Expressão gênica de marcadores inflamatórios em ensaio experimental com ratos diabéticos expostos à poluição atmosférica

Carolina Rosa Gaia da Silveira[1], José Paulo Brandoli Martins[1], Monique Matsuda[2], Mônica Valéria Marquezini[2], Daniel Siquieroli Vilas Boas[1]

[1]Faculdade de Ciências Biológicas – Universidade Santa Cecília (UNISANTA)
[2]Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo (USP)
MCT-CNPq/CT Saúde n° 1806
E-mail: daniel@unisanta.br

Resumo: Atualmente há cerca de 3,2 bilhões de pessoas vivendo em áreas urbanas no mundo. Todas elas estão sujeitas à poluição atmosférica formada por partículas e gases, vindos de diferentes fontes de emissão. Vários estudos estão sendo conduzidos para verificação de seus efeitos na saúde pública, já que muitas dessas fontes contêm substâncias químicas mutagênicas e há evidências de que o risco de diabetes tipo 2 e a inflamação subclínica pode estar aumentado em locais mais poluídos. Em ratos diabéticos expostos às partículas de diesel, foi observada uma diminuição mais acentuada no tamanho e número de células das ilhotas pancreáticas e vacuolização celular associada com um aumento significativo de células apoptóticas. Este estudo teve o objetivo de quantificar a expressão gênica de interleucina-6 em ensaio experimental com ratos diabéticos expostos à poluição atmosférica no município de São Paulo. Foram utilizadas neste estudo, biopsias de coração de ratos Wistar expostos à poluição nas câmaras do Concentrador de Partículas Finas Atmosféricas de Harvard. A análise da expressão transcricional do gene marcador de inflamação foi realizada por PCR. A expressão do gene IL-6 mostrou-se aumentada (174,19%, p<0,001) nos grupos experimentais em relação aos grupos controles.

Palavras chave: expressão gênica, interleucina-6, diabetes, poluição atmosférica.

Gene expression of inflammatory markers in an experimental assay with diabetic rats exposed to atmospheric pollution

Abstract: There are currently around 3.2 billion people living in urban areas in the world. All of them are subject to atmospheric pollution formed by particles and gases, coming from different emission sources. Several studies are being conducted to verify its effects on public health, as many of these sources contain mutagenic chemicals and there is evidence that the risk of type 2 diabetes and subclinical inflammation may be increased in more polluted locations. In diabetic rats exposed to diesel particles, a more pronounced decrease in the size and number of pancreatic islet cells and cellular vacuolization associated with a significant increase in apoptotic cells were observed. This study aimed to quantify the gene expression of interleukin-6 in an experimental test with diabetic rats exposed to air pollution in the city of São Paulo. Heart biopsies from Wistar rats exposed to pollution in the chambers of the Harvard Atmospheric Fine Particle Concentrator were used in this study. Analysis of the transcriptional expression of the inflammation marker gene was performed by PCR. The expression of the IL-6 gene was increased (174.19%, p<0.001) in the experimental groups in relation to the control groups.

Keywords: gene expression, interleukin-6, diabetes, air pollution.

1. Introdução

Este projeto dá continuidade à linha de pesquisa dos subprojetos clínicos e de pesquisa envolvendo indicação de exposição e biomonitoramento do projeto temático intitulado "Avaliação da toxicidade da poluição por material particulado gerado por diferentes fontes emissoras: proposição de estudos clínicos e experimentais" referente ao edital MCT-CNPq/CT Saúde n° 1806.

Para este estudo foi utilizado o Concentrador de Partículas Finas Ambientais de Harvard (CPFAH), que se encontra no laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da USP. Este equipamento foi desenvolvido pela Escola de Saúde Pública da Universidade de Harvard, EUA, em 1995.

O concentrador aumenta em até 30 vezes a concentração das partículas ambientais de diâmetro aerodinâmico igual ou inferior a 2,5µm, com tecnologia de impactadores virtuais e alimenta uma câmara de exposição para ensaios toxicológicos (SIOUTAS et al., 1995, 1997; ZHANG et al., 2020).

Atualmente há cerca de 3,2 bilhões de pessoas vivendo em áreas urbanas no mundo. Todas elas estão sujeitas à poluição atmosférica formada por partículas e gases, vindos de diferentes fontes de emissão: indústrias, veículos, cigarros, queima de florestas. Inúmeros estudos estão sendo feitos para entender melhor a ligação desses elementos com seus efeitos na saúde pública (YANG et al., 2022).

Muitas dessas fontes contêm substâncias químicas, como o hidrocarboneto aromático policíclico, presas dentro ou na superfície das partículas e que são mutagênicas ou carcinogênicas (SAMET et al., 2004; WU et al., 2022).

As partículas carregadas pelo ar entram em nosso organismo pela respiração. No pulmão, os materiais absorvidos vão para o sangue e são então distribuídos pelo corpo. Há relação entre poluentes urbanos e problemas cardiovasculares, respiratórios e aumento na incidência de vários tipos de câncer (FERREIRA et al., 2007) c experimentos mostram que a qualidade do sêmen de homens sem histórico de infertilidade vem diminuindo desde 1940 (MOHALLEM et al., 2005; HEHUA et al., 2021).

Estudos feitos com gaivotas que fazem seus ninhos próximos às siderúrgicas mostraram que conforme a proximidade delas com as indústrias, maior o número de mutações ocorridas em suas células germinativas (SOMERS et al., 2002). Outro estudo, feito na China, aponta sobre o potencial mutagênico dentro de casas e apartamentos recém-reformados ou decorados, devido ao grande uso de materiais sintéticos e químicos. Os efeitos adversos desses poluentes podem ser transmitidos dos pais expostos aos filhos através de mecanismos epigenéticos que ainda precisam ser melhores estudados (ZHOU et al., 2009; TANG et alo., 2020).

O Brasil, tanto por dimensão continental quanto por desenvolvimento industrial e agrícola apresenta situações onde o risco a saúde frente à contaminação ambiental deve ser avaliado. A geração de informações qualificadas sobre efeitos da poluição é um requisito fundamental para a elaboração de políticas públicas que visam à melhoria da qualidade de vida da população. A poluição do ar em alguns cenários pode representar um risco significativo de agravo à saúde, que merece uma avaliação responsável e proposição de medidas corretivas e preventivas. O ar da cidade de São Paulo tem sido uma grande preocupação, devido à emissão de gases tóxicos, emanados tanto por veículos quanto por indústrias e usinas ou até mesmo naturalmente.

A cidade de São Paulo possui mais de 12 milhões de habitantes e, como consequência, o número de total estimado de veículos é cerca de 6 milhões na região metropolitana. Por esse motivo, a poluição do ar na cidade é causada em sua maioria pela emissão de gases e material particulado (PM) dos veículos (MIRAGLIA e SALDIVA, 2005).

Saldiva et al. (1994) descreveram a correlação entre a poluição atmosférica e doenças sistêmicas, que também foi descrita como cofator desencadeante ou agravante de doenças pré-existentes ou concomitantes por Lichtenefels et al. (2007) e Arbex et al. (2007). Edwards e Myers (2007) demonstraram que a poluição atmosférica pode afetar a saúde humana em razão da alteração

de expressões gênicas, por ser genotóxica, ou seja, indivíduos expostos regularmente a este tipo de poluição estão mais suscetíveis a mutagênese (TANG et al., 2020).

O município de São Paulo devido à grande quantidade de veículos, que nesse caso, são os maiores responsáveis pela poluição urbana, é um local de referência para os estudos de toxicidade desse tipo de poluição. O limiar no qual o indivíduo exposto a certo grau de poluição começa a apresentar anormalidades, disfunções e agravos das doenças pré-existentes ou ainda alterações genômicas, segue em estudo.

Nesse sentido, justificam-se os estudos clínicos e experimentais na área, para que a compreensão dos efeitos da poluição sobre a saúde possa fornecer subsídios para a elaboração de medidas que visem reduzir os riscos causados pela poluição do ar na saúde da população.

Os efeitos adversos da poluição do ar são constantemente relacionados ao aerossol atmosférico, que permite sua coleta *in situ* para análises detalhadas a posteriori. O PM consiste em uma mistura de partículas sólidas ou liquidas, que variam em forma, composição e origem, e ficam suspensas no ar. O PM pode ser classificado em frações grossa, fina e ultrafina (LI et al., 2021).

Foi adotada nessa pesquisa, como indicador da contaminação do ar, a fração fina. As partículas finas, que tem diâmetro aerodinâmico igual a 2,5µm ($PM_{2,5}$) são derivadas, basicamente, de processos de combustão de automotores, indústrias ou usinas termoelétricas. O $PM_{2,5}$ contém partículas primárias, produzidas diretamente pelas fontes emissoras, assim como partículas secundárias geradas no processo de conversão de gás a partículas (MÜNZEL et al., 2018).

Partículas de carvão produzidas pela combustão dos combustíveis fósseis fazem parte do $PM_{2,5}$ e possuem adsorvidos à sua superfície, diferentes elementos e compostos, tais como metais pesados e hidrocarbonetos (LI et al., 2022).

Há evidências crescentes de que os poluentes do ar estão associados com o risco de diabetes tipo 2. A inflamação subclínica pode ser um mecanismo de ligação entre a poluição do ar com a diabetes. Há falta de informação se a poluição do ar também contribui para a piora do controle metabólico em diabetes tipo 2 recém diagnosticados. Tamayo et al. (2014) sugerem que as partículas residenciais (PM_{10}) estão associadas com o aumento da concentração de hemoglobina glicada no diabetes tipo 2 recém diagnosticados (RIOJAS-RODRIGUEZ et al., 2019; LIU et al., 2022).

Em ratos diabéticos expostos às partículas de diesel, foi observada uma diminuição mais acentuada no tamanho e número de células das ilhotas pancreáticas e vacuolização celular associada com um aumento significativo de células apoptóticas das ilhotas. Nestes ratos, as partículas de diesel aumentaram a atividade da amilase pancreática significativamentee também dos marcadores de estresse oxidativo (Nemmar, et al., 2014; YU et al., 2020)).

Nemmar et al. (2013) também observaram que partículas de diesel causam leucocitose e um aumento significativo na proteína C reativa no plasma em ratos diabéticos em comparação com ratos diabéticos expostos à salina e aos ratos não diabéticos expostos à poluição. Observou também que a PO_2 arterial, bem como o número de plaquetas e o tempo de oclusão trombótica avaliadas *in vivo* foram significativamente reduzidos após a exposição dos ratos diabéticos à poluição. Concluíram então, que os eventos sistêmicos e de coagulação são agravados pela diabetes em ratos e que essas ações podem ser relevantes para a exacerbação da morbidade cardiovascular que acompanha a poluição do ar por partículas em pacientes diabéticos (LIM et al., 2019; GU et al., 2020; LI et al., 2022).

2. Objetivo

O objetivo deste estudo foi quantificar a expressão do gene IL-6 por PCR no tecido cardíaco de ratos Wistar diabéticos expostos à poluição atmosférica através de ensaio experimental com o Concentrador de Partículas Finas Ambientais de Harvard (CPFAH).

3. Métodos

Modelo Experimental

Foram utilizadas neste estudo, biopsias de coração de 12 ratos Wistar, machos, diabéticos, com um ano de idade e peso médio de 250g. Os animais foram obtidos no biotério central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, divididos em dois grupos: Grupo Controle (C) com 4 ratos e Grupo Experimental (E) com 8 ratos e submetidos à exposição no CPFAH, calibrado para as condições ambientais brasileiras.

A exposição teve duração de 1 hora, diariamente, nos períodos da manhã, durante 1 semana (6 ratos - grupo 1) e durante 3 semanas (6 ratos -grupo 2).

A caracterização do material particulado foi realizada através de amostras dos filtros de policarbonato (Millipore®) com 47mm de diâmetro e vazão de 30L/min, nos pontos localizados antes da entrada do ar no CPFAH (ar ambiente) e após sua passagem pelo concentrador (ar concentrado).

Os animais não foram envolvidos intencionalmente em estresse e dor. Não foram imobilizados, não foram impedidos de se alimentarem e não foram submetidos processos invasivos. Os animais foram eutanasiados com dose excessiva de anestésico, os órgãos e tecidos de interesse foram removidos e congelados imediatamente em nitrogênio líquido. As carcaças foram embaladas em lixo séptico e enviadas ao Biotério Central para descarte apropriado.

Este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo 056507).

Análise da Expressão Transcricional do Gene IL-6

Estes experimentos utilizaram amostras de tecido de coração dos animais dos grupos C e E, descongeladas em gelo no momento de sua execução e mantidas em gelo durante toda sua manipulação. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e em condições isentas de RNase.

Isolamento do RNA total

O RNA total das amostras foi extraído utilizando-se o método do TRIzol (GIBCO BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA), conforme instruções do fabricante. As amostras foram suspensas em TRIzol na proporção de lmL do reagente para 100mg de tecido e a mistura foi homogeneizada em politron (Ultra-Turrax T25, Ika - Labortechnik, Germany) utilizando dois pulsos por segundo a 4°C e em sequência, as amostras foram incubadas durante 5 minutos em TA.

Em seguida foi adicionado 0,1mL de clorofórmio (Merck S.A, SP, Brasil) para cada 1mL de TRIzol utilizado e as amostras foram agitadas por inversão durante 15 segundos e incubadas durante 2 minutos em TA. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 14000rpm, durante 15 minutos a 4°C. À fase aquosa foi adicionado 0,5mL de isopropanol (Merck S.A, SP, Brasil) para cada lmL de TRIzol, sendo em seguida centrifugada a 14000rpm, durante 10 minutos a 4°C. Ao precipitado obtido (RNA total) foi adicionado 1mL de etanol 75% (Merck S.A, SP, Brasil) para cada lmL de TRIzol e centrifugado a 7500rpm, durante 5 minutos a 4°C.

A fase aquosa foi desprezada e o pellet foi seco em TA e posteriormente ressuspenso em 20uL de água destilada tratada com dietilpirocarbonato (Sigma Chemical Co., St. Louis, M0, EUA) na proporção de lmL de dietilpirocarbonato para cada 1L de água.

O conteúdo de RNA total foi quantificado por absorbância em espectrofotômetro (GeneQuant pro RNA/DNA Calculator, Amersham Pharnacia Biotech, Uppsala, Suécia). Consideramos que uma unidade de absorbância a 260nm corresponde a 40ug/mlL de RNA. A relação de absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280nm do RNA total foi calculada para certificação da ausência de contaminação proteica.

A integridade do RNA de cada amostra foi analisada eletroforeticamente em gel de agarose 1%, em tampão tris-borato EDTA (TBE; 50mM Tris base, 50mM ácido bórico, ImM EDTA, pH 8). As amostras cujas bandas ribossomais 28S e 18S estavam íntegras foram armazenadas a -80°C até sua utilização para a síntese da 1° fita de DNA complementar (cDNA).

Obtenção da 1° fita de cDNA

O RNA total serviu de molde para a síntese de cDNA (transcrição reversa), utilizando o kit Superscript I (GIBCO BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA). A 1ª fita de cDNA foi preparada utilizando-se 5µg do RNA total, 1U da enzima transcriptase reversa, lµL de oligos dT para um volume final de 20µl. Esta mistura foi incubada sequencialmente a 25°C por 10 minutos, 42°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos e 4°C por 1 minuto. O cDNA foi armazenado a -20°C até sua utilização nas reações em cadeia da polimerase (PCR).

Reação em Cadeia da Polimerase

A reação em cadeia da polimerase foi realizada com cDNA em volume de 1µL, 0,4mM do mix de desoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP), 0,2µM de cada primer, 1,5mM de $MgCl_2$ 2,5U da enzima Taq DNA polimerase em tampão de PCR (kit Superscript II, GIBCO BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA), em volume final de 25µL.

Primers para o gene constitutivo β-actina, foram utilizados para a padronização de expressão não-regulada.

A mistura de reação foi amplificada em termociclador de PCR PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, MA, EUA) utilizando o seguinte programa: desnaturação por 5 minutos a 94°C; 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58°C (anelamento dos primers) e l minuto a 72°C (extensão do DNA); extensão final por 10 minutos a 72°C e refrigeração a 4°C.

Após as reações, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE contendo brometo de etídeo (10µg/mL), utilizando padrão de DNA com 100pb (GIBCO BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA).

A visualização dos produtos de PCR no gel foi feita por meio do sistema Eagle EyelI (Stratagene, La Jolla, CA, EUA), utilizando luz ultravioleta e a densitometria das bandas pelo programa Quantity One 4.1.0 (Bio Rad, Hercules, CA, EUA).

Uma área de tamanho padronizado foi definida para cada conjunto de bandas do gel no cálculo da densitometria. A "densidade de fundo" do gel (background) foi registrada em uma área idêntica e descontada dos cálculos e as densidades das amostras amplificadas foram comparadas com a da banda do padrão de DNA de tamanho mais próximo. Os resultados expressos representaram a densidade de cada banda relativa à obtida para a β-actina na mesma amostra. Para este gene (β-actina) a densidade relativa foi considerada 100% uma vez que ele foi adotado como padrão interno de cada gel (padrão housekeeping).

Análise dos Resultados

A expressão dos genes foi testada em relação a sua normalidade de distribuição e em relação à homogeneidade das variâncias. Os grupos C e E foram comparados pelo teste t de Student. Os testes estatísticos foram realizados no programa Microsoft Excel. Os valores foram expressos cm média ± desvio padrão e foi fixado em 5% o nível para a rejeição da hipótese de nulidade (nível de significância).

4. Resultados

Determinação da Faixa Linear de Amplificação dos Genes

A figura 1 mostra a eletroforese em gel de agarose 1% dos ciclos crescentes de amplificação para os produtos de PCR da IL-6 do pool de amostras do grupo C. O número de ciclos escolhido para as amplificações semiquantitativas dos grupos C e E foi de 35. A linha de tendência mostrada pelo gráfico foi ajustada em relação aos pontos iniciais da curva, onde coube uma função polinomial de 3° grau ($y = 0{,}0003x^3 - 0{,}0234x^2 + 0{,}7642x - 7{,}7411$), sendo que a qualidade deste ajuste (R^2) foi de 96,1%.

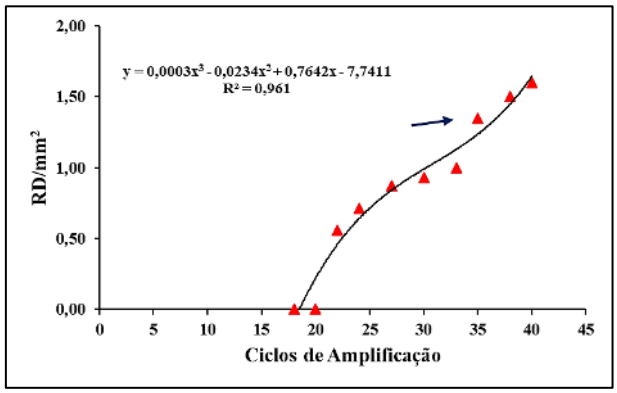

Figura 1. Ciclos crescentes de amplificação pela PCR do pool de amostras do grupo C para o gene β-actina. A seta mostra no gráfico o número de ciclos escolhidos para o experimento (35 ciclos).

A figura 2 mostra os resultados das eletroforeses cm gel de agarose 1% características dos produtos de amplificação da PCR semiquantitativa, obtidos a partir dos cDNAs das amostras dos grupos C e E para o gene lL-6. A tabela l mostra a validação do método de RT-PCR utilizado para os genes estudados, na qual foram avaliados os coeficientes de variação intra e interreações. A tabela 2 mostra a descrição dos resultados do teste t de Student para a igualdade das médias. Os valores estão expressos em média ± DP das densidades relativas das bandas no gel de agarose.

Maiores quantidades de RNAm foram constatadas para o grupo exposto uma semana (70,39%, $p<0{,}001$) e para o grupo exposto três semanas (174,19%, $p<0{,}001$) quando comparados aos controles.

A figura 3 apresenta graficamente a expressão do gene estudado, nos dois grupos de estudo C e E.

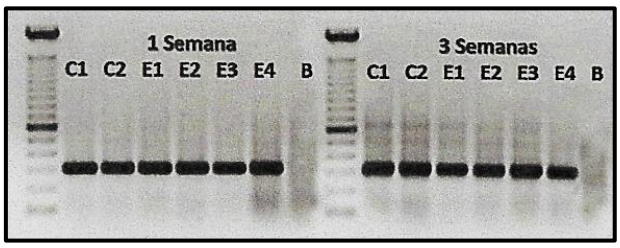

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados pela PCR semiquantitativa obtidos a partir dos cDNAs das amostras dos grupos C e E para a IL-6. As duas primeiras colunas de cada gel indicam um marcador de peso molecular (100pb). As duas últimas colunas de cada gel (B) indicam a reação branca.

Tabela 1. Estatística descritiva dos resultados do RT-PCR para a IL-6 nos dois grupos de estudo C e E. Os valores referem-se às densidades relativas das bandas no gel de agarose.

	1 semana						3 semanas					
	C1	**C2**	**E1**	**E2**	**E3**	**E4**	**C1**	**C2**	**E1**	**E2**	**E3**	**E4**
Média	0,572	0,590	0,890	1,021	0,997	1,052	0,567	0,548	1,465	1,539	1,562	1,552
DP	0,01		0,07				0,01		0,04			
CV	1,74	1,69	7,86	6,85	7,02	6,65	1,76	1,82	2,73	2,59	2,56	2,57

DP = Desvio Padrão; CV = Coeficiente de Variação (%).

Tabela 2. Resultados da densitometria dos produtos da RT-PCR semiquantitativa para IL-6 nos dois grupos de estudo C e E.

	Densidade Relativa Grupo C	**Densidade Relativa Grupo E**	**Aumento Transcricional Relativo no Grupo E**	**p**
1 semana	0,581±0,01	0,990±0,07	70,39%	0,0007
3 semanas	0,558±0,01	1,530±0,04	174,19%	0,000001

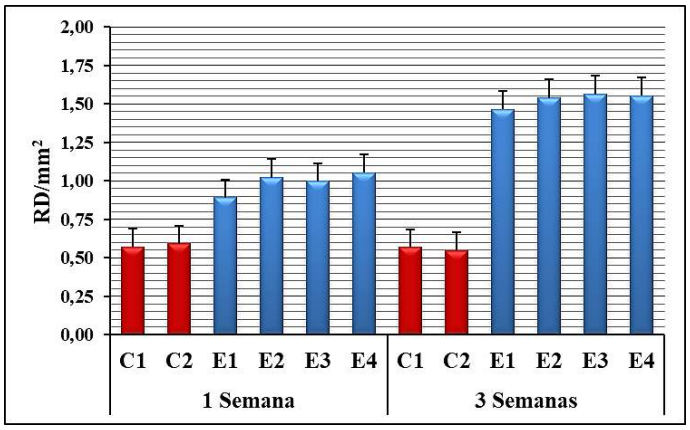

Figura 2. Resultados da densitometria dos produtos de RT-PCR semiquantitativa para o gene IL-6 nos dois grupos C e E.

5. Conclusão

A expressão gênica de IL-6 está aumentada em ratos diabéticos expostos à poluição atmosférica em relação aos ratos não expostos.

6. Referências Bibliográficas

ARBEX MA, MARTINS LC, DE OLIVEIRA RC, PEREIRA LA, ARBEX FF, CANÇADO JE, SALDIVA PH, BRAGA AL. Air pollution from biomass burning and asthma hospital admissions in a sugar cane plantation area in Brazil. J Epidemiol Community Health. 2007 May;61(5):395-400.

FERREIRA MI, DOMINGOS M, GOMES HDE A, SALDIVA PH, DE ASSUNÇÃO JV. Evaluation of mutagenic potential of contaminated atmosphere at Ibirapuera Park, São Paulo - SP, Brazil, using the Tradescantia stamen-hair assay. Environ Pollut. 2007 Jan;145(1):219-24.

GU J, SHI Y, ZHU Y, CHEN N, WANG H, ZHANG Z, CHEN T. Ambient air pollution and cause-specific risk of hospital admission in China: A nationwide time-series study. PLoS Med. 2020 Aug 6;17(8):e1003188.

HEHUA Z, YANG X, QING C, SHANYAN G, YUHONG Z. Dietary patterns and associations between air pollution and gestational diabetes mellitus. Environ Int. 2021 Feb;147:106347.

LI R, CAI M, QIAN ZM, WANG X, ZHANG Z, WANG C, WANG Y, ARNOLD LD, HOWARD SW, LI H, LIN H. Ambient air pollution, lifestyle, and genetic predisposition associated with type 2 diabetes: findings from a national prospective cohort study. Sci Total Environ. 2022 Nov 25;849:157838.

LI X, WANG M, SONG Y, MA H, ZHOU T, LIANG Z, QI L. Obesity and the relation between joint exposure to ambient air pollutants and incident type 2 diabetes: A cohort study in UK Biobank. PLoS Med. 2021 Aug 30;18(8):e1003767.

LI Z, LIU M, WU Z, LIU Y, LI W, LIU M, LV S, YU S, JIANG Y, GAO B, WANG X, LI X, WANG W, LIN H, GUO X, LIU X. Association between ambient air pollution and hospital admissions, length of hospital stay and hospital cost for patients with cardiovascular diseases and comorbid diabetes mellitus: Base on 1,969,755 cases in Beijing, China, 2014-2019. Environ Int. 2022 Jul;165:107301.

LI ZH, ZHONG WF, ZHANG XR, CHUNG VC, SONG WQ, CHEN Q, WANG XM, HUANG QM, SHEN D, ZHANG PD, LIU D, ZHANG YJ, CHEN PL, CHENG X, YANG HL, CAI MC, GAO X, KRAUS VB, MAO MB. Association of physical activity and air pollution exposure with the risk of type 2 diabetes: a large population-based prospective cohort study. Environ Health. 2022 Nov 6;21(1):106.

LICHTENFELS AJ, GOMES JB, PIERI PC, EL KHOURI MIRAGLIA SG, HALLAK J, SALDIVA PH. Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in São Paulo, Brazil. Fertil Steril. 2007 Jan;87(1):230-2.

LIM CC, THURSTON GD. Air Pollution, Oxidative Stress, and Diabetes: a Life Course Epidemiologic Perspective. Curr Diab Rep. 2019 Jul 19;19(8):58.

LIU F, ZHANG K, CHEN G, HE J, PAN M, ZHOU F, WANG X, TONG J, GUO Y, LI S, XIANG H. Sustained air pollution exposures, fasting plasma glucose, glycated haemoglobin, prevalence and incidence of diabetes: a nationwide study in China. Int J Epidemiol. 2022 Dec 13;51(6):1862-1873.

MIRAGLIA SG, SALDIVA PH, BÖHM GM. An evaluation of air pollution health impacts and costs in São Paulo, Brazil. Environ Manage. 2005 May;35(5):667-76.

MOHALLEM SV, DE ARAÚJO LOBO DJ, PESQUERO CR, ASSUNÇÃO JV, DE ANDRE PA, SALDIVA PH, DOLHNIKOFF M. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of Sao Paulo. Environ Res. 2005 Jun;98(2):196-202.

MÜNZEL T, GORI T, AL-KINDI S, DEANFIELD J, LELIEVELD J, DAIBER A, RAJAGOPALAN S. Effects of gaseous and solid constituents of air pollution on endothelial function. Eur Heart J. 2018 Oct 7;39(38):3543-3550.

NEMMAR A, AL-SALAM S, BEEGAM S, YUVARAJU P, YASIN J, ALI BH. Pancreatic effects of diesel exhaust particles in mice with type 1 diabetes mellitus. Cell Physiol Biochem. 2014;33(2):413-22.

NEMMAR A, SUBRAMANIYAN D, YASIN J, ALI BH. Impact of experimental type 1 diabetes mellitus on systemic and coagulation vulnerability in mice acutely exposed to diesel exhaust particles. Part Fibre Toxicol. 2013 Apr 15;10:14.

RIOJAS-RODRIGUEZ H, SOOD A, THURSTON GD, TO T, VANKER A, WUEBBLES DJ.Air Pollution and Noncommunicable Diseases: A Review by the Forum of International Respiratory Societies' Environmental Committee, Part 2: Air Pollution and Organ Systems. Schraufnagel DE, Balmes JR, Cowl CT, De Matteis S, Jung SH, Mortimer K, Perez-Padilla R, Rice Chest. 2019 Feb;155(2):417-426.

SALDIVA PH, LICHTENFELS AJ, PAIVA PS, BARONE IA, MARTINS MA, MASSAD E, PEREIRA JC, XAVIER VP, SINGER JM, BÖHM GM. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo, Brazil: a preliminary report. Environ Res. 1994 May;65(2):218-25.

SAMET JM, DEMARINI DM, MALLING HV. Biomedicine. Do airborne particles induce heritable mutations? Science. 2004 May 14;304(5673):971-2.

SIOUTAS C, KOUTRAKIS P, BURTON RM. A technique to expose animals to concentrated fine ambient aerosols. Environ Health Perspect. 1995 Feb;103(2):172-7.

SIOUTAS C, KOUTRAKIS P, GODLESKI J, FERGUSON ST, KIM CS, BURTON RM. Fine particles concentrators for inhalation exposures - Effect of particle size and composition. Joural of Aerosol Science 28:1057 - 1071, 1997.

SOMERS CM, YAUK CL, WHITE PA, PARFETT CLJ, QUINN JS. Air pollution induces heritable DNA mutations. Proc Natl Acad Sci USA. 2002 Dec 10;99(25):15904-7.

TAMAYO T, RATHMANN W, KRÄMER U, SUGIRI D, GRABERT M, HOLL RW. Is particle pollution in outdoor air associated with metabolic control in type 2 diabetes? PLoS One. 2014 Mar 11;9(3):e91639.

TANG X, ZHOU JB, LUO F, HAN Y, HEIANZA Y, CARDOSO MA, QI L. Air pollution and gestational diabetes mellitus: evidence from cohort studies. BMJ Open Diabetes Res Care. 2020 Mar;8(1):e000937.

WU Y, ZHANG S, QIAN SE, CAI M, LI H, WANG C, ZOU H, CHEN L, VAUGHN MG, MCMILLIN SE, LIN H. Ambient air pollution associated with incidence and dynamic progression of type 2 diabetes: a trajectory analysis of a population-based cohort. BMC Med. 2022 Oct 31;20(1):375.

YANG BY, FAN S, THIERING E, SEISSLER J, NOWAK D, DONG GH, HEINRICH J. Ambient air pollution and diabetes: A systematic review and meta-analysis. Environ Res. 2020 Jan;180:108817.

YU G, AO J, CAI J, LUO Z, MARTIN R, DONKELAAR AV, KAN H, ZHANG J. Fine particular matter and its constituents in air pollution and gestational diabetes mellitus. Environ Int. 2020 Sep;142:105880.

ZHANG H, WANG Q, HE S, WU K, REN M, DONG H, DI J, YU Z, HUANG C. Ambient air pollution and gestational diabetes mellitus: A review of evidence from biological mechanisms to population epidemiology. Sci Total Environ. 2020 Jun 1;719:137349.

ZHOU Y, LIU Y, QIU W, ZENG J, CHEN X, ZHOU H, LI A, ZHOU J. Exposure to residential indoor air induces heritable DNA mutations in mice. J Toxicol Environ Health A. 2009;72(24):1561-6.