico na resposta tóxica e cancerígena, porém, provou ser também um importante regulador da fisiologia celular e homeostase de órgãos. Ele apresenta sua contribuição para o funcionamento adequado dos sistemas imunológico, hepático, cardiovascular, vascular e reprodutivo. No nível celular, o AhR estabelece interações funcionais com vias de sinalização que regem a proliferação, o ciclo, a morfologia, a adesão e a migração celular. Esse receptor também tem sua implicação no controle da diferenciação e na pluripotência celular. A nível molecular, o AhR regula uma gama de genes fisiologicamente relevantes, seja por mecanismos dependentes de transcrição tradicionais ou por processos imprevistos envolvendo isoladores genômicos, dinâmica da cromatina e a transcrição genética. É razoável considerar que a desregulação dessas funções poderia contribuir ou até mesmo causar doenças humanas (Mulero-Navarro & Fernandez-Salguero, 2016).

O mRNA de ER $\beta$  demonstrou uma diminuição significativa da expressão entre os grupos: CT vs DEP; CT vs DEP+E2; CT vs DEP+P4; E2 vs DEP; E2 vs DEP+E2 e P4 vs DEP. A expressão do ER $\beta$  foi bem parecida com a expressão do AhR, ele pareceu responder mais ao DEP do que ao próprio E2 ao diminuir muito mais sua expressão quando comparamos um ao outro. Esta resposta sugere que exista uma interação entre os HPAs presentes no DEP com os receptores de estrogênio. E mais uma vez, demonstra a capacidade dos HPAs em mimetizar os esteroides sexuais femininos, sugerindo que eles possam provocar efeitos na via do estrogênio causando um bloqueio, uma diminuição ou até mesmo a alteração de suas funções, competindo assim por sítios receptores disponíveis (Clemons et. al, 1998). Esses xenoestrogênios também resultam em respostas adversas a estímulos fisiológicos ou iniciam mudanças inadequadas associadas à malignidade (Ying et al., 2002). Além disso, existem algumas evidências que apoiam o papel de desreguladores endócrinos estrogênicos que possam promover a carcinogênese pulmonar (Sweeney et al., 2015). Estudos demonstraram que a inalação de vapores de óleo de cozinha, que são compostos principalmente de aldeídos e HPAs, podem aumentar o risco de desenvolvimento de câncer de pulmão (Siastad et al., 2009), especificamente

em não fumantes (Pan et al., 2018). Chaloupka et. Al, 1996; Lin et.al., 2003; Kharat e Saaticiole, 1996, discutem sobre a capacidade dos HPAs e o estrogênio de promoverem uma alteração mútua, o que poderá resultar em desequilíbrio de ambos, que por sua vez poderá levar a tumorigênese.

Com relação ao mRNA da PR $\beta$  houve uma diminuição significativa entre CT vs E2; CT vs P4; CT vs DEP; CT vs DEP+E2; CT vs DEP+P4 e E2 vs DEP+E2. A diminuição do mRNA de PR $\beta$  se apresentou mais significativa para o DEP+P4 e para o DEP+E2 do que para o DEP isoladamente, apresentando uma diferente resposta em comparação ao resultado dos outros receptores. Neste caso, se sugere que o receptor de PR $\beta$  tem uma maior afinidade pelo DEP quando associado aos esteroides sexuais femininos, podendo ser um grande influenciador nas respostas celulares da via da progesterona. Uma outra diminuição significativa do mRNA deste receptor é quando ele está associado a presença do E2. Isso pode estar relacionado a capacidade deste receptor de metabolizar também o E2 além da P4. (Grott et. al., 2013) Mesmo assim, o receptor de PR $\beta$  pareceu ter uma grande afinidade com todas as moléculas a que foi exposto, sugerindo uma maior capacidade de interação com os HPAs do que o receptor de ER $\beta$ , que é muito conhecido na literatura. Isso pode estar associado à hipótese de que haja uma competição entre os três receptores (AhR o ER $\beta$  e o PR $\beta$ ) em relação ao DEP, principalmente por conter compostos orgânicos com capacidade estrogênica. Santodonato et. al., (1996) observaram como muitos compostos naturais e antropogênicos exibem propriedades estrogênicas em uma variedade de sistemas de bioensaio animal *in vivo* e *in vitro*, mas apenas um limitado número de químicos do meio ambiente com propriedades anti-progesterogênica foram identificados (Tran et al. 1996; Klotz et al., 1997) trazendo pouca informação a respeito das atividades progesterogênica ou anti-progesterogênica de substâncias no meio ambiente, demonstrando a necessidade de mais estudos sobre a interação HPAs/via da progesterona.

Comparando todos os resultados nessa etapa, o DEP aparenta desempenhar um importante papel tanto na via do AhR quanto na dos esteroides femininos (estrogênio e progesterona) e isso provavelmente está relacionado a presença dos HPAs adsorvidos no seu material particulado.

A fim de confirmar e analisar esse resultado com uma maior sensibilidade de detecção dos receptores AhR, ER $\beta$  e PR $\beta$ , foi utilizado o método de imunofluorescência. Os resultados observados nesta etapa foram apenas qualitativos, a fim de demonstrar que ocorreu diferenças na expressão e localização da proteína desses receptores. Foi ilustrado nos resultados apenas as respostas as células BEAS-2B, isso porque, ambas as células expressam seus receptores de maneira muito parecida. A diferença existente entre elas só poderia ser detectada através de uma quantificação de seus receptores.

De início, pode se observar que as expressões das proteínas desses receptores, realmente apresentaram uma relação inversamente proporcional ao seus mRNAs, conforme sugerido no resultado do teste de PCR.

Assim, as proteínas do receptor de AhR demonstraram um maior aumento em sua expressão quando as células foram expostas principalmente ao DEP. Choi e Kim (2021) também observaram que HPAs derivados de material particulado aumentaram a expressão do receptor AhR em células de fibroblastos das pregas vocais humanas e induzindo as respostas inflamatórias e o estresse oxidativo das células.

Além do aumento na expressão, os receptores de AhR durante a exposição ao DEP demonstraram uma maior concentração no núcleo das células, sugerindo que eles tenham se translocado para essa região, a fim de ser transcrito e metabolizado junto de seu ligante. Alguns estudos atuais apresentaram os mesmos resultados em relação a localização desse receptor, como por exemplo, Liu et. al. (2023) que observaram a translocação do AhR para o núcleo em células epiteliais de pulmão de camundongo MLE-12 e células epiteliais alveolares primárias tratadas com PM2.5 (10  $\mu$ g/ml) por 12 horas. Kim et. al. (2021) apresentaram os mesmos efeitos do PM2.5 nos receptores de AHR de queratinócitos primários humanos e pele organotípica.

Outro curioso resultado do AhR, foi o aumento da expressão de AhR durante a exposição ao P4+DEP. Dentre os poucos estudos que citam a participação de P4, se observa que existe um papel importante para ele na regulação da sinalização do AhR no útero de ratas. Eles afirmam que a P4 tem efeitos semelhantes ao E2 em relação a expressão de AhR, mas uma resposta antagonista ao E2 em relação aos genes-chave Cyp1a1, Gsta2 e Ugt1 (Rataj et.

al., 2015), colaborando com a hipótese de P4 ter uma ação anti-estrogênica e anti-progesterônica quando exposta em alguns tipos celulares.

Quanto ao receptor ER $\beta$ , este teve como resultado, um aumento da expressão de sua proteína quando as células foram expostas a E2+DEP. Assim como o receptor de AhR em relação ao DEP ele também apresentou a translocação de alguns receptores ER $\beta$  para o núcleo celular durante a exposição a E2+DEP. A ação de E2+DEP pode potencializar as respostas celulares tanto na via do estrogênio quanto na de xenobióticos, já que o E2 e o DEP podem atuar em ambas as vias de forma isolada ou conjunta. Helle et al. (2016), observou que células de glândulas mamárias de ratas quando tratadas com E2, expressaram um aumento nos receptores de AhR enquanto outros estudos relataram que alguns PAHs, incluindo benzo[a]pireno (B[a]P) e benzo[a]antraceno (B[a]A), podem ativar os receptores ER, seja diretamente ou indiretamente, produzindo metabólitos estrogênicos (Charles et al., 2000; Fertuck et al., 2001; Ohtake et al., 2003; Gozgit et al., 2004; Plísková et al., 2005).

Além disso, se tratando do ER $\beta$  expresso em células de pulmão, Luo et al. (2021), observou um aumento de ER $\beta$  e da citocina IL-6 quando expostos a extrato orgânico do PM2.5 e a inibição do receptor de estrogênio, diminuiu a expressão de IL-6 promovendo ainda mais a transformação maligna das células e confirmando estar envolvido em vários tipos de câncer.

Os receptores de PR surpreendentemente expressaram um grande aumento no número de proteínas nas células de pulmão quando expostas a todos os tratamentos. Levando em consideração que o resultado de seu mRNA foi inversamente proporcional a quantidade de proteínas, ambos os resultados aqui apresentados colaboram a respeito da expressão de PR em células de pulmão. Como já dito anteriormente, existem pouquíssimos estudos que abordam sobre o PR em pulmão. O que se pode afirmar é que esses receptores estão envolvidos na produção de citocinas inflamatórias (Artmuk, 2021). Mas estudos como o de Taylor (1961) observou que apesar do PR estar presente na mucosa nasal, a progesterona tem pouco efeito funcional, e também estudos de co-localização usando a proteína marcadora de células cíliadas  $\alpha$ -tubulin revelam que os PRs são expressos em regiões proximais dos cílios em células epiteliais traqueais humanas (Jain et al., 2012), com uma expressão mais elevada de PR $\beta$  em ambos os sexos. A progesterona diminui a motilidade ciliar

em células epiteliais: um efeito que é prevenido pela adição de E2, mostrando os efeitos potencialmente opostos desses esteroides sexuais (Jain et al., 2012).

A segunda etapa do estudo avaliou mudanças nas respostas celulares mediadas por genes no nível de transcrição/tradução. O ensaio de gene repórter se baseia na expressão do gene de interesse em resposta à ativação de uma cascata de sinalização específica, sob o controle de um elemento de resposta para avaliar sua atividade transcricional que pode ser facilmente detectada por um sinal luminescente (Unal, 2018). Além de exibir resposta genômica, as substâncias químicas desreguladoras endócrinas (EDCs) também modificam sinais de transcrição inibindo ou sintetizando novas proteínas. EDCs que imitam hormônios esteroides endógenos podem induzir uma resposta não genômica rápida, ligando-se com receptores de membrana plasmática e agindo por meio de cascatas de sinais desencadeados por segundos mensageiros, resultando em mudanças na motilidade celular, processos de sinalização e síntese hormonal rápida (Watson et al., 2007).

Os resultados em relação ao promotor XRE após os tratamentos com o DEP e os hormônios, foram significativos para CT vs DEP (ativação); CT vs E2, CT vs P4 e CT vs P4+DEP (inibição). A ativação do gene repórter XRE quando exposto apenas ao DEP, foi um resultado esperado, já que essa é a principal via de metabolização de xenobióticos como no caso dessa substância. Muitos estudos já observaram que o material particulado, em especial emitido por veículos, contém adsorvidos em suas moléculas compostos de HPAs e que por sua vez são capazes de ativar a via do aril-hidrocarboneto (Vogel et. al., 2020). Saito et. al. (2021) observou o aumento na atividade de transcrição dependentes do AHR/XRE induzidas por BaP em células de mama MCF-7, o que também demonstra a metabolização desse composto a partir do promotor XRE. Além disso, estudos como os de Grytting et. al., (2022) e Øvrevik et. al., (2015), afirmam que o promotor XRE regula inúmeras citocinas diretamente ou com o auxílio do fator de transcrição nuclear kappa  $\beta$  (NF- $\kappa$  $\beta$ ). Após a etapa de transcrição por essa via canônica, os xenobióticos são metabolizados por enzimas de fase I, como CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 e enzimas de fase II, incluindo NADPH:quinona oxidoreductase (NQO1), glutathione Stransferase (GST) A2 e UDP-glucuronosiltransferase (UGT) 1A1 e UGT1A6. Existe também um estudo que relaciona a resposta direta do promotor XRE em humanos e ratos,

como capaz de recrutar macrófagos quando expostos ao BaP (Pinel-Marie et al., 2009).

Em relação a inibição da atuação do promotor em resposta ao E2 e ao P4, se supõe que ocorra uma interação entre a via do AhR e os receptores ERs através de um mecanismo inibitório, principalmente do E2 e de seus receptores. Provavelmente, esses mecanismos estão relacionados as semelhantes estruturas moleculares entre os hormônios e os disruptores endócrinos. Mas, muito pouco se conhece sobre essa interação (Hwang et al., 2022).

Como resultado do gene repórter ERE em relação ao DEP e aos hormônios, não houve uma expressão significativa que indicasse a ativação ou inibição da via estrogênio. Analisando esse resultado em conjunto com os demais observados nesse estudo, se sugere a possível ligação do receptor ER $\beta$  e seus ligantes a um outro fator de transcrição atuante nessa via.

Se sabe que o promotor ERE é o fator de transcrição clássico dos receptores de ER e é conhecido por regular o crescimento celular (Heldring et al., 2007). Mas nem todas as respostas mediadas por ER requerem a ligação direta com o ERE. Eles também ativam a transcrição por meio de um 'mecanismo de ancoragem' no qual esses receptores podem interagir diretamente com outros fatores de transcrição ligados aos seus elementos de resposta. Dentre esses genes promotores, alguns exemplos são Sp1, AP-1, CREB1, PITX1, NF-k $\beta$ , PAX2, FOXA1, AP2, TCF, PAX6, BACH1, MEF3 e LUN1 (Charn et al., 2010; Porter et al., 1996; Paech et al., 1997; Heldring et al., 2011; Stender et al., 2011). O receptor ER $\beta$  especificamente, tem maior afinidade em se ligar com locais como o AP-1 (Zhao et al., 2010). Esse mecanismo de ação genômica indireta foi demonstrado em estudos envolvendo a atividade moduladora do ER $\beta$  nos fatores de transcrição do complexo Fos/Jun/AP-1 (Darbre, PD. 2014). Com isso, se sugere que uma possível região promotora que teria respondido aos tratamentos desse estudo, seria o promotor AP-1. Sendo interessante, se fazer um estudo mais detalhado dele.

Os resultados em relação ao promotor PRE após os tratamentos de interesse, foram significativos para CT vs DEP (ativação) e CT vs P4+DEP (inibição). A ativação do promotor PRE quando exposto ao DEP isoladamente, pode sugerir sua participação na via da progesterona, com a capacidade de mimetizar os hormônios sexuais femininos e promover uma ação progesterônica,



por outro lado, quando ele está associado a P4 se torna capaz de inibir o promotor PRE, sugerindo então ocorrer uma atividade anti-progesterônica na presença desse hormônio. O estudo de Wang et. al. (2005), observou que o material particulado proveniente da combustão de veículos inibiu a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase dependente de progesterona em levedura recombinante. É provável que num organismo feminino a ação anti-progesterônica prevaleça, devido a uma maior presença do hormônio P4 no organismo e conseqüentemente de seus receptores, como observado nos resultados de imunofluorescência.

Outros estudos usando a proteína marcadora de células cíliadas  $\alpha$ -tubulin, revelam que a exposição a progesterona diminui a motilidade ciliar em células do epitélio nasal, enquanto que o E2 é capaz de fazer o efeito contrario (Jain et al., 2012). Isso indica a possibilidade de a progesterona realmente atuar como um antagonista ou inibidor de determinadas respostas celulares.

Por fim, a última etapa apresentou respostas mediadoras a processos inflamatórios. Os resultados observados foram de modo geral, o aumento da expressão das citocinas GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, RANTES e TNF- $\alpha$  quando as células foram expostas ao E2 e ao E2+DEP em células BEAS-2B, indicando mais uma vez a sinergia dos hormônios associados ao material particulado. Já as células cancerígenas A549, expressaram um aumento de suas citocinas quando expostas somente ao DEP. Porém, a diferença mais interessante entre os dois tipos celulares foi que a célula BEAS-2B produziu citocinas inflamatórias 10X mais que as células A549. Um estudo feito em 2010 por Gualtieri et al., mostraram que células BEAS-2B apresentaram maior porcentagem de células necróticas, apoptóticas, mitótica e mitótica-apoptótica em concentrações variáveis de material particulado da poluição atmosférica quando comparados com células A549, mostrando também que estas são mais capazes de sobreviver a insultos que células normais.

Focando no material particulado, estudos recentes observaram a interação dele e seus componentes com o receptor AhR como um evento-chave que leva ao aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-8, proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), CXCL2, e à promoção de respostas imunes Th17 (Vogel et. al., 2020). Geralmente a exposição a alguns xenobióticos também pode induzir a superprodução de metabólitos com efeitos

tóxicos, e ativar o AhR, que por sua vez, pode regular positivamente alguns outros genes, incluindo TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , citocinas (IL-2, IL-6, IL-8, IL-1), mantendo a inflamação e, portanto, contribuindo para o desenvolvimento do câncer de pulmão (Tsay et al., 2013, Puga, Ma e Marlowe, 2009; Hillegass et al., 2006).

Dentre as citocinas citadas anteriormente, IL-1 $\beta$  apresentou uma resposta bem significativa em relação ao DEP isoladamente e ao E2 sozinho também. E o fator de necrose tumoral aumentou sua expressão principalmente quando exposto a E2 isolado, assim como respondeu a quimiocina RANTES.

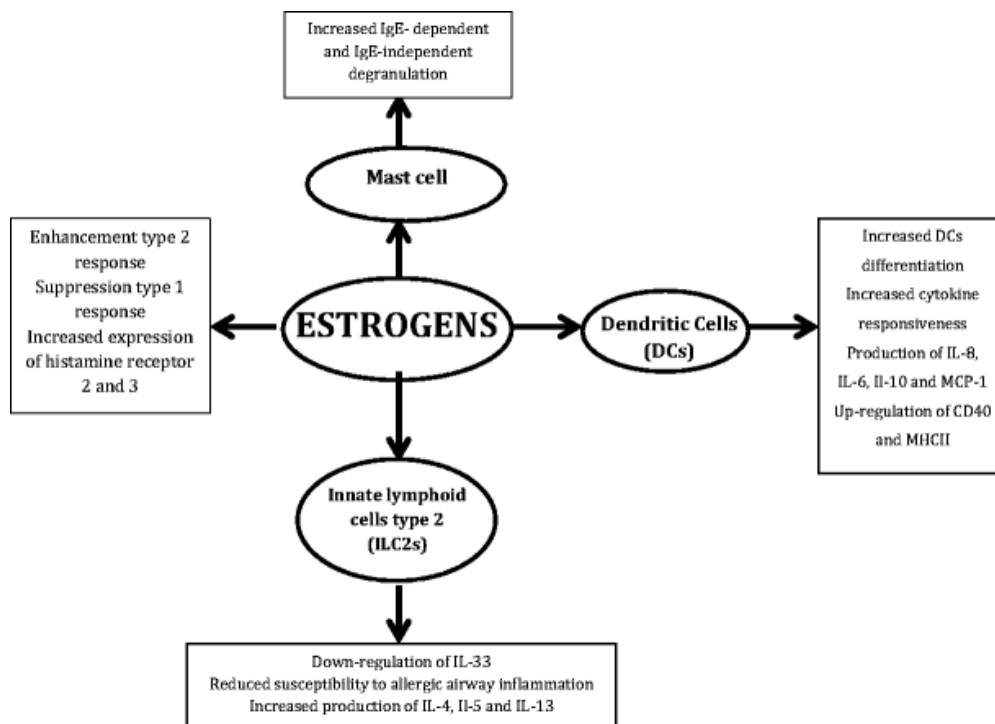
O IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e RANTES são citocinas envolvidas com respostas pró-inflamatórias e são produzidas principalmente por células inflamatórias, mas são encontradas em epitélio respiratório, sendo que a IL-1 $\beta$  está ligada a proliferação, diferenciação e apoptose celular; RANTES recruta leucócitos para o local da inflamação e TNF- $\alpha$  provoca morte celular.

A citocina, fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) facilita o desenvolvimento do sistema imunológico e promove a defesa contra infecções, os monócitos podem se diferenciar em macrófagos (Mo-Macs) ou células dendríticas (Mo-DCs) e GM-CSF induz a diferenciação de monócitos em Mo-Macs, enquanto a combinação de GM-CSF/interleucina (IL)-4 é amplamente utilizada para gerar Mo-DCs. Neste contexto, a exposição de BEAS-2B e A549 quando expostas aos grupos de tratamento, apresentaram um aumento da citocina GM-CSF quando exposta ao E2, E2+DEP e quando expostas ao DEP, respectivamente. Além dessa citocina, o mesmo resultado foi observado para a citocina IL-6. Existem evidências consistentes em doenças metabólicas ósseas e doenças hepáticas induzidas por vírus de que os estrogênios inibem a patogênese da doença através da supressão da produção de IL-6. Em um estudo retrospectivo de mulheres pós-menopausa com hepatite C crônica, a progressão para fibrose hepática foi menor em mulheres que fizeram terapia hormonal com estrogênio, em comparação com mulheres que não fizeram. Em modelos pré-clínicos de infecção por influenza, os estrogênios exibem ações imunomoduladoras poderosas, levando a uma resposta imunológica inata mais apropriada nos pulmões, associada a uma diminuição das citocinas pró-inflamatórias (Mauvais-Jarvis et. al., 2020). Comparando esses resultados aos desse estudo, a resposta encontrada foi inversa, pois apresentou o aumento da IL-6 justamente na presença do E2. Talvez essa resposta possa

estar relacionada aos HPAs presentes no DEP, que são capazes de mimetizar o E2 e o P4, podendo gerar uma resposta diferente das estudadas para infecções. Mas para confirmar essa hipótese se faz necessário um estudo mais detalhado.

A resposta de IL-10 foi em maior quantidade, por ambas a células BEAS-2B e A549, quando exposta ao E2 embora A549 teve uma menor concentração que a BEAS-2B. A IL-10 desempenha um papel fundamental na limitação da resposta imune do hospedeiro durante a infecção, inflamação, autoimunidade, transplante e tumorigênese (Kim et al., 1995; Fortis et al., 1996).

No diagrama abaixo (figura 28), Ridolo et al., 2019, através de revisão, colocaram que a alergia respiratória, e especialmente a asma, se desenvolve de forma diferente em homens e mulheres. Os mecanismos subjacentes à essa diferença estão nos efeitos dos hormônios femininos sobre a resposta imune. Em particular, ocorre uma modulação de resposta inflamatória por estrogênios, bem como o resultado da atividade de várias células, como células dendríticas, células linfóides inatas, células Th1, Th2, reguladoras T (Treg), reguladoras B (Bregs) e várias proteínas e citocinas como: IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13.



**Figura 27:** Ação do estrogênio no sistema imune. (Ridolo et al., 2019)

Neste sentido, podemos afirmar que o E2 provoca aumento de IL-10, e que os resultados encontrados no nosso estudo não são incoerentes. Existem evidências suficientes *in vivo* e *in vitro* de que os hormônios sexuais femininos são um fator importante no desenvolvimento de tumores neoplásicos, que são mitogênicos e carcinogênicos. Pesquisas indicam que as mulheres são mais predispostas e expostas ao adenocarcinoma, enquanto os homens são mais propensos a sofrer de carcinoma de células escamosas e indicam um papel significativo do hormônio  $\beta$ -estradiol na etiopatogenia, tratamento clínico e prognóstico do NSCLC. (Niikawa et al., 2008).

O que se sabe sobre a resposta imune aos hormônios sexuais femininos, é que as células imunes são bem conhecidas por se ligarem a estrogênios e andrógenos. Todos os tipos de linfócitos T expressam tanto ER $\alpha$  quanto ER $\beta$ , com o estrogênio sendo eficaz na ativação de cascatas de sinalização intracelular (Pierdominici et al., 2010). O que não está claro é se tal modulação da função das células T é supressora ou estimulante para a função imune nas doenças pulmonares. A relevância desses efeitos de estrogênio reside na conhecida exacerbação da asma durante a fase lútea do ciclo menstrual e durante a gravidez. Já os efeitos da progesterona nas células imunes são paralelos aos do estrogênio, embora os padrões de expressão de PR não tenham sido examinados sistematicamente (Hardy et al., 2006; Huck et al., 2005; Miyaura & Iwata, 2002; Piccinni et al., 1995). Ambos podem ter efeitos aditivos ou sinérgicos na exacerbação da asma.

Além disso, as mulheres têm concentrações séricas mais elevadas de anticorpos em comparação aos homens. Além disso, a IgE, que causa a degranulação de mastócitos, mostrou variar com o status hormonal em mulheres (Vellutini et al., 1997), podendo assim desempenhar um papel importante nas exacerbações da asma pré-menstrual.

Resumidamente, foi possível identificar que os mecanismos da via dos xenobióticos demonstraram claramente a resposta esperada e tendo como principal protagonista de atuação nas sinalizações dessa via o DEP. A via do estrogênio teve um maior aumento de seus receptores na presença do E2+DEP, mostrando haver interação das duas substâncias com a via. Essa interação não está relacionada a região promotora clássica ERE, já que ele não expressou uma

ativação e nem uma inibição significativa de seu gene. Em contrapartida, as respostas inflamatórias foram mais elevadas na presença do E2 e do E2+DEP, sugerindo existir sim uma interação com a via do estrogênio que possa ocorrer a partir de outras regiões promotoras; E por fim, a via da progesterona demonstrou resultados bem expressivos e que devem ser melhor investigados, como o aumento de seus receptores na presença do DEP e do DEP mais todos os hormônios, além da ativação do promotor PRE quando exposto ao DEP de forma isolada. Apesar da necessidade de estudos mais detalhados, é possível identificar a interação, mimetização e sinergia entre o DEP e os hormônios, sugerindo que eles possam atuar em conjunto para o agravamento de doenças respiratórias e do câncer em indivíduos do sexo feminino. E com isso, vem a necessidade de um maior entendimento desses mecanismos a fim de auxiliar em possíveis tratamentos terapêuticos.

## **8. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Concluimos que existem muitos mecanismos por trás do processo de metabolização dos HPAs presente na poluição atmosférica, e que vão muito além da via dos xenobióticos. Sugerimos que devido a capacidade desses HPAs em mimetizar hormônios como o E2 e a P4, eles podem atuar nas vias do estrogênio e da progesterona através da interação com os principais receptores dessas vias (ER $\beta$  e PR); da ativação de algumas regiões promotoras específicas que ainda devem ser melhor estudadas; e pelo aumento de respostas inflamatórias quando células de pulmão foram expostas principalmente ao DEP associado ao hormônio sexual feminino E2, corroborando com a ideia de que mulheres são mais suscetíveis a doenças respiratórias e ao câncer quando expostas a poluição do ar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Allen AG, Rocha GO, Cardoso AA, Paterlini WC, Machado CMD, Andrade JB. Atmospheric particulate polycyclic aromatic hydrocarbons from road transport in southeast Brazil. *Transportation Research Part D: Transport and Environment*. 2008; 13(8): 483-490

Allred DC, Harvey JM, Berardo M and Clark GM. 1998. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 11: 155-168.

Alvarez-Munoz D, Rodríguez-Mozaz S, Jacobs S, Serra-Compte A, Caceres N, Sioen, I, Verbeke, W, Barbosa V, Ferrari F, Fernandez-Tejedor M. 2018. Pharmaceuticals and endocrine disruptors in raw and cooked seafood from European market: concentrations and human exposure levels. *Environ. Int.* 119, 570–581.

Amadou A, Praud D, Coudon T, Deygas F, Grassot L, Faure E, Couvidat F, Caudeville J, Bessagnet B, Salizzoni P, Gulliver J, Leffondré K, Severi G, Mancini FR, Fervers B. Risk of breast cancer associated with long-term exposure to benzo[a]pyrene (BaP) air pollution: Evidence from the French E3N cohort study. *Environ Int.* 2021; 149:106399.

Anthony J. Lee, May Xiaoxin Cai, Paul E. Thomas, Allan H. Conney, Bao Ting Zhu, Characterization of the Oxidative Metabolites of 17 $\beta$ -Estradiol and Estrone Formed by 15 Selectively Expressed Human Cytochrome P450 Isoforms. *Endocrinology*. 2003; 144(8): 3382–3398.

Artico S, Nardeli SM, Brilhante O, Grossi-de-Sá MF, Alves-Ferreira M. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. *BMC Plant Biol.* 2010; 10: 49.

Artyuk N, Chervov V, Vitaliy O, Danilova, Larissa N, Polenok, E, Zotova O. "Threshold values of antibodies to estrogen, progesteron and benzo [a] pyrene as a risk factor for the development of endometriosis". *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. 2021; 42(3): 285-289.

Bayona JM, Markides KE, Lee ML. Characterization of polar polycyclic aromatic compounds in a heavy-duty diesel exhaust particulate by capillary column gas chromatography and high-resolution mass spectrometry. *Environment Science Technology*. 1988; 22: 1440-1447.

Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update. *Human Reproduction Update*. 2000; 6:225–236.

Boström CE, Gerde P, Hanberg A, Jernström B, Johansson C, Kyrklund T, Rannug A, Törnqvist M, Victorin K, Westerholm R. Cancer risk assessment,

indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Perspect.* 2002; 110(3): 451-88.

Bourotte MC, Forti S, Taniguchi MC, Bicego PA, Lotufo. A wintertime study of PAH in fine and coarse aerosols in São Paulo city, Brazil. *Atmospheric Environment.* 2005; 39: 3799-3811

Cao Z, West C, Norton-Wenzel CS, Rej R, Davis FB, Davis PJ, Rej R. Effects of resin or charcoal treatment on fetal bovine serum and bovine calf serum. *Endocr Res* 2009;34(4):101-108.

Chaloupka K, Krishnan V, Safe S. Polynuclear aromatic hydrocarbon carcinogens as antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells: role of the Ah receptor. *Carcinogenesis.* 1992; 13(12):2233-9.

Chen W, Xin B, Pang H, Han L, Shen W, Zhao Z, Duan L, Cao P, Liu L, Zhang H. 2019. Downregulation of estrogen receptor  $\beta$  inhibits lung adenocarcinoma cell growth. *Oncol Rep.* 41(5):2967-2974. doi: 10.3892/or.2019.7044.

Chen Y, Yang J, Yao B, Zhi D, Luo L, Zhou Y. 2022. Endocrine disrupting chemicals in the environment: Environmental sources, biological effects, remediation techniques, and perspective. *Environ Pollut.* 1; 310:119918. doi: 10.1016/j.envpol.2022.119918.

Clarke CL, Sutherland RL. Progesterone regulation of cellular proliferation. *Endocr Ver.* 1990; 11: 266-301.

Clemons J H, Allan LM, Marvin CH, Wu Z, Mccarry BE, Bryant DW, Zacharewski TR et al. 1998. Evidence of Estrogen and TCDD-Like activities in crude and fractionated extracts of PM10 air particulate material using in vitro gene expression assay. *JuEnviron SciTech*, 32(12): 1853-1860..

Clemons J. H., L. M. Allan, C. H. Marvin, Z. Wu, B. E. Mccarry, D. W. Bryant e T. R. Zacharewski. Evidence of Estrogen and TCDD-Like activities in crude and fractionated extracts of PM10 air particulate material using in vitro gene expression assay. *Environment Science Technology.* 1998; 32(12): 1853-1860.

Clougherty JE, Kubzansky LD. A Framework for Examining Social Stress and Susceptibility to Air Pollution in Respiratory Health. *Environmental Health Perspectives*, 2009; 117 (9): 1351 – 1358.

Dietrich C, Kaina B. 2010. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell-cell contact and tumor growth. *Carcinogenesis* 31:1319–1328. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq028>



EPA, USA. Cancer risk from outdoor exposure to air toxics, U.S.Environmental Protection Agency, Office of Air Quality Planning and Standards: Research Triangle Park, NC; EPA-450/1-90-004 a, b;1990.

Faivre EJ, Daniel AR, Hillard CJ, Lange CA. Progesterone receptor rapid signaling mediates serine 345 phosphorylation and tethering to specificity protein 1 transcription factors. *Mol. Endocrinol.* 2008; 22:823–837.

Fertuck, KC, Matthews J.B., Zacharewski T.R. Hydroxylated benzo[a]pyrene metabolites are responsible for in vitro estrogen receptor-mediated gene expression induced by Benzo[a]pyrene, but do not elicit uterotrophic effects in vivo, *Toxicology Science.* 2001; 59(2): 231–240.

Fortis C, Foppoli M, Gianotti L, Galli L, Citterio G, Consogno G, et al. 1996. Increased interleukin-10 serum levels in patients with solid tumours. *Cancer Lett.*; 104:1–5.

Gao H., Ye G, Lin Y, Chi Y, Dong S. 2020. Benzo[a]pyrene at human blood equivalent level induces human lung epithelial cell invasion and migration via aryl hydrocarbon receptor signaling. *J. Appl. Toxicol.* 40, 1087–1098.

Gill L, King L, and Adonis M. Trends of polycyclic aromatic hydrocarbon levels and mutagenicity in Santiago's inhalable airborne particles in the period, 1992-1996. *Inhalation Toxicology*, 2000; 12: 1185-1204.

Glushkov, A. N., & Polenok, E. G. Immunomodulation of carcinogens-induced steroids-dependent human diseases. *Saudi journal of biological sciences.* 2019; 26(2), 244–251.

Goldman S, Shalev E. Progesterone receptor profile in the decidual and fetal membrane. *Front. Biosci.* 2007; 12: 634–648.

Graham JD, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Review* 1997; 18: 502–19.

Grantley D, Charles, M, Bartels Timothy R, Zacharewski, B, Bhaskar Gi, Nancy L, Freshour E, Carney W. Activity of Benzo[a]pyrene and Its Hydroxylated Metabolites in an Estrogen Receptor- $\alpha$ Reporter Gene Assay- *Toxicological Sciences.* 2000; 55 (2): 320–326.

Grytting VS, Chand P, Låg M, Øvrevik J, Refsnes M. The pro-inflammatory effects of combined exposure to diesel exhaust particles and mineral particles in human bronchial epithelial cells. *Part Fibre Toxicol.* 2022 Feb 21;19(1):14.

Gualtieri M, Øvrevik J, Holme JA, Perrone MG, Bolzacchini E, Schwarze PE, Camatini M. 2010. Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of different PM fractions in human epithelial lung cells. *Toxicol In Vitro.* Feb;24(1):29-39. doi: 10.1016/j.tiv.2009.09.013.

Haarmann-Stemmann, T, Bothe H, Abel J. Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of arylhydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. *Biochemical pharmacology*. 2009; 77(4): 508–520.

Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology*. 1999; 140: 5566–5578.

Hang Fu, Huayan Xu, Na Zhang, Hong Xu, Zhenlin Li, Huizhu Chen, Rong Xu, Ran Sun, Lingyi Wen, Linjun Xie, Hui Liu, Kun Zhang, Chuan Fu, Keke Hou, Zhigang Yang, Ming Yang, Yingkun Guo. Association between Clinical, Laboratory and CT Characteristics and RT-PCR Results in the Follow-up of COVID-19 patients. medRxiv 2020; 20038315.

Hartz, AMS, Bauer B, Block ML, Jau-Shyong H, Milller, DS. 2008. Diesel exhaust particles induce oxidative stress, proinflammatory signaling, and P-glycoprotein up-regulation at the blood-brain barrier. *The FASEB Journal*, vol. 22, p. 1-11.

Hayakawa, K. et al. 2007. Estrogenic/antiestrogenic activities of polycyclic aromatic hydrocarbons and their monohydroxylated derivatives by yeast twohybrid assay. *Journal Health Sci*, n. 53, p. 562-570.

Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*. 2007 Jul;87(3):905-31. doi: 10.1152/physrev.00026.2006. PMID: 17615392.

Helle J, Bader M.I, Keiler M.A, Zierau O, Vollmer G, Chittur V.S, Tenniswood M, Kretzschmar G. Cross-Talk in the Female Rat Mammary Gland: Influence of Aryl Hydrocarbon Receptor on Estrogen Receptor Signaling. *Environmental Health Perspectives*, 2015, Volume 124, Issue 5, Pages 601 – 610.

Hillegass JM, Murphy KA, Villano CM, White LA. 2006. The impact of aryl hydrocarbon receptor signaling on matrix metabolism: implications for development and disease. *Biol Chem* 387:1159–1173.

Hirose T, Morito K, Kizu R, Toriba A, Hayakawa S, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y. Estrogenic/antiestrogenic activities of benzo[a]pyrene monohydroxy derivatives *J. Health Sci*. 2001; 47: 552-558.  
Hoffer A, Chang CY, Puga A. 1996. Dioxin induces transcription of fos and jun genes by Ah receptor-dependent and -independent pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 141:238–247.

Hyunsu Choi, Choung-Soo Kim, "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Fine Particulate Matter Induce Oxidative Stress and the Inflammatory Response in Human Vocal Fold Fibroblast Cells", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2021, Article ID 5530390, 10 pages, 2021.

Idle JR, Gonzalez FJ. *Metabolomics. Cell Metab* 2007; 6:348–351.

Ivanova et al. 2010; Ivanova MM, Mazhawidza W, Dougherty SM, Klinge CM. Sex Differences in Estrogen Receptor Subcellular Location and Activity in Lung Adenocarcinoma Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010; 42:320–330. [PubMed: 19556604]

Ivanova MM, Mazhawidza W, Dougherty SM, Klinge CM. Sex Differences in Estrogen Receptor Subcellular Location and Activity in Lung Adenocarcinoma Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010; 42:320–330.

Jana NR, Sarkar S, Ishizuka M, Yonemoto J, Tohyama C, Sone H. Cross-talk between 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and testosterone signal transduction pathways in LNCaP prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Mar 24;256(3):462-8.

Jiajia Gao, Hezhong Tian, Ke Cheng, Long Lu, Yuxuan Wang, Ye Wu, Chuanyong Zhu, Kaiyun Liu, Junrui Zhou, Xingang Liu, Jing Chen, Jiming Hao. Seasonal and spatial variation of trace elements in multi-size airborne particulate matters of Beijing, China: Mass concentration, enrichment characteristics, source apportionment, chemical speciation and bioavailability. *Atmospheric Environment*. 2014; 99: 257-265.

Khan H, Changkija B, Konwar R. 2012. Role of interleukin-10 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 133:11–21.

Kharat I, Saatcioglu F. Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. Cross-talk between aryl hydrocarbon- and estrogen-mediated signaling. *J Biol Chem*. 1996; 271(18): 10533-7, 1996.

Kim BE, Kim J, Goleva E, Berdyshev E, Lee J, Vang KA, Lee UH, Han S, Leung S, Hall CF, Kim NR, Bronova I, Lee EJ, Yang HR, Leung DY, Ahn K. Particulate matter causes skin barrier dysfunction. *JCI Insight*. 2021 Mar 8;6(5):e145185.

Kim J, Modlin RL, Moy RL, Dubinett SM, McHugh T, Nickoloff BJ, et al. 1995. IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. *J Immunol*. 155:2240–7.

Kirsch EA, Yuhanna IS, Chen Z, German Z, Sherman TS, Shaul PW. 1999. Estrogen acutely stimulates endothelial nitric oxide synthase in H441 human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 20:658–666.

Kirsch EA, Yuhanna IS, Chen Z, German Z, Sherman TS, Shaul PW. Estrogen acutely stimulates endothelial nitric oxide synthase in H441 human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; 20:658–666.

Klein, G. P. et al. 2006. Gas-phase ambient air contaminants exhibit significant dioxin-like and estrogen-like activity in vitro. *Environmental Health Perspectives*, n. 114, p. 697-703.

Klotz DM, Arnold SF, McLachlan JA. Inhibition of 17 beta-estradiol and progesterone activity in human breast and endometrial cancer cells by carbamate insecticides. *Life Science* 1997; 60:1467–75.

Kreiss K, Zack MM, Kimbrough R, Needham LL, Smrek AL, Jones BT. Association of blood pressure and polychlorinated biphenyl levels. *JAMA* 1981; 245 (24): 2505–2509.

Kuiper GG., Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson JA. 1998. The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*, 19(4): 253–286.

Kuiper, G.G., Shughrue, P.J., Merchenthaler, I., Gustafsson, J.A. The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*, 19(4): 253–286, 1998.

Kurien, T. Biji; Scofield, R. Hal. Western Blotting. *Methods*. 2006; 38(2): 283-293.

Labrie F, Simard J, Luu-The V, Trudel C, Martel C, Labrie C, Zhao HF, Rheaume E, Couet J, Breton N. Expression of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3 beta-HSD) and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (17 beta-HSD) in adipose tissue. *Int J Obes.* 1991; 15(2): 91–99.

Labrie F, Simard J, Luu-The V, Trudel C, Martel C, Labrie C, Zhao HF, Rheaume E, Couet J, Breton N. 1991. Expression of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3 beta-HSD) and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (17 beta-HSD) in adipose tissue. *Int J Obes.* 15(Suppl 2):91–99.

Labrie F. 2003. Extragonadal synthesis of sex steroids: intracrinology. *Ann Endocrinol (Paris)*. 64:95–107.

Labrie F. Extragonadal synthesis of sex steroids: intracrinology. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2003; 64:95–107.

Låg M, Øvrevik J, Refsnes M, Holme JA. Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons in air pollution-induced non-malignant respiratory diseases. *Respir Res.* 2020; 13;21(1):299.

Laks, D.M. et al. 2008 Composition of diesel particles influences acute pulmonary toxicity: an experimental study in MICE. *Inhalation toxicology*, n. 11, p. 1037-1042.

Lardizábal MN, Nocito AL, Daniele SM, Ornella LA, Palatnik JF, Veggi LM. Reference genes for real-time PCR quantification of microRNAs and messenger RNAs in rat models of hepatotoxicity. *PLoS One.* 2012;7(5):e36323.

Lin P, Chang JT, Ko JL, Liao SH, Lo WS. Reduction of androgen receptor expression by benzo[a]pyrene and 7,8-dihydro-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene in human lung cells. *Biochem Pharmacol.* 2004; 67(8):1523-30.

Luo F, Guo H, Yu H, Li Y, Feng Y, Wang Y. PM2.5 organic extract mediates inflammation through the ER $\beta$  pathway to contribute to lung carcinogenesis in vitro and vivo. *Chemosphere.* 2021 Jan; 263:127867.

Luo Z, Wu R, Jiang Y, Qiu Z, Chen W and Li W. 2015. Overexpression of estrogen receptor beta is a prognostic marker in non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 8: 8686-8697.

Luu-The V, Labrie F. 2010. The intracrine sex steroid biosynthesis pathways. *Prog Brain Res.* 181:177–192.

Luu-The V, Labrie F. The intracrine sex steroid biosynthesis pathways. *Prog Brain Res.* 2010; 181:177–192.

Mah V, Marquez D, Alavi M, Maresh EL, Zhang L, Yoon N, Horvath S, Bagryanova L, Fishbein MC, Chia D, et al. 2011. Expression levels of estrogen receptor beta in conjunction with aromatase predict survival in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 74: 318-325.

Marquez-Garban DC, Mah V, Alavi M, Maresh EL, Chen HW, Bagryanova L, Horvath S, Chia D, Garon E, Goodglick L, Pietras RJ. Progesterone and estrogen receptor expression and activity in human non-small cell lung cancer. *Steroids.* 2011; 76(9):910-20.

Matsuo R, Michikawa T, Ueda K, Ago T, Nitta H, Kitazono T, Kamouchi M; Fukuoka Stroke Registry Investigators. Short-Term Exposure to Fine Particulate Matter and Risk of Ischemic Stroke. *Stroke.* 2016; 47(12): 3032-3034.

Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nucl Recept Signal.* 2006; 4:e016.

Meek MD. Ah receptor and estrogen receptor-dependent modulation of gene expression by extracts of diesel exhaust particles. *Environ. Res.* 1998; 79, 114–121.

Morales-Bárceñas R, Sánchez-Pérez Y, Santibáñez-Andrade M, Chirino YI, Soto-Reyes E, García-Cuellar CM. 2023. Airborne particulate matter (PM10) induces cell invasion through Aryl Hydrocarbon Receptor and Activator Protein 1 (AP-1) pathway deregulation in A549 lung epithelial cells. *Mol Biol Rep. Jan*;50(1):107-119. doi: 10.1007/s11033-022-07986-x.

Morellup S, Jørgensen K, Berge G, Haugen A. Expression of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in human lung tissue and cell lines. *Lung Cancer.* 2002; 37:153-159, 2002.

Mori Y, Taneda S, Hayashi, H, Sakushima A, Kamata K, Suzuk AK, Yoshino S, Sakata M, Sagai M, and Seki K. Estrogenic activities of chemicals in diesel exhaust particles. *Bio. Pharm. Bull.* 2002; 25, 145-146.

Mulero-Navarro S, Fernandez-Salguero PM. New Trends in Aryl Hydrocarbon receptor biology. *Frontiers in Cell and Dev Biol.* 2016; 4: 1-14.

Neutra MR, and Forstner JF. Gastrointestinal mucus: synthesis, secretion, and function. In: *Proceedings of the Gastrointestinal Tract*, edited by L. R. Johnson. New York: *Raven*, 1987, p. 975–1009.

Niikawa, H.; Suzuki, T.; Miki, Y.; Suzuki, S.; Nagasaki, S.; Akahira, J.; Honma, S.; Evans, D.B.; Hayash, S.; Kondo, T. 2008. Intratumoral estrogens and estrogen receptors in human non-small cell lung carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 14,4417–4426.

Novák J, Hilscherová K, Landlová L, Čupr P, Kohút L, Giesy JP, Klánová J. Composition and effects of inhalable size fractions of atmospheric aerosols in the polluted atmosphere. Part II. In vitro biological potencies. *Environ Int.* 2014; 63:64-70.

Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 286: R233–R249.

Øvrevik J, Refsnes M, Låg M, Holme JA, Schwarze PE. Activation of proinflammatory responses in cells of the airway mucosa by particulate matter: oxidant- and non-oxidant-mediated triggering mechanisms. *Biomolecules.* 2015;5(3):1399–440.

Pamplona-Silva, M.T., Mazzeo, D.E.C., Bianchi, J., Marin-Morales, M.A. 2018. Estrogenic compounds: chemical characteristics, detection methods, biological and environmental effects. *Water, Air, Soil Pollut.* 229, 144

Pan J.-L, Gao J, Hou J-H, Hu D-Z, Li L. Interaction between environmental risk factors and Catechol-O-Methyltransferase (COMT) and X-Ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1) gene polymorphisms in risk of lung Cancer Among non-smoking chinese women: a case-control study, *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 2018; 15 (24): 5689–5697.

Phillips, JL, Löhr, C.V.; Nguyen, B.D.; Buermeyer, A.B.; Kolluri, S.K. 2022. Loss of the aryl hydrocarbon receptor increases tumorigenesis in p53-deficient mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 454, 116191.

Pierdominici, M.; Maselli, A; Cecchetti, S; Tinari, A; Mastrofrancesco, A; Alfe, M; Gargiulo, V; Beatrice, C; Di Blasio, G; Carpinelli, G; Ortona, E; Giovanneti, A; Fiorito, S. 2014. Diesel exhaust particle exposure in vitro impacts T lymphocyte phenotype and function. *Particle and Fibre Toxicology*, v.11, p. 1-14.

Pinel-Marie M.P, Sparfel L., Desmots S., Fardel O. Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of the NADPH oxidase subunit NCF1/p47phox expression leading to priming of human macrophage oxidative burst, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 47, Issue 6,2009, Pages 825-834.

Puga A, Ma C, Marlowe JL. 2009. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol* 77:713–722.

Puga A, Nebert DW, Carrier F. 1992. Dioxin induces expression of c-fos and c-jun proto-oncogenes and a large increase in transcription factor AP-1. *DNA Cell Biol* 11:269–281.

Ridolo E, Incorvaia C, Martignago I, Caminati M, Canonica GW, Senna G. 2019. Sex in Respiratory and Skin Allergies. *Clin Rev Allergy Immunol.* 56(3):322-332. doi: 10.1007/s12016-017-8661-0.

Ryberg D, Hewer A, Phillips DH, Haugen A. Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients. *Cancer Res.* 1994; 54(22):5801-3.

Safe S and Wörmke M. Inhibitory aryl hydrocarbon receptorestrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action. *Chem. Res. Toxicol.* 2003; 16: 807-816.

Safe S, Wormke M. Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol.* 2003 Jul;16(7):807-16.

Saldiva P. H. et al. 2002. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *American Journal of respiratory and critical care medicine*, n. 165, p. 1670-7

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

Santana E, Cunha KB, Ferreira AL, Zamboni A. Padrões de qualidade do ar: experiência comparada Brasil, EUA e União Européia. -- São Paulo: *Instituto de Energia e Meio Ambiente*, 2012.

Santodonato J. Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: relationship to carcinogenicity. *Chemosphere*. 1997; 34(4): 835-848.

Sathish V, Martin YN, Prakash YS. Sex steroid signaling implications for lung diseases. *Pharmacol Ther*. 2015; 150: 94-108.

Seriani R, Sousa CEC, Krempel, PG, Frias DP, Matsuda M, Correia AT, Ferreira MZJ, Alencar AM, Negri EM, Saldiva PHN, Mauad T, Macchione M. Human bronchial epithelial cells exposed in vitro to diesel exhaust particles exhibit alterations in cell rheology and cytotoxicity associated with decrease in antioxidant defenses and imbalance in pro- and anti-apoptotic gene expression. *Env. Science and Pollution Research*. 2016; 23:9862-9870.

Shaulian E, Karin M. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4:E131–E136. <https://doi.org/10.1038/ncb0502-e131>

Shinde R, McGaha TL. 2018. The Aryl Hydrocarbon Receptor: Connecting Immunity to the Microenvironment. *Trends in immunology*. 39: 1005-20.

Sjaastad AK, Svendsen K. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), mutagenic aldehydes, and particulate matter in norwegian `a la carte restaurants, *Ann. Occup. Hyg*. 2009; 53(7): 723–729.

Słowikowski BK, Lianeri M, Jagodziński PP. Exploring estrogenic activity in lung cancer. *Mol Biol Rep*. 2017; 44(1):35-50.

Sparfel L, Pinel-Marie ML, Boize M, Koscielny S, Desmots S, Pery A, Fardel O 2010. Transcriptional signature of human macrophages exposed to the environmental contaminant benzo(a) pyrene. *Toxicol Sci* 114:247–259. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq007>

Stéphanie Guénin, Mélanie Mauriat, Jérôme Pelloux, Olivier Van Wuytswinkel, Catherine Bellini, Laurent Gutierrez, Normalization of qRT-PCR data: the



necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references, *Journal of Experimental Botany*, 2009; 60(2):487–493.

Stephen Safe, Syng-Ook Lee, Un-Ho Jin, Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Carcinogenesis and Potential as a Drug Target. *Toxicological Sciences*. 2013; 135(1):1–16.

Sun Y, Zhang E, Lao T, Pereira AM, Li C, Xiong L, Morrison T, Haley KJ, Zhou X, Yu JJ. Progesterone and estradiol synergistically promote the lung metastasis of tuberin-deficient cells in a preclinical model of lymphangioleiomyomatosis. *Horm Cancer*. 2014; 5(5):284-98.

Sweeney MF, Hasan N, Soto AM, Sonnenschein C. Environmental Endocrine Disruptors: effects on the human male reproductive system. *Rev. Endocr. Metab. Disord*. 2015; 16:341–357.

Tam A, Morrish D, Wadsworth S, Dorscheid D, Man SF, Sin DD. 2011. The role of female hormones on lung function in chronic lung diseases. *BMC Women's Health*, 3:11-24.

Taneda S, Hayash, H, Sakushima A, Seki K, Suzuki AK, Kamata K, Sakata M, Yoshino S, Sagai M, and Mori Y. Estrogenic and anti-estrogenic activities of two types of diesel exhaust particles. *Toxicology*. 2000; 170: 153-161.

Tani Y, Kaneda H, Koh Y, Tamiya A, Isa S, Kubo A, Ogawa K, Matsumoto Y, Sawa K, Yoshimoto N, Mitsuoka S, Kawaguchi T. 2023. The Impact of Estrogen Receptor Expression on Mutational Status in the Evolution of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*. 24(2):165-174. doi: 10.1016/j.clcc.2022.12.010

Thorrez L, Van Deun K, Tranchevent LC, Van Lommel L, Engelen K, Marchal K, Moreau Y, Van Mechelen I, Schuit F. Using ribosomal protein genes as reference: a tale of caution. *PLoS One*. 2008; 3(3):e1854.

Townsend EA, Meuchel LW, Thompson MA, Pabelick CM, Prakash YS. Estrogen increases nitricoxide production in human bronchial epithelium. *J Pharmacol Exp Therap*. 2011; 339:815–824.

Tran DQ, Klotz DM, Ladlie BL, Ide CF, McLachlan JA, Arnold SF. Inhibition of progesterone receptor activity in yeast by synthetic chemicals. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229:518–23

Tsay JJ, Tchou-Wong KM, Greenberg AK, Pass H, Rom WN. 2013. Aryl hydrocarbon receptor and lung cancer. *Anticancer Res* 33:1247–1256

Tsukue N, Toda N, Tsubone H, Sagai M, Jin WZ, Watanabe G, Taya K, Birumachi J, Suzuki AK. Diesel exhaust (DE) affects the regulation of testicular function in male Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Environ. Health A*. 2001; 63: 115–126.

U.S. Environmental Protection Agency. Solid waste and emergency response glossary--Bioaccumulation: *U.S. Environmental Protection Agency*. 2010: acesso em 28 de maio de 2015.

Veljkovic E, Jiricny J, Menigatti m, Rehrauer H, Wan H. Chronic exposure to cigarette smoke condensate *in vitro* induces epithelial to mesenchymal transition-like changes in human bronchial epithelial cells, BEAS-2B. *Toxicology in vitro*. 2011; 25:446-453.

Villano CM, Murphy KA, Akintobi A, White LA. 2006. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces matrix metalloproteinase (MMP) expression and invasion in A2058 melanoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 210:212–224.

Vinggaard AM, Hnida C, Larsen JC. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons affect androgen receptor activation in vitro. *Toxicology*. 2000; 145(2-3):173-83.

Vogel F.A., Winkle L., Esser C., Haarmann-Stemmann T. The aryl hydrocarbon receptor as a target of environmental stressors – Implications for pollution mediated stress and inflammatory responses. *Redox Biology*. Volume 34, 2020.

Voutsas, E, Magoulas, K, Tassios, D. Prediction of the bioaccumulation of persistent organic pollutants in aquatic food webs. *Chemosphere*. 2002; 48:645-651.

Watanabe N, Oonuki Y. Inhalation of diesel engine exhaust affects spermatogenesis in growing male rats. *Environ. Health Perspect*. 1999; 107: 539–544  
Wen, J, Pan, L. 2015. Short-term exposure to benzo [a] pyrene disrupts reproductive endocrine status in the swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol*. 174, 13–20.

Wenger D, Gerecke AC, Heeb NV, Naegeli H, Zenobi R. Catalytic diesel particulate filters reduce the in vitro estrogenic activity of diesel exhaust. *Anal. Bioanal. Chem*. 2008; 390: 2021–2029.

Xie M, You S, Chen Q, Chen X, Hu C. Progesterone inhibits the migration and invasion of A549 lung cancer cells through membrane progesterone receptor  $\alpha$ -mediated mechanisms. *Oncology Reports*. 2013; 29: 1873-1880.

Yang, X.; Liu, D.; Murray, T.J.; Mitchell, G.C.; Hesterman, E.V.; Karchner, S.I.; Merson, R.R.; Hahn, M.E.; Sherr, D.H. 2005. The aryl hydrocarbon receptor constitutively represses c-myc transcription in human mammary tumor cells. *Oncogene*, 24, 7869–7881.

Ying, G-G, Williams B, Kookana R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review, *Environ. Int*. 2002; 28: 215–226.

Yoshida, S., Sagai, M., Oshio, S., Umeda, T., Ihara, T., Sugamata, M., Sugawara, I., Takeda, K. Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice. *Int. J. Androl.* 1999; 22, 307–315

Yoshizaki K, Fuziwara CS, Brito JM, Santos TMN, Kimura ET, Correia AT, Amato-Lourenco LF, Vasconcellos P, Silva LF, Brentani MM, Mauad T, Saldiva PHN, Macchione M. The effects of urban particulate matter on the nasal epithelium by gender: an experimental study in mice. *Environ. Pollut.* 2016; 213: 359–369.

Yoshizaki K, Fuziwara CS, Brito JM, Santos TMN, Kimura ET, Correia AT, Amato-Lourenco LF, Vasconcellos P, Silva LF, Brentani MM, Mauad T, Saldiva PHN, Macchione M. 2016. The effects of urban particulate matter on the nasal epithelium by gender: an experimental study in mice. *Environ. Pollut.*: 213, 359–369.

Zhang G, Liu X, Farkas AM, Parwani AV, Lathrop KL, Lenzner D, Land SR, Srinivas H. Estrogen receptor beta functions through nongenomic mechanisms in lung cancer cells. *Mol Endocrinol.* 2009; 23(2):146-56.

Zhang Y, Ma J, Pei Y, Xie Z, Fu DJ, Li J. 2023. Synthesis of S-2-phenylchromane Derivatives and Evaluation of the Antiproliferative Properties as Apoptosis Inducers in Cancer Cell Lines. *Anticancer Agents Med Chem.* 20. doi: 10.2174/1871520623666230420100254.

# ANEXOS

## Two Way Analysis of Variance

sexta-feira, 23 de abril de 2021 16:05:51

Data source: DEP

General Linear Model (No Interactions)

Dependent Variable: data

Normality Test (Shapiro-Wilk): Passed (P = 0,835)

Equal Variance Test (Brown-Forsythe): Passed (P = 1,000)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
tratamento	3	1021,323	340,441	52,824	0,004
tempo	1	0,0356	0,0356	0,00552	0,945
Residual	3	19,334	6,445		
Total	7	1040,693	148,670		

The difference in the mean values among the different levels of tratamento is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in tempo. There is a statistically significant difference (P = 0,004). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The difference in the mean values among the different levels of tempo is not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in tratamento. There is not a statistically significant difference (P = 0,945).

Power of performed test with alpha = 0,0500: for tratamento : 0,999

Power of performed test with alpha = 0,0500: for tempo : 0,0500

Least square means for tratamento :

Group	Mean
CT	93,833
10µg/ml	89,917
50µg/ml	77,233
100µg/ml	65,083

Std Err of LS Mean = 1,795

Least square means for tempo :

Group	Mean
1 h	81,583
2 hs	81,450

Std Err of LS Mean = 1,269

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):

Overall significance level = 0,05

Comparisons for factor: **tratamento**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,050
CT vs. 100µg/ml	28,750	11,325	0,009	Yes
10µg/ml vs. 100µg/ml	24,833	9,782	0,011	Yes
CT vs. 50µg/ml	16,600	6,539	0,029	Yes
10µg/ml vs. 50µg/ml	12,683	4,996	0,046	Yes
50µg/ml vs. 100µg/ml	12,150	4,786	0,034	Yes

CT vs. 10µg/ml 3,917 1,543 0,221 No

Comparisons for factor: **tempo**

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0,050
1 h vs. 2 hs	0,133	0,0743	0,945	No

### One Way Analysis of Variance

quarta-feira, outubro 04, 2023, 17:32:12

Data source: Data 1 in Notebook4

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

### Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

quarta-feira, outubro 04, 2023, 17:32:12

Data source: Data 1 in Notebook4

Group	N	Missing	Median	25%	75%
6	32	0	4,000	2,000	5,000
24	32	0	2,000	1,000	3,000
48	32	0	2,000	1,000	2,500
72	32	0	18,500	15,000	24,000
6 DIAS	32	0	21,000	16,500	26,500

H = 119,685 with 4 degrees of freedom. (P = <0,001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0,05
6 DIAS vs 48	2906,500	11,090	Yes
6 DIAS vs 24	2845,000	10,855	Yes
6 DIAS vs 6	2157,000	8,230	Yes
6 DIAS vs 72	184,000	0,702	No
72 vs 48	2722,500	10,387	Yes
72 vs 24	2661,000	10,153	Yes
72 vs 6	1973,000	7,528	Yes
6 vs 48	749,500	2,860	No
6 vs 24	688,000	2,625	Do Not Test
24 vs 48	61,500	0,235	Do Not Test

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between the two rank sums that enclose that comparison. For example, if you had four rank sums sorted in order, and found no significant difference between rank sums 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed rank sums is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the rank sums, even though one may appear to exist.

**One Way Analysis of Variance**

quarta-feira, 20 de dezembro de 2023 13:08:02

**Data source:** concentração e2**Normality Test (Shapiro-Wilk):** Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

**Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks**  
13:08:02

quarta-feira, 20 de dezembro de 2023

**Data source:** concentração e2 in e2\_juliana

Group	N	Missing	Median	25%	75%
CT	40	0	5,000	3,000	12,750
100pM	40	0	5,000	2,000	23,750
1nM	40	0	4,000	2,000	22,500
10nM	40	0	4,500	2,000	16,750

H = 0,771 with 3 degrees of freedom. (P = 0,856)

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,856)

**One Way Analysis of Variance**

quarta-feira, 20 de dezembro de 2023 15:13:55

**Data source:** A549 ERE in Notebook4**Normality Test (Shapiro-Wilk):** Passed (P = 0,109)**Equal Variance Test (Brown-Forsythe):** Passed (P = 0,854)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
CT	3	0	684,479	178,955	103,320
DEP	3	0	951,300	137,077	79,142
E2	3	0	1548,877	563,758	325,486
P4	3	0	1041,754	167,602	96,765
E2+DEP	3	0	1025,508	161,227	93,084
P4+DEP	3	0	1208,676	219,649	126,814

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	5	1241319,179	248263,836	3,163	0,047
Residual	12	941936,444	78494,704		
Total	17	2183255,623			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,047).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,504

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0,050
CT vs. E2	864,398	3,779	0,011	Yes

CT vs. P4+DEP	524,197	2,292	0,142	No
CT vs. P4	357,275	1,562	0,423	Do Not Test
CT vs. E2+DEP	341,029	1,491	0,464	Do Not Test
CT vs. DEP	266,821	1,166	0,669	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

### One Way Analysis of Variance

quarta-feira, 20 de dezembro de 2023 15:20:53

Data source: A549 PRE in Notebook5

Normality Test (Shapiro-Wilk): Passed (P = 0,058)

Equal Variance Test (Brown-Forsythe): Passed (P = 0,109)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
CT	3	0	101560,977	6345,381	3663,508
DEP	3	0	114683,304	6181,458	3568,866
E2	3	0	115903,675	4962,319	2864,996
P4	3	0	108570,754	22246,241	12843,874
E2+DEP	3	0	99178,600	9852,483	5688,334
P4+DEP	3	0	89446,586	5968,686	3446,023

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	5	1538878001,389	307775600,278	2,527	0,087
Residual	12	1461381591,058	121781799,255		
Total	17	3000259592,447			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,087).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,364

The power of the performed test (0,364) is below the desired power of 0,800. Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

### ne Way Analysis of Variance

quarta-feira, 20 de dezembro de 2023 14:58:58

Data source: BEAS XRE in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk): Passed (P = 0,379)

Equal Variance Test (Brown-Forsythe): Passed (P = 0,395)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
CT	3	0	432,807	85,740	49,502
DEP	3	0	737,822	115,654	66,773
E2	3	0	103,759	15,971	9,221
P4	3	0	131,376	30,627	17,683
E2+DEP	3	0	347,232	36,548	21,101
P4+DEP	3	0	169,861	17,633	10,181

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	5	878766,104	175753,221	44,746	<0,001
Residual	12	47134,021	3927,835		
Total	17	925900,125			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).

Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0,050
CT vs. E2	329,048	6,430	<0,001	Yes
CT vs. DEP	305,015	5,961	<0,001	Yes
CT vs. P4	301,431	5,891	<0,001	Yes
CT vs. P4+DEP	262,946	5,138	0,001	Yes
CT vs. E2+DEP	85,575	1,672	0,365	No

### One Way Analysis of Variance

quarta-feira, 20 de dezembro de 2023 15:04:51

Data source: BEAS ERE in Notebook2

Normality Test (Shapiro-Wilk): Passed (P = 0,594)

Equal Variance Test (Brown-Forsythe): Passed (P = 0,220)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
ct	3	0	3551,173	881,083	508,693
dep	3	0	3332,080	262,313	151,446
e2	3	0	1649,737	327,274	188,952
p4	3	0	1301,309	580,799	335,325
e2+dep	3	0	3716,839	1006,716	581,228
e2+dep	3	0	3716,839	1006,716	581,228
p4+dep	3	0	274,919	165,318	95,446

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	6	35607734,826	5934622,471	12,424	<0,001
Residual	14	6687673,004	477690,929		
Total	20	42295407,830			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).

Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0,050
ct vs. p4+dep	3276,254	5,806	<0,001	Yes
ct vs. p4	2249,864	3,987	0,007	Yes
ct vs. e2	1901,436	3,369	0,021	Yes
ct vs. dep	219,093	0,388	0,997	No
ct vs. e2+dep	165,666	0,294	0,999	Do Not Test
ct vs. e2+dep	165,666	0,294	0,999	Do Not Test



A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

**One Way Analysis of Variance**

quarta-feira, 20 de dezembro de 2023 15:10:45

**Data source:** BEAS PRE in Notebook3

**Normality Test (Shapiro-Wilk):** Passed (P = 0,295)

**Equal Variance Test (Brown-Forsythe):** Passed (P = 0,495)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
CT	3	0	255,241	80,910	46,714
DEP	3	0	524,944	125,118	72,237
E2	3	0	118,136	26,714	15,423
P4	3	0	116,103	27,632	15,953
E2+DEP	3	0	266,657	20,929	12,083
P4+DEP	3	0	101,374	31,065	17,935

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	5	393008,682	78601,736	18,803	<0,001
Residual	12	50162,356	4180,196		
Total	17	443171,038			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).

Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnnett's Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0,050
CT vs. DEP	269,703	5,109	0,001	Yes
CT vs. P4+DEP	153,867	2,915	0,049	Yes
CT vs. P4	139,138	2,636	0,079	No
CT vs. E2	137,105	2,597	0,085	Do Not Test
CT vs. E2+DEP	11,416	0,216	1,000	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

