

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Lílian Corrêa Costa-Beber

**EFEITOS DO POLUENTE ATMOSFÉRICO MATERIAL PARTICULADO
FINO (MP_{2,5}) SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA ATEROSCLEROSE:
PARÂMETROS DE ATIVAÇÃO MACROFÁGICA E DISFUNÇÃO
ENDOTELIAL VASCULAR**

Porto Alegre

2024

Lílian Corrêa Costa-Beber

**EFEITOS DO POLUENTE ATMOSFÉRICO MATERIAL PARTICULADO
FINO (MP_{2,5}) SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA ATEROSCLEROSE:
PARÂMETROS DE ATIVAÇÃO MACROFÁGICA E DISFUNÇÃO
ENDOTELIAL VASCULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Bioquímica.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Fátima Theresinha da Costa Rodrigues Guma
Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Jade de Oliveira

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Corrêa Costa Beber, LÍlian
EFEITOS DO POLUENTE ATMOSFÉRICO MATERIAL
PARTICULADO FINO (MP_{2,5}) SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA
ATEROSCLEROSE: PARÂMETROS DE ATIVAÇÃO MACROFÁGICA E
DISFUNÇÃO ENDOTELIAL VASCULAR / Lílian Corrêa Costa
Beber. -- 2024.

220 f.

Orientadora: Fátima Theresinha Costa Rodrigues
Guma.

Coorientadora: Jade de oliveira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Poluição atmosférica. 2. Doenças
cardiovasculares. 3. Disfunção endotelial. 4. Estresse
oxidativo. 5. Inflamação. I. Costa Rodrigues Guma,
Fátima Theresinha, orient. II. de oliveira, Jade,
coorient. III. Título.

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

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.”

Johann Goethe

AGRADECIMENTOS

A minha família por, apesar das diferenças, saber respeitar e apoiar, pois “cada um para o que nasceu”. E eu nasci para isso.

A UFRGS, por me aceitar na condição de egressa de uma universidade menor, com um programa de pós-graduação jovem, e me fornecer infraestrutura para o desenvolvimento da pesquisa.

A professora Fátima, por me aceitar e confiar em mim sem nem mesmo me conhecer. Poderia ter simplesmente negado, mas me aceitou, acolheu, e deu todo o suporte de que eu precisava durante a pesquisa, mesmo não sendo ‘da área’.

A professora Jade, por aprender a ‘me aproveitar’. Eu sempre entendi que talvez o meu máximo ainda seja pouco para o que eu almejo. Agradeço a professora Jade por ter aprendido a ler o meu jeito e a usar isso em nosso benefício.

As duas orientadoras, em conjunto, por terem me aconselhado da forma mais sábia possível quando eu mais precisei. Quando passei no concurso para professor substituto, a dúvida entre defender o doutorado com o trabalho incompleto para poder assumir a vaga, ou persistir no doutorado e confiar no destino em me proporcionar uma alternativa que melhor fechasse com os meus anseios, era grande. Contudo, como diria a Jade, “Hoje à noite, quando você orar, você vai pedir para ir ou para ficar?”. Foi assim que eu soube que caminho tomar, e em junho vou para Harvard! A vida é sobre escolhas, e essa vocês duas me ajudaram a fazer.

Aos colegas do laboratório 21, pelas imensuráveis horas na cultura de células, infinitos experimentos que deram errado, incontáveis lágrimas durante os testes de comportamento, as cervejas e programas de senhorinhas. Muito obrigada pela ajuda técnica e emocional. As gurias, obrigada por saber ler os meus olhos quando eu já tinha abraçado o caos.

Ao Mathias e Daniel, pela insistência em manter os nossos mais de 15 anos de amizade, e pela prontidão para tomar vinho e confidenciar, chorar as pitangas e praticar inglês bêbados.

Ao homem da minha vida, Natã, por ser o meu melhor amigo, e a melhor pessoa que eu poderia ter ao meu lado. Por ser a pessoa, mais acolhedora e compreensiva que eu já conheci, e por me lembrar que “eu tenho todo o direito de ficar nervosa, pois eu vou fazer o que eu sempre quis”. Parte das minhas conquistas ao longo desses dois anos, eu devo a ti.

Aos colegas, professores, da UNIJUÍ, por terem me apresentado esse mundo da pesquisa, lá me meados de 2015.

A professora Mirna, pelos conselhos que beiram a bruxaria, cirúrgicos no que eu preciso ouvir. “O mundo científico não quer mais pessoas que fiquem restritas a um local. Tu precisas sair. Vai, confia na força das tuas relações.”

Ao professor Thiago, por ter me ensinado a “ter tesão no que eu faço” e por ter sempre incentivado esse meu lado audacioso. Vai ficar conhecido como “O professor que alcançava livros”.

A professora Pauline e a Analú, que me apresentaram o lado fisiológico e bioquímico da vida, e que iniciaram todo o processo. Elas possivelmente nunca ficarão sabendo desse agradecimento, mas eu não poderia deixar de fazê-lo, pois elas representam o meu começo!

Aos demais colegas, muito obrigada pela companhia, pelo café e pelo imenso suporte!

PARTE I

RESUMO: A hipercolesterolemia é um fator de risco clássico para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Além disso, a exposição ao poluente atmosférico Material Particulado Fino (MP_{0,1 - 2,5} µm) também tem emergido como um perigo para o desenvolvimento da aterosclerose. Uma vez inalado, o MP_{2,5} pode atingir a circulação sanguínea e causar efeitos sistêmicos, que incluem o comprometimento da vasodilatação dependente de óxido nítrico (NO), por induzir estresse oxidativo. No lúmen vascular, as partículas de MP_{2,5} são englobadas por monócitos, que podem reagir via polarização do seu fenótipo para um majoritariamente pró-inflamatório em condições estressoras. Com isso, as células do endotélio vascular ficam sob o efeito do poluente, e de mediadores parácrinos. Tendo isso em consideração, visamos analisar os efeitos do MP_{2,5} sobre o desenvolvimento de lesão endotelial vascular, com foco nos macrófagos e nas células endoteliais como mediadores desse processo. Dada a coexistência dos fatores de risco, também buscamos avaliar se o MP_{2,5} pode desempenhar efeitos agravantes sobre a hipercolesterolemia. Para tal, procedemos com a extração parcial do MP_{2,5} dos filtros coletados na Gávea, RJ, Brasil, em tampão salina. Essa suspensão foi submetida a ultrassonicação e centrifugação, para obtenção do sobrenadante denominado solução concentrada (SC). Então, a SC foi analisada quimicamente por Espectrometria de Massa por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-MS) e diluída nas concentrações de interesse. A exposição camundongos CF-1 ao poluente mostrou intenso papel do MP_{2,5} em comprometer o metabolismo do NO, principalmente via estresse oxidativo e inflamação. Em concordância, a exposição direta de células endoteliais da linhagem EOMA ao poluente, resultou em redução da disponibilidade de NO apesar da expressão e ativação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Encontramos efeito pró-inflamatório do poluente sobre o modelo animal, sobre o qual constatamos contribuição dos macrófagos como produtores de fatores oxidantes e inflamatórios. Ao expormos macrófagos da linhagem RAW264.7 ao MP_{2,5}, encontramos características morfológicas, fagocíticas, oxidativas e inflamatórias, condizentes com a adoção de um fenótipo reativo, que favoreceu o acúmulo de triglicerídeos e a formação de células espumosas. Além disso, o secretoma dos macrófagos foi suficiente para comprometer a integridade da lâmina endotelial, via redução da viabilidade da linhagem EOMA, apesar dos mecanismos contra regulatórios ativados pelas células, como o aumento na disponibilidade de NO, possivelmente devido ao estímulo a defesa antioxidante. Por fim, ao associarmos a exposição ao MP_{2,5} a hipercolesterolemia em modelo animal, constatamos sinergia entre ambos os fatores de risco. A dieta hipercolesterolêmica alterou o metabolismo lipídico e hepático independentemente do poluente, enquanto o segundo fator de risco agiu majoritariamente sobre parâmetros oxidativos e inflamatórios. Assim, a combinação de ambos resulta no cenário perfeito para desenvolvimento e agravamento de lesões ateroscleróticas. Com isso, nossos resultados corroboram a hipótese de que o MP_{2,5} tem potencial aterogênico por agir sobre células endoteliais e macrófagos, e que pode exacerbar condições de risco pré-existentes.

Palavras-chave: estresse oxidativo; óxido nítrico; inflamação; dieta hipercolesterolêmica.

ABSTRACT: Hypercholesterolemia is a classic risk factor for the development of cardiovascular disease. In addition, exposure to the air pollutant Fine Particulate Matter ($PM_{0.1-2.5 \mu m}$) has also emerged as a hazard for the development of atherosclerosis. Once inhaled, $PM_{2.5}$ can reach the bloodstream and cause systemic effects, including impaired nitric oxide (NO)-dependent vasodilation by inducing oxidative stress. In the vascular lumen, $PM_{2.5}$ particles are engulfed by monocytes, which can react by polarizing their phenotype to a mostly pro-inflammatory, under stressful conditions. As a result, the cells of the vascular endothelium are under the effect of the pollutant and paracrine mediators. Taking this into account, we aimed to analyze the effects of $PM_{2.5}$ on the development of vascular endothelial injury, focusing on macrophages and endothelial cells as mediators of this process. Given the coexistence of the risk factors, we also intended to evaluate whether $PM_{2.5}$ can aggravate the effects of hypercholesterolemia. To this end, we proceeded with the partial extraction of $PM_{2.5}$ from the filters collected in Gavea, RJ, Brazil, in saline buffer. This suspension was submitted to ultrasonication and centrifugation to obtain the supernatant called concentrated solution (CS). Then, the CS was chemically analyzed by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) and diluted to the concentrations of interest. Exposure of CF-1 mice to the pollutant showed an intense role of $PM_{2.5}$ in compromising NO metabolism, mainly via oxidative stress and inflammation. Accordingly, direct exposure of endothelial cells from the EOMA lineage strain to the pollutant resulted in reduced NO availability despite the expression and activation of endothelial nitric oxide sintase (eNOS). We found a pro-inflammatory role of the pollutant in the animal model, in which we found the contribution of macrophages as producers of oxidizing and inflammatory factors. When we exposed macrophages of the RAW264.7 lineage to $PM_{2.5}$, we found morphological, phagocytic, oxidative, and inflammatory characteristics, consistent with the adoption of a reactive phenotype, which favored the accumulation of triglycerides and the formation of foam cells. In addition, the macrophage's secretome was sufficient to compromise the integrity of the endothelial lamina, via a reduction in the viability of EOMA, despite the counter-regulatory mechanisms activated by the cells, such as the increase in the availability of NO, possibly due to the stimulation of antioxidant defense. Finally, when the exposure to $PM_{2.5}$ was associated to hypercholesterolemia in an animal model, we found synergy between both risk factors. The hypercholesterolemic diet changed the lipid and hepatic metabolism independent of the pollutant, while the second risk factor acted mainly on oxidative and inflammatory parameters. Thus, the combination of both results in the perfect scenario for the development and aggravation of atherosclerotic lesions. Thus, our results corroborate the hypothesis that $PM_{2.5}$ has atherogenic potential because it acts on endothelial cells and macrophages, and that it can exacerbate pre-existing risk conditions.

Keywords: oxidative stress; nitric oxide; inflammation; hypercholesterolemic diet.

LISTA DE ABREVIACÕES

ADMA – Dimetilarginina assimétrica

Akt – Proteína cinase B

CAT – Catalase

CMLV – Células do músculo liso vascular

COX-2 - Ciclooxigenase 2

DHC – Dieta hipercolesterolêmica

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

ERK1/2 - Proteína cinase regulada por sinal extracelular

ERO – Espécies reativas de oxigênio

HCN – Cianeto de hidrogênio

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HSF1 – Fator de choque térmico

HSP70 – Proteínas de choque térmico de 70 kDa

HSR – Resposta ao choque térmico

ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular

ICP-MS - Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente

IKK – IκB cinase

IL - Interleucinas

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

MP_{0,1} – Material particulado ultrafino

MP_{2,5} – Material particulado fino

MP₁₀ – Material particulado grosso

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NFκB – Fator nuclear Kappa B

NLRP3 - Proteína contendo domínio NOD, LRR e pirina 3

NO – Óxido nítrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONOO⁻ - Peroxinitrito

PAH - Hidrocarbonetos poliaromáticos
PGE – Prostaglandina E2
PGA – Prostaglandina A
ROFA - *Residual Oil Fly Ash*
SASP - Fenótipo secretório associado a senescência
SC – Solução concentrada
SOD – Superóxido dismutase
SP – Proteínas surfactantes
SVOCs – Compostos orgânicos semivoláteis
TLR – Receptores *Toll like*
TNF- α – Fator de necrose tumoral
UPR – Resposta a proteínas desacopladas
VCAM-1 – Molécula de adesão vascular-1

Sumário

PARTE I

1. Introdução.....	7
2. Referencial teórico.....	9
2.1. Material Particulado Fino (MP _{2,5})	9
2.2. Consequências biológicas da exposição ao MP _{2,5}	13
2.2.1. MP _{2,5} e macrófagos	13
2.2.2. MP _{2,5} e disfunção endotelial.....	17
3. Objetivos.....	22
3.1. Objetivo geral	22
3.2. Objetivos específicos	22

PARTE II

Capítulo 1. The macrophage senescence hypothesis: the role of poor heat shock response in pulmonary inflammation and endothelial dysfunction following chronic exposure to air pollution.24

Capítulo 2. Aqueous PM_{2.5} exacerbates lipid accumulation associated to macrophages activation: insights of oxidative, inflammatory, and heat shock response parameters....41

Capítulo 3. PM_{2.5}-exposed macrophages secretome promotes endothelial injury, despite of counter-regulatory mechanisms

Capítulo 4. Exposure to fine particulate matter exacerbates hypercholesterolemia-induced vascular injury

PARTE III

1. Discussão	179
2. Conclusões.....	184
3. Perspectivas futuras	185
4. Referências	186

Anexos.....205

3.3. Anexo I: Aceite pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRGS)

3.4. Anexo II: Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa.....206

1. INTRODUÇÃO

Doenças cardiovasculares são as principais causas de morte a nível mundial, especialmente em países em desenvolvimento. Desde 1988, os níveis de colesterol acima de 190 mg/dL (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017), vêm sendo relacionados com desfechos cardiovasculares (Castelli et al., 1992; Wilson et al., 1988), se consolidando como um fator de risco clássico.

Desde então, outras condições vêm emergindo como perigos para a homeostasia vascular, como a poluição atmosférica (Brook et al., 2004). Dentre os poluentes atmosféricos, o Material Particulado Fino (MP_{2,5}) se destaca devido aos metais de transição presentes na sua composição (Ghio, Silbajoris, et al., 2002), e ao tamanho diminuto das suas partículas (0,1 a 2,5 µm), que permite maior inalação e alcance no trato respiratório, atingindo os alvéolos pulmonares e a circulação sistêmica (Furuyama et al., 2009).

Uma vez na circulação sanguínea, o MP_{2,5} pode exercer efeitos sistêmicos que envolvem o agravamento de lesões cardiovasculares pré-existentes (J. Liu et al., 2019b; Marchini et al., 2016). Essas doenças apresentam uma longa fase pré-clínica e assintomática, conhecida como disfunção endotelial, principalmente verificada a partir da disponibilidade de óxido nítrico (NO). O NO é um importante vasodilatador derivado do endotélio, cujos níveis podem ser afetados por modificações na sua síntese via óxido nítrico sintase (NOS) ou a sua oxidação a peroxinitrito (ONOO⁻) (Pacher et al., 2007a). Uma vez disfuncional, o endotélio se torna mais permeável à passagem de lipoproteínas e leucócitos para a camada subíntima, favorecendo o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. Nesse caso, o estresse oxidativo deflagrado pela exposição à poluição atmosférica pode ser um grande risco (Haberzettl et al., 2018; Haberzettl, McCracken, et

al., 2016; Haberzettl, O'Toole, et al., 2016; Hill et al., 2021; Kurlawala et al., 2023; Magnani et al., 2013; Marchini, 2023; Marchini et al., 2014).

Os monócitos são os primeiros a reconhecerem as partículas invasoras. Na presença de estímulos lesivos, eles podem modular o seu fenótipo secretório, de um neutro (MØ) para um majoritariamente pró-inflamatório (M1-like) e com isso determinar o progresso ou resolução da lesão (Jung et al., 2019; S. Liu et al., 2020). Nesse ponto, a ativação do fator nuclear Kappa B (NFκB) é a principal via que marca a ativação de macrófagos na exposição ao MP_{2,5} (Tang et al., 2019), e está associada a expressão das proteínas de choque térmico (HSP70), liberação de interleucinas (IL)-6, IL-1β e fator de necrose tumoral (TNF-α) (Tang et al., 2019), que podem contribuir para a propagação da lesão. Nessa perspectiva, estudos prévios já mostraram a interação deletéria entre macrófagos e células vasculares no contexto da exposição a SiO₂ (X. Liu et al., 2012), e a nicotina (J. Zhu et al., 2019). Contudo, sua relação com a disfunção endotelial induzida pelo MP_{2,5} ainda é desconhecida.

Com isso, visamos analisar os efeitos do MP_{2,5} no desenvolvimento de lesão endotelial vascular, com foco nos macrófagos e nas células do endotélio vascular como possíveis mediadores desse processo. Além disso, dada a coexistência dos dois fatores de risco para as doenças cardiovasculares, visamos analisar se esse MP_{2,5} pode desempenhar efeitos agravantes sobre a hipercolesterolemia.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Material Particulado Fino (MP_{2,5})

Estima-se que 9 a cada 10 pessoas vivam em contato com um ar em qualidade inferior ao preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (World Health Organization, 2023a). Esse fato se tornou especialmente alarmante durante a pandemia por Sars-COV2, quando o decreto por *knockdown* resultou em melhoria significativa nos níveis de poluentes a nível mundial, indiretamente responsabilizando o fluxo automobilístico pelas emissões (Costa-Beber & Goettems-Fiorin, 2023).

Apesar disso, se sabe que a poluição atmosférica pode ser derivada de várias fontes, entre antrópicas e naturais. Entre as causas naturais, podemos citar as queimadas e erupções vulcânicas. Dentre as derivadas de ações humanas, destacamos: combustão parcial de combustíveis fósseis pela indústria automobilística e industrial, queima de biomassa em pequena escala (Eriksson et al., 2022; Rylance et al., 2015; Walker et al., 2021) ou desmatamento, criação de animais (Tang et al., 2019), tabagismo, entre outros. Entre estas, salientamos que a poluição derivada de atividades antrópicas requer maior atenção e preocupação, devido a dimensão e maior toxicidade (Park et al., 2018).

A poluição atmosférica é composta de gases e sólidos. Os principais poluentes gasosos são dióxido de enxofre (SO₂), óxidos de nitrogênio (NO_x), monóxido de carbono (CO), ozônio (O₃), hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) e compostos orgânicos voláteis (Niemann et al., 2017). A fração sólida, por outro lado, é chamada Material Particulado (MP), cujas partículas estão suspensas no ar, como poeira, fumaça do cigarro, fuligem, e outros pequenos fragmentos. O MP pode ser classificado conforme o diâmetro de suas partículas. O Material Particulado Grosso (MP₁₀), corresponde as partículas com

diâmetro entre 2,5 e 10 μm , o Fino ($\text{MP}_{2,5}$), entre 0,1 e 2,5 μm , e o Ultrafino ($\text{MP}_{0,1}$), menores de 0,1 μm (Figura 1).

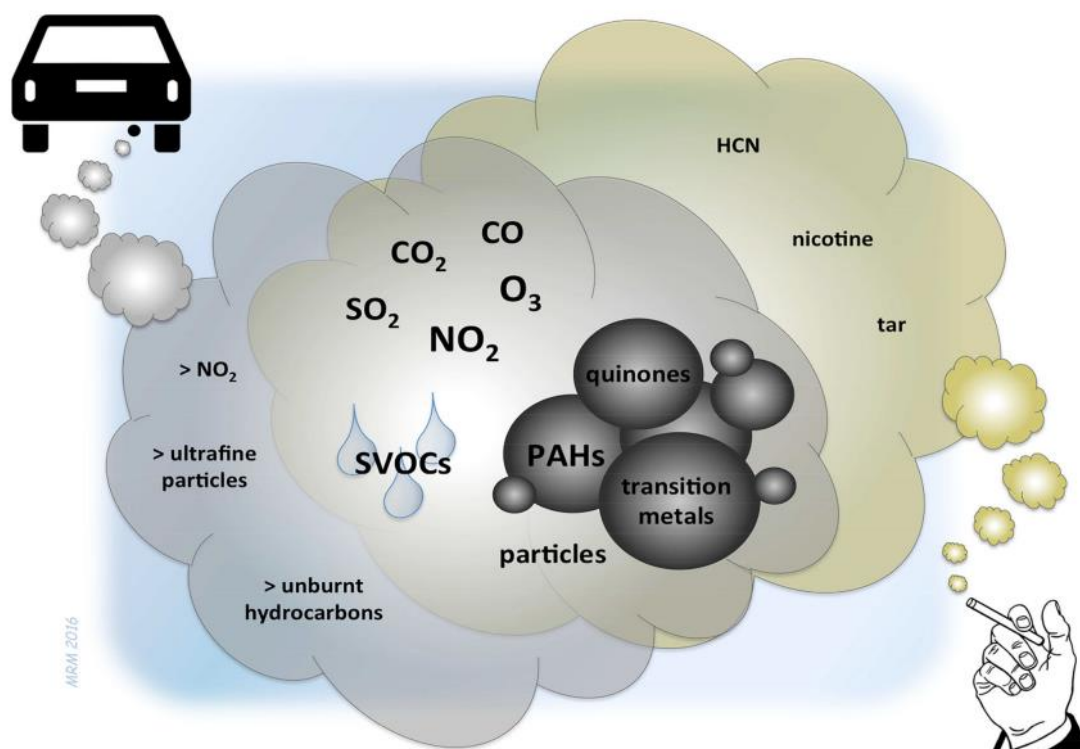


Figura 1: Representação gráfica dos tipos de poluentes atmosféricos, incluindo a fração gasosa e particulada. Figura retirada de Niemann et al. (2017). HCN: Cianeto de hidrogênio; PAH: Hidrocarbonetos poliaromáticos; SVOCs: Compostos orgânicos semivoláteis.

O $\text{MP}_{2,5}$ apresenta uma complexa composição, incluindo metais, sulfatos, silicatos, compostos carbônicos e nitrogenados (Galvão et al., 2022; Ghio, Silbajoris, et al., 2002). Um estudo recente analisou a composição elementar e mineralógica de poluentes coletados no sudeste brasileiro, e apontou a presença de óxidos ferrosos no $\text{MP}_{2,5}$, principalmente representados pelo óxido de potássio e ferro ($\text{K}_2\text{Fe}_2\text{O}_3$) (Galvão et al., 2022). Além disso, nitratos (NaNO_3), silicatos [Al_2SiO_3 , KAlSi_3O_8 , $\text{K}_4\text{Ca}(\text{SiO}_3)_3$], e principalmente sulfatos [$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{Ca}(\text{SO}_4)_2$, e $(\text{NH}_4)_3\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$] foram encontrados (Galvão et al., 2022).

A composição metálica, em especial, varia bastante de acordo com a fonte e localização, podendo atingir níveis entre 1 ng/m³ e 100 µg/m³. Elementos como Fe, V e Ni são encontrados em maior quantidade, enquanto Co, Hg e Sb estão presentes em níveis traços (Schroeder et al., 1987). Nos nossos trabalhos com MP_{2,5}, S, Fe, Sb, Mn, Br e As têm se apresentado em maior abundância (Costa Beber et al., 2020; Goettens-Fiorin et al., 2016; Kostrycki et al., 2019; Mai et al., 2017), ressaltando a influência dos metais de transição na composição e nos efeitos biológicos do MP_{2,5} (Figura 2).

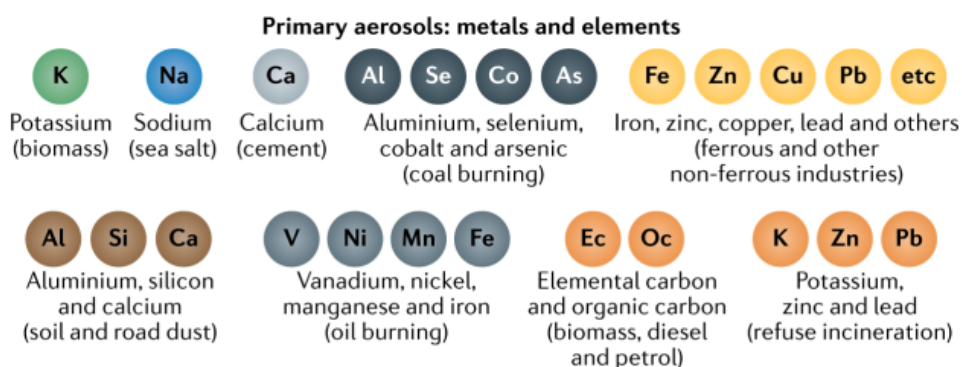


Figura 2: Representação gráfica da composição do MP_{2,5}. Figura adaptada de Al-Kindi et al. (2020).

Embora os estudos elencando os metais de transição presentes nas partículas do MP_{2,5} sejam relativamente abundantes, a caracterização elementar é mais comumente realizada sobre o material seco, antes de ser suspenso em solução salina para administração nos modelos (*in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*). No entanto, para fins de análise química, o MP_{2,5} pode ser fracionado em quatro partes: F1: componentes solúveis; F2: fração de redução e óxidos carbônicos; F3: fração oxidável e sulfídrica, matéria orgânica; F4: fração residual (Sah et al., 2019). Dessas frações, os metais são conhecidos por serem mais disponíveis na fração residual da solução (Sah et al., 2019), não deixando de serem abundantes na fração hidrossolúvel (de Paula Ribeiro et al., 2019, 2020; Ribeiro et al., 2016).

Estudos recentes utilizando o extrato polar do poluente apresentaram uma composição rica em Li, B, Si, Ti, Fe, Co, Cu, Zn, Ga, Ge, Rb, Sr, Zr, Cd, Cs, Ba, Ce, Nd, Eu, Bi, Be, Mg, Al, K, Mn, Hg e Tl (de Paula Ribeiro et al., 2020; Ribeiro et al., 2016). Destes elementos, As, Zn e Fe já foram detectados no extrato aquoso do MP_{2,5} obtido em algumas cidades europeias (Cavanagh et al., 2009). Na Ásia, Fe, Al, Cd, Ni, Co, Cr, V, Mn e As também foram detectados no extrato aquoso do poluente, com Al e Fe contribuindo com as maiores concentrações de metais traços (Othman et al., 2021).

Interessantemente, quando avaliados os efeitos das frações extraídas do MP_{2,5}, aquelas de maior poder pró-inflamatório apresentaram os níveis mais elevados de Cu, Mo, Sn e Ba, sugerindo que esses metais possam contribuir para os efeitos lesivos observados (Othman et al., 2021). Mais importante, quando comparado as suas frações, o MP_{2,5} total deflagrou uma resposta biológica mais danosa e intensa (Othman et al., 2021), sugerindo que embora trabalhar com material seco resulte em melhor acurácia na concentração de poluente, o extrato aquoso somado às partículas apresenta uma composição mais complexa, que melhor representa a exposição 'real'.

2.2. Consequências biológicas da exposição ao MP_{2,5}

2.2.1. MP_{2,5} e macrófagos

A exposição a poluição atmosférica tem se consolidado como um fator de risco para doenças cardiovasculares (Khraishah et al., 2022; Y. Ruan et al., 2024). Embora poluentes gasosos já tenham sido associados a efeitos deletérios à saúde (Faustini et al., 2014; Jerrett et al., 2009), evidências epidemiológicas substanciais apontam para o MP_{2,5} como o mais danoso componente do ar impuro (Al-Kindi et al., 2020; Brook et al., 2010).

O seu tamanho diminuto possibilita um maior alcance nas vias aéreas inferiores, chegando aos alvéolos pulmonares (Figura 3), e desempenhando efeitos sistêmicos. Os macrófagos representam a primeira defesa imune contra as partículas inaladas. Eles captam o poluente via micropinocitose, no caso das partículas maiores, ou endocitose mediada por cavéola ou clatrina, no caso das partículas menores (X. Cui et al., 2023). Nesse sentido, já foi demonstrado que o MP_{0,1} pode ultrapassar a barreira alvéolo-capilar via transcitose (Furuyama et al., 2009; Nemmar et al., 2002), enquanto o MP_{2,5} requer fagocitose pelos macrófagos alveolares (X. Cui et al., 2023; Furuyama et al., 2009), os quais podem contribuir para o transporte e alcance sistêmico desse poluente (X. Cui et al., 2023; Furuyama et al., 2009). Mais tarde, com a descoberta de que a exposição ao MP_{2,5} aumenta a permeabilidade dos vasos (Dai et al., 2017; Olesiejuk & Chałubiński, 2023), se subentendeu que nessas circunstâncias, as partículas finas também podem atingir a circulação sanguínea.

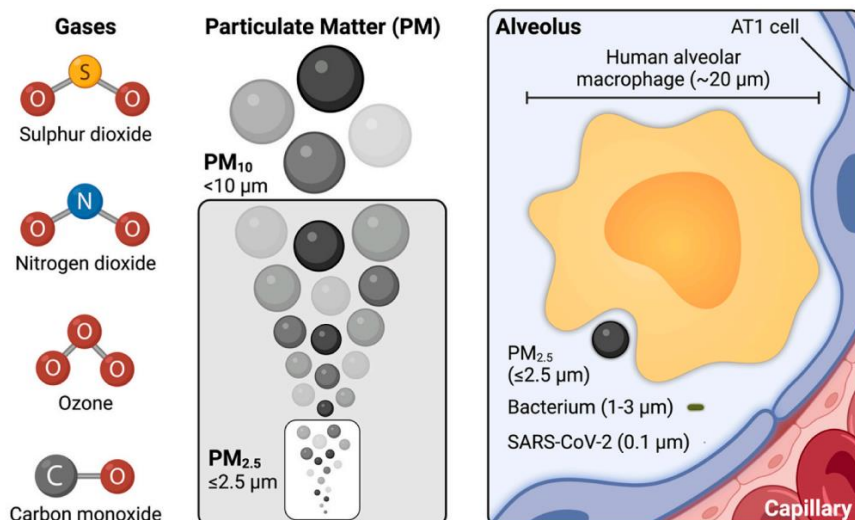


Figura 3: Representação gráfica das categorias de Material Particulado, com os seus respectivos diâmetros, e alcance pulmonar. Como demonstrado, o MP_{2,5} tem maior alcance no organismo, podendo atingir os alvéolos pulmonares, circulação sanguínea e, com isso, desempenhar efeitos sistêmicos. Figura retirada de Marchini (2023).

Em condições estressoras, é fisiológico aos macrófagos responderem via ativação do fator NFκB, que comanda a síntese e translocação de fatores pró-oxidantes e pró-inflamatórios (Costa-Beber et al., 2022). Em concordância com isso, é frequente o aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-6, e redução das anti-inflamatórias, como IL-10 no plasma de animais ou pacientes expostos ao MP_{2,5} (X. Du et al., 2019; Rylance et al., 2015). Nesse sentido, macrófagos que sofreram polarização para um fenótipo pró-inflamatório representam a principal fonte de IL-1β, TNF-α, IL-6 e IL-8 (Pachulec et al., 2017; Rylance et al., 2015; Y. Zhong et al., 2019), verificados no plasma de indivíduos e modelos animais expostos. Além disso, também potencializam a sua expressão e atividade da iNOS (Rylance et al., 2015; Y. Zhong et al., 2019), e da NADPH oxidase, gerando uma excessiva produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e NO (Magnani et al., 2013).

Nos macrófagos, a inflamação sistêmica causada pela captação das partículas de MP_{2,5} está associada a disfunção lisossomal e ao comprometimento da sua capacidade

fagocítica (X. Cui et al., 2023). Estudos apontaram para a proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2) como indutora da geração de ERO, responsáveis pelo comprometimento da acidificação (Y. Li et al., 2020), e disfunção lisossomal (X. Cui et al., 2023). De acordo, a captação das partículas de MP_{2,5} parece comprometer a fagocitose de células apoptóticas e microrganismos (Y. Li et al., 2020; Rylance et al., 2015). Nesses casos, a carga de partículas acumuladas pela célula é inversamente proporcional a capacidade de responder efetivamente contra invasores (Rylance et al., 2015).

Além disso, alterações na atividade lisossomal estão associadas a formação de células espumosas (Marques et al., 2021), caracterizadas pelo acúmulo intracelular de triglicerídeos e ésteres de colesterol, que dão início a lesão aterosclerótica. Já foi demonstrado que a exposição ao MP_{2,5} também exacerba a formação de células espumosas derivadas de macrófagos, via aumento da oxidação de colesterol (J. Liu et al., 2019; Manzano-León et al., 2013; Wan et al., 2019), e captação de partículas aterogênicas via CD36 (Rao et al., 2014; Yu et al., 2022). Nesse ponto, a existência de um microambiente pró-inflamatório quebra o *feedback* negativo que regula o metabolismo do colesterol, culminando na captação exacerbada de LDL nativa, acompanhado de síntese via HMG-CoA redutase, e acúmulo intracelular (Ye et al., 2009a, 2014a). Contudo, a avaliação da formação de células espumosas devido a exposição a poluição atmosférica tem se limitado aos testes com LDL modificada (oxidada ou acetilada) (J. Liu et al., 2019; Lund et al., 2011; Manzano-León et al., 2013), mais aterogênicas, e não consideram a inflamação crônica de baixo grau decorrente da exposição ao poluente.

Além de comprometer a atividade fagocítica, lisossomal e o metabolismo de colesterol, algumas vias pró-inflamatórias podem levar a morte celular. Especificamente, a apoptose que pode ser deflagrada por duas vias principais, intrínseca e extrínseca. A via intrínseca tem origem mitocondrial e está intimamente relacionada com o estresse

oxidativo. Já foi demonstrado que exposição ao MP_{2,5} pode levar os macrófagos a apoptose dependente de mitocôndria, via aumento na razão Bcl-2/Bax, liberação de citocromo-c e ativação das caspases-9 e -3 (J. Liu et al., 2019; Wei et al., 2021). Por outro lado, a via extrínseca é deflagrada pela presença de TNF- α , como também já foi observado após exposição ao MP_{2,5} (Deng et al., 2014).

Apesar dos inúmeros mecanismos pelos quais o MP_{2,5} pode afetar os macrófagos, a maioria esmagadora dos estudos foi conduzida com as partículas secas do poluente, ignorando totalmente os efeitos do extrato aquoso. Além disso, ainda é incerto como eles podem contribuir no desenvolvimento de lesões vasculares, tendo em vista o seu comportamento diante da exposição ao poluente.

2.2.2. MP_{2,5} e disfunção endotelial

A exposição ao MP_{2,5} está relacionada ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, assim como a piora de doenças já existentes. Recentemente, um estudo demonstrou que a exposição ao MP_{2,5} está associada com o desenvolvimento subclínico de aterosclerose, mesmo em pessoas de baixa idade (12-30 anos) (S.-Y. Chen et al., 2022).

A etapa subclínica que antecede o diagnóstico de aterosclerose é denominada disfunção endotelial. Essa fase de lesão vascular é majoritariamente identificada pela redução da biodisponibilidade de NO, via comprometimento na sua produção pela óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), ou aumento na sua oxidação a peroxinitrito (ONOO⁻). A redução da razão NO/ONOO⁻ compromete a capacidade vasodilatadora, aumentando a permeabilidade para lipoproteínas e leucócitos, além de aumentar a expressão de moléculas de adesão (Pacher et al., 2007a). Nesse sentido, qualquer condição que altere cronicamente o equilíbrio redox do vaso, como a exposição a poluição atmosférica, pode levar a disfunção endotelial.

A exposição ao MP_{2,5} está intimamente relacionada ao aumento na produção de ERO, e conseqüente estresse oxidativo (Baldissera et al., 2018; Marchini et al., 2014). Um estudo avaliando pacientes entre 22 e 65 anos, encontrou associação direta entre as concentrações de MP_{2,5} as quais foram submetidos e níveis de F-2 isoprostano e moléculas de adesão celular no plasma (aumento de 28,4% e 24,6%, respectivamente, para cada 10 µg/m³ de MP_{2,5}) (Riggs et al., 2020). Tais mudanças sinalizam uma associação positiva entre a exposição ao poluente, estresse oxidativo e disfunção endotelial (Riggs et al., 2020).

Em conformidade com esses resultados, experimentos *ex vivo* mostram que anéis da aorta incubados com MP_{2,5} apresentam comprometimento na vasodilatação mediada

pelo endotélio, cenário passível de ser prevenido pelo pré-tratamento com superóxido dismutase (SOD) (Labranche et al., 2012). Além disso, a exposição de animais ao MP_{2,5} aumenta a resposta contrátil das aortas a fenilefrina, o que reflete dificuldade em orquestrar uma resposta contrária (via NO) ao agente vasoconstritor e, conseqüentemente, menor capacidade vasodilatadora mediada pelo endotélio (Haberzettl, O'Toole, et al., 2016). Juntos, esses dados sugerem um papel do poluente em promover um microambiente oxidante, que reduz a disponibilidade de NO e, com isso, compromete a capacidade do endotélio de modular o tônus vascular.

Outros estudos também suportam o papel do estresse oxidativo como indutor do processo inflamatório e de adesão leucocitária diante da exposição a esse poluente (Rui et al., 2016). Um possível mediador do efeito oxidante do MP_{2,5} é a super-ativação da NADPH oxidase, que resulta no aumento na produção de O₂⁻ (Fang et al., 2022; X. Zhu et al., 2019). Nesse sentido, a inibição dessa enzima melhora marcadores de disfunção endotelial, proporcionando aumento na produção eNOS-dependente de NO, redução da ativação do inflamassomo NLRP3 (IL-1 β , IL-10 e IL-18) e da expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1, e P-selectina) (Zou et al., 2022).

Além disso, a disfunção mitocondrial também surge como um importante alvo terapêutico para a disfunção endotelial. Estudos reportam que a exposição ao MP derivado do cigarro promove redução do potencial de membrana mitocondrial e aumento na produção de ERO (S. Chen et al., 2019). Em concordância com isso, outros pesquisadores já relacionaram a exposição ao MP_{2,5} com disfunção mitocondrial (R. Li et al., 2015; Miao et al., 2019) e apoptose por via intrínseca (Yang et al., 2018). Desse modo, a neutralização do estresse oxidativo via antioxidantes parece ser suficiente na prevenção desses efeitos lesivos (S. Chen et al., 2019).

Além do estresse oxidativo, mudanças na expressão e ativação da eNOS também comprometem a vasodilatação dependente de endotélio exposto a poluição atmosférica. Estudos demonstram que a exposição a níveis moderados de $MP_{2,5}$ pode comprometer a expressão de mRNA e proteica de eNOS, bem como a sua atividade em arteríolas penianas (X. Wang et al., 2017). Tal efeito também pode ser observado no cordão umbilical da prole de ratas expostas ao $MP_{2,5}$, e foi responsabilizado pela restrição de crescimento intrauterino evidenciado nessas circunstâncias (Ding et al., 2022). Além disso, os efeitos do poluente sobre a eNOS podem ser pós-traducionais, via aumento na sua S-glutationilação (Y. Du et al., 2013), redução da sua fosforilação (Zou et al., 2022), aumento nos níveis de substratos inibitórios, como dimetilarginina assimétrica (ADMA) (Zou et al., 2022) ou seu desacoplamento (Sherratt et al., 2023). O desacoplamento da eNOS favorece a sua ação como NADPH oxidase, com produção de O_2^- , e exacerba o estresse oxidativo e disfunção endotelial (Figura 4).

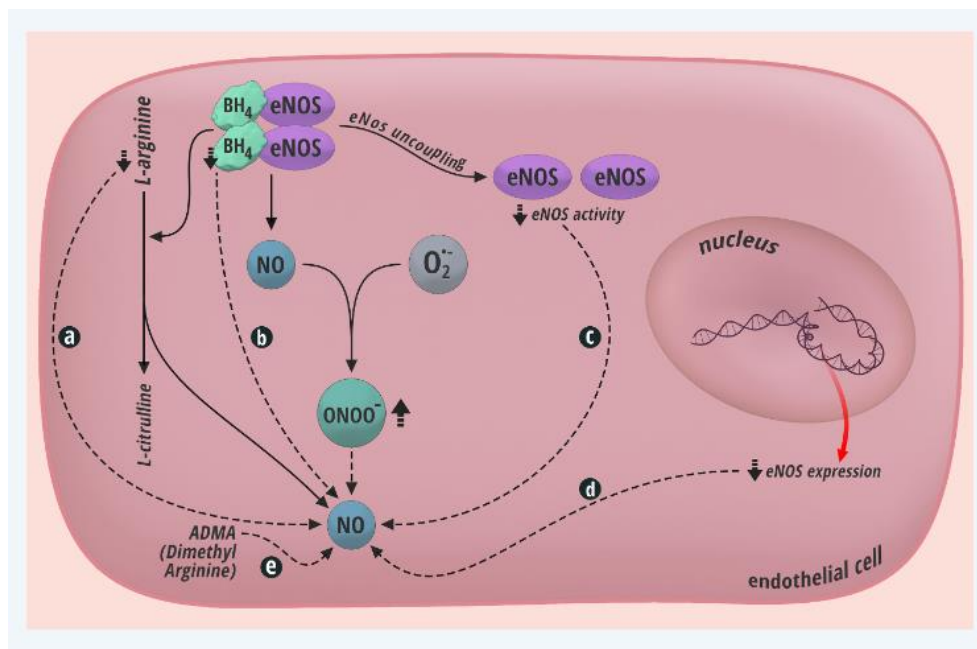


Figura 4: Representação esquemática do metabolismo de NO dependente de eNOS em condições patológicas. As setas tracejadas indicam vias que podem culminar na redução dos níveis de NO. **a.** Redução no substrato de eNOS (L-arginina) ou do seu cofator (BH_4). **b.** Neutralização do NO via oxidação a $ONOO^-$, reduzindo a biodisponibilidade de NO. **c.** Redução na produção de NO, devido a redução da atividade

ou desacoplamento da eNOS (mudanças pós-traducionais), devido à ausência de seus cofatores. **d.** Redução na síntese de NO, devido a redução da expressão de eNOS. **e.** Comprometimento da atividade da eNOS devido ao aumento na presença de inibidores competitivos, como o ADMA. Figura retirada de Shaito et al. (2022).

A perigosa combinação de estresse oxidativo e inflamação medeia os efeitos cardiovasculares causados pelo MP_{2,5} (Costa-Beber et al., 2023; Costa-Beber, Goettems-Fiorin, Borges, et al., 2021; Costa-Beber, Goettems-Fiorin, dos Santos, et al., 2021). O acúmulo de ERO e de ferro devido a poluição atmosférica, estão associados a morte de células endoteliais microvasculares da retina por ferroptose (Gu et al., 2022). Além disso, essa condição pró-oxidante aumenta a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, através da ativação da via inflamatória ERK/Akt/NFκB (Rui et al., 2016; X. Wang et al., 2017), e inflamassomo NLRP3 (Gu et al., 2022). Conseqüentemente, a exposição ao MP_{2,5} induz o aumento da produção de citocinas inflamatórias, como o TNF-α, IL-6 (Marchini et al., 2014, 2016) e IL-1β (Gu et al., 2022), e pode aumentar a área de lesão na aorta ascendente de modelo animal para aterosclerose (Wan et al., 2014, 2019).

Outros estudos também suportam essa causalidade. Foi demonstrado que a ausência de receptores *Toll-like-3* (TLR-3) atenua o aumento da pressão sanguínea pela exposição subcrônica ao MP_{2,5}, via melhoria na capacidade vasoconstritora da aorta, da expressão de ICAM-1 e NADPH oxidase nas células endoteliais (J. Zhang et al., 2022). Em concordância, outros pesquisadores comprovaram que a super-ativação da via hipotalâmica IκB cinase (IKK)/NFκB medeia a disfunção endotelial causada pela exposição ao MP_{2,5} (Ying et al., 2014), uma vez que a sua inibição seletiva foi capaz de prevenir os efeitos deletérios atribuídos ao poluente (M. Chen et al., 2018). Esses resultados ficaram ainda mais esclarecedores à medida que se verificou a eficiência de fármacos anti-TNF-α e anti-IL-6 sobre a ativação e infiltração de células imunes no miocárdio, induzidas pelo ROFA (Marchini et al., 2016).

A par dessas informações, é possível afirmar que o endotélio está sujeito a ações diretas das partículas de poluentes, e indiretas, uma vez que ele se encontra à mercê de fatores pró-oxidantes e pró-inflamatórios parácrinos liberados na corrente sanguínea (Figura 5). Contudo, quais os fatores e as suas fontes determinantes nesse processo de lesão vascular deflagrado pelo $MP_{2,5}$ permanece incerto.

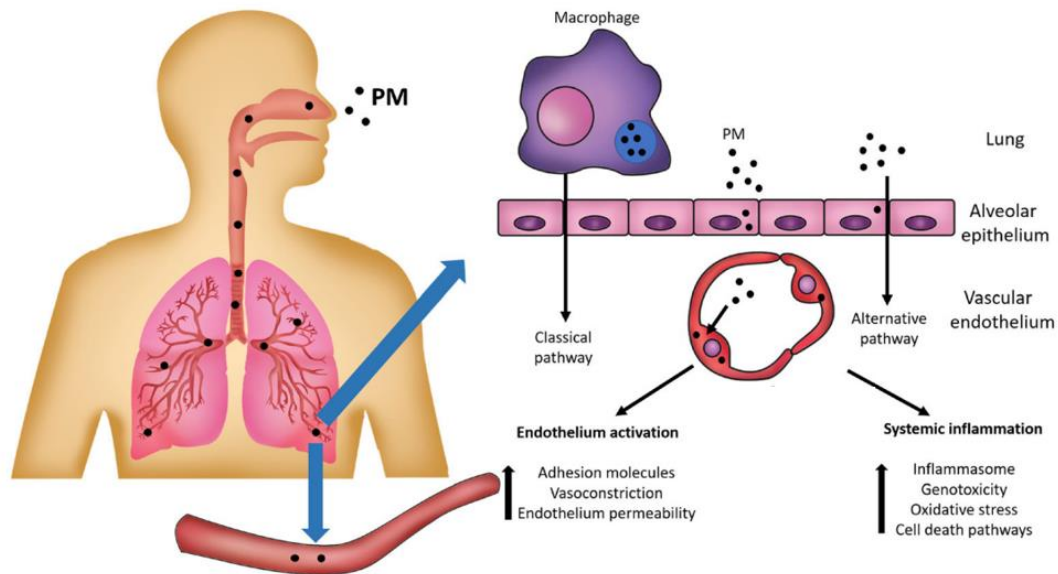


Figura 5: Representação esquemática dos efeitos diretos e indiretos do $MP_{2,5}$ sobre o endotélio vascular. Figura adaptada de Arias-Pérez et al. (2020).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel da poluição atmosférica sobre o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, com foco nas células do endotélio vascular e nos macrófagos como mediadores desse processo.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o papel aterogênico e inflamatório do MP_{2,5} sobre macrófagos;
- Analisar os efeitos diretos e indiretos do MP_{2,5} sobre a disfunção endotelial vascular;
- Investigar o papel dos macrófagos como possíveis mediadores da injúria endotelial causada pela exposição ao MP_{2,5}.
- Averiguar possíveis efeitos agravantes do MP_{2,5} sobre a injúria endotelial induzida pela hipercolesterolemia.

PARTE II

Nesta seção, a metodologia e os resultados serão apresentados em formato de artigos, subdivididos em capítulos precedidos por um breve prefácio.

Capítulo I. The macrophage senescence hypothesis: the role of poor heat shock response in pulmonary inflammation and endothelial dysfunction following chronic exposure to air pollution.

No capítulo I, apresentamos o artigo de revisão de literatura feito no início da pesquisa, e publicado na revista *Inflammation Research* (Doi: 10.1007/s00011-022-01647-2). Nele, reunimos evidências experimentais suportando a hipótese de que o MP_{2,5} poderia desencadear a senescência celular de macrófagos via depleção da sua resposta ao choque térmico, e com isso propagar a inflamação crônica e levar a disfunção endotelial. Quando expostos ao MP_{2,5}, os macrófagos aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio, que ativam o NFκB. O NFκB é naturalmente um fator pró-inflamatório que impulsiona a síntese de prostaglandina E2 (PGE2) e causa febre. PGE2 pode ser convertido em prostaglandina A2, um poderoso indutor de HSR. Portanto, quando ativado transitoriamente, o NFκB pode desencadear a resposta anti-inflamatória por meio de *feedback* negativo, induzindo a expressão de HSP70. No entanto, quando ativado cronicamente, o NFκB lidera um conjunto de vias envolvidas na disfunção mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático, resposta a proteínas desdobradas (do inglês, *Unfolded Protein Response*), ativação do inflamassoma e apoptose. Durante a exposição crônica ao MP_{2,5}, as células não conseguem expressar adequadamente a sirtuína-1 ou ativar o HSF-1, o que atrasa a fase de resolução da inflamação. Como os macrófagos alveolares são a primeira defesa imune contra MP_{2,5}, supõe-se que o poluente prejudique a HSR e, conseqüentemente, induza a senescência celular. Assim, os macrófagos senescentes mudam seu fenótipo secretor para um fenótipo mais inflamatório, conhecido como fenótipo secretório associado a senescência (SASP). Finalmente, o SASP dos macrófagos propagaria a inflamação sistêmica, levando à disfunção endotelial e aterosclerose.



The macrophage senescence hypothesis: the role of poor heat shock response in pulmonary inflammation and endothelial dysfunction following chronic exposure to air pollution

Lílian Corrêa Costa-Beber¹ · Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma¹

Received: 17 February 2022 / Revised: 18 July 2022 / Accepted: 14 September 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2022

Abstract

Introduction Cardiovascular diseases (CVD) have been associated with high exposure to fine particulate air pollutants (PM_{2.5}). Alveolar macrophages are the first defense against inhaled particles. As soon as they phagocytize the particles, they reach an inflammatory phenotype, which affects the surrounding cells and associates with CVD. Not coincidentally, CVD are marked by a depleted heat shock response (HSR), defined by a deficit in inducing 70-kDa heat shock protein (HSP70) expression during stressful conditions. HSP70 is a powerful anti-inflammatory chaperone, whose reduced levels trigger a pro-inflammatory milieu, cellular senescence, and a senescence-associated secretory phenotype (SASP). However, whether macrophage senescence is the main mechanism by which PM_{2.5} propagates low-grade inflammation remains unclear.

Objective and design In this article, we review evidence supporting that chronic exposure to PM_{2.5} depletes HSR and determines the ability to solve the initial stress.

Results and Discussion When exposed to PM_{2.5}, macrophages increase the production of reactive oxygen species, which activate nuclear factor-kappa B (NF-κB). NF-κB is naturally a pro-inflammatory factor that drives prostaglandin E2 (PGE2) synthesis and causes fever. PGE2 can be converted into prostaglandin A2, a powerful inducer of HSR. Therefore, when transiently activated, NF-κB can trigger the anti-inflammatory response through negative feedback, by inducing HSP70 expression. However, when chronically activated, NF-κB heads a set of pathways involved in mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response, inflammasome activation, and apoptosis. During chronic exposure to PM_{2.5}, cells cannot properly express sirtuin-1 or activate heat shock factor-1 (HSF-1), which delays the resolution phase of inflammation. Since alveolar macrophages are the first immune defense against PM_{2.5}, we suppose that the pollutant impairs HSR and, consequently, induces cellular senescence. Accordingly, senescent macrophages change its secretory phenotype to a more inflammatory one, known as SASP. Finally, macrophages' SASP would propagate the systemic inflammation, leading to endothelial dysfunction and atherosclerosis.

Keywords Atmospheric pollution · Reactive species · Cellular senescence · Autophagy · Heat shock proteins

Abbreviations

Akt	Protein kinase B	ATF-4	Activating transcription factor-4
AMPK	AMP-activated protein kinase	ATF-6	Activating transcription factor-6
AP-1	Activator protein-1	ATP	Adenosine triphosphate
ARE	Antioxidant response element	BiP	Bound immunoglobulin protein
		CCR2	C–C-chemokine receptor type 2
		CHOP	CCAAT/enhancer binding protein-homologous protein
		COF-PM _{2.5}	PM _{2.5} derived from cooking oil fumes
		COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
		COX-2	Cyclooxygenase-2
		CSE	Cigarette smoke extract
		CXCL-1	C–X–C Motif Chemokine Ligand-1
		Cyt-c	Cytochrome-c
		Drp-1	Dynamin-related protein-1

Responsible Editor: John Di Battista.

✉ Lílian Corrêa Costa-Beber
lilian.beber@sou.unijui.edu.br

¹ Postgraduate Program in Biological Sciences-Biochemistry, Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos, 2600, Anexo, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

eHSP70	Extracellular 70-kDa heat shock protein	PM _{0.1}	Ultrafine particles
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase	PM _{2.5}	Fine particulate matter
ER	Endoplasmic reticulum	ROFA	Residual oil fly ash
ERK1/2	Extracellular signal-regulated protein kinase	ROS	Reactive oxygen species
Fis-1	Fission-1	SASP	Senescence-associated secretory phenotype
GRP75	75-KDa glucose-regulated protein	SIRT-1	Sirtuin-1
GRP78	78-KDa glucose-regulated protein	TNF- α	Tumor necrosis factor- α
GRP94	94-KDa glucose-regulated protein	TLR	Toll-like receptors
HFD	High-fat diet	TLR-4	Toll-like receptors-4
HO-1	Heme oxygenase-1	TP _{2.5}	Size-fractionated tire particles
HSE	Heat shock elements	UPR	Unfolded protein response
HSF-1	Heat shock factor-1	VCAM-1	Vascular cell adhesion protein
HSP32	32-KDa heat shock proteins	VDAC-1	Voltage-dependent anion-selective channel protein-1
HSP70	70-KDa heat shock proteins		
HSP90	90-KDa heat shock proteins		
HSR	Heat shock response		
HuR	Human antigen R		
iHSP70	Intracellular 70-kDa heat shock protein		
IKK	I κ B kinase		
IL-1 β	Interleukin-1 β		
IL-6	Interleukin-6		
IL-12	Interleukin-12		
iNOS	Inducible nitric oxide synthase		
IP3R1	Inositol-1,4,5- C triphosphate receptor type 1		
IRE1	Inositol-requiring enzyme type 1		
JNK	C-Jun N-terminal Kinase		
LC-3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain-3		
LDL	Low-density lipoprotein		
LDLr	LDL receptor		
LOX-1	Oxidized LDL receptor		
MAM	Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes		
MAPK	Mitogen-activated protein kinases		
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1		
Mfn-1	Mitofusin-1		
mTOR	Mammalian target of rapamycin		
MyD88	Myeloid differentiation primary response-88		
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B		
NLRP3	NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3		
NO	Nitric oxide		
NOX	NADPH oxidase		
NRF-2	E2-related factor-2		
O ₂ ⁻	Superoxide		
ONOO ⁻	Peroxynitrite		
OPA-1	Dominant optic atrophy-1		
PERK	Protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase		
PGA2	Prostaglandin A2		
PGE2	Prostaglandin E2		
Pi3K	Phosphoinositide 3-kinase		

Introduction

Air pollution is responsible for about 6.5 million deaths annually [1], primarily by increasing the risk of cardiovascular diseases. Among particulate pollutants, fine particulate matter (PM_{2.5}) has an important responsibility in this context due to its reduced diameter, which allows it to be more deeply inhaled by organisms [2, 3]. Recently, the interest in its effects on the endothelium have grown due to the evident increase in the PM_{2.5}-induced mortality related to cardiovascular diseases [4].

The first immune defense associated with PM_{2.5} exposure is activation of alveolar macrophages. Alveolar macrophages exposed to PM_{2.5} present an inflammatory phenotype, characterized by nuclear factor kappa B (NF- κ B) activation and the increased release of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) [5]. PM_{2.5} enhances the release of macrophage-derived extracellular vesicles [6], thus causing the local inflammation to become a systemic condition [7–9]. Macrophage-derived IL-6 enhances the alveolar epithelial [10] and vascular endothelial permeability [11], thereby facilitating the translocation of inflammatory and oxidative factors from lung to vessels [12].

PM_{2.5} is an independent risk factor for cardiovascular diseases. It decreases the bioavailability of nitric oxide (NO), a powerful vasodilator, by reducing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) phosphorylation and inducing NO oxidation into peroxynitrite (ONOO⁻). The reduction of NO bioavailability increases endothelial permeability, thus allowing the passage of lipoproteins (mainly low-density lipoproteins (LDL)) and causing leukocyte adhesions and diapedesis. The oxidative and inflammatory milieu triggered by PM_{2.5} exposure also makes LDL more prone to being oxidized [13] and phagocytized by macrophages through oxidized LDL receptor (LOX-1) and toll-like receptor (TLR) signaling [14]. The increase in intracellular lipid deposition in macrophages leads to foam

cell formation. Foam cells produce a series of factors that stimulate the immune cells migration, which deposits in the vascular wall, contributing to the thrombus development and lumen narrowing, a hallmark of atherosclerosis [15, 16].

In such conditions, inflammatory pathways, such as mitogen activated protein kinases (MAPK) and NF- κ B signaling cascades, can extensively damage the endothelium and contribute to atherosclerosis development [17]. Such oxidative and inflammatory stress affects the structure and functionality of all macromolecules. The integrity of proteins depends on a system of quality control and repair that involves protein synthesis, translocation, folding, assembly, and degradation to avoid protein damage [18]. Thus, it is plausible to consider that such inflammatory stress can be sensed and marked by a whole class of proteins involved in proteostasis: the chaperones. Such well-preserved proteins remained stable during the evolution as have been associated with a wide range of internal and environmental challenges [19–22]. The 70-kDa heat shock proteins (HSP70s) are critical chaperones, antioxidants, and anti-inflammatory proteins [23, 24]. The HSP72, the inducible isoform, is widely expressed under stressful conditions and has a fundamental role in protecting the endothelium against disturbing factors [23]. Briefly, the adequate supply of HSP70 can prevent NF- κ B activation, reduce the generation of NADPH oxidase (NOX)-related reactive oxygen species (ROS), and inhibit the release of inflammatory and fibrotic factors [25–33].

During an inflammatory stimulus, sirtuins (primarily SIRT-1) and heat shock proteins (mainly HSP70) are cardioprotective and determine the final cellular outcome (survival, apoptosis, or senescence) [23, 29, 34]. Studies have revealed that while chronic stress may be harmful and induce cell death, transient stress may enhance the cellular tolerance to stress [35–38]. Numerous studies have shown that transient exposure to elevated temperatures (also known as heat shock or heat therapy) induces stress tolerance and cytoprotection by enhancing HSP70 expression [30, 31, 39, 40]. However, HSP70 levels appear to be differently affected under polluted conditions, depending on the intensity and duration of the PM_{2.5} exposure [41], and its different expression may be determinant in inflammation resolution.

When the cellular response through HSP70 expression is not enough to prevent NF- κ B activation during an inflammatory stimulus, it can cause cell senescence [29]. Senescent cells are resistant to apoptosis, present a cell cycle arrest, and do not replicate, but they remain metabolically active, releasing inflammatory cytokines [42]. Currently, there is a mechanistic hypothesis for inflammatory propagation in metabolic and cardiovascular conditions: the senescence-associated secretory phenotype (SASP) hypothesis [26–29, 43–47].

Considering the role of macrophages in initiating and propagating inflammation when exposed to PM_{2.5} [6–11], we hypothesize that PM_{2.5} can lead macrophages into SASP, which propagates inflammation and leads to pulmonary inflammation and endothelial dysfunction.

PM_{2.5} leads to alveolar macrophage dysfunction: oxidative stress, mitochondrial dysfunction, autophagy, and mitochondrial-mediated apoptosis

Due to its small diameter (0.1–2.5 μ m), PM_{2.5} can go deep into the respiratory system and cause effects that transcend the pulmonary tissue. The lungs are the first to be in contact with and affected by the pollutant. Histological analyses have revealed that, in mice exposed to PM_{2.5}, about 35% of their lungs are damaged, while in animals exposed to ultrafine particles (PM_{0.1}) for three months, it can reach 50% [48].

The first immune defense against PM_{2.5} are neutrophils, followed by monocytes, which infiltrate the alveolus after a single bout of pollutant exposure [49] and are directly involved in the PM_{2.5} clearance [50]. Indeed, alveolar macrophages present aggregates of particles in the cytoplasm following the *in vivo* exposure to PM_{2.5} or PM_{0.1} [48]. PM_{2.5} leads to an influx of immune cells to the alveolus and bronchoalveolar fluid as quickly as three hours after exposure [49, 51, 52]. During this phase of the lesion, vascular cell adhesion protein (VCAM-1), an inflammatory marker, increases leukocyte infiltration induced by PM_{2.5}, followed by pulmonary morphological changes, such as alveolar wall thickening, cystic lesions, and edema [12, 48, 53]. The infiltration of immune cells may be due to migration from blood [8] or recruitment from bone marrow [54, 55].

Leukocytes enhance their production of O₂⁻ after 24 and 48 h in response to *in vivo* exposure to pollution [51] which remains elevated after a sub-chronic exposure [56]. In parallel, neutrophils also seem to play an important role in the pollutant-induced increase in reactive oxygen species (ROS) production and lipoperoxidation in already susceptible populations [57]. Due to the increased ROS production, pulmonary epithelial cells (pneumocytes) also activate the E2-related factor-2 (NRF-2)/ antioxidant response element (ARE) pathway [58, 59] and enhance heme oxygenase (HO-1; also referred to as HSP32) expression [60]. NRF-2 and HSF-1 act together in triggering HO-1 expression [59, 61], which can aid in reversing the initial stimulus. However, the increase in NRF-2/ARE signaling is not enough to prevent the impairment of the antioxidant activity relative to ROS production. The reduction of paraoxanase [57], superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase activity may explain the increase in the lipoperoxidation observed

in lungs [56, 62]. Thus, it is reasonable to consider that over-expressing antioxidant enzymes may attenuate lung injury [63].

Mitochondria is the main source of ROS, and PM_{2.5}-induced oxidative stress can be a cause and a consequence of mitochondrial dysfunction. Residual Oil Fly Ash (ROFA) exposure increases mitochondrial production of O₂⁻ and is detrimental to ATP production [64]. This is consistent with a decrease in oxidative respiration and increase in anaerobic glycolysis (mitochondrial independent) in smokers' alveolar macrophages [65]. The progression of such oxidative stress can damage mitochondrial DNA, which is more vulnerable than nuclear DNA to the oxidative damage induced by PM_{2.5} and presents an insufficient capacity of repair.

Indeed, PM_{2.5}-associated ROS impairs mitochondrial dynamics and function in pulmonary cells. PM_{2.5} exposure compromised mitochondrial morphology in a primary culture of murine alveolar macrophages, which was marked by the presence of vacuoles and almost the absence of cristae [62]. PM_{2.5} also impaired the expression of specific mitochondrial fission/fusion markers (OPA-1, Mfn-1, Mfn-2, Fis-1, and Drp-1) in rat lung [66], including in alveolar macrophages [62, 67]. PM_{2.5} also inhibited Na⁺K⁺ ATPase and Ca²⁺ ATPase activities in rat lungs [66] and jeopardized the mitochondrial membrane potential in alveolar macrophages [5, 68]. Such changes in mitochondrial structure and dynamics directly mark its dysfunction.

Mitochondrial dysfunction can lead to its autophagic degradation (mitophagy), which clears damaged and toxic cellular constituents and favors cell survival [69]. Autophagy is upregulated during energy depletion by the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway [69]. AMPK is switched on during energetic privation [70], prevents cell growth, induces autophagy, and controls metabolism [71], whilst mTOR is activated by nutrient availability and plays the opposite roles [70]. Its ability to control autophagy makes AMPK a powerful therapeutic target in the treatment of cardiovascular diseases [72, 73]. Indeed, the temporary reduction in the energetic availability following PM_{2.5} exposure allows the pollutant to enhance AMPK phosphorylation and its activity [74]. This partially explains why AMPK deficiency causes more severe cardiac and pulmonary fibrosis, oxidative stress, and inflammation under polluted conditions [75, 76].

PM_{2.5} leads macrophages and vascular endothelial cells to autophagy via oxidative stress-mediated Pi3K/Akt activation, inhibition of mTOR [77, 78], and activation of the chaperone-dependent HSP70-LC-3 pathway [79, 80]. Interestingly, the effect of PM_{2.5} on autophagy may be related to the intensity (concentration and period) of exposure, and a decrease in the autophagic flux can be one of

the mechanisms by which PM_{2.5} exacerbates atherosclerosis [81]. PM_{2.5} blocks the fusion of autophagosomes with lysosomes, through an ERK1/2-related increase in ROS production, changing lysosomal pH and altering proteolytic activity [82]. Finally, the PM_{2.5}-induced autophagy may be insufficient to prevent cellular damage, as was reported in human bronchial epithelial cells [83] and alveolar macrophages [65] exposed to cigarette smoke extract (CSE). The CSE-mediated activation of autophagy is transient and insufficient, which accounts for an increase in the percentage of senescence in bronchial epithelial cells [83].

The ability to phagocytize external particles and engage in autophagy directly correlate with cell survival. A deficiency in autophagosome formation results in the accumulation of damaged/dysfunctional cellular components, exacerbates the inflammatory milieu [84], enhances NOX-derived ROS generation [85], inhibits cholesterol efflux from macrophage-derived foam cells [86], and induces cell senescence [65, 83]. Accordingly, the pharmacological or genetic inhibition of autophagy in primary bronchial epithelial cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) exposed to CSE increases senescence and SASP [83, 87]. Conversely, pharmacological stimulation of autophagy prevented such outcomes [83] and stabilized atherosclerotic plaques [87].

A certain level of autophagy may also be protective against apoptosis following carbon black nanoparticle exposure. While such exposure decrease autophagy, it enhances the apoptosis rate [68]. Therefore, autophagy is a potential target for interventions designed to decrease infection rates in individuals highly exposed to particulate pollutants [65]. Whilst insufficient autophagy may impair cell survival, excessive organelle damage can induce pathological levels of autophagy and, thereby, apoptosis [69]. Thus, autophagy is essential in the maintenance of homeostasis, with too much or too little imposing negative cardiovascular outcomes [88]. Furthermore, autophagic cell death can induce an immunogenic response and the release of inflammatory factors [89]. In this context, mTOR inhibition can alleviate the main outcomes, by reducing inflammation and foam cells formation in macrophages and promoting autophagy [81].

Following an excessive injury, apoptosis represents a cellular attempt to prevent inflammatory dissemination. Accordingly, *in vitro* studies have shown that PM_{2.5} induces apoptosis via mitochondrial pathways, increasing the Bax to Bcl-2 ratio, enhancing the release of cytochrome-c (Cyt-c), and promoting the cleavage of pro-caspases-9 and -3 in macrophage lineages [5]. Such effect is also evident in macrophages [16, 68] and pneumocytes exposed to lower levels of PM_{2.5} [90]. Finally, mitochondrial damage may be the key facilitator of oxidative stress propagation. Not surprisingly, a pilot clinical trial showed that B-vitamin supplementation

attenuates DNA methylation of genes involved in mitochondrial oxidative energy metabolism in CD4+ T-helper cells, the first highly increased by PM_{2.5} exposure [91].

Mitochondria are in close contact with the endoplasmic reticulum (ER). They are physically connected by structural domains known as mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAMs) [92]. These membranes participate in fundamental biological processes, allow crosstalk between the mitochondria and the ER, and present an important role in metabolism, mitochondrial dynamics, autophagy, ER stress, inflammation, and apoptosis [92]. Therefore, as PM_{2.5} causes mitochondrial dysfunction in alveolar macrophages, it also affects ER homeostasis.

PM_{2.5} induces ER stress and unfolded protein response (UPR) in pulmonary and immune cell

The ER plays crucial roles in protein biosynthesis, protein folding, and post-translational secretory and membrane protein alterations. During low-grade cellular stress, the chronic increase in protein synthesis results in the accumulation of unfolded and misfolded proteins in the ER, leading to ER stress [92, 93]. The oxidative stress related to exposure to PM_{2.5} is one trigger of ER stress [94, 95].

The interface between the ER and mitochondria allows the effective transfer of calcium (Ca²⁺) between both organelles. In the ER domain, the main protein responsible for Ca²⁺ release is Inositol-1,4,5- C triphosphate receptor type 1 (IP3R1) [92]. In the outer mitochondrial membrane, the voltage-dependent anion-selective channel protein-1 (VDAC-1) acts as a Ca²⁺ uptake channel [92]. These two channels are connected by 75-kDa glucose-regulated protein (GRP75), the mitochondrial form of HSP70, forming the VDAC-1/GRP75/IP3R1 channel complex [92].

PM_{2.5} exposure increased the levels of the ER chaperones GRP78, GRP94 and bound immunoglobulin protein (BiP) in the lungs of mice, suggesting the induction of ER stress in this tissue [95]. Pulmonary ER stress also occurs after shorter exposure to higher doses of PM_{2.5} and is considered to be one of the main mechanisms by which exposure to such pollutants exacerbate pulmonary alveolitis and fibrosis [96]. In vitro exposure of primary fetal type II pneumocytes to PM_{2.5} derived from cooking oil fumes (COF-PM_{2.5}) induced ER stress and enhanced ER stress-related apoptotic markers, such as caspase-12 [94].

The impact of PM_{2.5} on ER stress in pulmonary cells is relatively well established. However, the production of ROS and inflammatory cytokines, both related to ER stress, is higher in immune cells (e.g., alveolar macrophages and blood monocytes) due to their inherent nature. The intense production and release of cytokines demands the trafficking

of large amounts of protein-cargo through the ER of immune cells, thus making them more susceptible to disturbances in ER homeostasis [89]. Indeed, the ER stress in alveolar macrophages may be one of the triggers of pulmonary neutrophilic infiltration induced by diesel exhaust particulates (DEP), the main component of PM_{2.5} [93]. The exposure to DEP resulted in an increase in the immune content of ER stress markers in the lungs, such as BiP and CCAAT/enhancer binding protein-homologous protein (CHOP) [93]. Furthermore, the same authors also performed an in vitro study showing that the same pathways are involved in DEP-induced ER stress in alveolar macrophages and mediate the release of C-X-C Motif Chemokine Ligand-1 (CXCL-1/KC) release [93]. Since CXCL-1 is an important cytokine in neutrophil recruitment, the induction of its release is critical for understanding the immune infiltration in pulmonary tissues induced by PM_{2.5}.

ER stress is marked by an accumulation of unfolded/misfolded proteins and obvious ER oxidative damage [92]. Therefore, the unfolded protein response (UPR) represents a cellular attempt to restore proteostasis but can lead to apoptosis if chronically activated. UPR is characterized by four main reactions: protein degradation, inhibition of translation, production of chaperones, and cell death. These responses occur through activation of IRE, PERK, and activating transcription factor (ATF-6) transmembrane protein-mediated signaling pathways [92, 93]. These proteins recognize ER stress and activate the UPR process by, for example, increasing in the expression of BiP, a prominent ER-resident chaperone, and CHOP, an apoptotic transcriptional factor. As an important regulator of lipid metabolism, PERK overexpression enhances lipogenesis by increasing sterol regulatory element-binding protein (SREBP) Golgi processing [97]. Accordingly, UPR is found activated in atherosclerotic plaques, mainly in macrophage- and smooth muscle cell-derived foam cells [89].

In contrast to acute exposure, repeated exposure to low levels of PM_{2.5} (10 days) has been shown to cause sustained low-grade ROS accumulation, in addition to decreased levels of DNA damage, ER stress, and UPR [98]. PM_{2.5} elicited significant increases in UPR-related post-translational modifications, such as S6 ribosomal protein, HSP27, and protein kinase-related protein phosphorylation and cleavage of ATF-6 [99]. PM exposure also resulted in significant increases in the UPR-associated proteins ATF-4, HSP70, and HSP90 in human lung cells [99].

During ER stress, there is an increase in ROS production by NOX4, and a consequent damage to proteins involved in the active transport of Ca²⁺, which disrupts calcium homeostasis [97]. By the time ER becomes dysfunctional, Ca²⁺ is released into the cytoplasm and acts as a second messenger. It also moves into the mitochondrial matrix, which leads to mitochondrial calcium overload and organelle damage

[97]. The proximity of the ER and mitochondria allows this to exacerbate mitochondrial damage and the mitochondrial production of ROS [97].

The consequent cells' stress is sensed by a class of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors that form multiprotein complexes called inflammasomes. Under normal cellular conditions, the NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome is known to localize within the cytoplasm and ER [92]. Once stimulated, the NLRP3 inflammasome is recruited to MAM sites, suggesting a strategy to sense mitochondrial and ER damage [92]. Accordingly, mitochondrial or ER-derived high amounts of ROS can activate the NLRP3 inflammasome directly [97, 100, 101], or indirectly, by activating NF- κ B [102]. Under polluted conditions, toll-like receptors-4 (TLR-4)/ myeloid differentiation primary response-88 (MyD88) binding and NF- κ B activation are preludes to the NLRP3 inflammasome pathway [103, 104], which initiate the cleavage of interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-18 (IL-18) in their active isoforms [103, 105]. Thus, the NLRP3 inflammasome triggers an inflammatory loop, dependent on NF- κ B activation, which can culminate in a type of inflammatory cell death called pyroptosis via cleavage of procaspase-1 [92, 95, 102].

The NLRP3 inflammasome was found to be activated in cardiovascular diseases, especially in smokers [106]. Once induced by PM_{2.5}, it plays an important role in atherosclerosis development, acting as an important link between lipid metabolism and inflammation [106, 107]. Consistent with this finding, NLRP3 inflammasomes were found in the cytoplasm of foam cells and macrophages [107]. On the other hand, the genetic inhibition of NLRP3 signaling inhibits pro-inflammatory cytokines in animal models of atherosclerosis [106].

There is an increasing amount of evidence showing that inflammation may be cause and consequence of ER stress and NLRP3 inflammasome activation. Accordingly, anti-inflammatory approaches are having success in rescuing ER homeostasis [102]. Molecular or chemical agents/chaperones can rescue ER stress and prevent the main outcomes [89, 108]. Furthermore, there was a 30% reduction in the size of atherosclerotic plaques in animal models lacking IL-1 β [109, 110], which highlights the atherogenic role of the inflammasome-derived cytokines.

Once a certain inflammatory threshold is reached, cells present an abrogation in the ability to deal with the harmful stimulus. When chronically exposed, the surviving cells present abnormal adaptive responses, such as inhibition of mitochondria biogenesis and epigenetic deregulation, in addition to cellular senescence, as indicated by the S-phase arrest [98, 111]. In this sense, MAPK and NF- κ B-dependent inflammation play an important role

in disseminating inflammation and in abrogating its resolution.

PM_{2.5} induces NF κ B-dependent and -independent pathways: the role of macrophages in disseminating local and systemic inflammation

Both mitochondrial dysfunction and inflammatory responses can impair cell survival. PM_{2.5} increases the IL-1 β released by alveolar macrophages, which is associated with pro-inflammatory TLR-4/NF κ B pathway activation [104]. The TLRs/NF- κ B axis acts as the key signaling pathway in macrophages during PM_{2.5} exposure [67]. In addition, the activation of NF- κ B is crucial for ER stress-induced chronic inflammatory diseases [112], which amplifies such stress response mechanisms.

Indeed, lungs from animals exposed to PM₁ have increased expression of the NF- κ B p50 subunit and casp-8 [113]. Supporting our argument, TLR-4 is over-expressed by alveolar macrophages from animals intranasally exposed to ROFA [8], is involved in the monocyte egress from bone marrow to blood, and exacerbates the oxidative milieu through NOX expression [56].

Following PM_{2.5} exposure, there is an overproduction of O₂⁻ by TLR-4-dependent NOX [56, 64, 114, 115]. These data highlight an important mechanism by which inflammation dependent on TLR-4 binding can exacerbate the already existent oxidative stress. Accordingly, the neutralization of p47phox (a NOX subunit) and its ROS production is effective in reducing inflammation (*i.e.*, TNF- α levels) [114] and in preventing vascular endothelial dysfunction [56]. Furthermore, the TLR-4/NF- κ B pathway also causes inducible nitric oxide synthase (iNOS) to be highly active in endothelial and immune cells. iNOS is not a constitutive isoform but is induced under inflammatory conditions and triggers a high increase in NO and ONOO⁻ generation [116]. Indeed, PM_{2.5} enhances iNOS-derived ONOO⁻ production by macrophages and leads to pulmonary lipoperoxidation [49, 115].

Numerous findings support the importance of TLR-4/NF- κ B activation in oxidative stress and inflammation. First, animals lacking TLR-4 present an attenuation in the PM_{2.5}-induced increase in TNF- α and MCP-1 in plasma and lung tissue [56]. Second, absence of TLR-4 reduces IL-6 production by alveolar macrophages [117]. Third, iNOS inhibition reduces lung mechanical alterations and remodeling induced by PM_{2.5} [49]. Finally, neural IKK2 deficiency prevents the PM_{2.5}-induced tissue-specific increase of TNF- α , IL-6, and IL-1 β expression [118].

While NF- κ B activation can be correlated with the expression and release of inflammatory cytokines, some

studies have elucidated the importance of the integration of multiple signaling processes under polluted conditions [119]. PM_{2.5} activates alternative inflammatory pathways, such as MAPK [103]. MAPK include three major families: ERK, JNK and p38 MAP kinases. MAPK activation can act upstream of NF-κB translocation to the nucleus or lead to the activation of activator protein (AP-1). Under polluted conditions, it was demonstrated that metallic nickel nanoparticles enhance both AP-1 and NF-κB activation [120]. Moreover, MAPK (ERK, JNK, or p38 MAPK pathways) are essential to NF-κB-dependent inflammation triggered by PM_{2.5} in bronchial epithelial cells [121]. In agreement with these findings, AP-1 and NF-κB inhibition are the main mechanisms by which green tea catechin [122] and *Bletilla striata* (a traditional Chinese medicine) protect against the negative effects of PM_{2.5} [123]. Taken together, this evidence strongly suggests that PM_{2.5}-induced inflammation requires the cooperation of NF-κB and AP-1 activation, which can be triggered by MAPK signaling.

Once NF-κB and AP-1 are activated and inflammation proceeds, macrophages present an inflammatory phenotype, marked by higher IL-6, TNF-α, iNOS and IL-12 expression, as evidenced in vivo in APoE^{-/-} mice subchronically exposed to PM_{2.5} [124]. TNF-α and NO act in decreasing the mitochondrial membrane potential and damaging this organelle [125]. Thus, it is reasonable to consider that NF-κB-related inflammation can exacerbate mitochondrial dysfunction, increase ROS production, and act in a positive feedback loop in propagating inflammation.

PM_{2.5} induces an inflammatory phenotype in macrophages through a sequence of dysfunctions. In human alveolar macrophages and bronchial epithelial cells exposed to PM_{2.5} for 18 h [117], and in a monocyte cell line exposed for 6–48 h [105], there is an increase in Cox-2 and IL-6 mRNA [105, 117]. PM_{2.5} triggers an NF-κB-dependent inflammatory phenotype, marked by intense IL-6 and TNF-α release [5]. Such release is also perceptible in alveolar macrophages exposed to PM_{2.5} for shorter periods [126] and in animal models as early as one hour following ROFA exposure [9].

In such conditions, macrophage-derived IL-6 and TNF-α may be responsible for transforming local inflammation into systemic inflammation [7–9], through an increased release of macrophage-derived extracellular vesicles induced by PM_{2.5} [6]. Macrophages present a dose-dependent increase in IL-6, IL-8, IL-1β, and TNF-α mRNA expression in response to pollutant [6]. PM_{2.5} induces IL-6 translocation from the lung into systemic circulation [7], which enhances the alveolar epithelial [10] and vascular endothelial permeability [11], and thereby facilitates the translocation of inflammatory and oxidative factors from lung to vessels [12]. Macrophage-derived extracellular vesicles stimulate pneumocytes to overproduce IL-6 and TNF-α [6]. IL-6 and TNF-α have

been shown to decrease endothelium-dependent vasodilation [127] and aggravate experimental myocardial infarctions induced by PM_{2.5} [8]. It is noteworthy that the vascular endothelium suffers indirect (systemic ROS, metals, and cytokines) and direct effects of PM_{2.5}. Exposure to PM_{2.5} causes vascular insulin resistance by inducing pulmonary oxidative stress [128]. This relationship is evident since leucocyte infiltration into the lungs is positively associated with atherosclerotic plaques [129].

The physiological resolution (or not) of inflammation: the role of the heat shock response (HSR)

Heat shock factor (HSF-1) has an anti-inflammatory role. Oxidative and inflammatory stimuli can lead HSF-1 to translocate from the cytoplasm to the nucleus and bind to heat shock elements (HSE) in the promoter regions of heat shock genes [27, 29, 33, 130]. The promoter region of the *TNF-α* gene contains an HSF-1 binding site that represses TNF-α transcription [131]. Furthermore, HSF-1 suppresses the gene transcription of *IL-1* and *IL-6* following an exposure to lipopolysaccharides [23, 132].

An acute inflammatory stimulus activates NF-κB and cyclooxygenase (COX-2), driving prostaglandin E2 (PGE2) synthesis and causing fevers [29]. As the inflammatory response continues (24–48 h), PGE2 and other prostanoids are converted into cyclopentenone prostaglandins, such as prostaglandin A2 (PGA2). PGA2 increase and fever are powerful inducers of HSR [29]. The PGA1-dependent HSF-1 activation is responsible for inhibiting the degradation of the NF-κB inhibitor IκB-α [133].

SIRT-1 acts as an energetic sensor by modulating AMPK activity [34, 134], whereas AMPK regulates NAD⁺ metabolism and SIRT-1 activity [34, 135]. SIRT-1 prolongs HSF-1 binding to the promoters of heat shock genes by maintaining HSF-1 in a deacetylated, DNA-binding-competent state [29, 136]. SIRT-1 also actively downregulates NF-κB and represses PPARγ [137], negatively regulating inflammation and promoting oxidative metabolism [34]. Finally, the acute phase of inflammation may induce NFκB, whilst the SIRT-1/HSP70 pathway may mark the phase of resolution.

In the intracellular medium, HSP70 (iHSP70) associates with the NF-κB-IκB complex, inhibits IκB kinase (IKK) activity, and prevents its translocation to the nucleus [23, 138, 139]. Thus, a weak stimulus can induce its own resolution by inducing HSP70 expression and NF-κB inhibition. On the other hand, during chronic inflammation, TNF-α, a cytokine present in high levels, and phosphorylated JNK suppress HSF-1 [140] by phosphorylating its regulatory domain and inhibiting its ability to transcribe [141].

Therefore, a chronic stimulus can reduce the cell's ability to deal with it, by inhibiting the HSP70 expression.

The over-activation of the NF- κ B pathway leads to SASP, which reduces the expression of the mRNA-binding protein Human antigen R (HuR). Simultaneously, NLRP3 inflammasome activation can also contribute to caspase-mediated cleavage of HuR binding protein. HuR is essential to the stability of SIRT-1 mRNA and protein, as well as for HSP70 signaling [29, 142]. Once degraded, HuR is unable to promote SIRT-1-HSP70 signaling [29, 142]. Hence, the lack of proper HSR trigger SASP and perpetuate the low-grade and chronic inflammation, a mark of chronic diseases [27, 29].

The abrogation of resolution of PM_{2.5}-related inflammation: the hidden role of HSP70

In metabolic and cardiovascular conditions, there is a time-dependent decrease in HSP70 expression that blocks the resolution of the inflammatory stimulus [27, 29]. We propose that, during PM_{2.5} exposure, there is a similar failure in the HSR, which may be involved in the abrogation of resolution of PM_{2.5}-related inflammation.

The expression of HSP70 following an exposure to pollutants depends on its duration and concentration, which can regulate the entire course of inflammation. We propose that acute exposure to PM_{2.5} enhances ROS production and immediately activates NF- κ B. The intense production of inflammatory mediators triggers ER stress and UPR, recruits chaperone machinery, including HSP70, and may eventually evolve to cell death (necrosis or apoptosis). Indeed, there are several reports of increased HSP70 levels after an acute exposure, both in vivo [50, 143, 144] and in vitro [41, 60, 79, 80, 99, 145, 146] (see Table 1 for details). In such cases, HSP70 was related to ER stress and to other well-known markers, such as HO-1, HSP90 and ATF-1 [99]. If the exposure ends, the chaperones may be enough to inhibit NF κ B, preventing the creation of the NLRP3 inflammasome, and halting inflammatory propagation. These findings reinforce the idea that PM_{2.5} exposure may have a dose- (or time-) dependent effect on NF- κ B activation, resulting in suppression at lower doses (acute exposure) and activation at higher doses (chronic exposure) [147].

Similar to the immune response to acute episodes, a chronic exposure also activates NF- κ B and causes ER stress and UPR. However, sub-chronic and chronic exposures differ from acute by reducing SIRT-1 [148–150] and HSP70 levels [151–154]. SIRT-1 downregulation may be central to PM_{2.5}-induced damage [155], as it is in the development of atherosclerosis [30]. Since SIRT-1 is an upstream element that modulates HSF-1 binding to the HSP70 promoter and

regulates the HSF-1/HSP70 pathway [29], its downregulation may suggest an important role of pollutants in depleting HSR. In agreement with such hypothesis, the exposure to CSE enhances the HSP70 expression in pneumocytes with a peak after 6 h of exposure, but decreases until 48 h [41] (Fig. 1).

Unfortunately, there is not a standardized threshold of duration and concentration among all pollutants that marks the limit at which HSR will be compromised [22]. It is relative to each pollutant and tissue. For example, the acute exposure of ApoE^{-/-} mice to PM_{2.5} was not enough to induce the increase of alveolar HSP70, whilst the sub-chronic (seven-week) exposure did [7]. We hypothesize that genetic and metabolic backgrounds can delay the response to stress (see Table 1 for details).

Hence, any factor that disrupts SIRT-1/HSF-1/HSP70 expression may easily trigger a loop of oxidative stress, inflammation, tissue damage, and metabolic impairment [26, 34]. A weak HSR limits autophagy as an alternative to correcting the cellular damage [156]. Considering that the inhibition of autophagy could accelerate senescence [157], inadequate HSR could force cells to adopt an alternative to apoptosis: redox-sensitive senescence. Consistently, senescent cells present higher levels of HSP90, which is induced in the opposite manner than HSP70 [158], and higher LDL receptor (LDLr) levels [159]. Since HSP70 is a powerful anti-inflammatory protein, and inflammation induces lipid intracellular accumulation through LDLr by breaking the cholesterol negative feedback [160–163], a deficit in HSP70 expression can enhance foam cell formation [30, 158, 164]. Indeed, PM_{2.5} enhances macrophage foam cell formation due to the increase in lipid accumulation, mitochondrial damage [16], and immune-inflammatory impairment [15], which can chronically trigger SASP and perpetuate monocyte recruitment [165].

The environmental stress-induced premature senescence can be a consequent of mitochondrial dysfunction [157, 166], before any critical telomere shortening [157], and precedes replicative senescence [167–169]. In fact, both peripheral-blood monocytes and macrophages suffer oxidative senescence, due to chronic exposure to PM_{2.5} [170]. Senescent cells can propagate the inflammatory condition and affect how other cells respond to stress. This has been shown to occur among individuals persistently exposed to organic pollutants [171]. Furthermore, PM_{2.5} leads pneumocytes [94, 170, 172], peripheral-blood monocytes, macrophages [170], vascular endothelial cells [46, 173], and smooth muscle vascular cells to senescence [173].

Senescent pneumocytes can develop SASP and affect the function of surrounding pulmonary cells [174]. We propose that immune senescence may precede that of pneumocytes, since macrophage secretory products are primarily responsible for lung and cardiac injury under PM_{2.5} exposure [6,

Table 1 In vitro and in vivo studies evaluating the impact of the exposure to PM_{2.5} in the HSP70 levels

Model	Protein of interest In vivo studies	Result	Reference
Acute exposures			
Wistar rats Acute exposure (3 days) to 750 µg/100 µL of ROFA	Plasma eHSP70	↑	[139]
Male BALB/c Acute exposure (every three days, three times) to 100 µg of PM _{2.5}	Pulmonar iHSP70 Cardiac iHSP70	↑ ↑	[46]
Male BALB/c Acute exposure (once) to 100 µg of TP _{2.5}	Alveolar iHSP70	↑	[140]
Male ApoE ^{-/-} mice Acute exposure (three days) to 200 or 400 µg/m ³ of PM _{2.5} , 6 h/day	Alveolar iHSP70	=	[7]
Chronic exposures			
Male ApoE ^{-/-} mice Sub-chronic exposure (seven weeks) to 200 or 400 µg/m ³ of PM _{2.5} , 6 h/day	Alveolar iHSP70 eHSP72	↑	[7]
Male B6.129SF2/J mice 24 weeks of HFD consumption for obesity development, followed by the sub-chronic exposure to 5 µg of PM _{2.5} in the last 12 weeks (7 x/week)	Pancreas iHSP70	↓	[147]
Male B6.129SF2/J mice Sub-chronic exposure (12 weeks) to HFD consumption and 5 µg of PM _{2.5} (7 x/week)	Plasma eHSP70	↓	[148]
Male B6.129SF2/J mice Sub-chronic exposure (12 weeks) to 5 µg of PM _{2.5} (7 x/week) and intense aerobic training (5x/week)	Plasma eHSP70	↓	[149]
Wistar rats Sub-chronic exposure (30 days) to 10 mg/ m ³ of coal dust (3 h/day)	Plasma eHSP70	↓	[150]
In vitro studies			
Acute exposures			
Culture of RAW 264.7—monocytes Nanoparticles and coal dust particles 1 mg/mL for 24 h	iHSP70	↑	[141]
Co-culture of A549—human alveolar basal epithelial cells and THP-1—human monocytic cells Nanoparticles for 24 h	HSP70	↑	[76]
Culture of BEAS-2B—bronchial epithelial cells Black carbon 50 µg/mL for 20 h	HO-1	↑	[56]
Culture of BEAS-2B—bronchial epithelial cells PM _{2.5} for 24 h	iHSP27 iHSP70 iHSP90	↑	[96]
Primary culture of NHBE—normal human airway epithelial cells PM _{2.5} for 24 h	iHSP70	↑	[142]
Culture of A549—human alveolar basal epithelial cells Cigarette smoke for 2 h	HSP70	↑	[75]
Culture of A549—human alveolar basal epithelial cells Cigarette smoke for 6 to 48 h	HSP70 HO-1 HSP27	↑	[37]

Other possible interventions in the in vivo and in vitro studies are also described in the table

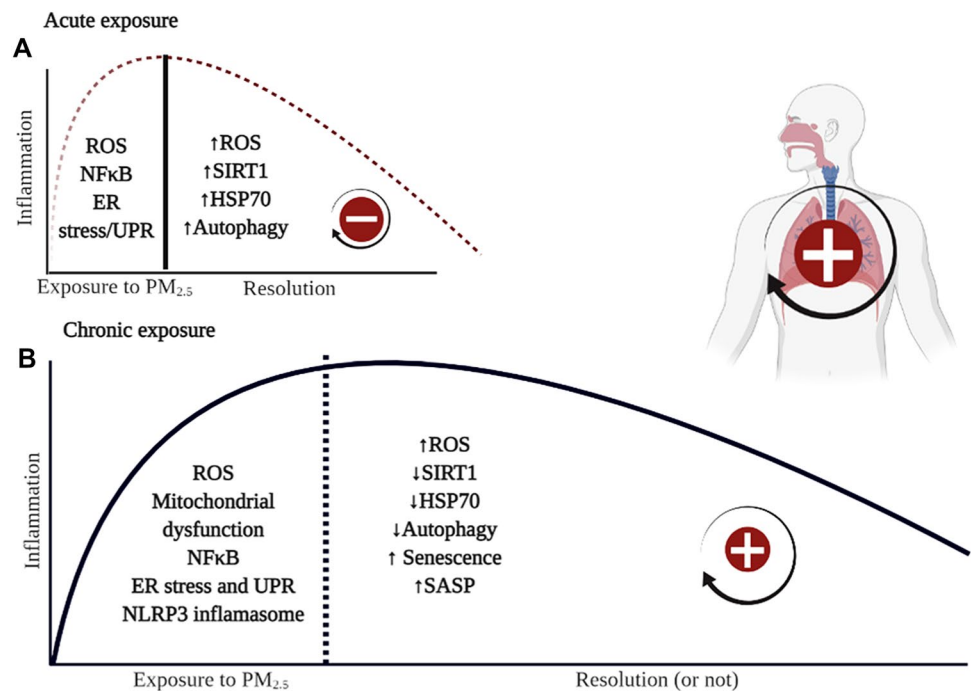
eHSP70 extracellular 70-kDa heat shock protein, *HFD* high fat diet, *HO-1* heme-oxygenase-1 (also known as HSP32), *iHSP70* intracellular 70-kDa heat shock protein, *PM_{2.5}* fine particulate matter, *ROFA* residual oil fly ash, *TP_{2.5}* size-fractionated tire particles

8]. Indeed, the long-term, persistent exposure to organic pollutants leads to telomere dysfunction in blood leukocytes and SASP, as marked by higher levels of IL-6 and TNF-α [171]. Thereby, cellular senescence is closely related to cardiovascular diseases [155, 173] and may be an important link between air pollution, systemic inflammation, and cardiovascular diseases. Moreover, vascular endothelial cell

senescence may also affect eNOS-derived NO production, which are partially regulated by HSP70 expression, with an increased generation of ROS and a reduction in telomerase activity [175].

Therefore, the stimulation of the SIRT-1/HSF-1/HSP70 pathway by heat therapy in a susceptible animal model (LDLr^{-/-} mice) significantly improved atherosclerotic

Fig. 1 The insulting and recovering (or not) period after an acute **A** or chronic **B** exposure to PM_{2.5}. NF-κB and SIRT-1/HSF-1/HSP70 control different phases of this process. While an exaggerated generation of ROS, mitochondrial dysfunction, ER stress, UPR, and NF-κB activation seem to act in inflammatory propagation, the adequate SIRT-1/HSF-1 activation and chaperone expression may direct cells to autophagy and solve the initial inflammatory stimulus. Otherwise, a failure in inducing proper SIRT-1/HSF-1/HSP70 signaling after a chronic exposure reduces autophagy rates and triggers cellular senescence and the senescence-associated secretory phenotype (SASP). This exacerbates the initial inflammatory stimulus. Created with BioRender.com



plaques and survival rates [30]. In addition, an increase in HSP70 levels induced by a cyclopentenone prostaglandin-based liposome targeting endothelium and foam cells completely reversed atherosclerotic lesions [164]. Although still not tested in PM_{2.5}-related atherosclerosis, such therapeutic alternatives seem promising. Consistently, the use of senolytic compounds (i.e., quercetin) was reported to be effective against PM_{2.5}-related oxidative damage and mitochondrial dysfunction through its antioxidant activity and by enhancing SIRT-1 expression [176]. Taken together, these findings allow us to hypothesize that HSP70-stimulating therapies could be useful against PM_{2.5}-induced metabolic and cardiovascular diseases.

Thus, we propose that, being the first defense against pollutant particles, alveolar macrophages may suffer senescence due to a weakened ability to express HSP70, propagate an inflammatory phenotype to neighboring cells via paracrine signaling, and exacerbate cardiovascular injuries (Fig. 2). Indeed, pulmonary inflammation, macrophage infiltration, and vascular endothelium permeability could be attenuated by HSF-1 by directly suppressing the transcription of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/C-C-chemokine

receptor type 2 (CCR2), which in turn reduce macrophage infiltration [177].

Final considerations

Exposure to PM_{2.5} leads to the readjustment of the cellular machinery of pulmonary cells (primarily, alveolar macrophages). As the main source of ROS, mitochondria are the first target of PM_{2.5}, becoming dysfunctional and exacerbating oxidative stress. The inter-organelle crosstalk allows dysfunctional mitochondria to aggravate oxidative stress and inflammation, which triggers the ER to interrupt protein synthesis and activate UPR. Therefore, the induction of HSP70 expression and other chaperones is a vital cellular mechanism to neutralize the initial harmful stimulus.

We hypothesize that the ability to deal with inflammation depends on the HSR, relative to the context of pollutant exposure (duration and intensity). During chronic exposures, cells cannot properly express SIRT-1 or activate HSF-1, which delays and blocks the resolution phase of inflammation. Since alveolar macrophages are the first to contact and phagocytize inhaled particles, as well as the main vehicle for propagating PM_{2.5}-induced pulmonary and cardiac injury, it seems clear that weak HSR due to chronic pollutant exposure is involved in redox-sensitive macrophage senescence and SASP, which propagates pulmonary and systemic inflammation and leads to endothelial dysfunction.

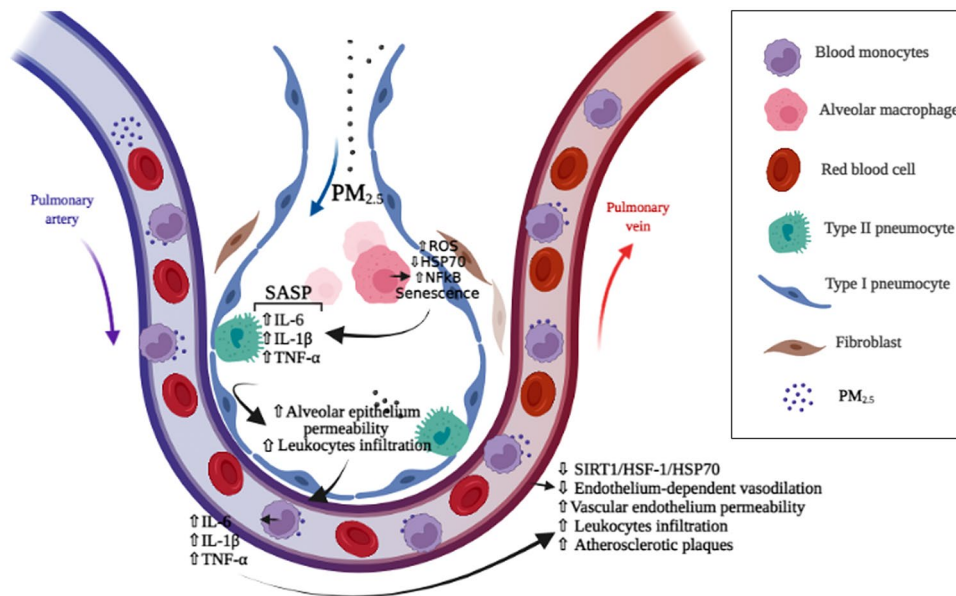


Fig. 2 The macrophages senescence hypothesis. As soon as $PM_{2.5}$ reach the alveoli, alveolar macrophages phagocytose the particles and develop a pro-oxidant and pro-inflammatory phenotype, marked by NF- κ B activation. After an acute exposure to low-moderate levels of pollution, the inflammatory stimulus can resolve itself by stimulating HSP70 expression. However, following a chronic exposure, the ability to deal with the stressful situation becomes impaired, and macrophages no longer properly express HSP70, which abrogates the phase of resolution. A weak heat shock response, measured by HSP70 levels, can cause cellular senescence and the senescence-

associated secretory phenotype (SASP), characterized by higher IL-6, IL-1 β , and TNF- α levels. Such inflammatory cytokines affect pulmonary epithelial cells, enhance permeability and turn it more prone to leukocytes infiltration. Moreover, IL-6, IL-1 β and TNF- α augment vascular endothelial permeability, and reduce endothelium-dependent vasodilation. Endothelial dysfunction enhances the susceptibility to immune infiltration and the formation of atherosclerotic plaques. Paracrine signaling can impair endothelial heat shock response, an important trigger for atherogenesis. Created with BioRender.com

Author contributions LCCB: conceptualized the project, performed the literature search, and wrote the manuscript. FTCRG: critically revised the work.

Funding This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they do not have any conflicts of interest.

Consent to participate The authors declared consent to participate.

Consent for publication The authors declare consent for publication.

References

1. WHO, W.H.O.-. Ambient air pollution. 2021 [cited 2021 Sept 09]; Available from: <https://www.who.int/teams/environment-climate-change-and-health/air-quality-and-health/ambient-air-pollution>.
2. Mehta S, et al. Ambient particulate air pollution and acute lower respiratory infections: a systematic review and implications for estimating the global burden of disease. *Air Qual Atmos Health*. 2013;6(1):69–83.
3. Furuyama A, et al. Extrapulmonary translocation of intratracheally instilled fine and ultrafine particles via direct and alveolar macrophage-associated routes. *Arch Toxicol*. 2009;83(5):429–37.
4. Hartiala J, et al. Ambient air pollution is associated with the severity of coronary atherosclerosis and incident myocardial infarction in patients undergoing elective cardiac evaluation. *J Am Heart Assoc*. 2016. <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.003947>.
5. Xiong Q, et al. Mitochondrial dysfunction and inflammatory response in the cytotoxicity of NR8383 macrophages induced by fine particulate matter. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017;55:1–7.
6. Martin PJ, et al. Cellular response and extracellular vesicles characterization of human macrophages exposed to fine atmospheric particulate matter. *Environ Pollut*. 2019;254(Pt A): 112933.
7. Kido T, et al. Particulate matter induces translocation of IL-6 from the lung to the systemic circulation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(2):197–204.
8. Marchini T, et al. Acute exposure to air pollution particulate matter aggravates experimental myocardial infarction in mice by potentiating cytokine secretion from lung macrophages. *Basic Res Cardiol*. 2016;111(4):44.
9. Marchini T, et al. Time course of systemic oxidative stress and inflammatory response induced by an acute exposure to residual oil fly ash. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;274(2):274–82.
10. Karki P, et al. Microtubule destabilization caused by particulate matter contributes to lung endothelial barrier dysfunction and inflammation. *Cell Signal*. 2019;53:246–55.

11. Dai J, et al. Exposure to concentrated ambient fine particulate matter disrupts vascular endothelial cell barrier function via the IL-6/HIF-1 α signaling pathway. *FEBS Open Bio*. 2016;6(7):720–8.
12. Cui A, et al. VCAM-1-mediated neutrophil infiltration exacerbates ambient fine particle-induced lung injury. *Toxicol Lett*. 2019;302:60–74.
13. Chen T, et al. Beijing ambient particle exposure accelerates atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Toxicol Lett*. 2013;223(2):146–53.
14. Negre-Salvayre A, et al. Dual signaling evoked by oxidized LDLs in vascular cells. *Free Radic Biol Med*. 2017;106:118–33.
15. Wan Q, et al. Acceleratory effects of ambient fine particulate matter on the development and progression of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by down-regulating CD4(+)/CD25(+)/Foxp3(+) regulatory T cells. *Toxicol Lett*. 2019;316:27–34.
16. Liu J, et al. PM_{2.5} aggravates the lipid accumulation, mitochondrial damage and apoptosis in macrophage foam cells. *Environ Pollut*. 2019;249:482–90.
17. Rui W, et al. PM_{2.5}-induced oxidative stress increases adhesion molecules expression in human endothelial cells through the ERK/AKT/NF- κ B-dependent pathway. *J Appl Toxicol*. 2016;36(1):48–59.
18. Morimoto RI, Santoro MG. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat Biotechnol*. 1998;16(9):833–8.
19. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*. 1962;18:571–3.
20. Ritossa F. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones*. 1996;1(2):97–8.
21. Brocchieri L, Conway de Macario E, Macario AJ. hsp70 genes in the human genome: conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evol Biol*. 2008;8:19.
22. Costa-Beber LC, et al. HSP70 as a biomarker of the thin threshold between benefit and injury due to physical exercise when exposed to air pollution. *Cell Stress Chaperones*. 2021;26(6):889–915.
23. Costa-Beber LC, et al. Chaperone duality: the role of extracellular and intracellular HSP70 as a biomarker of endothelial dysfunction in the development of atherosclerosis. *Arch Physiol Biochem*. 2020;128:1–8.
24. Mulyani WRW, et al. Chaperone-based therapeutic target innovation: heat shock protein 70 (HSP70) for Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020;13:559–68.
25. Krause M, et al. The regulatory roles of NADPH oxidase, intra- and extra-cellular HSP70 in pancreatic islet function, dysfunction and diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 2015;128(11):789–803.
26. Di Naso FC, et al. Obesity depresses the anti-inflammatory HSP70 pathway, contributing to NAFLD progression. *Obesity (Silver Spring)*. 2015;23(1):120–9.
27. Miragem AA, de Jr HomemBittencourt PI. Nitric oxide-heat shock protein axis in menopausal hot flashes: neglected metabolic issues of chronic inflammatory diseases associated with deranged heat shock response. *Hum Reprod Update*. 2017;23(5):600–28.
28. Bittencourt A, et al. Heat shock response to exercise in pancreatic islets of obese mice. *Biochimie*. 2020;168:28–40.
29. Newsholme P, de Bittencourt PI. The fat cell senescence hypothesis: a mechanism responsible for abrogating the resolution of inflammation in chronic disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2014;17(4):295–305.
30. Bruxel MA, et al. Chronic whole-body heat treatment relieves atherosclerotic lesions, cardiovascular and metabolic abnormalities, and enhances survival time restoring the anti-inflammatory and anti-senescent heat shock response in mice. *Biochimie*. 2019;156:33–46.
31. Lissarassa YPS, et al. Chronic heat treatment positively impacts metabolic profile of ovariectomized rats: association with heat shock response pathways. *Cell Stress Chaperones*. 2020;25:467–79.
32. Krause M, et al. The chaperone balance hypothesis: the importance of the extracellular to intracellular HSP70 ratio to inflammation-driven type 2 diabetes, the effect of exercise, and the implications for clinical management. *Mediators Inflamm*. 2015;2015: 249205.
33. Heck TG, et al. Acute exercise boosts cell proliferation and the heat shock response in lymphocytes: correlation with cytokine production and extracellular-to-intracellular HSP70 ratio. *Cell Stress Chaperones*. 2017;22(2):271–91.
34. Kauppinen A, et al. Antagonistic crosstalk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cell Signal*. 2013;25(10):1939–48.
35. Calabrese EJ, et al. What is hormesis and its relevance to healthy aging and longevity? *Biogerontology*. 2015;16(6):693–707.
36. Calabrese EJ. Pre- and post-conditioning hormesis in elderly mice, rats, and humans: its loss and restoration. *Biogerontology*. 2016;17(4):681–702.
37. Costa-Beber LC, et al. Ovariectomy enhances female rats' susceptibility to metabolic, oxidative, and heat shock response effects induced by a high-fat diet and fine particulate matter. *Exp Gerontol*. 2021;145: 111215.
38. Costa Beber LC, et al. The association of subchronic exposure to low concentration of PM_{2.5} and high-fat diet potentiates glucose intolerance development, by impairing adipose tissue anti-oxidant defense and eHSP72 levels. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2020;27(25):32006–16.
39. Brunt VE, et al. Passive heat therapy protects against endothelial cell hypoxia-reoxygenation via effects of elevations in temperature and circulating factors. *J Physiol*. 2018;596(20):4831–45.
40. Chung J, et al. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(5):1739–44.
41. Somborac-Bacura A, et al. Differential expression of heat shock proteins and activation of mitogen-activated protein kinases in A549 alveolar epithelial cells exposed to cigarette smoke extract. *Exp Physiol*. 2018;103(12):1666–78.
42. Song P, Zhao Q, Zou MH. Targeting senescent cells to attenuate cardiovascular disease progression. *Ageing Res Rev*. 2020;60: 101072.
43. Wiggins KA, Clarke MC. Senescence utilises inflammatory caspases to drive the SASP. *Ageing (Albany NY)*. 2019;11(12):3891–2.
44. Vrachnis N, et al. Probing the impact of sex steroids and menopause-related sex steroid deprivation on modulation of immune senescence. *Maturitas*. 2014;78(3):174–8.
45. Baeza I, et al. Ovariectomy causes immunosenescence and oxi-inflamm-aging in peritoneal leukocytes of aged female mice similar to that in aged males. *Biogerontology*. 2011;12(3):227–38.
46. Sharma K, et al. Fine air pollution particles induce endothelial senescence via redox-sensitive activation of local angiotensin system. *Environ Pollut*. 2019;252(Pt A):317–29.
47. Rangel-Zuniga OA, et al. Differential menopause- versus aging-induced changes in oxidative stress and circadian rhythm gene markers. *Mech Ageing Dev*. 2017;164:41–8.
48. Saleh Y, et al. Exposure to atmospheric ultrafine particles induces severe lung inflammatory response and tissue remodeling in mice. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(7):1210.

49. Prado CM, et al. iNOS inhibition reduces lung mechanical alterations and remodeling induced by particulate matter in mice. *Pulm Med.* 2019;2019:4781528.
50. Sancini G, et al. Health risk assessment for air pollutants: alterations in lung and cardiac gene expression in mice exposed to Milano winter fine particulate matter (PM_{2.5}). *PLoS One.* 2014;9(10):e109685.
51. Orona NS, et al. Acute exposure to buenos aires air particles (UAP-BA) induces local and systemic inflammatory response in middle-aged mice: a time course study. *Environ Pollut.* 2016;208(Pt A):261–70.
52. Jeong S, et al. PM_{2.5} exposure in the respiratory system induces distinct inflammatory signaling in the lung and the liver of mice. *J Immunol Res.* 2019;2019:3486841.
53. Liang S, et al. Repeat dose exposure of PM_{2.5} triggers the disseminated intravascular coagulation (DIC) in SD rats. *Sci Total Environ.* 2019;663:245–53.
54. Goto Y, et al. Exposure to ambient particles accelerates monocyte release from bone marrow in atherosclerotic rabbits. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;287(1):L79–85.
55. Goto Y, et al. Particulate matter air pollution stimulates monocyte release from the bone marrow. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170(8):891–7.
56. Kampfrath T, et al. Chronic fine particulate matter exposure induces systemic vascular dysfunction via NADPH oxidase and TLR4 pathways. *Circ Res.* 2011;108(6):716–26.
57. Sierra-Vargas MP, et al. Airborne particulate matter PM_{2.5} from Mexico City affects the generation of reactive oxygen species by blood neutrophils from asthmatics: an in vitro approach. *J Occup Med Toxicol.* 2009;4:17.
58. Klein SG, et al. Endothelial responses of the alveolar barrier in vitro in a dose-controlled exposure to diesel exhaust particulate matter. *Part Fibre Toxicol.* 2017;14(1):7.
59. Shang Y, et al. Airborne nitro-PAHs induce Nrf2/ARE defense system against oxidative stress and promote inflammatory process by activating PI3K/Akt pathway in A549 cells. *Toxicol In Vitro.* 2017;44:66–73.
60. Diabate S, et al. Anti-oxidative and inflammatory responses induced by fly ash particles and carbon black in lung epithelial cells. *Anal Bioanal Chem.* 2011;401(10):3197–212.
61. Inoue N, Sawamura T. Lectin-like oxidized LDL receptor-1 as extracellular chaperone receptor: its versatile functions and human diseases. *Methods.* 2007;43(3):218–22.
62. Wei H, et al. Alveolar macrophage reaction to PM_{2.5} of hazy day in vitro: evaluation methods and mitochondrial screening to determine mechanisms of biological effect. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019;174:566–73.
63. Ghio AJ, et al. Overexpression of extracellular superoxide dismutase decreases lung injury after exposure to oil fly ash. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;283(1):L211–8.
64. Magnani ND, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase and mitochondrial dysfunction in lung after an acute exposure to residual oil fly ashes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;270(1):31–8.
65. Monick MM, et al. Identification of an autophagy defect in smokers' alveolar macrophages. *J Immunol.* 2010;185(9):5425–35.
66. Li R, et al. Effect of ambient PM(2.5) on lung mitochondrial damage and fusion/fission gene expression in rats. *Chem Res Toxicol.* 2015;28(3):408–18.
67. Shi Y, et al. Identification and validation of metformin protects against PM_{2.5}-induced macrophages cytotoxicity by targeting toll like receptor pathway. *Chemosphere.* 2020;251:126526.
68. Guan S, et al. Combined toxic effects of CBNPs and Pb on rat alveolar macrophage apoptosis and autophagy flux. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020;205: 111062.
69. Aggarwal S, Mannam P, Zhang J. Differential regulation of autophagy and mitophagy in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016;311(2):L433–52.
70. Gonzalez A, et al. AMPK and TOR: the Yin and Yang of cellular nutrient sensing and growth control. *Cell Metab.* 2020;31(3):472–92.
71. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol.* 2011;13(9):1016–23.
72. Xin T, Lu C. SirT3 activates AMPK-related mitochondrial biogenesis and ameliorates sepsis-induced myocardial injury. *Aging (Albany NY).* 2020;12(16):16224–37.
73. Hu R, et al. Salidroside ameliorates endothelial inflammation and oxidative stress by regulating the AMPK/NF-kappaB/NLRP3 signaling pathway in AGEs-induced HUVECs. *Eur J Pharmacol.* 2020;867: 172797.
74. Liu C, et al. Air pollution-mediated susceptibility to inflammation and insulin resistance: influence of CCR2 pathways in mice. *Environ Health Perspect.* 2014;122(1):17–26.
75. Gao J, et al. Metformin protects against PM_{2.5}-induced lung injury and cardiac dysfunction independent of AMP-activated protein kinase alpha2. *Redox Biol.* 2020;28:101345.
76. Wang H, et al. AMPKalpha2 deficiency exacerbates long-term PM_{2.5} exposure-induced lung injury and cardiac dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 2018;121:202–14.
77. Su R, et al. Particulate matter exposure induces the autophagy of macrophages via oxidative stress-mediated PI3K/AKT/mTOR pathway. *Chemosphere.* 2017;167:444–53.
78. Ding R, et al. ROS-AKT-mTOR axis mediates autophagy of human umbilical vein endothelial cells induced by cooking oil fumes-derived fine particulate matters in vitro. *Free Radic Biol Med.* 2017;113:452–60.
79. Szoka P, et al. Cigarette smoke-induced oxidative stress and autophagy in human alveolar epithelial cell line (A549 Cells). *Adv Exp Med Biol.* 2019;1176:63–9.
80. Lukaszewicz A, et al. Co-expression of Hsp70 protein and autophagy marker protein LC3 in A549 cells and THP1 cells exposed to nanoparticles of air pollution. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1271:61–8.
81. Wan Q, et al. Atmospheric fine particulate matter exposure exacerbates atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by inhibiting autophagy in macrophages via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021;208: 111440.
82. Li Y, et al. Fine particulate matter inhibits phagocytosis of macrophages by disturbing autophagy. *FASEB J.* 2020;34(12):16716–35.
83. Fujii S, et al. Insufficient autophagy promotes bronchial epithelial cell senescence in chronic obstructive pulmonary disease. *Oncoimmunology.* 2012;1(5):630–41.
84. Joven J, et al. Autophagy is an inflammation-related defensive mechanism against disease. *Adv Exp Med Biol.* 2014;824:43–59.
85. Liao X, et al. Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis. *Cell Metab.* 2012;15(4):545–53.
86. Ouimet M, et al. Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. *Cell Metab.* 2011;13(6):655–67.
87. Martinet W, De Loof H, De Meyer GRY. mTOR inhibition: a promising strategy for stabilization of atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis.* 2014;233(2):601–7.
88. Wang S, et al. Knockout of macrophage migration inhibitory factor accentuates side-stream smoke exposure-induced myocardial contractile dysfunction through dysregulated mitophagy. *Pharmacol Res.* 2020;157: 104828.

89. Zhang C, et al. Role of endoplasmic reticulum stress, autophagy, and inflammation in cardiovascular disease. *Front Cardiovasc Med.* 2017;4:29.
90. Deng X, et al. Airborne fine particulate matter induces multiple cell death pathways in human lung epithelial cells. *Apoptosis.* 2014;19(7):1099–112.
91. Zhong J, et al. B vitamins attenuate the epigenetic effects of ambient fine particles in a pilot human intervention trial. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(13):3503–8.
92. Gao P, Yan Z, Zhu Z. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes in cardiovascular diseases. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8: 604240.
93. Kim DI, et al. Diesel exhaust particulates induce neutrophilic lung inflammation by modulating endoplasmic reticulum stress-mediated CXCL1/KC expression in alveolar macrophages. *Molecules.* 2020;25(24):6046.
94. Liu Y, et al. Oxidative stress, apoptosis, and cell cycle arrest are induced in primary fetal alveolar type II epithelial cells exposed to fine particulate matter from cooking oil fumes. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2015;22(13):9728–41.
95. Laing S, et al. Airborne particulate matter selectively activates endoplasmic reticulum stress response in the lung and liver tissues. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;299(4):C736–49.
96. Xu P, Yao Y, Zhou J. Particulate matter with a diameter of ≤ 2.5 μm induces and enhances bleomycin-induced pulmonary fibrosis by stimulating endoplasmic reticulum stress in rat. *Biochem Cell Biol.* 2019;97(4):357–63.
97. Chen X, et al. ER stress activates the NLRP3 inflammasome: a novel mechanism of atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:3462530.
98. Zhou W, et al. Exposure scenario: another important factor determining the toxic effects of PM2.5 and possible mechanisms involved. *Environ Pollut.* 2017;226:412–25.
99. Watterson TL, et al. Urban particulate matter causes ER stress and the unfolded protein response in human lung cells. *Toxicol Sci.* 2009;112(1):111–22.
100. Haberzettl P, et al. Insulin sensitizers prevent fine particulate matter-induced vascular insulin resistance and changes in endothelial progenitor cell homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016;310(11):H1423–38.
101. Du X, et al. Air pollution is associated with the development of atherosclerosis via the cooperation of CD36 and NLRP3 inflammasome in ApoE(-/-) mice. *Toxicol Lett.* 2018;290:123–32.
102. Hoseini Z, et al. NLRP3 inflammasome: Its regulation and involvement in atherosclerosis. *J Cell Physiol.* 2018;233(3):2116–32.
103. Tang Q, et al. Fine particulate matter from pig house induced immune response by activating TLR4/MAPK/NF-kappaB pathway and NLRP3 inflammasome in alveolar macrophages. *Chemosphere.* 2019;236: 124373.
104. Xu F, et al. Effects on IL-1beta signaling activation induced by water and organic extracts of fine particulate matter (PM2.5) in vitro. *Environ Pollut.* 2018;237:592–600.
105. Yuan W, et al. In vivo and in vitro inflammatory responses to fine particulate matter (PM2.5) from China and California. *Toxicol Lett.* 2020;328:52–60.
106. Zheng F, et al. Silence of NLRP3 suppresses atherosclerosis and stabilizes plaques in apolipoprotein E-deficient mice. *Mediators Inflamm.* 2014;2014: 507208.
107. Shi X, et al. Expression of the NLRP3 inflammasome in carotid atherosclerosis. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2015;24(11):2455–66.
108. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell.* 2010;140(6):900–17.
109. Bhaskar V, et al. Monoclonal antibodies targeting IL-1 beta reduce biomarkers of atherosclerosis in vitro and inhibit atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2011;216(2):313–20.
110. Kirii H, et al. Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(4):656–60.
111. de Oliveira AAF, et al. Genotoxic and epigenotoxic effects in mice exposed to concentrated ambient fine particulate matter (PM2.5) from Sao Paulo city, Brazil. *Part Fibre Toxicol.* 2018;15(1):40.
112. Choi JA, et al. Mycobacterial HBHA induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis through the generation of reactive oxygen species and cytosolic Ca²⁺ in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Cell Death Dis.* 2013;4:e957.
113. Farina F, et al. Milan PM1 induces adverse effects on mice lungs and cardiovascular system. *Biomed Res Int.* 2013;2013: 583513.
114. Xu X, et al. Effect of early particulate air pollution exposure on obesity in mice: role of p47phox. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(12):2518–27.
115. Magnani ND, et al. Role of transition metals present in air particulate matter on lung oxygen metabolism. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016;81(Pt B):419–26.
116. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007;87(1):315–424.
117. Becker S, et al. Regulation of cytokine production in human alveolar macrophages and airway epithelial cells in response to ambient air pollution particles: further mechanistic studies. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;207(2 Suppl):269–75.
118. Chen M, et al. Concentrated ambient PM2.5-induced inflammation and endothelial dysfunction in a murine model of neural IKK2 deficiency. *Environ Health Perspect.* 2018;126(2):027003.
119. Dorrington MG, Fraser IDC. NF-kappaB signaling in macrophages: dynamics, crosstalk, and signal integration. *Front Immunol.* 2019;10:705.
120. Magaye R, et al. Metallic nickel nanoparticles may exhibit higher carcinogenic potential than fine particles in JB6 cells. *PLoS ONE.* 2014;9(4): e92418.
121. Wang J, et al. Urban particulate matter triggers lung inflammation via the ROS-MAPK-NF-kappaB signaling pathway. *J Thorac Dis.* 2017;9(11):4398–412.
122. Wang L, et al. Protective effect of green tea catechin against urban fine dust particle-induced skin aging by regulation of NF-kappaB, AP-1, and MAPKs signaling pathways. *Environ Pollut.* 2019;252(Pt B):1318–24.
123. Zu YY, et al. Effective fraction of *Bletilla striata* reduces the inflammatory cytokine production induced by water and organic extracts of airborne fine particulate matter (PM2.5) in vitro. *BMC Complement Altern Med.* 2019;19(1):369.
124. Zhu X, et al. Potential injurious effects of the fine particulate PM2.5 on the progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice by activating platelets and leukocytes. *Arch Med Sci.* 2019;15(1):250–61.
125. Lopez-Armada MJ, et al. Mitochondrial activity is modulated by TNFalpha and IL-1beta in normal human chondrocyte cells. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(10):1011–22.
126. Luo B, et al. Impact of probable interaction of low temperature and ambient fine particulate matter on the function of rats alveolar macrophages. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2017;49:172–8.
127. Davel AP, et al. Endothelial dysfunction in the pulmonary artery induced by concentrated fine particulate matter exposure is associated with local but not systemic inflammation. *Toxicology.* 2012;295(1–3):39–46.
128. Haberzettl P, et al. Exposure to fine particulate air pollution causes vascular insulin resistance by inducing pulmonary oxidative stress. *Environ Health Perspect.* 2016;124(12):1830–9.

129. Miller MR, et al. Diesel exhaust particulate increases the size and complexity of lesions in atherosclerotic mice. *Part Fibre Toxicol*. 2013;10:61.
130. Torok Z, et al. Plasma membranes as heat stress sensors: from lipid-controlled molecular switches to therapeutic applications. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1838(6):1594–618.
131. Singh IS, et al. A high affinity HSF-1 binding site in the 5'-untranslated region of the murine tumor necrosis factor-alpha gene is a transcriptional repressor. *J Biol Chem*. 2002;277(7):4981–8.
132. Yu FX, et al. Screen of inflammatory genes regulated by heat shock factor 1 and corroboration with SOCS3 gene. *J Cent South Univ Technol*. 2006;31(2):167–73.
133. Rossi A, Elia G, Santoro MG. Inhibition of nuclear factor kappa B by prostaglandin A1: an effect associated with heat shock transcription factor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(2):746–50.
134. Lan F, et al. SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*. 2008;283(41):27628–35.
135. Canto C, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD+ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 2009;458(7241):1056–60.
136. Westerheide SD, et al. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science*. 2009;323(5917):1063–6.
137. Bordone L, Guarente L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(4):298–305.
138. Chen HW, et al. In vivo heat shock protein assembles with septic liver NF-kappaB/I-kappaB complex regulating NF-kappaB activity. *Shock*. 2005;24(3):232–8.
139. Kim I, Shin HM, Baek W. Heat-shock response is associated with decreased production of interleukin-6 in murine aortic vascular smooth muscle cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2005;371(1):27–33.
140. Knowlton AA. NFkappaB, heat shock proteins, HSF-1, and inflammation. *Cardiovasc Res*. 2006;69(1):7–8.
141. Wu L, et al. Heat shock transcription factor 1 attenuates TNFalpha-induced cardiomyocyte death through suppression of NFkappaB pathway. *Gene*. 2013;527(1):89–94.
142. Abdelmohsen K, et al. Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol Cell*. 2007;25(4):543–57.
143. Baldissera FG, et al. Subacute exposure to residual oil fly ash (ROFA) increases eHSP70 content and extracellular-to-intracellular HSP70 ratio: a relation with oxidative stress markers. *Cell Stress Chaperones*. 2018;23(6):1185–92.
144. Mantecca P, et al. Comparative acute lung inflammation induced by atmospheric PM and size-fractionated tire particles. *Toxicol Lett*. 2010;198(2):244–54.
145. Gasparotto J, et al. Coal and tire burning mixtures containing ultrafine and nanoparticulate materials induce oxidative stress and inflammatory activation in macrophages. *Sci Total Environ*. 2013;463–464:743–53.
146. Becker S, et al. TLR-2 is involved in airway epithelial cell response to air pollution particles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;203(1):45–52.
147. Miyata R, van Eeden SF. The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011;257(2):209–26.
148. Tanwar V, et al. In utero particulate matter exposure produces heart failure, electrical remodeling, and epigenetic changes at adulthood. *J Am Heart Assoc*. 2017. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.005796>.
149. Ribeiro Junior G, et al. Diesel exhaust exposure intensifies inflammatory and structural changes associated with lung aging in mice. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2019;170:314–23.
150. Wu Z, et al. Sirt1 protects against thrombomodulin down-regulation and lung coagulation after particulate matter exposure. *Blood*. 2012;119(10):2422–9.
151. Goettems-Fiorin PB, et al. Fine particulate matter potentiates type 2 diabetes development in high-fat diet-treated mice: stress response and extracellular to intracellular HSP70 ratio analysis. *J Physiol Biochem*. 2016;72(4):643–56.
152. Costa-Beber LC, et al. The association of PM25 and high-fat diet potentiates glucose intolerance development, by impairing adipose tissue antioxidant defense and eHSP72 levels. *UNIJU*. 2020;27:32006–16.
153. Mai AS, et al. Exercise training under exposure to low levels of fine particulate matter: effects on heart oxidative stress and extra-to-intracellular HSP70 ratio. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:9067875.
154. Gasparotto J, et al. Obese rats are more vulnerable to inflammation, genotoxicity and oxidative stress induced by coal dust inhalation than non-obese rats. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2018;165:44–51.
155. Martens DS, Nawrot TS. Air pollution stress and the aging phenotype: the telomere connection. *Curr Environ Health Rep*. 2016;3(3):258–69.
156. Tong Z, et al. HSF-1 is involved in attenuating the release of inflammatory cytokines induced by LPS through regulating autophagy. *Shock*. 2014;41(5):449–53.
157. Shakeri H, et al. Cellular senescence links aging and diabetes in cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;315(3):H448–62.
158. Madrigal-Matute J, et al. HSP90 inhibition by 17-DMAG attenuates oxidative stress in experimental atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2012;95(1):116–23.
159. Lee MY, Wang Y, Vanhoutte PM. Senescence of cultured porcine coronary arterial endothelial cells is associated with accelerated oxidative stress and activation of NFkB. *J Vasc Res*. 2010;47(4):287–98.
160. Ma KL, et al. Activation of mTOR modulates SREBP-2 to induce foam cell formation through increased retinoblastoma protein phosphorylation. *Cardiovasc Res*. 2013;100(3):450–60.
161. Ye Q, et al. Difference in LDL receptor feedback regulation in macrophages and vascular smooth muscle cells: foam cell transformation under inflammatory stress. *Inflammation*. 2014;37(2):555–65.
162. Ye Q, et al. Inflammatory stress increases unmodified LDL uptake via LDL receptor: an alternative pathway for macrophage foam-cell formation. *Inflamm Res*. 2009;58(11):809–18.
163. Ruan XZ, et al. Mechanisms of dysregulation of low-density lipoprotein receptor expression in vascular smooth muscle cells by inflammatory cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(5):1150–5.
164. Homem de Bittencourt PI, et al. LipoCardium: endothelium-directed cyclopentenone prostaglandin-based liposome formulation that completely reverses atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*. 2007;193(2):245–58.
165. Childs BG, et al. Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science*. 2016;354(6311):472–7.
166. Yu F, et al. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons derived from vehicle exhaust gas induces premature senescence in mouse lung fibroblast cells. *Mol Med Rep*. 2019;19(5):4326–34.

167. Zheng H, et al. mTOR signaling promotes foam cell formation and inhibits foam cell egress through suppressing the SIRT1 signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2017;16(3):3315–23.
168. Clemente DBP, et al. Prenatal and childhood traffic-related air pollution exposure and telomere length in European children: the HELIX Project. *Environ Health Perspect*. 2019;127(8):87001.
169. Shan M, et al. A feasibility study of the association of exposure to biomass smoke with vascular function, inflammation, and cellular aging. *Environ Res*. 2014;135:165–72.
170. Salinas ME, et al. Continuous exposure to low doses of ultrafine black carbon reduces the vitality of immortalized lung-derived cells and activates senescence. *J Toxicol*. 2020;2020:5702024.
171. Yuan J, et al. Long-term persistent organic pollutants exposure induced telomere dysfunction and senescence-associated secretory phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2018;73(8):1027–35.
172. Chang-Chien J, et al. Particulate matter causes telomere shortening and increase in cellular senescence markers in human lung epithelial cells. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2021;222: 112484.
173. Jun X, et al. PM2.5 promotes abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin -infused apoe^{-/-} mice. *Biomed Pharmacother*. 2018;104:550–7.
174. Chung EJ, et al. IGF-1 receptor signaling regulates type II pneumocyte senescence and resulting macrophage polarization in lung fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2021;110(2):526–38.
175. Buchner N, et al. Unhealthy diet and ultrafine carbon black particles induce senescence and disease associated phenotypic changes. *Exp Gerontol*. 2013;48(1):8–16.
176. Jin X, et al. Amelioration of particulate matter-induced oxidative damage by vitamin c and quercetin in human bronchial epithelial cells. *Chemosphere*. 2016;144:459–66.
177. Li T, et al. HSF1 attenuates LPS-induced acute lung injury in mice by suppressing macrophage infiltration. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:1936580.
178. Huang S, et al. Long-term impacts of ambient fine particulate matter exposure on overweight or obesity in Chinese adults: the China-PAR project. *Environ Res*. 2021;201: 111611.
179. de Lemos Muller CH, et al. Heat-induced extracellular HSP72 release is blunted in elderly diabetic people compared with healthy middle-aged and older adults, but it is partially restored by resistance training. *Exp Gerontol*. 2018;111:180–7.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Capítulo II. Aqueous PM_{2.5} exacerbates lipid accumulation associated to macrophages activation: insights of oxidative, inflammatory, and heat shock response parameters

No capítulo II, apresentamos os nossos achados em forma de artigo submetido a revista *Environmental Research*. Nele, propomos avaliar se o extrato aquoso de MP_{2.5} poderia desempenhar efeitos pró-aterogênicos por meio da polarização de macrófagos para um fenótipo pró-oxidante e pró-inflamatório e potencialização da formação de células espumosas. O MP_{2.5} retido em filtros foi parcialmente extraído em PBS e centrifugado a 1000 x g. Essa solução (1 g de filtro/ 125 mL de PBS) foi diluída em DMEM 10% SFB, cem (MP100x) ou dez vezes (MP10x). Então, expusemos macrófagos da linhagem RAW264.7 ao MP_{2.5} por 48 h e usamos o PBS10x como Controle. Primeiramente, o MP_{2.5} aquoso induziu apoptose e reduziu o número de células proliferativas. Nas sobreviventes, notamos características morfológicas, fagocíticas, oxidantes e inflamatórias (iNOS, Integrin-1 β , IL-6) indicativas de ativação clássica. Além disso, detectamos um aumento nos níveis de HSP70 total e de superfície celular, possível marco da ativação macrofágica. Na sequência, o MP_{2.5} aquoso exacerbou o acúmulo lipídico em macrófagos expostos ao LDL não modificado. Considerando a natureza não-oxidada da lipoproteína utilizada (LDL), e os numerosos estudos reforçando o papel da inflamação em comprometer o *feedback* negativo do colesterol, nós supomos que o fenótipo inflamatório induzido aos macrófagos pela exposição ao MP_{2.5} pode aumentar a sua susceptibilidade a transformação em células espumosas. Finalmente, os nossos resultados comprovaram que a exposição ao MP_{2.5} aquoso promove a ativação macrofágica, marcada pelo estímulo a expressão de HSP70, que está envolvida na aterosclerose.

Capítulo III. PM_{2.5}-exposed macrophages secretome promotes endothelial injury, despite of counter-regulatory mechanisms

No capítulo III, apresentamos os nossos achados em forma de artigo a ser submetido a revista *The Science of the Total Environment*. Nele, nós apresentamos uma abordagem mista, com experimentos *in vitro* e *in vivo*, e propomos caracterizar os mecanismos pelos quais esse poluente promove a ativação e disfunção vascular através do comprometimento do metabolismo do NO, e avaliar se os macrófagos poderiam agir como mediadores nesse processo. Para tal, camundongos CF-1 foram expostos a MP_{2.5} (30 µg/10 µL) ou ao mesmo volume de solução salina por instilação intranasal uma vez ao dia, 5 dias/semana, por duas semanas. A exposição ao MP_{2.5} induziu a lipoperoxidação plasmática e prejudicou a defesa antioxidante, enquanto promoveu um desequilíbrio na liberação de IL-6 e IL-10. Identificamos os macrófagos (linhagem RAW264.7) como uma fonte de citocinas pró-inflamatórias após exposição direta ao MP_{2.5}. A incubação com plasma dos animais expostos a MP_{2.5} (1% v/v) foi suficiente para levar a disfunção endotelial *in vitro*, assim como o meio condicionado dos macrófagos (10% v/v). Este meio comprometeu a sobrevivência das células endoteliais (linhagem EOMA), embora tenha induzido mecanismos protetores via aumento na fosforilação de eNOS, produção de NO, e redução na geração de ROS, sugerindo ativação de fatores antioxidantes. Em conjunto, nós demonstramos uma nova ligação entre a exposição ao MP_{2.5} e as vias inflamatórias, destacando a importância dos macrófagos como possível agravantes nas doenças cardiovasculares.

Capítulo IV. Exposure to fine particulate matter exacerbates hypercholesterolemia-induced vascular injury

No capítulo IV, apresentamos os nossos achados em forma de artigo a ser submetido a revista *Free Radical Biology and Medicine*. Nele, buscamos avaliar se a exposição subaguda a esse poluente poderia exacerbar a injúria vascular induzida pela hipercolesterolêmica adquirida, por comprometer o metabolismo do NO, via alterações na sua síntese e neutralização. Para tal, camundongos CF-1 machos foram divididos em Ctrl e DHC. O grupo DHC recebeu dieta rica em colesterol (45% de ácidos graxos, 2,5% de colesterol, 0,5% de ácido cólico), enquanto o grupo Ctrl recebeu dieta padrão por quatro semanas. Ao final da segunda semana, os animais foram subdivididos em quatro grupos experimentais: dieta padrão + soro fisiológico (Ctrl), dieta padrão + poluente (MP_{2,5}), dieta rica em colesterol + solução salina (DHC) e dieta rica em colesterol + poluente (DHC + MP_{2,5}). Os grupos MP_{2,5} e DHC + MP_{2,5} receberam instilação intranasal de MP_{2,5} (30 µg/10 µL), enquanto o Ctrl e DHC receberam solução salina (NaCl 0,9%) por duas semanas, uma vez por dia, 5 dias por semana, totalizando quatro semanas de planejamento experimental. Ao final do experimento, detectou-se um enorme impacto da dieta na alteração morfológica e do metabolismo lipídico, independentemente dos efeitos da poluição. Por outro lado, tanto a dieta quanto o MP_{2,5} prejudicaram a fosforilação da eNOS e os parâmetros oxidativos plasmáticos, com efeitos interativos significativos sobre a parede vascular da aorta. As intervenções também comprometeram o equilíbrio anti-/pro-inflamatório. Finalmente, concluímos que o MP_{2,5} pode atuar sinergicamente à dieta rica em colesterol para desencadear disfunção endotelial, via estresse oxidativo e inflamação. Nossos dados suportam a hipótese de que o MP_{2,5} pode potencializar o risco cardiovascular entre indivíduos hipercolesterolêmicos.

PARTE III

1. DISCUSSÃO

Nesse estudo, visamos analisar os efeitos cardiovasculares da exposição ao MP_{2,5} sobre o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Sua complexa composição aliada ao tamanho das partículas permitiu profunda inalação pelo organismo, e consequências adversas que incluíram a polarização de macrófagos para um fenótipo pró-oxidante e pró-inflamatório, e efeitos diretos e indiretos sobre a disfunção endotelial. Além disso, também mostramos que o MP_{2,5} pode ter sinergia sobre fatores de risco pré-existentes, como a hipercolesterolemia, e que eles podem estar associados aos metais presentes na sua composição. Desse modo, os nossos resultados suportam a hipótese de que o MP_{2,5} desempenha suas ações aterogênicas via ação sobre macrófagos e células endoteliais.

Devido ao seu tamanho diminuto, o MP_{2,5} pode atingir a circulação sanguínea por intermédio de macrófagos (X. Cui et al., 2023; Furuyama et al., 2009). Com isso, a exposição crônica a esse poluente tem sido elencada como fator de risco para a aterosclerose (Auchincloss et al., 2008). A ele se somam várias outras condições debilitantes, como a hipercolesterolemia (Castelli et al., 1992; Wilson et al., 1988). Como a lesão vascular inicia muitos anos antes do diagnóstico, nós investigamos o papel do MP_{2,5} sobre a disfunção endotelial, especialmente em relação ao metabolismo do NO.

No nosso estudo, o MP_{2,5} aumentou a fosforilação de eNOS na aorta, que foi atenuada na interação entre dieta e poluente. Foi um resultado bastante intrigante, considerando que estudos já demonstraram prejuízo na vasodilatação dependente de endotélio em resposta ao estímulo com acetilcolina em indivíduos expostos a poluição (Proctor et al., 2006; Wauters et al., 2013). No nosso estudo, apesar da modulação da fosforilação da eNOS, os níveis de NO não foram alterados, sugerindo a influência de um meio pró-oxidante (Pacher et al., 2007a). Em concordância com essa hipótese, as análises plasmáticas indicaram aumento no dano lipídico e comprometimento da defesa

antioxidante. Logo, supomos que o aumento da fosforilação da eNOS em resposta as intervenções isoladas se devam a uma medida contra regulatória, como encontrado na associação de LDL e fumaça de cigarro (Steffen et al., 2012), com o intuito de prevenir danos maiores à parede vascular. Com isso, nós reforçamos que o MP_{2,5} é capaz de agir sinergicamente com a hipercolesterolemia em promover um microambiente favorável a lesão vascular. Além disso, mostramos que mesmo exposições subagudas a baixas concentrações são suficientes para promover disfunção endotelial, independentemente de qualquer outra condição pré-existente.

Além de ser o principal vasodilatador derivado do endotélio, o NO também apresenta potente ação vasoprotetora, e de regulação da permeabilidade endotelial (Pacher et al., 2007a). Como a exposição ao MP_{2,5} e a dieta hipercolesterolêmica influenciaram no metabolismo do NO, avaliamos se essas alterações poderiam se refletir no aumento da permeabilidade. Um método de avaliação é a quantificação do edema pulmonar (Huang et al., 2023), que também indica inflamação local, comum em modelos de exposição a poluição atmosférica (Y. Wang et al., 2021). Embora a Anova de duas vias não tenha mostrado efeito dos fatores (MP_{2,5}, dieta hipercolesterolêmica e interação), o Teste-T indicou edema pulmonar nos animais expostos ao MP_{2,5}, sugerindo aumento na permeabilidade vascular e inflamação pulmonar, que favorece a passagem de partículas de poluente para a circulação sanguínea (Calderón-Garcidueñas et al., 2014; Gu et al., 2022; Y. Wang et al., 2021).

Por ser a camada celular mais interna da parede vascular, o endotélio está em contato direto com partículas que chegam à corrente sanguínea (Furuyama et al., 2009) e com fatores parácrinos (Marchini et al., 2016). Assim, nós avaliamos os efeitos diretos do MP_{2,5} sobre as células endoteliais. Foi evidente que o poluente *per se* foi capaz de desencadear disfunção endotelial, via redução dos níveis de NO, apesar do aumento dos

níveis de eNOS fosforilada. Nós hipotetizamos que esse resultado se devesse a oxidação de NO a ONOO⁻ (Pacher et al., 2007a), em concordância com o que foi encontrado *in vivo*. Contudo, a exposição direta ao MP_{2,5} não alterou parâmetros oxidativos, sugerindo a existência de outro mecanismo. Então, nós detectamos redução na geração de NO dependente de iNOS, possivelmente atrelada ao aumento nos níveis de HSP70 (Uchiyama et al., 2007), a qual reconhecidamente contribui para a expressão de eNOS em detrimento da iNOS. Com isso, nós concluimos que as próprias partículas de MP_{2,5} são suficientes para levar a disfunção endotelial, e que esse processo está associado ao comprometimento do metabolismo do NO e processo inflamatório.

No organismo, a inflamação causada pela exposição ao MP_{2,5} pode aumentar a permeabilidade vascular e favorecer os seus efeitos sistêmicos (Calderón-Garcidueñas et al., 2014; Gu et al., 2022; Y. Wang et al., 2021). De fato, encontramos efeito sinérgico entre a dieta hipercolesterolêmica e MP_{2,5} em alterar os níveis de IL-6, e somente da poluição em reduzir os níveis circulantes de IL-10, com grande contribuição dos macrófagos nesse processo. Quando diretamente expostos ao MP_{2,5}, esses leucócitos adotaram uma morfologia ramificada (Vogel et al., 2014), intensa maquinaria fagocítica, e sofreram polarização para um fenótipo oxidativo e inflamatório, com alta produção de NO dependente de iNOS (Prado et al., 2019), expressão de Integrina-1β, e de HSP70 na superfície celular. Além disso, demonstramos que a presença de HSP70 na superfície celular foi proporcional ao estado de ativação nessas células, em concordância com o encontrado em outras condições (Rubio-Infante et al., 2018). Portanto, confirmamos o potencial lesivo do poluente sobre os macrófagos, e reforçamos a contribuição dessas células em promover um meio oxi-inflamatório em contato com o MP_{2,5} (X. Cui et al., 2023; Marchini et al., 2016), possivelmente lesivo para a lâmina endotelial.

No microambiente vascular, a IL-10 tem importante função regulatória e anti-inflamatória, com possíveis aplicações terapêuticas (Bu et al., 2021; Gao et al., 2020). Com isso, nós passamos a investigar se o meio inflamatório verificado *in vivo* seria suficiente para comprometer a homeostasia das células endoteliais. De fato, a suplementação *in vitro* com o plasma condicionado dos animais expostos ao MP_{2,5} aumentou os níveis de NO, independentemente de qualquer alteração na expressão e ativação da eNOS. A eNOS pode ter a sua atividade modulada de acordo com os níveis de IL-6, que desempenha ações inibitórias sobre essa enzima, com graves consequências para o endotélio (Orshal & Khalil, 2004). No nosso estudo, a IL-6 plasmática não foi responsiva a exposição ao poluente, possível razão pela qual a p-eNOS não foi influenciada. Em conjunto, esses resultados confirmaram a presença de fatores parácrinos que poderiam modular a função endotelial, na presença de MP_{2,5}.

Tendo em vista a polarização pró-inflamatória dos macrófagos após exposição direta ao poluente, nós investigamos se eles poderiam ser mediadores da disfunção endotelial. Para tal, nós expusemos células endoteliais ao meio condicionado de macrófagos. De fato, o secretoma dos macrófagos reduziu a viabilidade das células endoteliais. Nas células sobreviventes, promoveu mecanismos compensatórios via aumento na produção de NO, e redução na geração de ERO. Tais efeitos devem estar atrelados a uma potente defesa antioxidante, como evidenciado após exposições agudas (Guan et al., 2019; Klein et al., 2017; Shang et al., 2017; Xu et al., 2017; Zhou et al., 2017), passíveis de prevenir a apoptose (Peng et al., 2022). Com isso, nós concluímos que o meio pró-inflamatório derivado dos macrófagos é suficiente para a indução da injúria endotelial.

A injúria e disfunção endotelial antecedem o surgimento de sintomas visíveis na clínica. Dados os nossos resultados suportando os efeitos diretos e indiretos do MP_{2,5}

sobre a lâmina endotelial, e seus efeitos sinérgicos sobre a hipercolesterolemia, avaliamos a histologia das aortas dos animais. A coloração H&E mostrou espessamento da parede aórtica devido a exposição ao poluente e a dieta hipercolesterolêmica. Nós inferimos a ausência de infiltração via contagem de núcleos nos cortes. Além disso, como o nosso modelo animal não era geneticamente modificado, não esperávamos formação de placa pelo consumo tão curto de dieta hipercolesterolêmica. Logo, supomos que o espessamento vascular nesse período experimental se devesse a hipertrofia das CMLV (Wan et al., 2018). Contudo, o nosso modelo *in vitro* de macrófagos expostos ao MP_{2,5} e ao LDL mostrou acúmulo intracelular de triglicérides, um indicativo de formação de células espumosas, que é uma etapa chave no desenvolvimento da aterosclerose. Portanto, embora o nosso modelo animal tenha sido de curta duração para essa validação, nós atestamos *in vitro* que o MP_{2,5} apresenta potencial de promover a disfunção endotelial, formação de células espumosas e de aumentar a susceptibilidade ao agravamento de lesões ateroscleróticas *in vivo* (Moore & Tabas, 2011).

2. CONCLUSÕES

Concluimos que a o $MP_{2,5}$ apresenta um grande potencial indutor e agravante de lesões vasculares, via ações sobre macrófagos e células endoteliais. A exposição ao poluente é capaz de promover a formação de células espumosas por macrófagos, além de reatividade e citotoxicidade nessas células. Nessas circunstâncias, o secretoma dessas células é suficiente para mediar a injúria endotelial, via comprometimento da ativação da eNOS, embora haja mecanismos compensatórios em ação. Além disso, o próprio $MP_{2,5}$ compromete o metabolismo do NO, via estresse oxidativo e inflamação. Assim, o tamanho aerodinâmico diminuto das partículas associada à sua composição rica em metais de transição, permite que o poluente aja direta e indiretamente sobre a lesão vascular. Finalmente, os nossos resultados suportam as nossas hipóteses, e reforçam o perigo da poluição atmosférica para a saúde cardiovascular, e a urgência por legislação e fiscalização vigentes visando a melhoria da qualidade do ar.

3. PERSPECTIVAS FUTURAS

Pretendemos ainda refazer as análises de Western Blotting de aorta, e revelar as membranas para CD68, Integrin-1 β e HSP70. Além disso, faremos a marcação e análise histológica das aortas com AdipoRed O, e imuno-histoquímica para p-eNOS e CD68.

Em um momento futuro, daremos prosseguimento a análise proteômica do meio condicionado dos macrófagos, para identificação das citocinas envolvidas na injúria endotelial. Para isso, também visamos ampliar o nosso modelo de estudo para a utilização de inibidores farmacológicos de IL-6, TNF- α e IL-1 β .

Também armazenamos as estruturas cerebrais (córtex e hipocampo) desses animais, e visamos avaliar a saúde vascular do sistema nervoso central. Já fizemos os cortes e técnicas de marcação com GFAP, Iba-1 e lectina de tomate, que vão nos permitir uma ideia de astrogliose, microgliose e abundância capilar. Além disso, pretendemos homogeneizar os tecidos para realização de Western Blotting para parâmetros de integridade, função e permeabilidade endotelial, assim que as condições nos permitirem.

4. REFERÊNCIAS

- Aaron, C. P., Chervona, Y., Kawut, S. M., Roux, A. V. D., Shen, M., Bluemke, D. A., Van Hee, V. C., Kaufman, J. D., & Barr, R. G. (2016). Particulate Matter Exposure and Cardiopulmonary Differences in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Environmental Health Perspectives*, *124*(8), 1166–1173. <https://doi.org/10.1289/ehp.1409451>
- Al-Kindi, S. G., Brook, R. D., Biswal, S., & Rajagopalan, S. (2020). Environmental determinants of cardiovascular disease: lessons learned from air pollution. *Nature Reviews Cardiology*, *17*(10), 656–672. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0371-2>
- Arias-Pérez, R. D., Tabora, N. A., Gómez, D. M., Narvaez, J. F., Porras, J., & Hernandez, J. C. (2020). Inflammatory effects of particulate matter air pollution. *Environmental Science and Pollution Research*, *27*(34), 42390–42404. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10574-w>
- Auchincloss, A. H., Diez Roux, A. V., Dvorchak, J. T., Brown, P. L., Barr, R. G., Davignus, M. L., Goff, D. C., Kaufman, J. D., & O'Neill, M. S. (2008). Associations between Recent Exposure to Ambient Fine Particulate Matter and Blood Pressure in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Environmental Health Perspectives*, *116*(4), 486–491. <https://doi.org/10.1289/ehp.10899>
- Baldissera, F. G., dos Santos, A. B., Sulzbacher, M. M., Goettens-Fiorin, P. B., Frizzo, M. N., Ludwig, M. S., Rhoden, C. R., & Heck, T. G. (2018). Subacute exposure to residual oil fly ash (ROFA) increases eHSP70 content and extracellular-to-intracellular HSP70 ratio: a relation with oxidative stress markers. *Cell Stress and Chaperones*, *23*(6), 1185–1192. <https://doi.org/10.1007/s12192-018-0924-z>
- Brook, R. D., Franklin, B., Cascio, W., Hong, Y., Howard, G., Lipsett, M., Luepker, R., Mittleman, M., Samet, J., Smith, S. C., & Tager, I. (2004). Air Pollution and Cardiovascular Disease. *Circulation*, *109*(21), 2655–2671. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000128587.30041.C8>
- Brook, R. D., Rajagopalan, S., Pope, C. A., Brook, J. R., Bhatnagar, A., Diez-Roux, A. V., Holguin, F., Hong, Y., Luepker, R. V., Mittleman, M. A., Peters, A., Siscovick, D., Smith, S. C., Whitsel, L., & Kaufman, J. D. (2010). Particulate Matter Air Pollution and Cardiovascular Disease. *Circulation*, *121*(21), 2331–2378. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e3181d8bec1>
- Bu, T., Li, Z., Hou, Y., Sun, W., Zhang, R., Zhao, L., Wei, M., Yang, G., & Yuan, L. (2021). Exosome-mediated delivery of inflammation-responsive *Il-10* mRNA for controlled atherosclerosis treatment. *Theranostics*, *11*(20), 9988–10000. <https://doi.org/10.7150/thno.64229>
- Bundscherer, A., Malsy, M., Lange, R., Hofmann, P., Metterlein, T., Graf, B. M., & Gruber, M. (2013). Cell harvesting method influences results of apoptosis analysis by annexin V staining. *Anticancer Research*, *33*(8), 3201–3204.

- Caceres, L., Abogunloko, T., Malchow, S., Ehret, F., Merz, J., Li, X., Sol Mitre, L., Magnani, N., Tasat, D., Mwinyella, T., Spiga, L., Suchanek, D., Fischer, L., Gorke, O., Colin Gissler, M., Hilgendorf, I., Stachon, P., Rog-Zielinska, E., Groß, O., ... Marchini, T. (2024). Molecular mechanisms underlying NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β production in air pollution fine particulate matter (PM_{2.5})-primed macrophages. *Environmental Pollution*, *341*, 122997. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122997>
- Calderón-Garcidueñas, L., Vojdani, A., Blaurock-Busch, E., Busch, Y., Friedle, A., Franco-Lira, M., Sarathi-Mukherjee, P., Martínez-Aguirre, X., Park, S.-B., Torres-Jardón, R., & D'Angiulli, A. (2014). Air Pollution and Children: Neural and Tight Junction Antibodies and Combustion Metals, the Role of Barrier Breakdown and Brain Immunity in Neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease*, *43*(3), 1039–1058. <https://doi.org/10.3233/JAD-141365>
- Castelli, W. P., Anderson, K., Wilson, P. W. F., & Levy, D. (1992). Lipids and risk of coronary heart disease The Framingham Study. *Annals of Epidemiology*, *2*(1–2), 23–28. [https://doi.org/10.1016/1047-2797\(92\)90033-M](https://doi.org/10.1016/1047-2797(92)90033-M)
- Cavanagh, J.-A. E., Trought, K., Brown, L., & Duggan, S. (2009). Exploratory investigation of the chemical characteristics and relative toxicity of ambient air particulates from two New Zealand cities. *Science of The Total Environment*, *407*(18), 5007–5018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.05.020>
- Chae, S. (2004). Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomaterials*, *25*(5), 843–850. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00605-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00605-7)
- Chang, K., Lee, S.-J., Cheong, I., Billiar, T. R., Chung, H.-T., Han, J.-A., Kwon, Y.-G., Ha, K.-S., & Kim, Y.-M. (2004). Nitric oxide suppresses inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting post-translational modification of I κ B. *Experimental & Molecular Medicine*, *36*(4), 311–324. <https://doi.org/10.1038/emm.2004.42>
- Chen, M., Qin, X., Qiu, L., Chen, S., Zhou, H., Xu, Y., Hu, Z., Zhang, Y., Cao, Q., & Ying, Z. (2018). Concentrated Ambient PM_{2.5}-Induced Inflammation and Endothelial Dysfunction in a Murine Model of Neural IKK2 Deficiency. *Environmental Health Perspectives*, *126*(2). <https://doi.org/10.1289/EHP2311>
- Chen, S., Wang, Y., Zhang, H., Chen, R., Lv, F., Li, Z., Jiang, T., Lin, D., Zhang, H., Yang, L., & Kong, X. (2019). The Antioxidant MitoQ Protects Against CSE-Induced Endothelial Barrier Injury and Inflammation by Inhibiting ROS and Autophagy in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *International Journal of Biological Sciences*, *15*(7), 1440–1451. <https://doi.org/10.7150/ijbs.30193>
- Chen, S.-Y., Wu, C.-F., Wu, C., Chan, C.-C., Hwang, J.-S., & Su, T.-C. (2022). Urban Fine Particulate Matter and Elements Associated with Subclinical Atherosclerosis in Adolescents and Young Adults. *Environmental Science & Technology*, *56*(11), 7266–7274. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c06347>

- Chen, Y., Chen, Y., Zhao, L., Chen, Y., Mei, M., Li, Q., Huang, A., Varghese, Z., Moorhead, J. F., & Ruan, X. Z. (2012). Inflammatory stress exacerbates hepatic cholesterol accumulation via disrupting cellular cholesterol export. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 27(5), 974–984. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.06986.x>
- Chen, Y., Ruan, X. Z., Li, Q., Huang, A., Moorhead, J. F., Powis, S. H., & Varghese, Z. (2007). Inflammatory cytokines disrupt LDL-receptor feedback regulation and cause statin resistance: a comparative study in human hepatic cells and mesangial cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 293(3), F680–F687. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00209.2007>
- Cochain, C., Vafadarnejad, E., Arampatzi, P., Pelisek, J., Winkels, H., Ley, K., Wolf, D., Saliba, A.-E., & Zerneck, A. (2018). Single-Cell RNA-Seq Reveals the Transcriptional Landscape and Heterogeneity of Aortic Macrophages in Murine Atherosclerosis. *Circulation Research*, 122(12), 1661–1674. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312509>
- Costa Beber, L. C., da Silva, M. O. A. F., dos Santos, A. B., Mai, A. S., Goettens-Fiorin, P. B., Frizzo, M. N., Hirsch, G. E., Ludwig, M. S., & Heck, T. G. (2020). The association of subchronic exposure to low concentration of PM2.5 and high-fat diet potentiates glucose intolerance development, by impairing adipose tissue antioxidant defense and eHSP72 levels. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(25), 32006–32016. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09581-8>
- Costa-Beber, L. C., & Goettens-Fiorin, P. B. (2023). POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA E COVID-19: Uma Complexa Relação Bidirecional. In *Abordagem Interdisciplinar da Pandemia de Covid-19* (pp. 237–250). Editora Unijuí. https://doi.org/10.21527/978-85-419-0365-3_15
- Costa-Beber, L. C., Goettens-Fiorin, P. B., Borges, J., Santos, D., Friske, P. T., Heck, T. G., Hirsch, G. E., & Ludwig, M. S. (2021). Ovariectomy reduces the cardiac cytoprotection in rats exposed to particulate air pollutant. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12350-w> /Published
- Costa-Beber, L. C., Goettens-Fiorin, P. B., dos Santos, J. B., Friske, P. T., Frizzo, M. N., Heck, T. G., Hirsch, G. E., & Ludwig, M. S. (2021). Ovariectomy enhances female rats' susceptibility to metabolic, oxidative, and heat shock response effects induced by a high-fat diet and fine particulate matter. *Experimental Gerontology*, 145. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.111215>
- Costa-Beber, L. C., Goettens-Fiorin, P. B., dos Santos, J. B., Friske, P. T., Frizzo, M. N., Heck, T. G., & Ludwig, M. S. (2023). Air pollution combined with high-fat feeding aggravates metabolic and cardiovascular diseases: A dangerous, oxidative, and immune-inflammatory association. *Life Sciences*, 317, 121468. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121468>
- Costa-Beber, L. C., Hirsch, G. E., Heck, T. G., & Ludwig, M. S. (2022). Chaperone duality: the role of extracellular and intracellular HSP70 as a biomarker of endothelial dysfunction in the development of atherosclerosis. *Archives of*

- Cui, K., Ardell, C. L., Podolnikova, N. P., & Yakubenko, V. P. (2018). Distinct Migratory Properties of M1, M2, and Resident Macrophages Are Regulated by α D β 2 and α M β 2 Integrin-Mediated Adhesion. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02650>
- Cui, X., Lai, W., Zhao, Y., & Chen, C. (2023). The Exosome-Mediated Cascade Reactions for the Transfer and Inflammatory Responses of Fine Atmospheric Particulate Matter in Macrophages. *Environmental Science & Technology*, 57(21), 7891–7901. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c01436>
- Dai, J., Chen, W., Lin, Y., Wang, S., Guo, X., & Zhang, Q.-Q. (2017). Exposure to Concentrated Ambient Fine Particulate Matter Induces Vascular Endothelial Dysfunction via miR-21. *International Journal of Biological Sciences*, 13(7), 868–877. <https://doi.org/10.7150/ijbs.19868>
- de Paula Ribeiro, J., Cáceres Quijano, M. F., Ferreiro, J. D., Gioda, A., Jiménez-Vélez, B., Monserrat, J. M., & Gioda, C. R. (2020). Aqueous particulate matter (PM_{2.5}) from Brazil alters antioxidant profile responses and causes oxidative stress. *Atmospheric Pollution Research*, 11(3), 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.apr.2019.11.023>
- de Paula Ribeiro, J., Kalb, A. C., de Bastos Maya, S., Gioda, A., Martinez, P. E., Monserrat, J. M., Jiménez-Vélez, B. D., & Gioda, C. R. (2019). The impact of polar fraction of the fine particulate matter on redox responses in different rat tissues. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(31), 32476–32487. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06452-9>
- Deng, X., Zhang, F., Wang, L., Rui, W., Long, F., Zhao, Y., Chen, D., & Ding, W. (2014). Airborne fine particulate matter induces multiple cell death pathways in human lung epithelial cells. *Apoptosis*, 19(7), 1099–1112. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-0980-5>
- Diabaté, S., Bergfeldt, B., Plaumann, D., Übel, C., & Weiss, C. (2011). Anti-oxidative and inflammatory responses induced by fly ash particles and carbon black in lung epithelial cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(10), 3197–3212. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5102-4>
- Ding, R., Li, J., Zhang, Q., Zhang, C., Li, N., Sun, S., Li, C., Shen, C., Zhao, Q., Chen, H., Hao, J., & Cao, J. (2022). Vitamin D3 protects intrauterine growth restriction induced by cooking oil fume derived fine particulate matters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 229, 113103. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113103>
- Du, X., Jiang, S., Zeng, X., Zhang, J., Pan, K., Song, L., Zhou, J., Kan, H., Sun, Q., Zhao, J., & Xie, Y. (2019). Fine particulate matter-induced cardiovascular injury is associated with NLRP3 inflammasome activation in Apo E^{-/-} mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.064>

- Du, Y., Navab, M., Shen, M., Hill, J., Pakbin, P., Sioutas, C., Hsiai, T. K., & Li, R. (2013). Ambient ultrafine particles reduce endothelial nitric oxide production via S-glutathionylation of eNOS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *436*(3), 462–466. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.05.127>
- Eriksson, A., Abera, A., Malmqvist, E., & Isaxon, C. (2022). Characterization of fine particulate matter from indoor cooking with solid biomass fuels. *Indoor Air*, *32*(11). <https://doi.org/10.1111/ina.13143>
- Eshghjoo, S., Kim, D. M., Jayaraman, A., Sun, Y., & Alaniz, R. C. (2022). Macrophage Polarization in Atherosclerosis. *Genes*, *13*(5), 756. <https://doi.org/10.3390/genes13050756>
- Fang, T., Huang, Y.-K., Wei, J., Monterrosa Mena, J. E., Lakey, P. S. J., Kleinman, M. T., Digman, M. A., & Shiraiwa, M. (2022). Superoxide Release by Macrophages through NADPH Oxidase Activation Dominating Chemistry by Isoprene Secondary Organic Aerosols and Quinones to Cause Oxidative Damage on Membranes. *Environmental Science & Technology*, *56*(23), 17029–17038. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c03987>
- Faustini, A., Rapp, R., & Forastiere, F. (2014). Nitrogen dioxide and mortality: review and meta-analysis of long-term studies. *European Respiratory Journal*, *44*(3), 744–753. <https://doi.org/10.1183/09031936.00114713>
- Feng, C., Chen, Q., Fan, M., Guo, J., Liu, Y., Ji, T., Zhu, J., & Zhao, X. (2019). Platelet-derived microparticles promote phagocytosis of oxidized low-density lipoprotein by macrophages, potentially enhancing foam cell formation. *Annals of Translational Medicine*, *7*(18), 477–477. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.08.06>
- Furuyama, A., Kanno, S., Kobayashi, T., & Hirano, S. (2009). Extrapulmonary translocation of intratracheally instilled fine and ultrafine particles via direct and alveolar macrophage-associated routes. *Archives of Toxicology*, *83*(5), 429–437. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0371-1>
- Galvão, E. S., Santos, J. M., Reis Junior, N. C., Feroni, R. de C., & Orlando, M. T. D. (2022). The mineralogical composition of coarse and fine particulate material, their fate, and sources in an industrialized region of southeastern Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, *194*(2), 88. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09710-x>
- Gao, C., Huang, Q., Liu, C., Kwong, C. H. T., Yue, L., Wan, J.-B., Lee, S. M. Y., & Wang, R. (2020). Treatment of atherosclerosis by macrophage-biomimetic nanoparticles via targeted pharmacotherapy and sequestration of proinflammatory cytokines. *Nature Communications*, *11*(1), 2622. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16439-7>
- Ghio, A. J., Silbajoris, R., Carson, J. L., & Samet, J. M. (2002). Biologic Effects of Oil Fly Ash. *Environmental Health Perspectives*, *110*. <http://ehpnet1.niehs.nih.gov/docs/2002/suppl-1/89-102ghio/abstract.html>

- Goettens-Fiorin, P. B., Grochanke, B. S., Baldissera, F. G., dos Santos, A. B., Homem de Bittencourt, P. I., Ludwig, M. S., Rhoden, C. R., & Heck, T. G. (2016). Fine particulate matter potentiates type 2 diabetes development in high-fat diet-treated mice: stress response and extracellular to intracellular HSP70 ratio analysis. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 72(4), 643–656. <https://doi.org/10.1007/s13105-016-0503-7>
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*, 3(1), 23–35. <https://doi.org/10.1038/nri978>
- Gu, Y., Hao, S., Liu, K., Gao, M., Lu, B., Sheng, F., Zhang, L., Xu, Y., Wu, D., Han, Y., Chen, S., Zhao, W., Lou, X., Wang, X., Li, P., Chen, Z., Yao, K., & Fu, Q. (2022). Airborne fine particulate matter (PM_{2.5}) damages the inner blood–retinal barrier by inducing inflammation and ferroptosis in retinal vascular endothelial cells. *Science of The Total Environment*, 838, 156563. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156563>
- Guan, L., Geng, X., Stone, C., Cosky, E. E. P., Ji, Y., Du, H., Zhang, K., Sun, Q., & Ding, Y. (2019). PM_{2.5} exposure induces systemic inflammation and oxidative stress in an intracranial atherosclerosis rat model. *Environmental Toxicology*, 34(4), 530–538. <https://doi.org/10.1002/tox.22707>
- Haberzettl, P., Conklin, D. J., Abplanalp, W. T., Bhatnagar, A., & O’Toole, T. E. (2018). Inhalation of Fine Particulate Matter Impairs Endothelial Progenitor Cell Function Via Pulmonary Oxidative Stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(1), 131–142. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309971>
- Haberzettl, P., McCracken, J. P., Bhatnagar, A., & Conklin, D. J. (2016). Insulin sensitizers prevent fine particulate matter-induced vascular insulin resistance and changes in endothelial progenitor cell homeostasis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 310(11), H1423–H1438. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00369.2015>
- Haberzettl, P., O’Toole, T. E., Bhatnagar, A., & Conklin, D. J. (2016). Exposure to Fine Particulate Air Pollution Causes Vascular Insulin Resistance by Inducing Pulmonary Oxidative Stress. *Environmental Health Perspectives*, 124(12), 1830–1839. <https://doi.org/10.1289/EHP212>
- Häkkinen, T., Karkola, K., & Ylä-Herttua, S. (2000). Macrophages, smooth muscle cells, endothelial cells, and T-cells express CD40 and CD40L in fatty streaks and more advanced human atherosclerotic lesions. *Virchows Archiv*, 437(4), 396–405. <https://doi.org/10.1007/s004280000239>
- Higuchi, M., Dusting, G. J., Peshavariya, H., Jiang, F., Hsiao, S. T.-F., Chan, E. C., & Liu, G.-S. (2013). Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into Fat Involves Reactive Oxygen Species and Forkhead Box O1 Mediated Upregulation of Antioxidant Enzymes. *Stem Cells and Development*, 22(6), 878–888. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0306>
- Hill, B. G., Rood, B., Ribble, A., & Haberzettl, P. (2021). Fine particulate matter (PM_{2.5}) inhalation-induced alterations in the plasma lipidome as promoters of vascular

- inflammation and insulin resistance. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 320(5), H1836–H1850. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00881.2020>
- Homem de Bittencourt, P. I., Lagranha, D. J., Maslinkiewicz, A., Senna, S. M., Tavares, A. M. V., Baldissera, L. P., Janner, D. R., Peralta, J. S., Bock, P. M., Gutierrez, L. L. P., Scola, G., Heck, T. G., Krause, M. S., Cruz, L. A., Abdalla, D. S. P., Lagranha, C. J., Lima, T., & Curi, R. (2007). LipoCardium: Endothelium-directed cyclopentenone prostaglandin-based liposome formulation that completely reverses atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*, 193(2), 245–258. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.049>
- Huang, D., Jia, N., Pei, C., Shen, Z., Zhao, S., Wang, Y., Wu, Y., Shi, S., Li, S., & Wang, Z. (2023). Rosavadin protects against PM2.5-induced lung toxicity via inhibition of NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis by activating the PI3K/AKT pathway. *Biochemical Pharmacology*, 213, 115623. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115623>
- Ilha, M., Meira Martins, L. A., da Silveira Moraes, K., Dias, C. K., Thomé, M. P., Petry, F., Rohden, F., Borojevic, R., Trindade, V. M. T., Klamt, F., Barbé-Tuana, F., Lenz, G., & Guma, F. C. R. (2022). Caveolin-1 influences mitochondrial plasticity and function in hepatic stellate cell activation. *Cell Biology International*, 46(11), 1787–1800. <https://doi.org/10.1002/cbin.11876>
- Jerrett, M., Burnett, R. T., Pope, C. A., Ito, K., Thurston, G., Krewski, D., Shi, Y., Calle, E., & Thun, M. (2009). Long-Term Ozone Exposure and Mortality. *New England Journal of Medicine*, 360(11), 1085–1095. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0803894>
- Jung, M., Dodsworth, M., & Thum, T. (2019). Inflammatory cells and their non-coding RNAs as targets for treating myocardial infarction. *Basic Research in Cardiology*, 114(1), 4. <https://doi.org/10.1007/s00395-018-0712-z>
- Kaufman, J. D., Adar, S. D., Barr, R. G., Budoff, M., Burke, G. L., Curl, C. L., Daviglius, M. L., Roux, A. V. D., Gassett, A. J., Jacobs, D. R., Kronmal, R., Larson, T. V., Navas-Acien, A., Olives, C., Sampson, P. D., Sheppard, L., Siscovick, D. S., Stein, J. H., Szpiro, A. A., & Watson, K. E. (2016). Association between air pollution and coronary artery calcification within six metropolitan areas in the USA (the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis and Air Pollution): a longitudinal cohort study. *The Lancet*, 388(10045), 696–704. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00378-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00378-0)
- Khraishah, H., Alahmad, B., Ostergard, R. L., AlAshqar, A., Albaghdadi, M., Vellanki, N., Chowdhury, M. M., Al-Kindi, S. G., Zanobetti, A., Gasparri, A., & Rajagopalan, S. (2022). Climate change and cardiovascular disease: implications for global health. *Nature Reviews Cardiology*, 19(12), 798–812. <https://doi.org/10.1038/s41569-022-00720-x>
- Kim, K., Shim, D., Lee, J. S., Zaitsev, K., Williams, J. W., Kim, K.-W., Jang, M.-Y., Seok Jang, H., Yun, T. J., Lee, S. H., Yoon, W. K., Prat, A., Seidah, N. G., Choi, J., Lee, S.-P., Yoon, S.-H., Nam, J. W., Seong, J. K., Oh, G. T., ... Choi, J.-H. (2018).

- Transcriptome Analysis Reveals Nonfoamy Rather Than Foamy Plaque Macrophages Are Proinflammatory in Atherosclerotic Murine Models. *Circulation Research*, 123(10), 1127–1142. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312804>
- Klein, S. G., Cambier, S., Hennen, J., Legay, S., Serchi, T., Nelissen, I., Chary, A., Moschini, E., Krein, A., Blömeke, B., & Gutleb, A. C. (2017). Endothelial responses of the alveolar barrier in vitro in a dose-controlled exposure to diesel exhaust particulate matter. *Particle and Fibre Toxicology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0186-4>
- Kostrycki, I. M., Wildner, G., Donato, Y. H., dos Santos, A. B., Beber, L. C. C., Frizzo, M. N., Ludwig, M. S., Keane, K. N., Cruzat, V., Rhoden, C. R., & Heck, T. G. (2019). Effects of High-Fat Diet on eHSP72 and Extra-to-Intracellular HSP70 Levels in Mice Submitted to Exercise under Exposure to Fine Particulate Matter. *Journal of Diabetes Research*, 2019, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/4858740>
- Kurlawala, Z., Singh, P., Hill, B. G., & Haberzettl, P. (2023). Fine particulate matter (PM_{2.5})-induced pulmonary oxidative stress contributes to changes in the plasma lipidome and liver transcriptome in mice. *Toxicological Sciences*, 192(2), 209–222. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfad020>
- Kurygina, A. V., Erokhina, M. V., Makarevich, O. A., Sysoeva, V. Yu., Lepekha, L. N., Kuznetsov, S. A., & Onishchenko, G. E. (2018). Plasticity of Human THP–1 Cell Phagocytic Activity during Macrophagic Differentiation. *Biochemistry (Moscow)*, 83(3), 200–214. <https://doi.org/10.1134/S0006297918030021>
- Labranche, N., El Khattabi, C., Dewachter, L., Dreyfuss, C., Fontaine, J., van de Borne, P., Berkenboom, G., & Pochet, S. (2012). Vascular Oxidative Stress Induced by Diesel Exhaust Microparticles. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 60(6), 530–537. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e318270f1a8>
- Lancaster, G. I., & Febbraio, M. A. (2005). Exosome-dependent Trafficking of HSP70. *Journal of Biological Chemistry*, 280(24), 23349–23355. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502017200>
- Li, D., Liu, Y., Chen, J., Velchala, N., Amani, F., Nemarkommula, A., Chen, K., Rayaz, H., Zhang, D., Liu, H., Sinha, A. K., Romeo, F., Hermonat, P. L., & Mehta, J. L. (2006). Suppression of atherogenesis by delivery of TGF β using adeno-associated virus type 2 in LDLR knockout mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(3), 701–707. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.010>
- Li, R., Kou, X., Geng, H., Xie, J., Tian, J., Cai, Z., & Dong, C. (2015). Mitochondrial damage: An important mechanism of ambient PM_{2.5} exposure-induced acute heart injury in rats. *Journal of Hazardous Materials*, 287, 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.006>
- Li, X., Lin, B., Zhang, H., Xie, F., Ta, N., Tian, L., Liu, H., & Xi, Z. (2016). Cytotoxicity and mutagenicity of sidestream cigarette smoke particulate matter of different particle sizes. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(3), 2588–2594. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5483-6>

- Li, Y., Yong, Y., Yang, M., Wang, W., Qu, X., Dang, X., Shang, D., Shao, Y., Liu, J., & Chang, Y. (2020). Fine particulate matter inhibits phagocytosis of macrophages by disturbing autophagy. *The FASEB Journal*, *34*(12), 16716–16735. <https://doi.org/10.1096/fj.202000657R>
- Liao, W., & Florén, C.-H. (1993). Tumor necrosis factor up-regulates expression of low-density lipoprotein receptors on HepG2 cells. *Hepatology*, *17*(5), 898–907. <https://doi.org/10.1002/hep.1840170521>
- Liao, W., Rudling, M., & Angelin, B. (1997). Novel Effects of Histamine on Lipoprotein Metabolism: Suppression of Hepatic Low Density Lipoprotein Receptor Expression and Reduction of Plasma High Density Lipoprotein Cholesterol in the Rat*. *Endocrinology*, *138*(5), 1863–1870. <https://doi.org/10.1210/endo.138.5.5115>
- Liu, J., Liang, S., Du, Z., Zhang, J., Sun, B., Zhao, T., Yang, X., Shi, Y., Duan, J., & Sun, Z. (2019b). PM_{2.5} aggravates the lipid accumulation, mitochondrial damage and apoptosis in macrophage foam cells. *Environmental Pollution*, *249*, 482–490. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.045>
- Liu, J., Liang, S., Du, Z., Zhang, J., Sun, B., Zhao, T., Yang, X., Shi, Y., Duan, J., & Sun, Z. (2019a). PM_{2.5} aggravates the lipid accumulation, mitochondrial damage and apoptosis in macrophage foam cells. *Environmental Pollution*, *249*, 482–490. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.045>
- Liu, J., Ma, K. L., Gao, M., Wang, C. X., Ni, J., Zhang, Y., Zhang, X. L., Liu, H., Wang, Y. L., & Liu, B. C. (2012). Inflammation Disrupts the LDL Receptor Pathway and Accelerates the Progression of Vascular Calcification in ESRD Patients. *PLoS ONE*, *7*(10), e47217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047217>
- Liu, J., Ma, K. L., Zhang, Y., Wu, Y., Hu, Z. B., Lv, L. L., Tang, R. N., Liu, H., Ruan, X. Z., & Liu, B. C. (2015). Activation of mTORC1 disrupted LDL receptor pathway: A potential new mechanism for the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *61*, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.01.011>
- Liu, S., Chen, J., Shi, J., Zhou, W., Wang, L., Fang, W., Zhong, Y., Chen, X., Chen, Y., Sabri, A., & Liu, S. (2020). M1-like macrophage-derived exosomes suppress angiogenesis and exacerbate cardiac dysfunction in a myocardial infarction microenvironment. *Basic Research in Cardiology*, *115*(2), 22. <https://doi.org/10.1007/s00395-020-0781-7>
- Liu, X., Xue, Y., Ding, T., & Sun, J. (2012). Enhancement of proinflammatory and procoagulant responses to silica particles by monocyte-endothelial cell interactions. *Particle and Fibre Toxicology*, *9*(1), 36. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-36>
- Liu, Y., Li, D., Chen, J., Xie, J., Bandyopadhyay, S., Zhang, D., Nemarkommula, A. R., Liu, H., Mehta, J. L., & Hermonat, P. L. (2006). Inhibition of atherosclerosis in LDLR knockout mice by systemic delivery of adeno-associated virus type 2-hIL-10. *Atherosclerosis*, *188*(1), 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.10.029>

- Lund, A. K., Lucero, J., Harman, M., Madden, M. C., McDonald, J. D., Seagrave, J. C., & Campen, M. J. (2011). The Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor Mediates Vascular Effects of Inhaled Vehicle Emissions. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *184*(1), 82–91. <https://doi.org/10.1164/rccm.201012-1967OC>
- Lyu, Q., Wawrzyniuk, M., Rutten, V. P. M. G., van Eden, W., Sijts, A. J. A. M., & Broere, F. (2020). Hsp70 and NF- κ B Mediated Control of Innate Inflammatory Responses in a Canine Macrophage Cell Line. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(18), 6464. <https://doi.org/10.3390/ijms21186464>
- Ma, K. L., Liu, J., Wang, C. X., Ni, J., Zhang, Y., Wu, Y., Lv, L. L., Ruan, X. Z., & Liu, B. C. (2013). Activation of mTOR modulates SREBP-2 to induce foam cell formation through increased retinoblastoma protein phosphorylation. *Cardiovascular Research*, *100*(3), 450–460. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt203>
- Ma, K. L., Ruan, X. Z., Powis, S. H., Chen, Y., Moorhead, J. F., & Varghese, Z. (2008). Inflammatory stress exacerbates lipid accumulation in hepatic cells and fatty livers of apolipoprotein E knockout mice. *Hepatology*, *48*(3), 770–781. <https://doi.org/10.1002/hep.22423>
- Magnani, N. D., Marchini, T., Vanasco, V., Tasat, D. R., Alvarez, S., & Evelson, P. (2013). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase and mitochondrial dysfunction in lung after an acute exposure to Residual Oil Fly Ashes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *270*(1), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.04.002>
- Mai, A. S., dos Santos, A. B., Beber, L. C. C., Basso, R. D. B., Sulzbacher, L. M., Goettens-Fiorin, P. B., Frizzo, M. N., Rhoden, C. R., Ludwig, M. S., & Heck, T. G. (2017). Exercise Training under Exposure to Low Levels of Fine Particulate Matter: Effects on Heart Oxidative Stress and Extra-to-Intracellular HSP70 Ratio. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2017/9067875>
- Mallat, Z., Besnard, S., Duriez, M., Deleuze, V., Emmanuel, F., Bureau, M. F., Soubrier, F., Esposito, B., Duez, H., Fievet, C., Staels, B., Duverger, N., Scherman, D., & Tedgui, A. (1999). Protective Role of Interleukin-10 in Atherosclerosis. *Circulation Research*, *85*(8). <https://doi.org/10.1161/01.RES.85.8.e17>
- Manzano-León, N., Mas-Oliva, J., Sevilla-Tapia, L., Morales-Bárceñas, R., Serrano, J., O'Neill, M. S., García-Cuellar, C. M., Quintana, R., Vázquez-López, I., & Osornio-Vargas, Á. R. (2013). Particulate Matter Promotes In Vitro Receptor-Recognizable Low-Density Lipoprotein Oxidation and Dysfunction of Lipid Receptors. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *27*(1), 69–76. <https://doi.org/10.1002/jbt.21452>
- Marchini, T. (2023). Redox and inflammatory mechanisms linking air pollution particulate matter with cardiometabolic derangements. *Free Radical Biology and Medicine*, *209*, 320–341. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.10.396>

- Marchini, T., Magnani, N. D., Paz, M. L., Vanasco, V., Tasat, D., González Maglio, D. H., Alvarez, S., & Evelson, P. A. (2014). Time course of systemic oxidative stress and inflammatory response induced by an acute exposure to Residual Oil Fly Ash. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 274(2), 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.11.013>
- Marchini, T., Wolf, D., Michel, N. A., Mauler, M., Dufner, B., Hoppe, N., Beckert, J., Jäckel, M., Magnani, N., Duerschmied, D., Tasat, D., Alvarez, S., Reinöhl, J., von zur Muhlen, C., Idzko, M., Bode, C., Hilgendorf, I., Evelson, P., & Zirlik, A. (2016). Acute exposure to air pollution particulate matter aggravates experimental myocardial infarction in mice by potentiating cytokine secretion from lung macrophages. *Basic Research in Cardiology*, 111(4), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00395-016-0562-5>
- Marques, A. R. A., Ramos, C., Machado-Oliveira, G., & Vieira, O. V. (2021). Lysosome (Dys)function in Atherosclerosis—A Big Weight on the Shoulders of a Small Organelle. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.658995>
- Martins, L. A. M., Coelho, B. P., Behr, G., Pettenuzzo, L. F., Souza, I. C. C., Moreira, J. C. F., Borojevic, R., Gottfried, C., & Guma, F. C. R. (2014). Resveratrol Induces Pro-oxidant Effects and Time-Dependent Resistance to Cytotoxicity in Activated Hepatic Stellate Cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 68(2), 247–257. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9703-8>
- Mateus, V. L., Monteiro, I. L. G., Rocha, R. C. C., Saint’Pierre, T. D., & Gioda, A. (2013). Study of the chemical composition of particulate matter from the Rio de Janeiro metropolitan region, Brazil, by inductively coupled plasma-mass spectrometry and optical emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 86, 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2013.03.003>
- Mendez, R., Zheng, Z., Fan, Z., Rajagopalan, S., Sun, Q., & Zhang, K. (2013). Exposure to fine airborne particulate matter induces macrophage infiltration, unfolded protein response, and lipid deposition in white adipose tissue. *American Journal of Translational Research*, 5(2), 224–234.
- Miao, X., Li, W., Niu, B., Li, J., Sun, J., Qin, M., & Zhou, Z. (2019). Mitochondrial dysfunction in endothelial cells induced by airborne fine particulate matter ($\leq 2.5 \mu\text{m}$). *Journal of Applied Toxicology*, 39(10), 1424–1432. <https://doi.org/10.1002/jat.3828>
- Moorby, C. D., Gherardi, E., Dovey, L., Godliman, C., & Bowyer, D. E. (1992). Transforming growth factor- $\beta 1$ and interleukin- 1β stimulate LDL receptor activity in Hep G2 cells. *Atherosclerosis*, 97(1), 21–28. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(92\)90047-K](https://doi.org/10.1016/0021-9150(92)90047-K)
- Moore, K. J., & Tabas, I. (2011). Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Cell*, 145(3), 341–355. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.005>
- Nemmar, A., Hoet, P. H. M., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M. F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L., & Nemery, B. (2002). Passage of

- Inhaled Particles Into the Blood Circulation in Humans. *Circulation*, 105(4), 411–414. <https://doi.org/10.1161/hc0402.104118>
- Newsholme, P., & de Bittencourt, P. I. H. (2014). The fat cell senescence hypothesis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 17(4), 295–305. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000077>
- Niemann, B., Rohrbach, S., Miller, M. R., Newby, D. E., Fuster, V., & Kovacic, J. C. (2017). Oxidative Stress and Cardiovascular Risk: Obesity, Diabetes, Smoking, and Pollution: Part 3 of a 3-Part Series. In *Journal of the American College of Cardiology* (Vol. 70, Issue 2, pp. 230–251). Elsevier USA. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.05.043>
- Olesiejuk, K., & Chałubiński, M. (2023). How does particulate air pollution affect barrier functions and inflammatory activity of lung vascular endothelium? *Allergy*, 78(3), 629–638. <https://doi.org/10.1111/all.15630>
- Orshal, J. M., & Khalil, R. A. (2004). Reduced Endothelial NO-cGMP-Mediated Vascular Relaxation and Hypertension in IL-6-Infused Pregnant Rats. *Hypertension*, 43(2), 434–444. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000113044.46326.98>
- Othman, M., Latif, M. T., Jamhari, A. A., Abd Hamid, H. H., Uning, R., Khan, M. F., Mohd Nadzir, M. S., Sahani, M., Abdul Wahab, M. I., & Chan, K. M. (2021). Spatial distribution of fine and coarse particulate matter during a southwest monsoon in Peninsular Malaysia. *Chemosphere*, 262, 127767. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127767>
- Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007a). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 87(1), 315–424. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>
- Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007b). *Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease*.
- Pachulec, E., Abdelwahed Bagga, R. Ben, Chevallier, L., O'Donnell, H., Guillas, C., Jaubert, J., Montagutelli, X., Carniel, E., & Demeure, C. E. (2017). Enhanced Macrophage M1 Polarization and Resistance to Apoptosis Enable Resistance to Plague. *The Journal of Infectious Diseases*, 216(6), 761–770. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix348>
- Park, M., Joo, H. S., Lee, K., Jang, M., Kim, S. D., Kim, I., Borlaza, L. J. S., Lim, H., Shin, H., Chung, K. H., Choi, Y.-H., Park, S. G., Bae, M.-S., Lee, J., Song, H., & Park, K. (2018). Differential toxicities of fine particulate matters from various sources. *Scientific Reports*, 8(1), 17007. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35398-0>
- Peng, H., Zhang, S., Zhang, Z., Wang, X., Tian, X., Zhang, L., Du, J., Huang, Y., & Jin, H. (2022). Nitric oxide inhibits endothelial cell apoptosis by inhibiting cysteine-dependent SOD1 monomerization. *FEBS Open Bio*, 12(2), 538–548. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13362>

- Potteaux, S., Esposito, B., van Oostrom, O., Brun, V., Ardouin, P., Groux, H., Tedgui, A., & Mallat, Z. (2004). Leukocyte-Derived Interleukin 10 Is Required for Protection Against Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(8), 1474–1478. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000134378.86443.cd>
- Prado, C. M., Righetti, R. F., dos Santos Lopes, F. D. T. Q., Leick, E. A., Arantes-Costa, F. M., de Almeida, F. M., Saldiva, P. H. N., Mauad, T., Tibério, I. de F. L. C., & Martins, M. de A. (2019). iNOS Inhibition Reduces Lung Mechanical Alterations and Remodeling Induced by Particulate Matter in Mice. *Pulmonary Medicine*, 2019, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2019/4781528>
- Proctor, S. D., Dreher, K. L., Kelly, S. E., & Russell, J. C. (2006). Hypersensitivity of Prediabetic JCR:LA-cp Rats to Fine Airborne Combustion Particle-Induced Direct and Noradrenergic-Mediated Vascular Contraction. *Toxicological Sciences*, 90(2), 385–391. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj100>
- Rao, X., Zhong, J., Maiseyeu, A., Gopalakrishnan, B., Villamena, F. A., Chen, L.-C., Harkema, J. R., Sun, Q., & Rajagopalan, S. (2014). CD36-Dependent 7-Ketocholesterol Accumulation in Macrophages Mediates Progression of Atherosclerosis in Response to Chronic Air Pollution Exposure. *Circulation Research*, 115(9), 770–780. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.304666>
- Ribeiro, J. de P., Kalb, A. C., Campos, P. P., Cruz, A. R. H. D. La, Martinez, P. E., Gioda, A., Souza, M. M. de, & Gioda, C. R. (2016). Toxicological effects of particulate matter (PM2.5) on rats: Bioaccumulation, antioxidant alterations, lipid damage, and ABC transporter activity. *Chemosphere*, 163, 569–577. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.094>
- Ridker, P. M., MacFadyen, J. G., Thuren, T., Everett, B. M., Libby, P., Glynn, R. J., Ridker, P., Lorenzatti, A., Krum, H., Varigos, J., Siostrzonek, P., Sinnaeve, P., Fonseca, F., Nicolau, J., Gotcheva, N., Genest, J., Yong, H., Urina-Triana, M., Milicic, D., ... Glynn, R. J. (2017). Effect of interleukin-1 β inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 390(10105), 1833–1842. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32247-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32247-X)
- Riggs, D. W., Zafar, N., Krishnasamy, S., Yeager, R., Rai, S. N., Bhatnagar, A., & O'Toole, T. E. (2020). Exposure to airborne fine particulate matter is associated with impaired endothelial function and biomarkers of oxidative stress and inflammation. *Environmental Research*, 180, 108890. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108890>
- Rosenzweig, R., Nillegoda, N. B., Mayer, M. P., & Bukau, B. (2019). The Hsp70 chaperone network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(11), 665–680. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0133-3>
- Ruan, X. (1998). Cytokines regulation of low-density lipoprotein receptor gene transcription in human mesangial cells. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 13(6), 1391–1397. <https://doi.org/10.1093/ndt/13.6.1391>

- Ruan, X. Z., Moorhead, J. F., Tao, J. L., Ma, K. L., Wheeler, D. C., Powis, S. H., & Varghese, Z. (2006). Mechanisms of Dysregulation of Low-Density Lipoprotein Receptor Expression in Vascular Smooth Muscle Cells by Inflammatory Cytokines. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(5), 1150–1155. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000217957.93135.c2>
- Ruan, X. Z., Varghese, Z., Powis, S. H., & Moorhead, J. F. (2001). Dysregulation of LDL receptor under the influence of inflammatory cytokines: A new pathway for foam cell formation. See Editorial by van Zonneveld and Rabelink, p. 2037. *Kidney International*, 60(5), 1716–1725. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00025.x>
- Ruan, Y., Bao, Q., Wang, L., Wang, Z., Zhu, W., & Wang, J. (2024). Cardiovascular diseases burden attributable to ambient PM2.5 pollution from 1990 to 2019: A systematic analysis for the global burden of disease study 2019. *Environmental Research*, 241, 117678. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117678>
- Rubio-Infante, N., Ilhuicatzí-Alvarado, D., Torres-Martínez, M., Reyes-Grajeda, J. P., Nava-Acosta, R., González-González, E., & Moreno-Fierros, L. (2018). The Macrophage Activation Induced by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Protoxin Involves ERK1/2 and p38 Pathways and the Interaction with Cell-Surface-HSP70. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1), 580–598. <https://doi.org/10.1002/jcb.26216>
- Rui, W., Guan, L., Zhang, F., Zhang, W., & Ding, W. (2016). PM2.5-induced oxidative stress increases adhesion molecules expression in human endothelial cells through the ERK/AKT/NF-κB-dependent pathway. *Journal of Applied Toxicology*, 36(1), 48–59. <https://doi.org/10.1002/jat.3143>
- Rylance, J., Fullerton, D. G., Scriven, J., Aljurayyan, A. N., Mzinza, D., Barrett, S., Wright, A. K. A., Wootton, D. G., Glennie, S. J., Baple, K., Knott, A., Mortimer, K., Russell, D. G., Heyderman, R. S., & Gordon, S. B. (2015). Household Air Pollution Causes Dose-Dependent Inflammation and Altered Phagocytosis in Human Macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 52(5), 584–593. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0188OC>
- Sah, D., Verma, P. K., Kandikonda, M. K., & Lakhani, A. (2019). Chemical fractionation, bioavailability, and health risks of heavy metals in fine particulate matter at a site in the Indo-Gangetic Plain, India. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(19), 19749–19762. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05144-8>
- Schroeder, W. H., Dobson, M., Kane, D. M., & Johnson, N. D. (1987). Toxic Trace Elements Associated with Airborne Particulate Matter: A Review. *JAPCA*, 37(11), 1267–1285. <https://doi.org/10.1080/08940630.1987.10466321>
- Shaito, A., Aramouni, K., Assaf, R., Parenti, A., Orekhov, A., Yazbi, A. El, Pintus, G., & Eid, A. H. (2022). Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 27(3), 0105. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2703105>
- Shang, Y., Zhou, Q., Wang, T., Jiang, Y., Zhong, Y., Qian, G., Zhu, T., Qiu, X., & An, J. (2017). Airborne nitro-PAHs induce Nrf2/ARE defense system against oxidative

- stress and promote inflammatory process by activating PI3K/Akt pathway in A549 cells. *Toxicology in Vitro*, *44*, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.06.017>
- Sherratt, S. C. R., Libby, P., Dawoud, H., Bhatt, D. L., Malinski, T., & Mason, R. P. (2023). Eicosapentaenoic acid (EPA) reduces pulmonary endothelial dysfunction and inflammation due to changes in protein expression during exposure to particulate matter air pollution. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *162*, 114629. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114629>
- Shi, Y., Batibawa, J. W., Maiga, M., Sun, B., Li, Y., Duan, J., & Sun, Z. (2020). Identification and validation of metformin protects against PM2.5-induced macrophages cytotoxicity by targeting toll like receptor pathway. *Chemosphere*, *251*, 126526. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126526>
- Shin, H.-J., Cho, H. G., Park, C. K., Park, K. H., & Lim, H. Bin. (2017). Comparative *In Vitro* Biological Toxicity of Four Kinds of Air Pollution Particles. *Toxicological Research*, *33*(4), 305–313. <https://doi.org/10.5487/TR.2017.33.4.305>
- Sociedade Brasileira de Cardiologia. (2017). V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol*.
- Steffen, Y., Vuillaume, G., Stolle, K., Roewer, K., Lietz, M., Schueller, J., Lebrun, S., & Wallerath, T. (2012). Cigarette smoke and LDL cooperate in reducing nitric oxide bioavailability in endothelial cells via effects on both eNOS and NADPH oxidase. *Nitric Oxide*, *27*(3), 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2012.06.006>
- Sun, Z., Yuan, W., Li, L., Cai, H., Mao, X., Zhang, L., Zang, G., & Wang, Z. (2022). Macrophage CD36 and TLR4 Cooperation Promotes Foam Cell Formation and VSMC Migration and Proliferation Under Circadian Oscillations. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, *15*(5), 985–997. <https://doi.org/10.1007/s12265-022-10225-0>
- Svendsen, C., Spurgeon, D. J., Hankard, P. K., & Weeks, J. M. (2004). A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *57*(1), 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.08.009>
- Tang, Q., Huang, K., Liu, J., Wu, S., Shen, D., Dai, P., & Li, C. (2019a). Fine particulate matter from pig house induced immune response by activating TLR4/MAPK/NF- κ B pathway and NLRP3 inflammasome in alveolar macrophages. *Chemosphere*, *236*, 124373. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124373>
- Tang, Q., Huang, K., Liu, J., Wu, S., Shen, D., Dai, P., & Li, C. (2019b). Fine particulate matter from pig house induced immune response by activating TLR4/MAPK/NF- κ B pathway and NLRP3 inflammasome in alveolar macrophages. *Chemosphere*, *236*, 124373. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124373>
- Uchiyama, T., Atsuta, H., Utsugi, T., Oguri, M., Hasegawa, A., Nakamura, T., Nakai, A., Nakata, M., Maruyama, I., Tomura, H., Okajima, F., Tomono, S., Kawazu, S., Nagai, R., & Kurabayashi, M. (2007). HSF1 and constitutively active HSF1 improve vascular endothelial function (heat shock proteins improve vascular endothelial

- function). *Atherosclerosis*, *190*(2), 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.03.037>
- Vanneste, D., Bai, Q., Hasan, S., Peng, W., Pirottin, D., Schyns, J., Maréchal, P., Ruscitti, C., Meunier, M., Liu, Z., Legrand, C., Fievez, L., Ginhoux, F., Radermecker, C., Bureau, F., & Marichal, T. (2023). MafB-restricted local monocyte proliferation precedes lung interstitial macrophage differentiation. *Nature Immunology*, *24*(5), 827–840. <https://doi.org/10.1038/s41590-023-01468-3>
- Vega, V. L., Rodríguez-Silva, M., Frey, T., Gehrman, M., Diaz, J. C., Steinem, C., Multhoff, G., Arispe, N., & De Maio, A. (2008). Hsp70 Translocates into the Plasma Membrane after Stress and Is Released into the Extracellular Environment in a Membrane-Associated Form that Activates Macrophages. *The Journal of Immunology*, *180*(6), 4299–4307. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.4299>
- Vogel, D. Y. S., Glim, J. E., Stavenuiter, A. W. D., Breur, M., Heijnen, P., Amor, S., Dijkstra, C. D., & Beelen, R. H. J. (2014). Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. *Immunobiology*, *219*(9), 695–703. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.05.002>
- Walker, E. S., Noonan, C. W., Semmens, E. O., Ware, D., Smith, P., Boyer, B. B., Erdei, E., Hopkins, S. E., Lewis, J., Belcourt, A., & Ward, T. J. (2021). Indoor fine particulate matter and demographic, household, and wood stove characteristics among rural US homes heated with wood fuel. *Indoor Air*, *31*(4), 1109–1124. <https://doi.org/10.1111/ina.12808>
- Wan, Q., Cui, X., Shao, J., Zhou, F., Jia, Y., Sun, X., Zhao, X., Chen, Y., Diao, J., & Zhang, L. (2014). Beijing ambient particle exposure accelerates atherosclerosis in ApoE knockout mice by upregulating visfatin expression. *Cell Stress and Chaperones*, *19*(5), 715–724. <https://doi.org/10.1007/s12192-014-0499-2>
- Wan, Q., Liu, Z., Yang, M., & Wu, J. (2019). Acceleratory effects of ambient fine particulate matter on the development and progression of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by down-regulating CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Toxicology Letters*, *316*, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.09.005>
- Wan, Q., Liu, Z., & Yang, Y. (2018). Puerarin inhibits vascular smooth muscle cells proliferation induced by fine particulate matter via suppressing of the p38 MAPK signaling pathway. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *18*(1), 146. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2206-9>
- Wang, X., Yang, Y., Li, J., Bai, Y., Tang, Y., & Han, P. (2017). Effects of Fine Particulate Matter on Erectile Function and Its Potential Mechanism in Rats. *Urology*, *102*, 265.e9-265.e16. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2016.08.034>
- Wang, Y., Wu, Y., Zhang, J., Tang, J., Fan, R., Li, F., Yu, B., Kou, J., & Zhang, Y. (2021). Ruscogenin attenuates particulate matter-induced acute lung injury in mice via protecting pulmonary endothelial barrier and inhibiting TLR4 signaling pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, *42*(5), 726–734. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-00502-6>

- Watterson, T. L., Hamilton, B., Martin, R., & Coulombe, R. A. (2009). Urban Particulate Matter Causes ER Stress and the Unfolded Protein Response in Human Lung Cells. *Toxicological Sciences*, *112*(1), 111–122. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp186>
- Wauters, A., Dreyfuss, C., Pochet, S., Hendrick, P., Berkenboom, G., van de Borne, P., & Argacha, J.-F. (2013). Acute Exposure to Diesel Exhaust Impairs Nitric Oxide–Mediated Endothelial Vasomotor Function by Increasing Endothelial Oxidative Stress. *Hypertension*, *62*(2), 352–358. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00991>
- Wei, H., Yuan, W., Yu, H., & Geng, H. (2021). Cytotoxicity induced by fine particulate matter (PM_{2.5}) via mitochondria-mediated apoptosis pathway in rat alveolar macrophages. *Environmental Science and Pollution Research*, *28*(20), 25819–25829. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12431-w>
- Wilson, P. W., Abbott, R. D., & Castelli, W. P. (1988). High density lipoprotein cholesterol and mortality. The Framingham Heart Study. *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.*, *8*(6), 737–741. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.8.6.737>
- World Health Organization. (2023a). *Air pollution*.
- World Health Organization. (2023b). *Cardiovascular diseases (CVD)*.
- Xie, F., Zhan, R., Yan, L.-C., Gong, J.-B., Zhao, Y., Ma, J., & Qian, L.-J. (2016). Diet-induced elevation of circulating HSP70 may trigger cell adhesion and promote the development of atherosclerosis in rats. *Cell Stress and Chaperones*, *21*(5), 907–914. <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0716-2>
- Xie, Z., Wang, X., Liu, X., Du, H., Sun, C., Shao, X., Tian, J., Gu, X., Wang, H., Tian, J., & Yu, B. (2018). Adipose-Derived Exosomes Exert Proatherogenic Effects by Regulating Macrophage Foam Cell Formation and Polarization. *Journal of the American Heart Association*, *7*(5). <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.007442>
- Xu, J., Zhang, W., Lu, Z., Zhang, F., & Ding, W. (2017). Airborne PM_{2.5}-Induced Hepatic Insulin Resistance by Nrf2/JNK-Mediated Signaling Pathway. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *14*(7), 787. <https://doi.org/10.3390/ijerph14070787>
- Yang, X., Feng, L., Zhang, Y., Hu, H., Shi, Y., Liang, S., Zhao, T., Fu, Y., Duan, J., & Sun, Z. (2018). Cytotoxicity induced by fine particulate matter (PM_{2.5}) via mitochondria-mediated apoptosis pathway in human cardiomyocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *161*, 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.092>
- Ye, Q., Chen, Y., Lei, H., Liu, Q., Moorhead, J. F., Varghese, Z., & Ruan, X. Z. (2009). Inflammatory stress increases unmodified LDL uptake via LDL receptor: an alternative pathway for macrophage foam-cell formation. *Inflammation Research*, *58*(11), 809–818. <https://doi.org/10.1007/s00011-009-0052-4>
- Ye, Q., Lei, H., Fan, Z., Zheng, W., & Zheng, S. (2014). Difference in LDL Receptor Feedback Regulation in Macrophages and Vascular Smooth Muscle Cells: Foam

Cell Transformation Under Inflammatory Stress. *Inflammation*, 37(2), 555–565. <https://doi.org/10.1007/s10753-013-9769-x>

- Ying, Z., Xu, X., Bai, Y., Zhong, J., Chen, M., Liang, Y., Zhao, J., Liu, D., Morishita, M., Sun, Q., Spino, C., Brook, R. D., Harkema, J. R., & Rajagopalan, S. (2014). Long-Term Exposure to Concentrated Ambient PM_{2.5} Increases Mouse Blood Pressure through Abnormal Activation of the Sympathetic Nervous System: A Role for Hypothalamic Inflammation. *Environmental Health Perspectives*, 122(1), 79–86. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307151>
- Yoshioka, T., Okada, T., Maeda, Y., Ikeda, U., Shimpo, M., Nomoto, T., Takeuchi, K., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Takahashi, M., Matsushita, T., Mizukami, H., Hanazono, Y., Kume, A., Ookawara, S., Kawano, M., Ishibashi, S., Shimada, K., & Ozawa, K. (2004). Adeno-associated virus vector-mediated interleukin-10 gene transfer inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Gene Therapy*, 11(24), 1772–1779. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302348>
- Yu, H., Xu, L., Cui, T., Wang, Y., Wang, B., Zhang, Z., Su, R., Zhang, J., Zhang, R., Wei, Y., Li, D., Jin, X., Chen, W., & Zheng, Y. (2022). The Foam Cell Formation Associated With Imbalanced Cholesterol Homeostasis Due to Airborne Magnetite Nanoparticles Exposure. *Toxicological Sciences*, 189(2), 287–300. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfac079>
- Zhang, J., Chen, R., Zhang, G., Wang, Y., Peng, J., Hu, R., Li, R., Gu, W., Zhang, L., Sun, Q., & Liu, C. (2022). PM_{2.5} increases mouse blood pressure by activating toll-like receptor 3. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 234, 113368. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113368>
- Zhang, Y., Ma, K. L., Liu, J., Wu, Y., Hu, Z. B., Liu, L., & Liu, B. C. (2015). Dysregulation of low-density lipoprotein receptor contributes to podocyte injuries in diabetic nephropathy. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 308(12), E1140–E1148. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00591.2014>
- Zhao, C., Pu, W., Niu, M., Wazir, J., Song, S., Wei, L., Li, L., Su, Z., & Wang, H. (2022). Respiratory exposure to PM_{2.5} soluble extract induced chronic lung injury by disturbing the phagocytosis function of macrophage. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(10), 13983–13997. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16797-9>
- Zhao, L., Chen, Y., Tang, R., Chen, Y., Li, Q., Gong, J., Huang, A., Varghese, Z., Moorhead, J. F., & Ruan, X. Z. (2011). Inflammatory stress exacerbates hepatic cholesterol accumulation via increasing cholesterol uptake and de novo synthesis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26(5), 875–883. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06560.x>
- Zhong, S., Zhao, L., Li, Q., Yang, P., Varghese, Z., Moorhead, J. F., Chen, Y., & Ruan, X. Z. (2015). Inflammatory Stress Exacerbated Mesangial Foam Cell Formation and Renal Injury via Disrupting Cellular Cholesterol Homeostasis. *Inflammation*, 38(3), 959–971. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-0058-0>

- Zhong, Y., Liao, J., Hu, Y., Wang, Y., Sun, C., Zhang, C., & Wang, G. (2019). PM2.5 Upregulates MicroRNA-146a-3p and Induces M1 Polarization in RAW264.7 Cells by Targeting Sirtuin1. *International Journal of Medical Sciences*, *16*(3), 384–393. <https://doi.org/10.7150/ijms.30084>
- Zhou, W., Tian, D., He, J., Zhang, L., Tang, X., Zhang, L., Wang, Y., Li, L., Zhao, J., Yuan, X., & Peng, S. (2017). Exposure scenario: Another important factor determining the toxic effects of PM2.5 and possible mechanisms involved. *Environmental Pollution*, *226*, 412–425. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.010>
- Zhu, J., Liu, B., Wang, Z., Wang, D., Ni, H., Zhang, L., & Wang, Y. (2019). Exosomes from nicotine-stimulated macrophages accelerate atherosclerosis through miR-21-3p/PTEN-mediated VSMC migration and proliferation. *Theranostics*, *9*(23), 6901–6919. <https://doi.org/10.7150/thno.37357>
- Zhu, X., Zhao, P., Lu, Y., Huo, L., Bai, M., Yu, F., & Tie, Y. (2019). Potential injurious effects of the fine particulate PM2.5 on the progression of atherosclerosis in apoE-deficient mice by activating platelets and leukocytes. *Archives of Medical Science*, *15*(1), 250–261. <https://doi.org/10.5114/aoms.2018.81039>
- Zou, L., Xiong, L., Wu, T., Wei, T., Liu, N., Bai, C., Huang, X., Hu, Y., Xue, Y., Zhang, T., & Tang, M. (2022). NADPH oxidases regulate endothelial inflammatory injury induced by PM2.5 via AKT/eNOS/NO axis. *Journal of Applied Toxicology*, *42*(5), 738–749. <https://doi.org/10.1002/jat.4254>

Anexos

Anexo I: Aceite pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRGS)



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 38492

Título: EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO NA PREVENÇÃO DA PIORA DA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL INDUZIDA PELO MATERIAL PARTICULADO FINO

Vigência: 01/03/2020 à 01/03/2025

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

FATIMA THERESINHA COSTA RODRIGUES GUMA - coordenador desde 01/03/2020
Jade De Oliveira - pesquisador desde 01/03/2020
NICOLLY PAZ FERREIRA MARQUES - Assistente de Pesquisa desde 01/03/2020
RENATA KRUGER MARTINS - Assistente de Pesquisa desde 01/03/2020
JULIA NOSTRANI MARTINS - Assistente de Pesquisa desde 01/03/2020
JESSICA MARQUES OBELAR RAMOS - Aluno de Mestrado desde 01/03/2020
Arieli Cruz de Sousa - Aluno de Mestrado desde 01/03/2020
Matheus Scarpatto Rodrigues - Aluno de Doutorado desde 01/03/2020
Hémelin Resende Farias - Aluno de Doutorado desde 01/03/2020
Lilian Corrêa Costa Beber - Aluno de Doutorado desde 01/03/2020

Equipe Externa:

Izabel Cristina Custódio de Souza - pesquisador desde 01/03/2020

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 31/08/2020 - Reunião via webconferência - Sistema UFRGS - Mconf, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 92 camundongos CF-1 provenientes do CREAL-UFRGS, e 120 camundongos da linhagem LDLr e 20 camundongos da linhagem C57BL/6 provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica - UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 14 de Setembro de 2020

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética

Anexo II: Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa

HOSPITAL NOSSA SENHORA
DA CONCEIÇÃO - GRUPO
HOSPITALAR CONCEIÇÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO IN VITRO DOS EFEITOS DA HIPERCOLESTEROLEMIA EM CÉLULAS DA GLIA

Pesquisador: JADE DE OLIVEIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 68013323.8.3001.5530

Instituição Proponente: HOSPITAL NOSSA SENHORA DA CONCEICAO SA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.725.590

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivos da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do documento Informações Básicas da Pesquisa ESTUDO IN VITRO DOS EFEITOS DA HIPERCOLESTEROLEMIA EM CÉLULAS DA GLIA, datado em 01/02/2024 e do Projeto Detalhado ESTUDO IN VITRO DOS EFEITOS DA HIPERCOLESTEROLEMIA EM CÉLULAS DA GLIA.

Introdução:

O colesterol é um álcool insaturado, que pertence à família dos compostos esteróides, essencial para toda a vida animal. Participa da composição das membranas celulares e da bainha de mielina dos neurônios, além de ser precursor nos processos de síntese de ácidos biliares, de hormônios esteróides e vitamina D (GOEDEKE; FERNÁNDEZ-HERNANDO, 2012; TABAS, 2002). Em mamíferos, a sua síntese ocorre principalmente no fígado, e o seu transporte para os tecidos periféricos ocorre por meio da lipoproteína de baixa densidade (LDL), sendo essa a principal reguladora da homeostase do colesterol (BENITO-VICENTE et al., 2018; ZHOU et al., 2020).

Desequilíbrios no metabolismo do colesterol têm efeitos prejudiciais e estão relacionados com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (SUGIYAMA et al., 2015). A hipercolesterolemia, caracterizada por níveis de colesterol superiores a 190 mg/dL,

Endereço: Av. Francisco Trein, 596 - Prédio do Ambulatório - 3º andar

Bairro: CRISTO REDENTOR

CEP: 91.350-200

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3357-2714

E-mail: cep-ghc@ghc.com.br

Continuação do Parecer: 6.725.590

pode ser causada por alterações genéticas, sendo denominada hipercolesterolemia familiar (HF), ou por um estilo de vida inadequado. O estudo de

Framingham foi o primeiro robusto a indicar altos níveis de colesterol total e baixos níveis de HDL como fatores de risco para eventos cardíacos em humanos (CASTELLI et al., 1992; WILSON; ABBOTT; CASTELLI, 1988). Em tais casos, o clearance de LDL plasmática é ineficaz e, portanto, ela se mantém circulante por mais tempo que o desejado. A LDL em contato com um meio rico em espécies reativas sofre oxidação, e passa a ser reconhecida pelos receptores Lox-1 e scavenger dos macrófagos. Como tal captação não é mais regulada por feedback negativo, os macrófagos acumulam lipídeos e se transformam em células espumosas, chave no desenvolvimento da aterosclerose (CATAR et al., 2022).

Apesar de ter sido a primeira relação patológica evidenciada, os efeitos da hipercolesterolemia vão muito além do desenvolvimento de doenças cardiovasculares e já foram associados com a ocorrência de declínio cognitivo e doenças neurodegenerativas. Sparks e colaboradores (1990) foram os pioneiros a relatar a associação entre hipercolesterolemia e doença de Alzheimer (DA). Eles encontraram um aumento das placas amiloides, em cérebros de pacientes com doença cardiovascular, e em modelo animal de dieta hipercolesterolêmica (SPARKS et al., 1994). Corroborando com esses resultados, foi demonstrado que uma dieta hipercolesterolêmica resulta em um acúmulo exacerbado de peptídeo -amilóide (A) no sistema nervoso central (SNC) (REFOLO et al., 2000) e causa prejuízos de aprendizado e memória, associados com

alterações bioquímicas (MOREIRA et al., 2014).

Uma característica comum entre as doenças neurodegenerativas é a neuroinflamação (GUZMAN-MARTINEZ et al., 2019). O nosso grupo de pesquisa, utilizando modelos experimentais de hipercolesterolemia, observou que a neuroinflamação, em especial a ativação das células gliais, parece preceder as disfunções cerebrais características de doenças neurodegenerativas (DE OLIVEIRA et al., 2014; 2020; RODRIGUES et al, 2021). Por exemplo, camundongos nocautes para o receptor de LDL (LDLr/-) exibem disfunção hipocampal associada à astrogliose (de OLIVEIRA et al., 2014), enquanto ratos alimentados com uma dieta hipercolesterolêmica apresentam imunorreatividade microglial no córtex cerebral (ULLRICH et al., 2010). Assim, a hipercolesterolemia parece exercer um efeito significativo sobre a atividade microglial, em um processo independente da deposição de peptídeo A (XUE, SPARKS, STREIT, 2007).

As células gliais são os tipos celulares mais abundantes do SNC, e desempenham funções imunológicas basais de manutenção, refinamento e homeostase metabólica, essenciais ao

Endereço: Av. Francisco Trein, 596 - Prédio do Ambulatório - 3º andar

Bairro: CRISTO REDENTOR

CEP: 91.350-200

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3357-2714

E-mail: cep-ghc@ghc.com.br

Continuação do Parecer: 6.725.590

funcionamento neuronal (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016; RANSOHOFF, 2016). Além disso, os astrócitos e microglia são chave no desenvolvimento de uma resposta inflamatória controlada (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016; RANSOHOFF, 2016). No entanto, na neuroinflamação crônica, essas células se tornam reativas e perdem as suas assinaturas moleculares homeostáticas. Nesse contexto, desenvolvem um fenótipo majoritariamente pró-inflamatório, com alta produção de sinalizadores de dano (IL-1, IL-6, IL-18, ROS, NOS e TNF-), em detrimento dos anti-inflamatórios (IL-10, IL-4, IL-13), além de apresentar depósitos lisossomais e alterações do metabolismo glicêmico e lipídico (COLONNA; BUTOVSKY, 2017).

Ademais, a ativação glial (astrócitos e microglia) coexiste com a disfunção da barreira hematoencefálica (BHE) e é um importante marcador da fase subclínica do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (RODRIGUES et al, 2021). Naturalmente, o SNC apresenta um metabolismo de colesterol completamente independente da periferia, com os astrócitos desempenhando um papel importante em prover essa macromolécula para uso neuronal (FERRIS et al., 2017; WANG et al., 2021). No entanto, condições inflamatórias como as verificadas nas doenças neurodegenerativas acometem a BHE, elevando a sua permeabilidade a fatores nocivos ao SNC (SPARKS et al., 2000; DE OLIVEIRA et al., 2020). A nossa principal hipótese é de que tal injúria possa facilitar na passagem de colesterol via LDL, e favorecer um efeito citotóxico direto dessa lipoproteína sobre as células gliais, em paralelo aos efeitos periféricos sobre os macrófagos circulantes.

Nesse cenário, parece ser relevante o estudo de estratégias anti-inflamatórias para o manejo das alterações cerebrais induzidas pela hipercolesterolemia (RODRIGUES et al, 2021). Uma molécula promissora na atenuação da neuroinflamação é a minociclina (CHOI et al. 2007; DU et al., 2001; FERRETTI et al., 2012; GARCEZ et al., 2017). Trata-se de uma tetraciclina semi sintética de segunda geração empregada como antibiótico (GARRIDO-MESA et al., 2013), que vem tendo seus efeitos neuroprotetores avaliados em modelos experimentais de doenças neurodegenerativas, principalmente no que concerne a inibição da reatividade microglial (CHOI et al. 2007;

DU et al., 2001; FERRETTI et al., 2012; GARCEZ et al., 2017; GARRIDO-MESA et al., 2013; SCHOLZ et al., 2015; WU et al, 2002). Dessa forma, acreditamos que a minociclina pode apresentar efeitos terapêuticos nas alterações cerebrais induzidas pela hipercolesterolemia, em especial na reatividade microglial e sua conexão com os prejuízos cognitivos.

Hipótese:

Endereço: Av. Francisco Trein, 596 - Prédio do Ambulatório - 3º andar
Bairro: CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3357-2714 **E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br

Continuação do Parecer: 6.725.590

A nossa principal hipótese é que as alterações cerebrais induzidas por hipercolesterolemia estão relacionadas a processos de reatividade microglial e astrocitária, derivada da citotoxicidade direta da LDL sobre essas células via quebra da BHE. Também acreditamos que tais efeitos sobre o SNC ocorrem paralelamente aos observados periféricamente sobre macrófagos sanguíneos. Além disso, acreditamos que a inibição da ativação das micróglia é uma estratégia terapêutica interessante para prevenir e/ou atenuar o impacto da hipercolesterolemia no cérebro, e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

Objetivo Primário:

Investigar se a exposição direta a LDL isolada do plasma de doadores adultos quebra a homeostasia de macrófagos periféricos, microglia e astrócitos, por levar a um fenótipo reativo, pró-oxidante e pró-inflamatório in vitro. Além disso, buscamos avaliar possíveis estratégias farmacológicas de proteção neurológica sobre os efeitos nocivos da LDL nas células microgliais. **Objetivo Secundário:**

Avaliar a toxicidade da LDL isolada de plasma de doadores adultos em macrófagos, micróglia e astrócitos, sobre parâmetros de viabilidade, densidade, reatividade, proliferação e morte celular;

Analisar os efeitos da LDL isolada de plasma de doadores adultos sobre parâmetros inflamatórios de macrófagos, micróglia e astrócitos; Analisar o papel da micróglia exposta a LDL isolada de plasma de doadores adultos como mediadora de danos sobre os neurônios, pelo uso de meio condicionado;

Avaliar alternativas terapêuticas, pela administração de minociclina (eficiente na inibição da reatividade microglial), atorvastatina e metformina.

Metodologia Proposta:

Candidatos a participantes da pesquisa presentes no departamento de Bioquímica da UFRGS serão convidados para participar da pesquisa entre os meses de março de 2023 até dezembro de 2027. Após aceitarem participar e assinar o TCLE, os participantes irão fazer a doação de sangue no Banco de Sangue do Grupo Hospitalar Conceição. Em seguida, o plasma será separado, para ser utilizado na pesquisa, enquanto as demais frações ficarão sob responsabilidade do Banco de Sangue. A bolsa de plasma será transportada até o Departamento de Bioquímica da UFRGS, seguindo as normas necessárias. Ao chegar no departamento, o plasma será utilizado para isolar a fração de LDL. Essa fração de LDL isolada

Endereço: Av. Francisco Trein, 596 - Prédio do Ambulatório - 3º andar

Bairro: CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200

UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3357-2714

E-mail: cep-ghc@ghc.com.br

HOSPITAL NOSSA SENHORA DA CONCEIÇÃO - GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO



Continuação do Parecer: 6.725.590

será armazenada sob refrigeração (-20 °C) até sua utilização nas linhagens celulares.

As linhagens de macrófagos sanguíneos (RAW264.7), microglia (BV2), astrócitos (C6) e neurônios hipocámpais (HT-22) serão expostas a concentrações crescentes de LDL. As alternativas terapêuticas (minociclina, atorvastatina e metformina) serão testadas conforme julgado pertinente, considerando os resultados encontrados ao longo do estudo. A fim de avaliar os efeitos dos mediadores, produzidos pela ativação da microglia, nos neurônios, células HT-22 serão expostas ao meio condicionado das células BV2 previamente incubadas com LDL e/ou minociclina.

Todas as linhagens serão expostas a LDL e/ou ao tratamento, por 24 horas ou 48 horas e em seguida serão realizados o teste de viabilidade celular por MTT, ensaio de proliferação celular por Sulforrodamina B, formação de espécies reativas de oxigênio por DCF, ensaios de citometria de fluxo, imunofluorescência e RT-PCR.

Coleta de sangue e obtenção do plasma: A coleta de sangue do participante será realizada no Banco de Sangue do Grupo Hospitalar Conceição, por um profissional treinado e capacitado para essa função. O profissional fará cuidadosa assepsia no braço do participante no local a ser puncionado. Ele colherá cerca de 450 ml do sangue por meio de agulha acoplada a um conjunto de bolsas plásticas, todos estéreis e de uso único. A duração da coleta em geral é de 8 a 12 minutos e o participante será assistido durante todo o procedimento. O procedimento poderá ser realizado em qualquer momento do dia (manhã/tarde), não sendo necessário estar em jejum. Dessa bolsa de sangue será separado o plasma, para utilização na pesquisa, enquanto as demais frações ficarão sob responsabilidade do Banco de Sangue.

Isolamento e oxidação de LDL: A fração de LDL será isolada a partir do plasma humano de candidatos participantes presentes no departamento de Bioquímica da UFRGS. O processo de isolamento da LDL será realizado por meio de ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade, conforme descrito por De Bem et al. (2008). Será adicionado EDTA 1 mg/mL e sacarose 0,5% ao plasma, a fim de evitar a agregação de LDL. O plasma-EDTA será ajustado a densidade de 1,22 g/mL utilizando KBr 0,326 g/mL, e em seguida será acionado NaCl 1,006 g/mL. Na sequência será executada a ultracentrifugação a 191000 x G por 2 horas, a 4 °C em ultracentrífuga Hitachi Himac CP80WX, rotor 4OST. Ao final desse processo, a camada contendo LDL (porção superior) será coletada e dialisada durante 16 horas a 4 °C em PBS 148 mM (Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM, KCl 2,6 mM, NaCl 136 mM, pH 7,4). O teor de proteína da LDL isolada será determinado pelo método de Lowry (1951).

Critério de Inclusão:

Endereço: Av. Francisco Trein, 596 - Prédio do Ambulatório - 3º andar
Bairro: CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3357-2714 **E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br

HOSPITAL NOSSA SENHORA
DA CONCEIÇÃO - GRUPO
HOSPITALAR CONCEIÇÃO



Continuação do Parecer: 6.725.590

Os candidatos a participante que devidamente assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), forem maiores de 18 anos, aptos a doação de sangue, e que sua última doação sanguínea tenha sido a mais de 60 dias (homens) ou 90 dias (mulheres). Os participantes não devem apresentar quadro de hipercolesterolemia, fazer uso de algum tipo de hipercolesterolemiantes, como estatinas, ou apresentar idade superior a 69 anos.

Critério de Exclusão:

Não existe um critério de exclusão, uma vez que o participante atenda todos os critérios de inclusão, nada o torna inapto para a doação de sangue, exceto que ele mesmo retire sua autorização para participação da pesquisa e desista de sua participação no projeto. Riscos:

Dentre os riscos desse projeto têm-se o risco de quebra de sigilo dos participantes. Dessa forma, os pesquisadores garantem o sigilo e que farão tudo ao seu alcance para mantê-lo, bem como garantir a não violação e a integridade dos documentos (danos físicos, cópias, rasuras). Além disso, os resultados da pesquisa serão divulgados de forma agrupada, impossibilitando a identificação do participante, e somente a equipe de pesquisa terá acesso ao material e aos dados coletados.

O trabalho também pode apresentar riscos de origem física, uma vez que será realizada a coleta de sangue do participante e isso pode gerar algum desconforto local, acresce que há risco de leve dor pós-coleta e risco de formação de hematoma ao redor do local da punção. Assim, os pesquisadores garantem que a coleta será realizada por profissionais habilitados para o procedimento, e tais riscos serão resolvidos com a observação de procedimentos que garantam cuidados e respeito de acordo com a manifestação do participante,

como: realização de uma palpação cuidadosa e aplicação adequada da agulha, certificando-se da sua penetração completa na parede da veia. Além disso, ao perceber a formação de hematoma, a agulha e o garrote serão retirados e será aplicada pressão no local por um período mínimo de 3 minutos.

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

A nossa principal hipótese é que as alterações cerebrais induzidas por hipercolesterolemia estão relacionadas a processos de reatividade microglial e astrocitária, derivada da citotoxicidade direta da LDL sobre essas células via quebra da BHE. Também acreditamos que tais efeitos sobre o SNC ocorrem paralelamente aos observados periféricamente sobre macrófagos sanguíneos. Além disso, acreditamos que a inibição da ativação das micróglias é uma estratégia terapêutica interessante para prevenir e/ou atenuar o impacto da

Endereço: Av. Francisco Trein, 596 - Prédio do Ambulatório - 3º andar

Bairro: CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200

UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3357-2714

E-mail: cep-ghc@ghc.com.br

Continuação do Parecer: 6.725.590

hipercolesterolemia no cérebro, e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

Objetivo Primário:

Investigar se a exposição direta a LDL isolada do plasma de doadores adultos quebra a homeostasia de macrófagos periféricos, microglia e astrócitos, por levar a um fenótipo reativo, pró-oxidante e pró-inflamatório in vitro. Além disso, buscamos avaliar possíveis estratégias farmacológicas de proteção neurológica sobre os efeitos nocivos da LDL nas células microgliais.

Objetivo Secundário:

Avaliar a toxicidade da LDL isolada de plasma de doadores adultos em macrófagos, microglia e astrócitos, sobre parâmetros de viabilidade, densidade, reatividade, proliferação e morte celular;

Analisar os efeitos da LDL isolada de plasma de doadores adultos sobre parâmetros inflamatórios de macrófagos, microglia e astrócitos; Analisar o papel da microglia exposta a LDL isolada de plasma de doadores adultos como mediadora de danos sobre os neurônios, pelo uso de meio condicionado;

Avaliar alternativas terapêuticas, pela administração de minociclina (eficiente na inibição da reatividade microglial), atorvastatina e metformina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Dentre os riscos desse projeto têm-se o risco de quebra de sigilo dos participantes. Dessa forma, os pesquisadores garantem o sigilo e que farão tudo ao seu alcance para mantê-lo, bem como garantir a não violação e a integridade dos documentos (danos físicos, cópias, rasuras). Além disso, os resultados da pesquisa serão divulgados de forma agrupada, impossibilitando a identificação do participante, e somente a equipe de pesquisa terá acesso ao material e aos dados coletados.

O trabalho também pode apresentar riscos de origem física, uma vez que será realizada a coleta de sangue do participante e isso pode gerar algum desconforto local, acresce que há risco de leve dor pós-coleta e risco de formação de hematoma ao redor do local da punção. Assim, os pesquisadores garantem que a coleta será realizada por profissionais habilitados para o procedimento, e tais riscos serão resolvidos com a observação de procedimentos que garantam cuidados e respeito de acordo com a manifestação do participante,

como: realização de uma palpação cuidadosa e aplicação adequada da agulha, certificando-se da sua penetração completa na parede da veia. Além disso, ao perceber a formação de

Endereço: Av. Francisco Trein, 596 - Prédio do Ambulatório - 3º andar

Bairro: CRISTO REDENTOR

CEP: 91.350-200

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3357-2714

E-mail: cep-ghc@ghc.com.br

HOSPITAL NOSSA SENHORA
DA CONCEIÇÃO - GRUPO
HOSPITALAR CONCEIÇÃO



Continuação do Parecer: 6.725.590

hematoma, a agulha e o garrote serão retirados e será aplicada pressão no local por um período mínimo de 3 minutos.

Benefícios:

Os participantes serão beneficiados de forma indireta, assim como a comunidade, com os resultados da pesquisa, pois dentre os objetivos desse projeto tem-se a avaliação dos mecanismos da toxicidade da LDL, a qual está presente em concentrações elevadas em pacientes hipercolesterolêmicos, em astrócitos e microglias, que pode estar relacionado com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, e a avaliação do tratamento com minociclina para atenuar/reverter o processo de ativação microglial. Além disso, os resultados da pesquisa serão disponibilizados em plataformas digitais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa adequadamente apresentada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos documentos adequadamente apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa. O pesquisador assume o compromisso de seguir, a Resolução nº 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde que trata das diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, e, as normativas éticas complementares vigentes.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa. O pesquisador assume o compromisso de seguir, a Resolução nº 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde que trata das diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, e, as normativas éticas complementares vigentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2113986.pdf	01/02/2024 16:47:11		Aceito
Outros	Termo_Confidencialidade_Sigilo_ass	01/02/2024	JADE DE OLIVEIRA	Aceito

Endereço: Av. Francisco Trein, 596 - Prédio do Ambulatório - 3º andar
Bairro: CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3357-2714 **E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br

Página 08 de 09

HOSPITAL NOSSA SENHORA
DA CONCEIÇÃO - GRUPO
HOSPITALAR CONCEIÇÃO



Continuação do Parecer: 6.725.590

Outros	inado.pdf	16:45:21	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2113986.pdf	31/01/2024 16:37:40		Aceito
Outros	PARECER_GHC.pdf	31/01/2024 16:37:11	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Curriculos_completo.pdf	31/01/2024 16:36:40	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
Orçamento	Orcamento_PB.pdf	31/01/2024 16:36:04	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_atualizado_plataforma_brasil.pdf	31/01/2024 16:32:47	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Plataforma_Brasil.pdf	15/03/2023 23:24:36	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração do Patrocinador	Declaraca_infraestrutura.pdf	25/01/2023 16:16:22	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração do Patrocinador	Declaracao_compromisso_relatorios.pdf	20/01/2023 11:06:19	JADE DE OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	20/01/2023 10:57:42	JADE DE OLIVEIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 26 de Março de 2024

Assinado por:
Natália Miranda Jung
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Francisco Trein, 596 - Prédio do Ambulatório - 3º andar

Bairro: CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200

UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3357-2714

E-mail: cep-ghc@ghc.com.br