

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO À POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA EM CONCENTRAÇÕES
URBANAS NA FUNÇÃO TESTICULAR DE RATOS WISTAR.**

TESE DE DOUTORADO

EDUARDO PORTO RIBEIRO

Orientador: Prof. Dr. Ernani Luis Rhoden

PORTO ALEGRE, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

*EFEITO DA EXPOSIÇÃO À POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA EM CONCENTRAÇÕES
URBANAS NA FUNÇÃO TESTICULAR DE RATOS WISTAR.*

EDUARDO PORTO RIBEIRO

Orientador: Prof. Dr. Ernani Luis Rhoden

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina: Ciências Médicas, para
obtenção do grau de Doutor em
Medicina.

Tese de Doutorado
Porto Alegre, 2010

Orientador: Prof. Dr. Ernani Luis Rhoden

Professor Adjunto Livre-Docente da Disciplina de Urologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UCSPA)

Professor do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da UFRGS

Professor Adjunto do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UCSPA

Pesquisador nível II do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

LOCAL DE REALIZAÇÃO

- Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da UCSPA

À minha família, pelo amor, estímulo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Ernani Luis Rhoden, cientista cujo incentivo, apoio e ensinamentos, desde o início desta contínua jornada na pós-graduação, foram absolutamente essenciais.

À Professora Doutora Claudia Rhoden, chefe do Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica da UCSPA, pelo apoio e confiança.

À colega pesquisadora e doutoranda Grazielle Halmenschlager, cujo auxílio direto em várias etapas da pesquisa permitiu a realização deste estudo.

À colega pesquisadora e doutoranda Ana Cláudia Zanchi que, em conjunto com a Professora Cláudia Rhoden, foi responsável pela idealização e desenvolvimento da “casinha”, em outras palavras, da câmara de exposição à poluição atmosférica, na qual este trabalho foi desenvolvido.

Aos amigos Fernando Bastos Duarte e Tiana Gabriela Burmann, pelo fraterno e prazeroso apoio logístico a esta jornada.

Ao Dr. Osmar Luiz Magalhães de Oliveira, que em prol da pesquisa, e de forma extremamente cordial e prestativa, realizou em seu laboratório as análises por quimioluminescência.

A Professora Doutora Maria Isabel Albano Edelweiss, por ter me apoiado em vencer dificuldades e buscar soluções no início desta pesquisa, em continuidade com a ajuda já oferecida durante o curso de mestrado.

À equipe do laboratório Macro e Micro Anatomia Patológica, de Florianópolis, e em particular aos Drs. Maria Beatriz Cacesse Shiozawa e Gianfranco Luigi Colombeli, que me cederam gentilmente seu sistema de microscopia e captura de imagem para realização das fotografias de histologia.

Ao grupo de urologistas com os quais tenho a felicidade de conviver e trabalhar, os Drs. Sérgio Porto, Rogério Paulo Moritz, Marcio Ikeda e Flávio José Fernandes Lima, pela compreensão pelos longos períodos de ausência do trabalho dedicados ao doutorado.

Aos funcionários do PPG em Medicina: Ciências Médicas, Vera Suzana Ribeiro, Lucas Garcia, Luciano T de Azevedo, Mayara Costa da Silva e Mariana Andrigueto pela competência e disponibilidade.

E à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado que financiou parte da pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	08
INTRODUÇÃO.....	09
REVISÃO DA LITERATURA.....	11
Material Particulado.....	16
Ozônio.....	23
Dióxido de Nitrogênio.....	28
Dióxido de Enxofre.....	31
Efeitos adversos na saúde da poluição atmosférica: Estudos Clínicos.....	33
Avaliação de Toxicidade Testicular.....	40
Modelos experimentais de exposição à poluição atmosférica.....	46
Efeitos adversos à função testicular da poluição atmosférica.....	49
OBJETIVOS.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ARTIGO CIENTÍFICO.....	74
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
ANEXO 1 – Descrição do processamento histológico e contagem celular histológica	96

RESUMO

Introdução: O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição em níveis habituais de poluição atmosférica em um ambiente urbano na função testicular de ratos.

Método: Vinte ratos Wistar foram randomicamente alocados, desde o período fetal, em duas câmaras de exposição, filtrada (grupo CF) e não filtrada (grupo CNF). As câmaras foram construídas perto de uma área de tráfego intenso, com uma concentração ambiente média de material particulado de até 2.5 nanômetros de diâmetro (PM_{2.5}) de 22.1 µg/m³. Após 150 dias os ratos foram mortos por guilhotinamento e a massa testicular, o estresse oxidativo do homogeneizado testicular e a concentração de testosterona total sérica e intra-testicular foram aferidos. Além disto, uma avaliação histológica testicular qualitativa e quantitativa foi realizada. Para cada rato, 10 tubulos seminíferos arredondados consecutivos em ciclo VII-VIII da espermatogênese foram avaliados em relação aos seguintes parâmetros: diâmetro tubular médio; contagem celular histológica de espermatídes redondas, paquítenos e células de Sertoli com nucléolo evidente; avaliação das proporções entre estes tipos celulares.

Resultados: As massas testiculares absolutas (gm) foram menores no grupo CNF (1.86 ± 0.18 vs 1.64 ± 0.13; p < 0.01). As médias das testosteronas sérica (ng/dL) e intra-testicular (ng/gm de testículo) foram 2.8 vezes maiores no grupo CNF (respectivamente, 208 ± 109 vs 577 ± 395; p = 0.02 e 26.6 ± 17.2 vs 106.3 ± 76.5; p = 0.01). Não houve diferença estatística entre os grupos CF e CNF em relação ao estresse oxidativo do homogeneizado testicular e aos desfechos histológicos avaliados.

Conclusões: Ratos machos expostos à poluição atmosférica em concentrações de ambientes urbanos apresentam testículos com menor massa e concentrações séricas e intra-testiculares de testosterona total maiores que ratos respirando ar filtrado. A espermatogênese, avaliada por contagem celular histológica, não foi influenciada pela exposição a estes níveis de poluição atmosférica.

INTRODUÇÃO

A poluição atmosférica antropogênica é hoje um sério problema de saúde pública mundial. A urbanização rápida, associada ao aumento das emissões industriais e veiculares, vem gradativamente deteriorando a qualidade do ar que respiramos. Vários estudos epidemiológicos vêm demonstrando de forma consistente que a poluição atmosférica está associada com doenças cardiovasculares e respiratórias, câncer de pulmão e mortalidade.

Depois de inaladas, substâncias nocivas podem ficar aprisionadas nos pulmões, causando danos locais, ou difundir através da membrana capilar alveolar para a circulação sistêmica, afetando diretamente órgãos distantes. Além disso, a inflamação pulmonar pode contribuir indiretamente na gênese dos efeitos sistêmicos da poluição aérea, ao aumentar os níveis sanguíneos de substâncias inflamatórias, como as citocinas, provocando estresse oxidativo. Alguns componentes do material particulado em suspensão no ar, como hidrocarbonetos poliaromáticos, dioxinas e nitrofenóis, têm a capacidade de agir como desreguladores endócrinos, com potencial de alterar a função e regulação testiculares.

Estudos epidemiológicos recentes vêm sugerindo que a poluição atmosférica pode prejudicar a qualidade seminal. Vários componentes da poluição atmosférica foram associados em estudos experimentais à toxicidade testicular. Além disso, foi demonstrado que a exposição a níveis extremamente altos de escapamento de motor a diesel pode diminuir a produção de espermatozóides, aumentar os níveis séricos de testosterona e diminuir os níveis séricos de FSH e LH em ratos e camundongos.

Nas últimas duas décadas, a comunidade científica mundial assistiu travar-se um polêmico debate sobre uma possível diminuição da fertilidade masculina nos últimos 50 anos, representada por uma piora progressiva da qualidade dos espermogramas registrados no período. Este assunto, ainda não resolvido, acabou por impulsionar uma gama de estudos envolvendo diversos agentes tóxicos possivelmente envolvidos. Em 2006, em dissertação de mestrado, apresentei os efeitos da exposição subcrônica às ondas eletromagnéticas dos telefones celulares na função testicular. Na mesma linha de pesquisa, da investigação de exposição a possíveis fatores tóxicos ambientais aos

testículos, surgiu o interesse em avaliar os efeitos à exposição à poluição atmosférica, motivado pelo desenvolvimento no mesmo período, pelas pesquisadoras Claudia Ramos Rhoden e Ana Cláudia Zanchi, de uma sofisticada câmara de exposição à poluição. Neste contexto, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da exposição a níveis habituais de poluição atmosférica em um ambiente urbano na função testicular de ratos.

REVISÃO DA LITERATURA

O ar puro é considerado um requisito básico de saúde e bem-estar. Embora um grande número de atividades físicas naturais (erupções vulcânicas, incêndios, etc.) possa liberar diferentes poluentes no meio ambiente, atividades antropogênicas são as maiores causas da poluição ambiental atmosférica. Embora produtos químicos nocivos possam escapar para o ambiente em acidentes, a maior parte dos poluentes é liberada no ar por instalações industriais, escapamento de veículos e outras atividades, com conseqüente risco de dano à saúde humana e ao meio ambiente (1). Poluição atmosférica pode ser definida como a presença de substâncias estranhas na atmosfera, resultantes da atividade humana ou de processos naturais, em concentrações suficientes para interferir direta ou indiretamente na saúde, segurança e bem estar dos seres vivos (2).

Os humanos inalam aproximadamente 20 m^3 de ar por dia, que entra em contato direto com os 100 m^2 de superfície pulmonar. Destes, 350 litros de oxigênio difundem através da membrana basal dos capilares alveolares nos 10 000 litros de sangue circulando pelos pulmões diariamente. Desta forma, o trato respiratório entra em contato com um grande volume de ar ambiente e seus componentes diariamente. A urbanização rápida e a industrialização com o concomitante aumento das emissões veiculares e industriais têm deteriorado a qualidade do ar que respiramos. As substâncias nocivas inaladas, especialmente material particulado, não somente ficam retidas nos pulmões causando efeitos locais danosos, mas possuem também o potencial de entrar na circulação sistêmica pela membrana basal dos capilares alveolares e afetar outros órgãos do corpo.

Ao longo da história recente, vários casos de aumento agudo de mortalidade associados a períodos de intensa poluição foram registrados em diversas localidades. O exemplo mais clássico e mais citado é o da cidade de Londres, ocorrido entre os dias 5 e 9 de dezembro de 1952. Nesta ocasião, uma conjuntura de efeitos climáticos (inversão térmica e ausência de vento), associada à intensa poluição, emitida basicamente da queima de carvão mineral para aquecimento doméstico, resultou numa concentração de fumaça que excedeu $4000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (3). Os registros demonstraram que

esta situação foi sucedida por um excesso de 4000 mortes nas três semanas que seguiram o episódio, o equivalente a três vezes mais mortes que o esperado. (Figura 1) Não só isto, a taxa de mortes continuou mais alta que o esperado por vários meses. Uma reanálise recente dos dados concluiu que 12000 mortes adicionais podem ser atribuídas à poluição daquela semana, indicando que o aumento da mortalidade não foi apenas devido à antecipação de mortes de indivíduos já muito doentes, porque se este fosse o caso, seguir-se-ia uma queda na taxa de mortalidade (4).

Há aproximadamente vinte cinco anos atrás o mundo desenvolvido experimentou algum sucesso na luta contra a poluição até então tradicional (queima de combustíveis fósseis, principalmente carvão mineral), com o desenvolvimento, regulamentação e implementação de melhorias no processo de queima e liberação de fumaça. De lá para cá, entretanto, a poluição atmosférica reemergiu como um dos principais focos de preocupação em relação à saúde pública. Uma das razões é que embora a poluição resultante da combustão de fósseis tradicionais seja liberada em concentrações bem menores do que há 50 anos, outros componentes tornaram-se proeminentes, ganhando destaque a poluição atmosférica fotoquímica, caracterizada por altas concentrações de ozônio durante dias quentes e ensolarados, e a descarga de óxidos de nitrogênio, produzidos pelo crescente número de veículos automotivos (5).

No ano de 2000 a Organização Mundial da Saúde (OMS) iniciou um projeto envolvendo mais de 100 pesquisadores de 30 instituições e 200 revisores, com o objetivo de mensurar a carga global de morte e doenças provocadas pela poluição atmosférica externa, baseando-se nas concentrações de material particulado (6). A conclusão do estudo foi alarmante: a poluição atmosférica externa é responsável direta por aproximadamente 3% da mortalidade cardiovascular, 5% das mortes por câncer de traquéia, brônquio e pulmão e 1% das mortes por infecção respiratória aguda em crianças com menos de 5 anos de idade. Estes números equivalem a aproximadamente 0.8 milhões (1.2%) de mortes prematuras por ano, e 6.4 milhões (0.5%) de anos de vida perdidos.

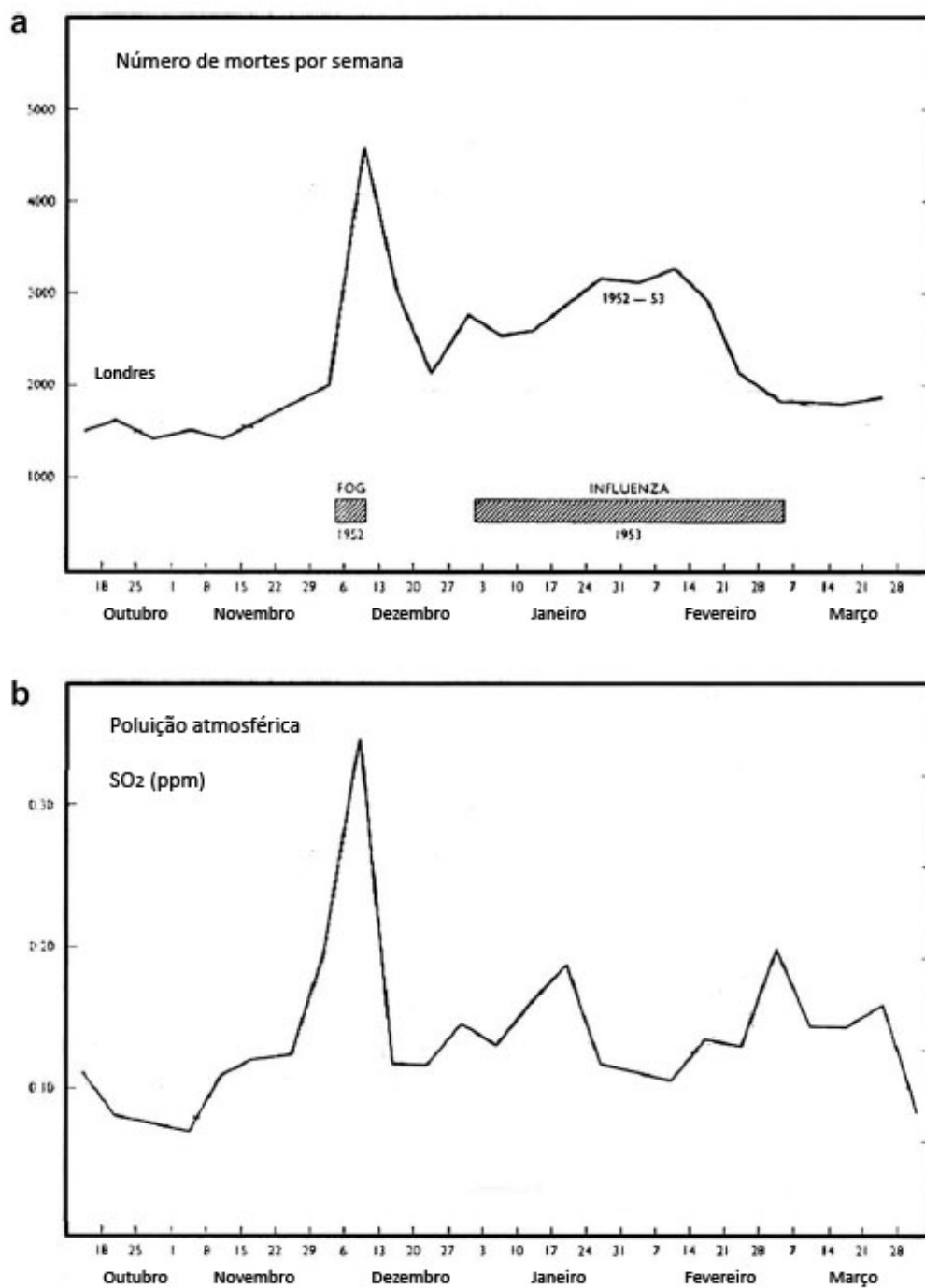


Figura 1. Cidade de Londres, outubro de 1952 a março de 1953. Percebe-se nitidamente o expressivo aumento do número de mortes com o aumento da poluição atmosférica, no início de dezembro (3).

Esta carga de doença ocorre predominantemente nos países em desenvolvimento, 65% somente na Ásia. É importante frisar que estes dados levam em conta apenas a mortalidade, e não a morbidade (i.e., anos vividos com deficiência física), bem mais difícil de ser aferida devido a limitações na base de dados epidemiológica global, mas que certamente recebe impacto ainda maior.

Para piorar, estes dados tratam apenas da poluição atmosférica externa, sem levar em consideração a poluição interna, ou de dentro de casa, um problema grave, sobretudo nos países mais pobres.

Mais da metade da população mundial depende de estrume, restos de plantações ou carvão para geração das suas necessidades energéticas básicas, como o preparo de alimentos e aquecimento. Estes combustíveis sólidos em fogueiras abertas ou fornos sem chaminés produzem poluição atmosférica interna, ou seja, dentro de casa. A fumaça interna resultante contém uma gama de poluentes danosos à saúde, incluindo pequenas partículas de fuligem e poeira, capazes de penetrar profundamente nos pulmões. Em moradias pouco ventiladas, esta fumaça pode exceder os níveis aceitáveis de partículas pequenas no ambiente externo em mais de 100 vezes. A exposição é particularmente alta entre mulheres e crianças, que passam a maior parte do tempo próximos da lareira da casa. Estima-se que, a cada ano, a poluição atmosférica interna seja responsável pela morte de 1.6 milhões de pessoas – 1 morte a cada 20 segundos – devido à pneumonia (risco maior em crianças com menos de cinco anos), doença pulmonar obstrutiva crônica (principalmente com o uso de carvão) e câncer de pulmão (7). Em uma revisão sistemática recente, a evidência de uma ligação entre poluição atmosférica interna e asma, catarata e tuberculose foi considerada moderada. Além disto, acredita-se que a poluição esteja ligada a resultados adversos na gestação, particularmente a baixo peso ao nascer, doença cardíaca isquêmica e cânceres de nasofaringe e laringe (7). A Organização Mundial da Saúde após análise de fatores de risco para doenças em geral, concluiu que a poluição atmosférica interna é o oitavo fator mais importante, responsável por mais de 1.6 milhões de mortes e 2.7% do total de doenças ao redor do globo (8). Desta forma, o uso de combustíveis poluentes impõe um grande fardo à saúde de famílias pobres de países em desenvolvimento.

A seguir, os principais componentes da poluição atmosférica serão isoladamente descritos.

Material Particulado (PM)

Existem atualmente provas consistentes de que o material particulado (PM) atmosférico, na concentração a que estão expostas as populações urbanas de países desenvolvidos e em desenvolvimento, é capaz de promover efeitos adversos à saúde (7, 9). Embora afete principalmente o sistema respiratório e o cardiovascular, a gama de efeitos sobre a saúde pode ser ampla. Indivíduos com outras doenças e saúde fragilizada ou em extremos de idades são os mais susceptíveis aos efeitos adversos da poluição. O risco aumenta com o grau de exposição, mas há pouca evidência que sugira um limite abaixo do qual nenhum efeito adverso à saúde seria esperado. Em outras palavras, devido à variabilidade individual de níveis de exposição e de resposta a ela, é improvável que o simples seguimento de qualquer norma ou diretriz possa determinar completa proteção contra todos os possíveis efeitos adversos à saúde do PM.

A escolha do indicador utilizado para a medida da concentração de PM na atmosfera também requer consideração. Atualmente, a maioria dos sistemas de controle do ar e, conseqüentemente, dos estudos epidemiológicos, é baseada na medida do material particulado de até 10 micrômetros (PM₁₀) como indicador de exposição, por ser este considerado o principal responsável pelos efeitos adversos da poluição atmosférica na saúde em ambientes urbanos. O PM₁₀ representa a massa de partículas inaláveis, ou seja, pequenas o suficiente para conseguir entrar no trato respiratório e penetrar na caixa torácica. É constituído de partículas grossas (entre 2,5 e 10 µm), finas (diâmetro inferior a 2,5 µm, PM_{2.5}) e ultrafinas (diâmetro inferior a 0,1 µm ou 100 nm). As partículas finas têm maior probabilidade de deposição nas vias aéreas condutoras mais finas e nos alvéolos pulmonares.

Dados de um estudo da *American Cancer Society* (ACS) e de pesquisadores de Harvard, realizado em seis cidades americanas (*Harvard Six Cities Study*), recentemente atualizados, demonstraram associações robustas entre exposição de longo prazo ao PM_{2.5} e aumento global da mortalidade (10-13). A concentração média de PM_{2.5} era de 18 µg/m³ nas seis cidades-estudo e de 20 µg/m³ no estudo da ACS. Em nenhum destes estudos foi possível determinar limiares seguros de concentração de

poluição atmosférica abaixo dos quais não há risco para a saúde. No estudo da ACS a incerteza estatística das estimativas de risco ficava evidente somente em concentrações abaixo de $13 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Dockery et al. (10) em pesquisa em cidades com diferentes concentrações aérea de partículas encontraram riscos a longo prazo semelhantes nas duas cidades com as menores concentrações de $\text{PM}_{2.5}$ (11 e $12,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Em comparação, na cidade com a concentração média imediatamente superior ($14,9 \mu\text{g}/\text{m}^3$) o aumento do risco já ficou aparente, sugerindo que os efeitos na saúde podem ser esperados quando as concentrações médias anuais atingem a faixa de 11-15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Portanto, uma concentração média anual de $\text{PM}_{2.5}$ de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ pode ser considerada, segundo a literatura científica disponível, abaixo da média para o aumento da mortalidade. Em relação a exposições agudas, de curta duração, vários estudos demonstraram que para cada aumento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ na concentração diária de PM_{10} a mortalidade aumenta aproximadamente 0.5% (14, 15).

A Organização Mundial da Saúde estabeleceu em 2004 as seguintes recomendações de concentrações padrão: para PM_{10} , até $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de média anual e $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de média de 24 horas; para $\text{PM}_{2.5}$, até $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de média anual e $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de média de 24 horas. Estas recomendações de padrões de concentração ou metas de redução propostas pela OMS representam, conforme acima explicado, valores associados à diminuição do risco de doenças e que ao mesmo tempo sejam factíveis, visto terem sido atingidas por países desenvolvidos (10, 11, 13). No Brasil, a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) que determina os padrões nacionais foi submetida há mais tempo, em junho de 1990 (resolução CONAMA nº03/90), sendo para PM_{10} de até $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de média anual e $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de média de 24 horas, não devendo este último ser excedido mais do que uma vez ao ano. Esta resolução classifica a concentração atmosférica de PM_{10} por níveis: atenção (entre 250 e $420 \mu\text{g}/\text{m}^3$), alerta (entre 420 e $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e emergência ($> 500 \mu\text{g}/\text{m}^3$).

As partículas grossas são produzidas principalmente por processos mecânicos, tais como atividades industriais e da construção, re-suspensão de poeira da estrada por veículos e pelo vento, re-suspensão de cinza residual da queima de óleo (*residual oil fly ash*, ROFA) e de carvão, sal marinho, e fragmentos biológicos como pólen, bolor, esporos, fungos e endotoxinas bacterianas. O $\text{PM}_{2.5}$ se origina principalmente a partir

de fontes de combustão, entre elas os combustíveis automotivos como o diesel e a gasolina, além de carvão mineral e vegetal (7). A maior parte das partículas finas é formada a partir da condensação de gases, embora possam também ser formadas diretamente como partículas primárias. Tipicamente, as partículas originam-se como ultrafinas, sendo produzidas por nucleação (condensação de substâncias formadas por vaporização em altas temperaturas ou reações químicas na atmosfera). Posteriormente, estes núcleos crescem por coagulação (fusão de mais de um núcleo formando uma partícula maior) ou por condensação de gases na superfície da partícula (16). A eficiência destes processos (coagulação e condensação) diminui com o aumento do tamanho das partículas, resultando em um limite de tamanho superior de aproximadamente um micrômetro, normalmente excedido apenas quando há crescimento higroscópico em ambientes úmidos. Desta forma, as partículas finas tendem a se acumular em um tamanho de 0,1 – 1 μm .

Os principais gases precursores de partículas finas são o dióxido de enxofre, os óxidos de nitrogênio, a amônia e os compostos orgânicos voláteis. Conseqüentemente, mudanças na concentração atmosférica destes gases podem afetar a concentração e composição das partículas. O dióxido de enxofre é convertido por oxidação em ácido sulfúrico (H_2SO_4). O dióxido de nitrogênio é oxidado em ácido nítrico (HNO_3), que por sua vez reage com a amônia para formar o nitrato de amônia (NH_4NO_3). Estas partículas produzidas por reações intermediárias de gases na atmosfera são chamadas partículas secundárias. Desta forma, a fração fina do material particulado é composta por nitrato, sulfato, amônia, carbono elementar (grafite), íons de hidrogênio (material ácido) e um grande número de compostos orgânicos (dioxinas, benxeno, fenóis) e metais pesados (cádmio, chumbo, zinco, entre outros). Cada um destes componentes tem sido relacionado em diversos estudos experimentais de exposição a efeitos adversos específicos (7, 17).

A concentração, proporção entre partículas grossas e finas, bem como a composição das mesmas, pode variar consideravelmente entre diferentes cidades, conforme a geografia local, meteorologia, estação do ano e fontes de PM específicas. Em países desenvolvidos tipicamente dois terços do $\text{PM}_{2.5}$ são relacionados a fontes antropogênicas. Na Califórnia, 50 a 70% do PM foram relacionados à formação

secundária de sulfato e nitrato de amônia e PM primário provenientes do escapamento automotivo (18). Já em outras áreas, os incêndios florestais e as queimadas para limpeza de terras para agricultura podem ser uma importante fonte de PM_{2.5}. Durante estes episódios, é comum que os níveis de PM aumentem três a quatro vezes.

A proporção PM_{2.5}/PM₁₀ de 50% é típica de centros urbanos de países em desenvolvimento, variando nos centros urbanos dos Estados Unidos (EUA) e da Europa entre 0.5 e 0.8 (19, 20). Esta proporção é utilizada para se realizar converções de dados epidemiológicos entre PM₁₀ e PM_{2.5} visando estabelecer uniformização para efeitos comparativos. No entanto, estes dados exigem monitoramento contínuo, porque mudanças em políticas sociais e econômicas podem ter efeitos marcantes nas características do PM. Como um exemplo, após a unificação da Alemanha, em 1990, foram observadas reduções nas concentrações médias de PM₁₀ e PM_{2.5}, redução da presença de dióxido de enxofre no PM, e um aumento da concentração de partículas ultrafinas (PM_{0.1}), representando o decréscimo relativo da contribuição da indústria pesada à poluição atmosférica e o aumento relativo da contribuição do tráfego automotivo (21). Nos EUA, um dos principais componentes do PM em todas as regiões é o carbono, enquanto o sulfato é mais presente nos estados do leste (20 – 50%) e o nitrato de amônia na Califórnia (> 25%).

Concentrações médias anuais de PM_{2.5} maiores que 15 µg/m³ são registradas em cerca de 50% dos centros urbanos americanos, enquanto que a concentração média de 24 horas na cidade do México freqüentemente excede os 65 µg/m³ (7). Países do norte da Europa conseguiram diminuir a média anual de PM₁₀ para até 20 µg/m³. Já nas áreas da Europa com alta densidade populacional e de tráfego, os níveis são maiores, tendo como exemplos, Amsterdam e Berlim (45 – 50 µg/m³), Budapeste (57 µg/m³), Pisa (61 µg/m³) e Atenas (98 µg/m³) (22, 23).

Países populosos asiáticos têm níveis ainda maiores, com concentrações médias anuais de PM₁₀ em alguns centros urbanos chineses que variam entre 115 e 275 µg/m³, enquanto em Bangkok concentrações médias de 24 horas entre 80 e 100 µg/m³ foram publicadas em mais de um estudo (24, 25).

Dados continuamente divulgados pela Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Porto Alegre (SMAM), através do seu portal eletrônico, entre janeiro a novembro de

2009, demonstraram uma concentração média anual de PM_{10} de $33.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ na região metropolitana de Porto Alegre (medidor localizado no prédio da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – USCPA). Em 30 das 250 (12%) medições de 24hs deste período a concentração média de PM_{10} superou o limite da OMS de $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$. A máxima do período foi de $95.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (26).

Dados do último relatório da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), publicado em 2008, indicam que a maior concentração em SP ocorre no município de Cubatão, com concentração média anual de PM_{10} de aproximadamente $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$, enquanto na região metropolitana de São Paulo a concentração média anual PM_{10} fica em torno de $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Figura 2).

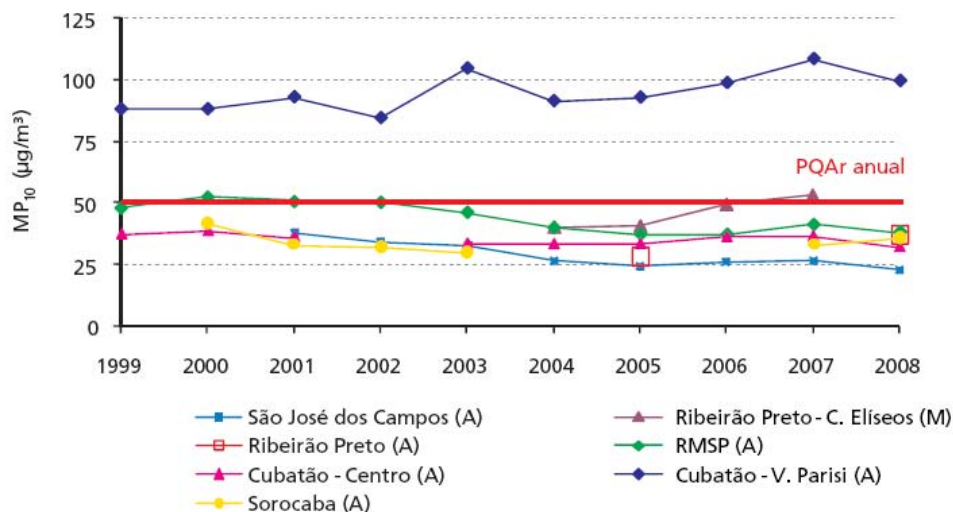


Figura 2. Evolução das concentrações médias anuais de PM_{10} (fonte: Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo 2008)

Os padrões atuais de controle de emissão de PM levam em consideração apenas o tamanho das partículas. Este modelo assume implicitamente que todas as partículas têm a mesma toxicidade, independente da sua composição. Da mesma forma, a OMS determinou que os limites estabelecidos de concentração de $PM_{2.5}$ sejam também considerados válidos para interiores (ambientes internos), especialmente no mundo em desenvolvimento, onde grandes populações estão expostas a níveis

elevados de partículas derivadas da combustão de biomassa em fogões de cozinha à lenha e lareiras para aquecimento, sem chaminés.

No geral, estudos epidemiológicos que compararam a toxicidade relativa dos produtos da combustão de combustíveis fósseis e de biomassa, obtiveram estimativas semelhantes, tanto em cidades de países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Entretanto, vários estudos sugerem uma ligação entre as propriedades químicas específicas das partículas com os seus efeitos biológicos (27). Como exemplo, estudos experimentais demonstraram uma maior liberação de mediadores inflamatórios em animais expostos ao PM extraído da atmosfera do que nos expostos somente a partículas de carbono elementar de mesmo tamanho (28). Entretanto, faltam ainda evidências inequívocas de que os efeitos tóxicos à exposição às partículas sejam determinados por ações biológicas de constituintes químicos específicos e não apenas pela presença física das partículas nos tecidos. O mais provável, é que esta falta de evidência exista devido à dificuldade em se controlar, em estudos de inalação de partículas, a enorme variabilidade das suas características de tamanho e composição, além da diversidade nos protocolos de inalação e desfechos biológicos estudados, gerando múltiplas combinações de características em estudo e desfechos. Dentre as principais características das partículas que poderiam estar relacionadas a efeitos adversos à saúde, destacam-se tamanho, concentração de massa e de número das partículas, acidez, composição química da superfície e do núcleo das partículas, presença de metais, carbono (orgânico e elementar ou preto), origem biogênica, entre outras (27). Além disso, outra propriedade que pode interferir nos efeitos adversos à saúde é a biopersistência. Conforme a solubilidade, determinados componentes do PM depositados nos pulmões podem se dissolver em questão de horas ou dias ou, no caso de substâncias muito insolúveis, permanecer nos alvéolos pulmonares indefinidamente, aumentando a chance de produzirem efeitos nocivos (29).

Como já previamente mencionado, o PM₁₀ representa a massa de partículas inaláveis, ou seja, pequenas o suficiente para conseguir entrar no trato respiratório, com consequentes efeitos adversos aos pulmões e outros órgãos. Os efeitos pulmonares envolvem a formação de resposta inflamatória, a exacerbação de doenças pulmonares pré-existentes (i.e., hiper-reatividade brônquica) e o comprometimento dos mecanismos

de defesa pulmonares, com aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de infecções (17, 30).

A inflamação é considerada um dos principais mecanismos na gênese de muitos dos efeitos adversos à saúde relacionados ao PM. A causa principal desta inflamação é a o aumento do estresse oxidativo, via fatores de transcrição redox-sensíveis, embora um mecanismo neurogênico envolvendo fibras C-reativas e histamina também tenha sido descrito (31-33). Em asmáticos, o PM é capaz de potencializar a inflamação alérgica, agravando a doença (34).

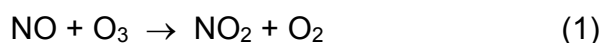
Eventos genotóxicos podem explicar os efeitos carcinogênicos das partículas. Tanto um mecanismo de genotoxicidade direto, mediado pelas partículas, quanto um indireto, mediado por células inflamatórias de indivíduos expostos ao PM foi descrito (35-37). Em relação aos efeitos cardiovasculares, células endoteliais expostas diretamente ao PM₁₀ demonstram aumento do potencial em gerar trombose (38). Além disto, a exposição aguda ao PM resulta em disfunção endotelial e a exposição crônica pode acelerar a progressão da aterosclerose (39-41). O transporte sanguíneo de citocinas produzidas na inflamação pulmonar também contribui como um mecanismo indireto de efeitos sistêmicos (42). Um estado inflamatório sistêmico aumentado pode interferir na cascata de coagulação com conseqüente aumento do risco de ocorrência de acidente vascular cerebral e infarto agudo do miocárdio (43). Além disso, o PM pode ter um efeito direto sobre o miocárdio, pela circulação de componentes químicos da sua composição com potencial de interferir na função cardíaca ou no controle autonômico, podendo alterar, por exemplo, a pressão arterial sistêmica ou a freqüência cardíaca (39, 41).

Estudos clínicos e epidemiológicos associaram a exposição ao PM a uma série de efeitos adversos para a saúde, entre eles: aumento da mortalidade total, cardiovascular e respiratória; aumento do número de admissões hospitalares em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica e doença cardiovascular; exacerbação dos sintomas e maior uso de medicações na asma; aumento do risco de infarto agudo do miocárdio; aparecimento de doença pulmonar inflamatória e doenças inflamatórias sistêmicas; disfunção vascular e endotelial; desenvolvimento de aterosclerose; maior incidência de infecções; e aumento do risco de câncer de pulmão.

Ozônio (O₃)

O O₃, um alótropo do oxigênio, é um dos componentes gasosos da poluição atmosférica não diretamente emitido por fontes primárias. Trata-se de um agente oxidante formado principalmente por uma série de reações fotoquímicas complexas na atmosfera que ocorrem após a absorção de energia solar pelas moléculas de NO₂, formando NO e O. O átomo isolado de oxigênio (O) é instável, e logo reage com o O₂, formando o O₃. Deste modo, o O₃ é classificado como um poluente secundário. Depois de formado na atmosfera, o O₃ tem uma meia vida de dias a semanas, podendo ser transportado por longas distâncias. É o mais persistente poluente do ar urbano, e é o principal responsável pela formação da névoa fotoquímica urbana mais conhecida como *smog*.

Como mencionado anteriormente, as emissões de óxidos de nitrogênio ocorrem predominantemente na forma de óxido nítrico (NO), compreendendo aproximadamente 95% do total. O poluente mais perigoso para a saúde humana, entretanto, é o óxido nítrico (NO₂), e a principal via de conversão do NO em NO₂ é a do O₃. As reações de conversão são as seguintes:



Como estas reações são rápidas, uma situação de equilíbrio (estado foto-estacionário), contendo porções dos três componentes, acaba sendo logo estabelecida. A reação 2 depende dos raios solares então não acontece à noite. Em áreas com menor concentração de NO₂, e na presença de O₃ em quantidade suficiente, a reação 1 pode converter todo o NO em NO₂ no período noturno. Esta situação é bastante comum em áreas rurais, onde a concentração de O₃ a noite pode cair à zero. Em ambientes mais poluídos, próximos das fontes geradoras como nos centros urbanos, normalmente há O₃ suficiente para completar a reação e manter o equilíbrio. O entendimento desta

relação química é importante no controle das concentrações tanto de NO₂ quanto de O₃.

Existe também uma concentração ambiente de fundo de O₃ atmosférico, atualmente representando menos da metade do total, que é oriunda do transporte descendente do O₃ formado na estratosfera pela quebra fotolítica direta do oxigênio. Na estratosfera, o O₃ desempenha uma função extremamente importante e está presente em uma proporção muito maior em relação a outros gases em comparação à troposfera. Uma notável característica deste gás é sua capacidade de absorver luz ultravioleta solar na faixa de 220-320 nm o que o torna um 'escudo' natural da Terra (camada de ozônio) para os seres humanos e a outras formas de vida, para o qual esses raios são nocivos.

Além disto, somente com a reação 3 não seria possível o acúmulo de grandes concentrações ambientes de O₃, que rapidamente é novamente quebrado pela reação 1, conforme descrito. A situação é diferente, entretanto, quando compostos orgânicos voláteis (COV) estão presentes na atmosfera. OS COV são gases de fontes antropogênicas e biogênicas como o monóxido de carbono (CO) e o metano (CH₄), com meias vidas bastante longas. A oxidação destes gases na presença de luz solar promove a formação de espécies altamente reativas, os radicais peróxido. Em uma atmosfera poluída, os radicais peróxido reagem com o NO formando NO₂ sem consumir moléculas de O₃, favorecendo a sua acumulação:



Desta forma, a concentração ambiente de O₃ depende de vários fatores, entre eles a intensidade da luz solar, da convecção atmosférica, a altura da camada de inversão térmica, a concentração dos óxidos de nitrogênio e dos COVs, além da razão entre os COVs e os óxidos de nitrogênio. Razões entre 4:1 e 10:1 são as mais favoráveis para a formação de O₃ (WHO, 2005).

A formação do O₃ em uma escala de tempo mais longa envolve reações onde baixas concentrações de óxidos de nitrogênio interagem com metano e CO, por exemplo, na atmosfera dos oceanos, aumentando a concentração de O₃ de fundo, que

hoje é o dobro da era pré-industrial. Em uma escala de tempo mais curta, em áreas de alta concentração de COVs, e na presença de luz solar e NO₂, a concentração ambiente de O₃ pode aumentar com rapidez.

Uma das conseqüências da reação 1 é que normalmente a concentração de O₃ é maior na periferia dos grandes centros, e em áreas rurais próximas aos centros urbanos, já que na área mais próxima da fonte poluidora a produção constante de NO₂ pelo tráfego consome parte do O₃.

O O₃ é um poluente de ambientes externos. Fontes geradoras de O₃ em ambientes internos são raras, e sendo extremamente reativo, o contato deste gás com as superfícies dos ambientes internos faz com que se reduza novamente em O₂. Desta forma, a razão do O₃ externo / interno seja alta, embora possa haver variações.

O padrão estabelecido pela OMS como limite máximo foi recentemente reduzido de 120 para 100 µg/m³ em uma média de 8 horas. O padrão da US-EPA baixou de 0.12 ppm de média de 1 hora para 0.08 ppm (ou 160 µg/m³) de média de 8 horas. Séries temporais recentes demonstraram o aparecimento de efeitos advesos agudos em níveis abaixo de 100 µg/m³ (7). Embora haja evidências de que a exposição de longo prazo pode trazer efeitos adversos crônicos, elas não são suficientes para permitir a determinação de uma recomendação de limites para média anual de exposição. A concentração troposférica de fundo de O₃, dependendo da região, pode chegar a 80 µg/m³. Durante o verão, na cidade de São Paulo, os níveis de O₃ chegam a exceder os 400 µg/m³ (44). O uso de carros a álcool e a mistura de álcool na gasolina aumentam o número de precursores de O₃ na atmosfera, particularmente o de aldeídos, o que eleva a concentração de O₃ (7).

A absorção do O₃ ocorre por via inalatória, ocorrendo principalmente no trato respiratório superior e vias aéreas intratorácicas (45, 46). A taxa de absorção pode variar, sendo inversamente proporcional a frequência respiratória e diretamente proporcional ao aumento do volume corrente (46).

Os danos à saúde em decorrência da absorção do O₃ ocorrem devido a uma série de eventos complexos, entre eles a oxidação direta dos componentes celulares, inflamação e reflexos neurais. Ao mesmo tempo, mecanismos adaptativos e de

proteção são ativados. Estes eventos ocorrem simultaneamente, e a interação entre eles que determina a magnitude do dano (7).

O O₃ é um potente agente oxidante, que pode induzir direta e indiretamente dano oxidativo em tecidos, mediado por uma série de transferências de elétrons. A instável molécula de O₃ inicia uma série de reações do tipo redox com moléculas adjacentes – proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA. A interação do O₃ com os lipídios provoca o início de um processo autocatalítico que prejudica integridade da membrana e organelas celulares. A oxidação de proteínas provoca fragmentação e degradação protéica na célula. Além disto, a formação de dobras anormais nas proteínas (na sua configuração tridimensional) devido à formação de ligações cruzadas proteína-proteína pode levá-las a se acumular no retículo endoplasmático, fenômeno idêntico ao que ocorre em algumas doenças neurológicas como o Alzheimer e o Parkinson (47, 48).

Além de danos celulares, a oxidação do DNA nuclear e mitocondrial pode causar uma série de mutações pontuais ou quebras de DNA, processos envolvidos normalmente na patogênese de neoplasias e no processo de envelhecimento (49, 50).

No curto prazo, o O₃ inalado causa inflamação difusa das vias aéreas, particularmente da mucosa nasal e bronquíolos terminais (51, 52). Os sistemas de defesa pulmonar são afetados, com oxidação do surfactante, que induz a apoptose alveolar (53), anormalidades agudas do epitélio ciliado (fusão ciliar, deficiência no transporte ciliar e aumento da permeabilidade trans-epitelial) (54), diminuição da atividade de macrófagos e efeitos prejudiciais aos linfócitos circulantes. Estas alterações podem levar horas a dias até serem revertidas.

O O₃ pode induzir a produção de mediadores inflamatórios no pulmão por uma série de mecanismos: geração local de substâncias bioativas (55); influxo de proteínas plasmáticas (i.e., sistemas cinina, complemento e de fatores de coagulação) (56, 57); liberação de mediadores inflamatórios pré-formados, como na degranulação de mastócitos (58); síntese de metabólitos do ácido araquidônico, com a ação de fosfolipases após a lise das membranas celulares (59); produção de fator ativador de plaquetas (60, 61); aumento dos níveis de óxido nítrico pulmonar pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (62); liberação de proteases lisossômicas através da ativação de leucócitos e macrófagos (63); ativação de células endoteliais, que

participam no processo de adesão e migração de leucócitos sanguíneos ao tecido pulmonar (64). Além disto, o O₃ pode induzir reação inflamatória sistêmica, induzindo resposta de fase aguda. Após uma exposição aguda, marcadores séricos de inflamação sistêmica (i.e., proteína C reativa, interleucinas) e de ativação do sistema complemento podem se elevar (65, 66).

Dados de estudos de exposição controlada em humanos demonstram claramente que os níveis de O₃ atualmente presentes em diversas áreas induzem alterações funcionais e bioquímicas, principalmente no trato respiratório. Exposições mais prolongadas podem causar alterações estruturais significativas aos pulmões, caracterizadas por hiperplasia mucosa difusa, estreitamento bronquiolar e fibrose alveolar. As evidências para a existência de efeitos cardiovasculares são menos conclusivas. O O₃ pode ainda induzir mutações nas células respiratórias, embora os resultados sobre carcinogênese sejam ainda inconclusivos (7).

Dióxido de nitrogênio (NO₂)

Embora existam várias espécies químicas de óxidos de nitrogênio, a que apresenta o maior interesse do ponto de vista da saúde humana é o NO₂. A maior parte do NO₂ circulante no ambiente urbano é proveniente da conversão pelo O₃ do óxido nítrico (NO) emitido pelas fontes de combustão poluentes, particularmente de motores de combustão interna de veículos automotivos e de navios, de fontes de aquecimento e de usinas geradoras de energia, em reações fotoquímicas já previamente descritas. Em uma escala global, as emissões de óxidos de nitrogênio de fontes naturais são maiores do que as antropogênicas. Entre as fontes naturais, destacam-se a intrusão de gases provenientes da estratosfera, ação bacteriana, vulcânica e os raios. Entretanto, como a emissão natural é dispersa, bem distribuída ao redor do globo, a concentração atmosférica de fundo dela resultante é bem pequena. Fontes internas incluem o cigarro e o uso de eletrodomésticos e aquecedores a gás e óleo.

Estudos experimentais em animais e humanos indicam que o NO₂ – em concentrações acima de 200 µg/m³ – é um gás tóxico com efeitos na saúde significativos. Além disto, conforme já explicado, através de reações fotoquímicas na presença de hidrocarbonetos e luz solar, o NO₂ é a maior fonte de O₃ na troposfera. O NO₂ está também sujeito a transformações atmosféricas adicionais que levam a formação de agentes oxidantes, participantes da conversão do NO₂ em óxido nítrico e do dióxido de enxofre (SO₂) em ácido sulfúrico, e subsequentemente, em seus sais de amônia neutralizantes. Além disso, estes novos poluentes gerados pela ativação fotoquímica do NO₂ são uma importante fonte de partículas finas (PM₁₀ e PM_{2.5}) orgânicas de nitrato e de sulfato. Desta forma, o NO₂ é um importante precursor de poluentes secundários para os quais efeitos na saúde humana estão bem comprovados.

Vários estudos epidemiológicos têm utilizado o NO₂ como um marcador do coquetel de poluentes relacionados à combustão, e em particular do tráfego rodoviário e ambientes internos. Para estes, muitas vezes é difícil separar os efeitos adversos do NO₂ dos provocados pelos co-poluentes. O nível máximo recomendado pela OMS de média anual para o NO₂ é de 40 µg/m³ e o de média de 1 hora é de 200 µg/m³.

Entretanto, se o NO₂ estiver sendo monitorado como um marcador da mistura de poluentes, níveis abaixo desta recomendação devem ser adotados (7).

Concentrações médias anuais de NO₂ em áreas urbanas geralmente encontram-se entre 20 e 90 µg/m³, variando conforme a hora do dia, estação do ano e fatores meteorológicos (67). Tipicamente, dois picos na concentração são observados, correspondentes às horas de congestionamento do tráfego, de ida e volta ao trabalho. As concentrações médias de 1 hora de NO₂ em avenidas movimentadas em horas de pico podem exceder os 940 µg/m³ (0.5 ppm) (7). Em cozinhas com fogões a gás sem exaustores a concentração máxima pode superar em muito a de ambientes externos, variando entre 230 e 2055 µg/m³ de NO₂ (7).

A absorção do NO₂ ocorre por via inalatória. Entre 70 e 90 % do NO₂ inalado é absorvido, embora uma porção significativa (aproximadamente 40 a 50%) seja removida na nasofaringe. Por este motivo, durante exercícios físicos, nos quais a inspiração muda progressivamente de nasal para oral, um aumento no aporte pulmonar de NO₂ é esperado (67-69). Estudos experimentais demonstraram que o NO₂ e os produtos do seu metabolismo podem permanecer nos pulmões por períodos prolongados. Os ácidos nítrico e nitroso e os seus sais foram observados no sangue e na urina após exposição ao NO₂ (67-69).

Em estudos experimentais o NO₂ pode gerar efeitos pulmonares metabólicos, estruturais, funcionais, inflamatórios e prejudicar a defesa pulmonar contra infecções. Há, entretanto, uma dificuldade em transpor os resultados destes estudos para humanos, devido a diferenças entre espécies na capacidade de inativação do NO₂, o que faz com que as concentrações tóxicas possam diferir consideravelmente (WHO, 2005). Por este motivo, os efeitos tóxicos que poderiam ocorrer em humanos são conhecidos, mas os efeitos que de fato ocorrem após a inalação de uma dose específica de NO₂ não puderam ser ainda completamente descritos.

Entre os efeitos pulmonares descritos em estudos experimentais destacam-se: aumento da peroxidação lipídica (70); substituição de células epiteliais alveolares tipo I e células epiteliais ciliadas por células tipo II e células bronquiolares não ciliadas; (67) alterações do tipo enfisematosas, com espessamento da membrana capilar alveolar, perda do epitélio ciliar e aumento do colágeno pulmonar (67); aumento da frequência

respiratória, diminuição da distensibilidade pulmonar e da troca gasosa (67); hiperreatividade brônquica, inflamação eosinofílica e alteração do estado de ativação de macrófagos (71); e aumento da suscetibilidade a infecções bacterianas (67).

Efeitos carcinogênicos relacionados a cânceres da infância e de pulmão vêm sendo sugeridos, embora até o presente momento não exista evidência adequada disponível na literatura (7).

Dióxido de enxofre (SO₂)

Embora fontes naturais como as erupções vulcânicas possam contribuir em determinadas regiões para a formação dos níveis ambientais atuais de SO₂, na grande maioria das áreas urbanas as contribuições antropogênicas são motivo de bem mais preocupação. Entre as principais, destacam-se as que utilizam combustíveis fósseis ricos em enxofre (carvão mineral e óleo diesel) para o aquecimento doméstico, geração de energia elétrica e em veículos motorizados.

O SO₂ é parte da poluição sulfurosa do ar ambiente que atormentou populações humanas por séculos, tendo como exemplo mais marcante o nevoeiro mortal de Londres de 1952 (72).

Os países desenvolvidos vêm progressivamente conseguindo reduzir a concentração de SO₂ na atmosfera dos grandes centros nas últimas décadas, através de medidas como a diminuição do uso de combustíveis domésticos ricos em enxofre e o aumento na altura das chaminés das estações de energia, aumentando a dispersão e diluição dos gases. Esta infelizmente não é ainda a realidade de diversos países em desenvolvimento.

Como resultado destas mudanças, os níveis médios anuais e diários de SO₂ nas maiores cidades da Europa encontram-se hoje abaixo de, respectivamente, 50 µg/m³ e 100 µg/m³. Por outro lado, em áreas rurais européias, a média anual que normalmente era menor que 5 µg/m³ em alguns lugares aumentou para até 25 µg/m³ devido a dispersão do gás das altas chaminés por distâncias maiores. Em cidades chinesas a concentração pode variar bastante, desde 20 µg/m³ até 200 µg/m³ em cidades como Taipei e Hong Kong. Em alguns casos, aumentos súbitos transitórios de vários milhares de µg/m³ por curto período de tempo pode ocorrer, quando, por exemplo, correntes de ar trazem a fumaça das chaminés para o solo (7).

As recomendações padrão da OMS de limites máximo de SO₂ no ar ambiente são de uma média de 24 horas de 20 µg/m³ e a média de 10 minutos de 500 µg/m³ para que efeitos adversos à saúde sejam evitados (7).

Como o SO₂, um gás incolor hidrossolúvel e com forte odor, é altamente reativo, não permanece muito tempo na atmosfera como gás. Muito do SO₂ emitido é oxidado

em aerossóis ácidos, na forma de ácido sulfúrico e sulfuroso, principalmente quando presente na superfície de partículas e na presença de metais catalíticos. Os efeitos ecológicos destes aerossóis ácidos, na forma de chuva ácida, têm recebido muita atenção, embora não seja o foco desta revisão, mas sim seus efeitos à saúde humana. Acredita-se que a causa principal dos efeitos adversos à saúde e aumento de mortalidade dos londrinos na década de 50 tenha sido causado por ácido sulfúrico inspirado na forma de PM fina e ultrafina (7). A neutralização do SO₂ pela amônia leva a produção de sulfatos e bissulfatos.

A absorção do SO₂ ocorre nas membranas mucosas do nariz e trato respiratório alto. O aumento do fluxo diminui a absorção nasal do SO₂ inspirado. Desta forma, o exercício físico promove um maior aporte deste gás às vias aéreas menores.

Entre os possíveis efeitos pulmonares agudos da exposição a concentrações elevadas de SO₂, destacam-se dano epitelial, seguido ou não por hiperplasia epitelial e hipertrofia de glândulas submucosas, lentificação do transporte ciliar e broncoconstrição.

Efeitos adversos na saúde da poluição atmosférica: Estudos Clínicos

Morbi-mortalidade geral, cardiovascular e respiratória

Vários estudos em série temporais (análise de dados de uma determinada população definida geograficamente em um período de tempo, registrada dia a dia) e de coorte (análise de longo-prazo) demonstraram que a exposição aguda e prolongada a níveis aumentados de poluição atmosférica e especificamente de PM estão associadas a um aumento específico de mortalidade.

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA) realizou uma meta-análise de 37 séries temporais realizadas nos EUA e no Canadá, demonstrando que na maioria delas o fator PM₁₀ encontra-se associado aos desfechos mortalidade total, mortalidade cardiovascular e respiratória (Figura 3) (73). Os resultados demonstraram que para cada incremento em 10 µg/m³ na concentração de PM₁₀ o risco relativo de morte aumenta em 0,21%. Dados do estudo *National Morbidity and Mortality Air Pollution* (NMMAPS), do grupo de investigadores do Johns Hopkins (envolvendo as 20 maiores metrópoles americanas e os seus 50 milhões de habitantes) foram utilizados (9). Isoladamente, estes pesquisadores demonstraram, através de regressão de Poisson, um aumento no risco de mortalidade geral e de mortalidade cardiovascular e respiratória de, respectivamente, 0.5% (IC 0.1% - 0.9%) e 0.7% (IC 0.2% - 1.2%) para cada incremento em 10 µg/m³ na concentração de PM₁₀. Além disso, o grupo publicou um estudo demonstrando um aumento no risco de admissões hospitalares por doença pulmonar obstrutiva crônica em 2.5% (IC 1.8% - 3.3%) e por doenças cardiovasculares em 1.3% (IC 1.0% - 1.5%) (74). Posteriormente, este grupo demonstrou que para cada aumento em 10 ppb na concentração atmosférica de O₃ na semana prévia, o risco de morte aumentou em 0.5%, enquanto a mortalidade cardiovascular e respiratória aumentou em 0.64% (75). Em outras séries temporais, o aumento da mortalidade diária variou entre 0.3% e 0.5% para cada incremento em 10 µg/m³ na concentração média de 8 horas, ficando entre 1% e 2% com concentrações entre 100 e 160 µg/m³ e 3% a 5% com concentrações entre 160 e 240 µg/m³. Níveis acima de 240 µg/m³ podem trazer risco ainda maior (7).

Uma força tarefa da OMS, em uma meta-análise de séries temporais de 33 cidades europeias, demonstrou que para cada aumento no PM_{10} em $10 \mu g/m^3$ o risco relativo de mortalidade total aumentou 0.6% (IC 0.4% – 0.8%), cardiovascular 0,9% (IC95% 0.5 – 1.3) e respiratório 1.3% (IC 0.5% – 2.0%) (76). O estudo principal incluído nesta meta-análise foi o APHEA-2 (*Air Pollution and Health: a European Approach*), que envolveu 43 milhões de pessoas em 29 cidades europeias, em um período de mais de 5 anos (77). O risco de mortalidade geral para cada aumento de $10 \mu g/m^3$ na concentração de PM_{10} aumentou em 0.6% (IC 0.4% – 0.8%) e o de admissões hospitalares por asma ou doença pulmonar obstrutiva crônica em 1.0% (IC 0.5% - 1.5%).

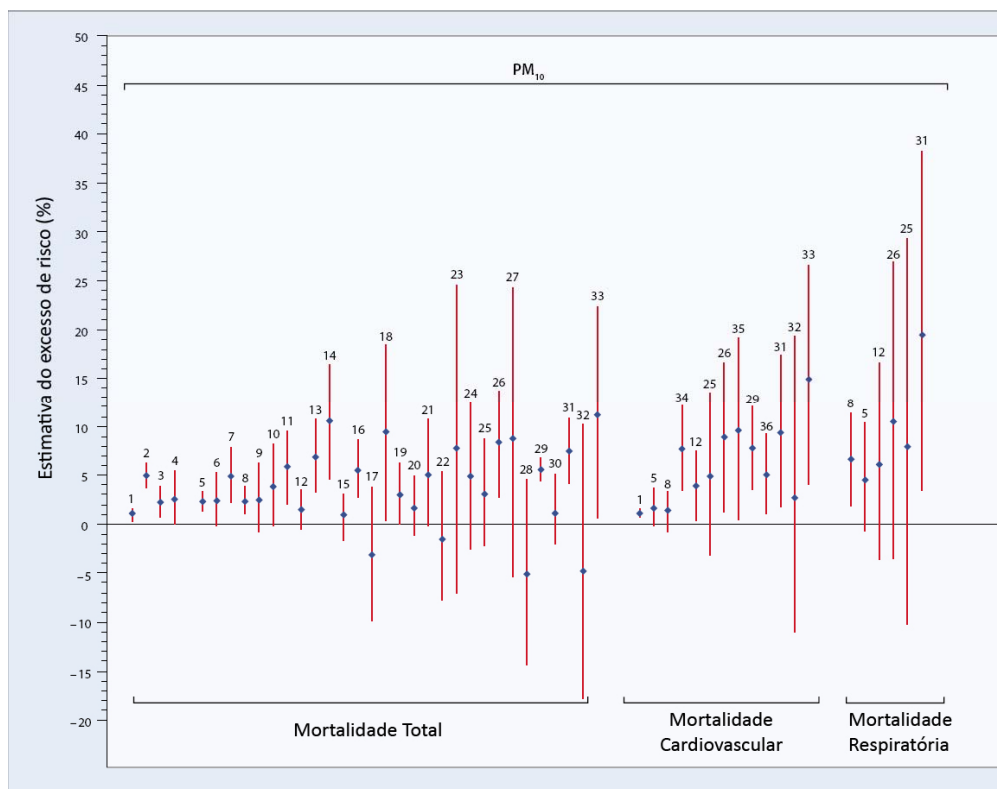


Figura 3. Estimativas de excesso de risco para mortalidade total não acidental, cardiovascular e respiratória em modelos de poluição nos EUA e Canadá (Fonte: US – EPA) (73)

Um dos estudos de coorte mais importantes, o *Harvard Six Cities study*, com uma amostra relativamente pequena (8111 indivíduos) por um período de 14 a 16 anos, demonstrou uma taxa de mortalidade ajustada da cidade mais poluída (maior concentração de PM_{2.5}) em comparação à mais limpa, igual a 1,3 (IC 1.1 – 1.5). Surpreendentemente, foi estimada uma redução de dois anos na expectativa de vida dos indivíduos da cidade mais poluída (10, 78). Além disso, foi demonstrada uma associação da poluição particulada com mortes por câncer de pulmão e doenças cardiovasculares.

No estudo de coorte da *American Cancer Society* coordenado por Pope et al. (13) 500 mil adultos foram acompanhados por um período de até 16 anos. PM₁₀ e SO₂ estavam associados a um aumento da mortalidade geral, cardiopulmonar e por câncer de pulmão, sendo que para cada aumento de 10 µg/m³ na concentração de PM₁₀ o risco relativo destas mortalidades aumentava, respectivamente, em 4%, 6% e 8%.

Abbey et al. (79) acompanharam uma coorte de mais de 6000 indivíduos por 15 anos. O PM₁₀ foi relacionado a um aumento da mortalidade, com risco de 1,2 (IC 1.4 – 4.0) para cada aumento em 1 intervalo interquartil (43 dias/ano) da medida PM₁₀ > 100 µg/m³. Além disso, tanto PM₁₀ quanto O₃ e SO₂, demonstraram associação importante com mortalidade por câncer de pulmão em homens, com riscos relativos de, respectivamente, 2.4, 4.2 e 2.0, e SO₂ e NO₂ em mulheres, com riscos relativos de, respectivamente, 3.0 e 2.8. Em uma segunda publicação, este grupo descreveu a associação do O₃ como desenvolvimento de asma em homens adultos, com risco relativo de 2,1 (IC 1.03 – 4.2) para cada aumento em 27 ppb na concentração de O₃ (80).

Em um estudo recente no qual 65893 mulheres pós menopausa foram acompanhadas por um período médio de seis anos, em um total de 350.000 pacientes-anos (*Women's health Initiative, WHI*), Miller et al. (81) concluíram que a exposição prolongada ao material particulado fino do ar era associada a uma maior incidência de doença cardiovascular e morte. Foi estimado que para cada aumento em 10 µg/m³ de PM_{2.5} a taxa de risco (*hazard ratio*) de morte por doença cardiovascular aumenta em 76%.

Um desenho de estudo clínico chamado de caso-*crossover* vem sendo empregado para avaliar a mudança no risco de um evento agudo, durante um breve período considerado como de risco (*hazard period*), subsequente à exposição a um fator desencadeante em potencial (no caso específico dias com maior concentração atmosférica de poluentes). Este método foi originalmente descrito para avaliar o risco relativo de IAM pós-atividade sexual, pós-esforço físico vigoroso e pós-episódios de raiva, e a sua principal característica é o fato de que cada participante serve como seu próprio controle (82).

Barnett et al. (83) em uma meta-análise de estudos caso-*crossover* realizados em 7 cidades na Austrália e Nova Zelândia, descreveram os riscos relativos para admissões hospitalares por evento cardíaco em indivíduos com mais de 65 anos, para cada aumento equivalente à variação de 1 intervalo interquartil da média diária da concentração do poluente. O trabalho é interessante porque utilizou um modelo de análise estatística multi-poluente e controlado para uma série de fatores ambientais e meteorológicos. Os resultados associaram a poluição atmosférica com vários desfechos cardiovasculares em idosos. O ozônio foi o único poluente avaliado que não demonstrou associação com doenças cardíacas. Para cada aumento de 0.9 ppm de CO, houve um aumento na admissão hospitalar por doença cardíaca de 2.8% (IC 1.3% – 4.4%). Da mesma forma, cada aumento de 5.1 ppb de NO₂ e de 3.8 µg/m³ de PM_{2.5} aumentaram, respectivamente, em 3.4% (IC 1.9% – 4.9%) e 1.9% (IC 1.9% – 4.9%) o risco de admissão hospitalar por doença cardíaca. Entre as doenças cardíacas, destacaram-se a insuficiência cardíaca, com riscos relativos para CO, NO₂ e PM_{2.5} de respectivamente 6.0 (IC 3.5 – 8.5), 6.9 (IC 2.2 – 11.8) e 3.6 (IC 1.8 – 5.4) e o infarto agudo do miocárdio com riscos relativos para NO₂ e PM_{2.5} de respectivamente 4.4 (IC 1.0 – 8.0) e 2.7 (IC 1.3 – 4.2).

A asma é uma das doenças crônicas mais comuns da infância, e sua prevalência vem aumentando nas últimas décadas. A OMS estima que 300 milhões de pessoas tenham asma em todo mundo, e que até 250 mil morrem por ano desta doença. O aumento da reatividade das vias aéreas inerente à doença torna as crianças asmáticas especialmente susceptíveis aos efeitos inflamatórios da poluição atmosférica (17, 84). Esta associação entre poluição atmosférica (especialmente do material particulado) e

asma vem sendo estudada clinicamente através de revisão de taxas de admissões hospitalares e consultas médicas em relação a mudanças nos níveis de poluição no período e em estudos de coorte.

Estudos em voluntários saudáveis expostos a $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de partículas de combustão de diesel por uma hora em câmaras de exposição, revelaram um aumento na contagem de neutrófilos no escarro e biópsia brônquica, além de aumento nos níveis de interleucina 6 e 8 e de oncogene alfa relacionado ao crescimento, com alterações mínimas da função pulmonar (inflamação subclínica em indivíduos saudáveis) (85, 86). Em um estudo subsequente, com o mesmo modelo de exposição, ficou demonstrado que as partículas de diesel aumentam a hiper-reatividade brônquica à metacolina em pacientes asmáticos (87).

Uma série temporal realizada em São Paulo, através de um modelo estatístico de defasagem polinomial, controlado para variáveis climáticas, avaliou a associação de admissões hospitalares por doença respiratória em crianças com o aumento de um intervalo interquartil na concentração atmosférica de poluentes específicos. Os resultados demonstraram que crianças com menos de dois anos de idade são as mais afetadas. Neste grupo, o risco de admissão respiratória aumenta em 9.4% (IC 7.9% – 10.9%) com elevação do PM_{10} , 5.9% (IC 4.5 % - 7.4%) do SO_2 , 5.0% (IC 3.3% - 6.8%) do CO e 9.4% (IC 6.2% - 12.6%) do NO_2 . Apenas o ozônio não demonstrou associação (88).

Uma série temporal de 11 cidades canadenses investigou em 9500 neonatos a associação entre O_3 , CO , SO_2 e NO_2 e admissões hospitalares. Após análise multivariada, encontraram associação positiva com os gases O_3 e NO_2 , com riscos relativos de respectivamente, 3.4 (IC 1.7 – 4.8) e 2.9 (IC 1.9 – 4.0). O aumento no risco de admissões considerando os quatro poluentes combinados foi de 9.61% (IC 4.52 – 14.7%) (89).

Os estudos clínicos de exposição controlada ao O_3 têm demonstrado de forma consistente que este gás diminui a capacidade vital forçada e o volume expiratório forçado (VEF1), provoca desconforto torácico na inspiração e hiper-reatividade brônquica inespecífica, principalmente com exercício (90). Exposição aguda a baixos níveis de O_3 ($0.08 \text{ mg}/\text{m}^3$) induzem a degranulação de mastócitos em voluntários

saudáveis, efeito detectado por lavagem nasal (58). Por estas razões, exercícios aeróbicos em ambientes externos devem ser evitados por asmáticos em dias de maior poluição. Exposição a concentrações de 0.1 a 0.4 ppm de O₃ já estão relacionadas a inflamação brônquica neutrofílica que inicia após 1 hora de exposição, e pode persistir por até 24 horas (91).

Alguns estudos clínicos de exposição controlada ao NO₂ em indivíduos com doença respiratória prévia (asma, DPOC) demonstraram que este gás em baixas doses pode diminuir a capacidade vital forçada e o volume expiratório forçado (VEF1), e aumentar a resistência da via aérea. Entretanto, a diferença detectada foi pequena e existem alguns estudos cuja diferença não pode ser demonstrada (92, 93). Para indivíduos saudáveis, somente após doses muito acima das que ocorrem normalmente na atmosfera é que alterações funcionais pulmonares foram detectadas (92).

Os efeitos de exposição de curto prazo a altas concentrações de SO₂ ocorrem principalmente no trato respiratório, com alterações da função respiratória e hiperreatividade brônquica em indivíduos predispostos. Cabe salientar que é bastante difícil extrair os efeitos de longo prazo de mortalidade e morbidade do SO₂ daqueles produzidos pela exposição ao PM, visto que a presença de ambos no ar é fortemente correlacionada. Estudos controlados em asmáticos em exercício indicam que uma grande proporção experimenta alterações da função pulmonar e sintomas respiratórios após períodos de exposição de apenas alguns minutos a concentrações elevadas de SO₂. A recuperação destes efeitos de exposição no curto prazo costuma ser rápida (94).

Jalaudin et al. (95) após acompanharem uma coorte de 148 crianças com história de dificuldade respiratória e chiado por 11 meses, concluíram que aumentos moderados nos níveis de O₃ provocam uma diminuição do pico de fluxo expiratório, principalmente em indivíduos com história prévia de hiper-reatividade brônquica. Além disso, demonstraram associação entre os níveis de PM₁₀ e o número de consultas médica por asma e dos níveis de NO₂ com a prevalência de tosse úmida (96).

Efeitos reprodutivos e teratogênicos

Embora o feto em desenvolvimento, principalmente no primeiro trimestre, seja motivo freqüente de preocupação em relação à exposição materna à poluição atmosférica, a base de evidência na literatura existente até o momento é controversa, não permitindo ainda estabelecer com segurança qualquer recomendação (7).

Em uma ampla revisão sistemática publicada em 2004, 312 estudos sobre poluição atmosférica e saúde fetal foram identificados, dos quais apenas 12 foram selecionados pelos critérios de inclusão (97). Dentre estes, quatro dos seis estudos de coorte demonstraram associação entre retardo no crescimento fetal e a concentração atmosférica de material particulado, enquanto em dois os achados foram inconclusivos. A associação com parto prematuro foi considerada muito fraca, e em três estudos a associação com o número de natimortos não pode ser comprovada. Pereira et al. (98) em uma série temporal na cidade de São Paulo em um período de dois anos, encontraram uma associação robusta e significativa entre a mortalidade intra-uterina e a poluição atmosférica, particularmente com o NO₂.

Hansen et al. (99) realizaram recentemente um estudo caso-controle para avaliar a associação da poluição atmosférica com a presença de defeitos congênitos. Embora tenham encontrado associações positivas para alguns defeitos, por exemplo, razão de chances de 3.0 (IC 1.3 – 7.5) para defeitos da artéria pulmonar e valvulares para cada aumento em 5 ppb nos níveis de O₃, associações inversas também foram descritas, o que impediu qualquer conclusão definitiva.

Avaliação de Toxicidade Testicular

Normalmente só se consegue demonstrar de forma objetiva efeitos tóxicos testiculares em estudos com modelos animais. Há dois motivos principais que explicam a dificuldade de se estudar toxicidade testicular em humanos. O primeiro é a falta de parâmetros confiáveis. O espermograma, parâmetro mais utilizado, tem baixa acurácia e reprodutibilidade (coeficiente de variação entre laboratórios de 37,5%), além de enorme variação entre indivíduos férteis (coeficiente de variação de 39%) e entre amostras de diferentes períodos do mesmo indivíduo (100). O segundo motivo é a dificuldade de se conduzir estudos clínicos controlados que envolvam coleta de sêmen, exame que costuma encontrar forte resistência para ser realizado (101). Ainda assim, alguns estudos vêm sendo conduzidos nos últimos anos, sendo os mais promissores os que introduziram marcadores de avaliação de integridade do DNA do espermatozóide (102). Testes espermáticos anormais para a integridade do DNA, que são extremamente raros em homens férteis, aparecem em uma significativa proporção dos inférteis. Dentre os testes destacam-se os de pesquisa de fragmentação do DNA, entre eles o SCSA (medida da suscetibilidade do DNA espermático à desnaturação), o TUNEL e o Comet (quebras do DNA de dupla fita), medidas da composição protéica nuclear (níveis de histona e protamina) e os testes de maturidade do núcleo espermático para avaliação do empacotamento da cromatina. Destes, o SCSA desponta atualmente como o mais objetivo e reproduzível, além de poder ser utilizado para amostras de sêmen congeladas (102, 103).

Durante muito tempo, diversas diretrizes reguladoras de estudos experimentais de toxicidade reprodutiva basearam-se na fertilidade (sucesso em atingir gravidez) como o principal índice da função masculina. Posteriormente, ficou demonstrado que a fertilidade, em estudos com modelos animais, é um dos piores marcadores, com sensibilidade extremamente baixa (104). Só para se ter uma idéia, é necessário que a contagem espermática de ratos diminua em aproximadamente 90% antes que a fertilidade se altere (105). Neste período, a análise histopatológica testicular se firmou como o indicador mais sensível e confiável, capaz de detectar sutis alterações da produção espermática (104, 106, 107). Para tanto, é imprescindível que sejam

observadas técnicas adequadas de preparo (fixação, plano de corte, inclusão, coloração) e avaliação histopatológica. Por exemplo, a combinação de fixação em formol e inclusão em parafina, técnica habitualmente empregada na rotina laboratorial, provoca retração (encolhimento) tubular e uma maior distorção tecidual com prejuízo ao detalhamento morfológico, constituindo-se em técnica inadequada (105). Entre os fixadores preconizados, destacam-se a solução de Bouin, utilizada para imersão, e a solução de Karnovsky (glutaraldeído e paraformaldeído), tanto para imersão quanto perfusão vascular (108). A inclusão em resinas plásticas como o glicol metacrilato fornece resultados bem superiores aos obtidos com parafina, permitindo inclusive análise em microscopia eletrônica. Quanto à coloração, preconiza-se a utilização do ácido periódico de Schiff (PAS), que marca o componente glicoproteico do acrossoma, componente nuclear espermático fundamental para uma análise histológica detalhada, conforme explicado a seguir (105).

Espermatogênese é o processo no qual células tronco germinativas diplóides passam por um processo de divisões e diferenciação para formar espermatozóides haplóides. O processo pode ser dividido em três fases: 1) proliferativa, na qual as espermatogônias passam por sucessivas divisões mitóticas até diferenciarem-se em espermatócitos primários; 2) meiótica, na qual um espermatócito primário duplica e recombina o seu material genético, sofre duas divisões meióticas, e dá origem a quatro espermátides redondas haplóides; 3) espermiogênica, na qual as espermátides diferenciam-se em espermatozóides.

Um corte transversal de um túbulo seminífero permite a visualização de diversas camadas concêntricas de células germinativas. As espermatogônias encontram-se dispostas em contato com a membrana basal. Na medida em que avança o processo de espermatogênese, as células progressivamente se aproximam da luz tubular, até que são liberadas como espermatozóides formados. Uma característica extremamente interessante deste processo é que, sob o comando das células de Sertoli, os tipos celulares das diversas camadas identificadas em um corte transversal avançam de forma sincronizada. Desta forma, é possível descrever associações celulares em fases específicas, dividindo a espermatogênese em estágios. Por convenção, o estágio em que se encontra uma espermátide redonda recém formada – logo após a segunda

meiose – é considerado o estágio I. No rato, a espermatogênese foi dividida em 14 estágios, conforme características das espermátides redondas, particularmente de acordo com o grau de desenvolvimento do acrossoma (109). Após o estágio XIV, o ciclo do epitélio seminífero recomeça, sendo que cada nova camada celular corresponde à camada inferior do ciclo anterior (Figura 3).

A freqüência da existência de um determinado estágio em um corte transversal é proporcional ao tempo em que o mesmo demora a terminar. Assim, por exemplo, enquanto um ciclo completo do epitélio seminífero de um rato Wistar tem duração de 13 dias (312 horas), o estágio VII, um dos mais longos, dura cerca de 56 horas. Logo, este ciclo estará presente em aproximadamente 18% dos túbulos de um corte transversal ($56/312$) (105). O processo de espermatogênese completo em ratos tem duração de aproximadamente 58 dias ($4 \frac{1}{2}$ ciclos).

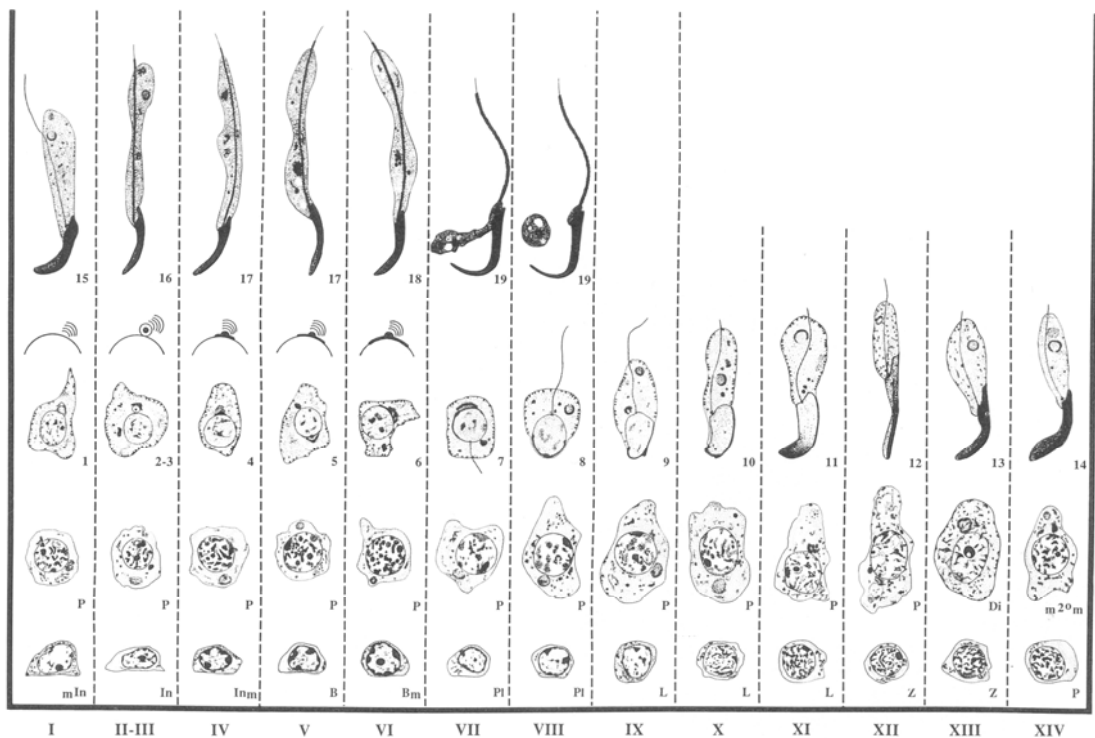


Figura 3. Estágios do ciclo do epitélio seminífero dos ratos (RUSSEL, *et al.*, 1990).

É recomendado que estudos desenhados no intuito de detectar se há dano testicular presente – em contraposição aos estudos desenhados para caracterizar este dano (*i.e.*, descrever qual tipo celular é afetado) – tenham duração mínima de 6 ciclos do epitélio seminífero (no rato, em torno de 11 semanas). Esta exposição, chamada subcrônica, permite que o agente tóxico se distribua pelos tecidos e afete desde a formação de uma espermatogônia até o momento em que a mesma, após passar por todas as fases de divisão e diferenciação atinja o final do sistema ductal reprodutivo (105).

O entendimento deste chamado “estagiamento” do epitélio germinativo é extremamente importante para se avaliar de forma acurada um possível dano tóxico aos testículos. No estágio IX, por exemplo, as espermátides alongadas, considerando-se o processo fisiológico normal, já foram liberadas, e as redondas estão recém iniciando o processo de remodelamento para se tornarem um pouco mais achatadas e alongadas. Nesta fase, portanto, só há uma camada de espermátides. Um pesquisador que desconheça a divisão em estágios pode interpretar erroneamente este fato por ausência patológica de um tipo celular. Por outro lado, caso espermátides alongadas estejam presentes nesta fase, isto deve ser na verdade interpretado como atraso na liberação de espermátides ou “retenção de espermátides”, este sim um processo patológico que representa um distúrbio funcional das células de Sertoli (101). Além disso, o número médio de células de cada tipo em um corte transversal é relativamente constante de acordo com o estágio em que se encontra. É possível, desta forma, realizar contagens de tipos celulares específicos em determinados estágios em ratos expostos e controles e verificar se houve perda celular (análise quantitativa da espermatogênese) (105).

Entre as análises histopatológicas quantitativas, destacam-se:

1. Contagem celular determinada por morfometria – somente através de correções estereológicas de células redondas é possível se obter as contagens celulares verdadeiras em um corte transversal. O número bruto de células contadas varia naturalmente conforme a espessura do corte empregada. A contagem celular verdadeira é obtida através da fórmula de Abercrombie (contagem bruta x [espessura do corte / [espessura do corte + diâmetro nuclear]]). Além disso, é possível corrigir a

contagem para uma possível retração de comprimento tubular isolada – sem diminuição de diâmetro – através do fator de correção da célula de Sertoli (contagem verdadeira x [células de Sertoli por túbulo nos animais controle / células de Sertoli por túbulo nos animais tratados]). Por fim, é possível ainda realizar-se contagens celulares totais por testículo, através de cálculos estereológicos um pouco mais complexos (105).

2. Razões celulares – normalmente utiliza-se a contagem do tipo celular que se quer averiguar dividido pelo número de células de Sertoli ou de nucléolos de células de Sertoli, que costumam sobreviver mesmo após várias situações de agressão que resultam em depleção germinativa.

Análises histopatológicas qualitativas costumam detectar alterações um pouco menos sutis. Pode-se avaliar a presença de infiltração intersticial, vacuolização celular, formação de células gigante multinucleadas, falha da liberação das espermatídes, ausência completa de tipos celulares (culminando com a situação descrita como *Sertoli cell only syndrome*), ausência de luz tubular, aumento no conteúdo lipídico celular, e quebra da barreira hemato-testicular (i.e., com presença de células inflamatórias ou hemácias no interior dos túbulos). Em 1970, Johnsen descreveu um escore no qual classifica os túbulos em uma escala de 1 a 10, conforme a presença das camadas celulares do epitélio seminífero (i.e., 1 = ausência de células; 5 = ausência de espermatozóides ou espermatídes, mas vários espermatócitos presentes; 10 = espermatogênese completa, com vários espermatozóides). Além de relativamente subjetiva, esta divisão não leva em consideração o conhecimento do estagiamento tubular.

Existem ainda outros parâmetros comumente empregados na avaliação da toxicidade germinativa masculina, com sensibilidades intermediárias entre os estudos reprodutivos e a histopatologia testicular:

1. Pesos dos testículos e epidídimos: costumam ser apresentados tanto em valores absolutos como em relação ao peso corporal total. Embora a variabilidade inter-individual seja baixa, alguns fatores como, por exemplo, a presença de infiltrado inflamatório, podem alterar seus valores. Ainda assim, podem ser considerados como tendo boa sensibilidade.

2. Contagem espermática: em cães e coelhos, pode ser avaliada no ejaculado. Em ratos e camundongos, que ejaculam uma pelota endurecida, a contagem espermática é determinada através da análise do homogeneizado do testículo e do epidídimo. No testículo, a técnica é conhecida como “técnica das espermátides resistentes a homogeneização com detergente”. Somente as espermátides alongadas dos estágios VI-VIII permanecem íntegras ao final do processo. Utilizando-se um hematócrito, o número de espermátides resistentes é determinado, e o resultado expresso por grama de tecido (105). No epidídimo, normalmente utiliza-se o homogeneizado da cauda, por um processo bastante similar. O resultado é expresso em espermatozóides por epidídimo ou por grama de tecido. O maior problema destas contagens, é a grande variabilidade inter-individual, em torno de 16% para a contagem de espermátides e de até 29.3% para a de espermatozóides, fato que diminui de forma considerável a sensibilidade deste parâmetro (110).

3. Morfologia e a motilidade: os espermatozóides podem ser coletados na cauda do epidídimo ou no lavado do ducto deferente. A morfologia espermática, em ratos, é o parâmetro que apresenta a maior variabilidade interindividual. Além disso, é o mais trabalhoso dos três parâmetros da análise seminal. Existem diversas anormalidades morfológicas descritas, embora seja preconizada a classificação em normais e anormais. Por outro lado, a motilidade é o parâmetro espermático que apresenta a menor variabilidade inter-individual (coeficiente de variação de 16%). Apresenta boa sensibilidade e relação com a fertilidade. Em alguns estudos de toxicidade testicular, a motilidade chegou a ser o único parâmetro a se alterar, demonstrando, nestes casos, sensibilidade superior à histopatologia (111). Entretanto, além de ser um critério relativamente subjetivo, pode ser influenciado por fatores como tempo de abstinência, método de coleta e manipulação, temperatura de armazenamento, concentração e meio de diluição e método de contagem (especificamente, tipo de câmara empregada e uso de computador para a contagem) (112). Discute-se quais os critérios que melhor refletem o dano espermático, entre velocidade, linearidade ou amplitude do deslocamento da cabeça. De forma simplificada, e no intuito de tornar o método mais objetivo, é bastante usual a descrição dos resultados em porcentagem de espermatozóides móveis.

Modelos experimentais de exposição à poluição atmosférica

A realização de estudos válidos de exposição a agentes tóxicos inalatórios complexos, como é o caso da poluição atmosférica é, de forma inerente, uma tarefa difícil. Isto é uma verdade tanto em relação à criação de um modelo experimental específico que reproduza a exposição à determinada mistura tóxica na dose e composição desejadas, bem como à precisão e à relevância do método e do poluente escolhidos para aferição do modelo (113). Por exemplo, a concentração de uma substância química escolhida como referência de medida devido a critérios como disponibilidade e praticidade pode não ser a mais relevante no entendimento de um mecanismo patológico determinado por uma mistura. Além disso, existem diversas interações físicas e reações químicas que podem levar a avaliações equivocadas da composição da mistura. Como um exemplo, constituintes voláteis podem entrar em equilíbrio termodinâmico com a fase líquida de materiais particulados (aerossóis) ou ser integrados à superfície de partículas sólidas, afetando o padrão de deposição e de penetração destes compostos nos pulmões. Desta forma, agentes voláteis que normalmente se depositam nas vias aéreas superiores por suas características de reatividade química e hidrosolubilidade podem, ao ser transportados em partículas, atingir vias aéreas inferiores.

Outro fator que pode interferir em uma composição química gasosa é a interação de substâncias quando presentes em alta concentração, antes da sua diluição. Por exemplo, a mistura dos gases O_3 e SO_2 pode rapidamente levar a formação de milhares de partículas finas, na verdade gotículas de ácido sulfúrico, que podem ser convertidas em sulfato de amônia (caso a amônia, um contaminante comum, estiver presente) (113).

A estabilidade e homogeneidade de uma mistura gasosa tende a variar conforme determinantes físicos, como temperatura e umidade, bem como com o passar do tempo. Assim, o aquecimento do ar de uma câmara de exposição pela perda de calor do corpo dos modelos animais por evaporação, na dependência de como foi projetado o modelo experimental, pode fazer com que a composição química da mistura fique diferente da que se imagina estar sendo aplicada (113). Não só isso, alterações de

freqüência respiratória por calor ou estresse podem alterar toda a dinâmica de inalação de modelos animais.

O passar do tempo também modifica a composição química de uma mistura gasosa. Este conhecimento é fundamental no planejamento de como se analisar amostras do ar em exposição. Por exemplo, partículas maiores tendem a ser perdidas por assentamento por gravidade, enquanto partículas menores, com maior coeficiente de difusão, podem ser perdidas no contato com as paredes do frasco. Gases hiperreativos como o O_3 também podem se transformar ao contato com as paredes do frasco. Desta forma, em uma câmara de exposição fechada, ao longo do tempo, enquanto a concentração de alguns constituintes da mistura diminui rapidamente, a de outros, como o monóxido de carbono, por exemplo, tende a levar bem mais tempo para se dissipar.

Por todas estas razões, uma mesma composição gasosa na fonte pode estar completamente diferente quando inalada pelos animais em razão de variações no desenho do modelo experimental. Enquanto a relação entre a concentração de monóxido de carbono e PM é linear em câmaras com fluxo de ar direcional envolvendo somente o nariz, a proporção do gás em relação PM aumenta muito em câmaras fechadas de exposição de corpo inteiro (113).

A relevância dos achados em estudos experimentais em laboratório é muitas vezes questionada e tida por incerta em razão das diferenças nas doses dos poluentes nos órgãos alvo no cenário experimental e no mundo real (7). Parte da literatura é limitada ainda mais por não levar em consideração as múltiplas interações entre os poluentes, que como já dito, podem afetar a dosimetria e a toxicidade. É o caso de todos os estudos envolvendo agentes tóxicos isolados, como por exemplo, a análise dos efeitos da administração isolada de um metal pesado. Por fim, outra dificuldade é encontrar modelos animais que sejam sensíveis o bastante para mimetizar os mecanismos tóxicos observados em humanos, em níveis de exposição não muito longe dos realísticos, além dos riscos de se considerar como linear a relação entre os efeitos tóxicos e a concentração de uma determinada substância. Na verdade, a relação dose-resposta pode ser supra-linear ou sublinear (a potência tóxica diminui, desaparece ou

até transforma-se em benéfico em doses baixas), e ser diferente conforme o organismo em estudo (114).

Vários modelos experimentais utilizando diferentes fontes de emissão e ressuspensão de PM_{10} foram descritos, e uma excelente revisão detalhada de vários deles, abordando vantagens e desvantagens de formas de exposição e dosimetria foi recentemente publicada (115). Entre as considerações, destaca-se a de que para estudos de exposição mais prolongados câmaras de exposição de corpo inteiro levam vantagem, enquanto que para avaliação de exposições agudas é preferível se optar por sistemas de exposição da cabeça e nariz. A revisão descreve vários métodos de geração de gases e aerossóis, além de técnicas de administração direta como inalação e instilação intratraqueais.

Quando se opta por realizar estudo de toxicidade de poluição atmosférica expondo animais ao ar ambiente, naturalmente poluído, duas questões fundamentais passam a ser o foco: a primeira é o cuidado em se aferir com a maior precisão possível a concentração e características dos poluentes daquela região específica no período de tempo da vigência do estudo; a segunda é realizar a filtragem do ar do grupo controle ou “não-poluído”. A situação ideal é aquela na qual os animais controle estejam sujeitos a exatamente todos os mesmos fatores que os animais expostos, exceto pela poluição atmosférica, que deve ser filtrada. Uma alternativa muitas vezes empregada é a de se manter grupos de animais em locais diferentes, um mais e outro menos poluído, realizar aferições de concentração de poluentes em ambos os locais, e medir as diferenças percebidas nos desfechos (116, 117). Obviamente, esta opção tende a ser menos adequada, justamente por permitir que variações de outros fatores atuem como possíveis fontes de vieses, como alterações de umidade relativa do ar, temperatura, clima, nível de estresse por ruído, entre outras.

Efeitos adversos à função testicular da poluição atmosférica

A inflamação é considerada um dos principais mecanismos na gênese de muitos dos efeitos adversos à saúde relacionados à poluição atmosférica. A causa principal desta inflamação é a o aumento do estresse oxidativo, via fatores de transcrição redox-sensíveis (31-33). Uma parcela dos poluentes, como por exemplo, metais pesados e hidrocarbonetos poli-aromáticos do PM, é absorvida no sistema respiratório e ganha a circulação sistêmica, com conseqüente potencial de gerar efeitos adversos inflamatórios em outros órgãos, como no coração, no cérebro e no fígado (118). Vários dos compostos orgânicos absorvidos são lipofílicos, capazes de passar por membranas ou barreiras. Além disso, o transporte sanguíneo de citocinas produzidas na inflamação pulmonar também contribui como um mecanismo indireto de efeitos sistêmicos (42).

Nos testículos, os espermatozóides são células particularmente suscetíveis ao dano induzido pelo aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs), porque sua membrana plasmática contém grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados (119) e seu citoplasma contém diminuta concentração de enzimas antioxidantes (120, 121). Para compensar, o plasma seminal é rico em defesa antioxidante para proteger os espermatozóides, entre mecanismos enzimáticos (superóxido dismutase, sistema glutathiona peroxidase / redutase, catalase) e não enzimáticos (ascorbato, urato, alfa-tocoferol, piruvato, glutathiona, taurina e hipotaurina) (121). Estudos demonstram que EROs em altas concentrações são detectadas em 25% a 40% das amostras seminais de homens inférteis, relacionando a disfunção espermática como um efeito tóxico do aumento na inflamação seminal (122-124).

Eventos genotóxicos diretos, mediados pela absorção de poluentes e indiretos, mediados por células inflamatórias e produção de EROs em indivíduos expostos vêm sendo descritos (35-37). Além disso, existem evidências robustas que sugerem que a fragmentação de DNA comumente observada em espermatozóides de homens inférteis é mediada pela presença de altos níveis de EROs (125, 126). O estresse oxidativo acelera o processo de apoptose das células germinativas em prejuízo da fertilidade.

A exposição aguda ao PM pode causar disfunção endotelial e a exposição crônica pode acelerar a progressão da aterosclerose, ambos efeitos com potencial de

prejudicar a vascularização de diversos órgãos, com aumento do risco de IAM, AVC e, nesta linha de raciocínio, possivelmente disfunção testicular (39-41, 43).

Por fim, uma série de compostos presentes na poluição atmosférica, entre eles hidrocarbonetos poli-aromáticos, derivativos de dioxinas e nitrofenóis, presentes no PM, podem agir como desreguladores endócrinos (*endocrine disrupters*) e com isto alterar todo o funcionamento dos testículos (127).

Nas últimas duas décadas, a comunidade científica mundial assistiu travar-se um polêmico debate sobre uma possível diminuição da fertilidade masculina nos últimos 50 anos, representada por uma piora progressiva da qualidade dos espermogramas registrados no período (128-132). Um grupo de especialistas, que inicialmente se uniu com o declarado intuito de provar o contrário, acabou confirmando o fenômeno, demonstrando uma redução anual de 2,1% na concentração espermática dos parisienses nos últimos 20 anos (133).

Este assunto, ainda não resolvido, acabou por impulsionar uma gama de estudos envolvendo diversos agentes tóxicos possivelmente envolvidos. A presença de estrógenos ambientais representa, ainda hoje, a melhor explicação disponível para a propalada queda da fertilidade masculina (134). No entanto, vários agentes tóxicos aos testículos foram já descritos, entre medicações, aditivos alimentares, agentes químicos da indústria, solventes e agrotóxicos (101). A associação do aumento da prevalência de doenças congênitas do sistema reprodutivo masculino (criptorquidia, hipospádia), tumor de testículo e infertilidade, vem sendo relacionada à exposição de fatores tóxicos ambientais no período fetal (dioxinas, di(n-butyl)phtalato) no que vem sendo descrito como síndrome de disgenesia testicular (135).

Que alguns poluentes do ar, particularmente os originários da combustão em motores internos de veículos automotivos, também possam estar envolvidos neste declínio da fertilidade é uma hipótese que merece ser investigada.

Estudos Clínicos

Um importante programa de pesquisa foi desenvolvido a partir de 1989, pelo governo da República Tcheca, uma das regiões com os centros urbanos mais poluídos da Europa, com o objetivo de estudar os efeitos adversos na saúde da poluição

atmosférica (programa Teplice). A fonte principal de poluição nesta região é a queima de carvão mineral para geração de energia, na indústria e aquecimento doméstico. A partir desta iniciativa, diversos estudos foram publicados. Em relação aos efeitos adversos na fertilidade, os estudos iniciais já sugeriam uma relação consistente entre defeitos da morfologia e da mobilidade dos espermatozóides e a poluição do ar. Do local e período de menor (Prachatice, $\text{SO}_2 = 17.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$) ao de maior poluição (Teplice, $\text{SO}_2 = 164 \mu\text{g}/\text{m}^3$), a porcentagem de indivíduos com menos do que 13% de espermatozóides normais aumentou progressivamente de, respectivamente, 0.2% (0.1 – 0.7%) a 10.1% (2.8 – 36%). A hipótese principal dos autores foi que a poluição atmosférica poderia prejudicar a espermiogênese (136). Além disso, foi observada uma associação entre a poluição atmosférica e a presença de anormalidades na cromatina, medida pela análise da estrutura da cromatina do espermatozóide (SCSA). Um achado interessante foi que as alterações provocadas na qualidade do sêmen eram reversíveis, uma vez que havia uma melhora dos padrões seminais alguns meses após períodos de poluição mais intensa (137). A crítica a estes dois estudos é que os grupos estudados eram de locais diferentes e, portanto, poderiam estar sendo expostos a vários vieses de confusão completamente obscuros, sendo bastante difícil comprovar que os grupos eram similares em relação aos demais aspectos.

Em 2005 o mesmo grupo publicou um estudo de uma coorte de indivíduos que realizaram espermogramas seriados com registro da poluição neste período. A quantidade de anormalidades na cromatina medida por SCSA era maior nos períodos de maior poluição atmosférica. Outros parâmetros do espermograma não se relacionaram à poluição neste estudo, contrariando os achados prévios (138). A associação entre o aumento no índice de fragmentação no DNA medida por SCSA e a poluição atmosférica foi novamente confirmada em uma publicação de 2009. Neste estudo, os autores identificaram também que a presença de determinados polimorfismos do DNA, envolvendo genes do metabolismo e de reparo poderiam modular a suscetibilidade individual aos efeitos deletérios da poluição na cromatina dos gametas (139).

Os trabalhos acima descritos compararam grupos de indivíduos diferentes de locais diferentes no mesmo período de tempo ou o mesmo grupo de indivíduos em

períodos de tempo diferentes. Uma das alternativas para se aumentar a sensibilidade e diminuir os vieses de confusão associados a estas metodologias de pesquisa é a de se comparar grupos de indivíduos da mesma região e no mesmo período de tempo, porém com exposições à poluição marcadamente diferentes, em estudos caso-controle. Dois estudos avaliando trabalhadores de pedágios de rodovias - um grupo particularmente exposto à poluição do tráfego - foram publicados.

De Rosa et al. (140) avaliaram 85 homens adultos jovens trabalhadores de pedágios combinados com 85 indivíduos controle da mesma faixa etária. O período de exposição era o turno de 6 horas de trabalho por dia. Os pesquisadores descreveram diversos parâmetros seminais alterados e piores do que nos indivíduos controle: motilidade total (35% versus 57%), motilidade progressiva (12% versus 29%) teste da eosina (52% versus 81%), teste hipo-osmótico (43% versus 65%) e teste do laranja de acridina (49% versus 76%), entre outros. Apenas concentração e volume espermáticos foram similares. O FSH sérico dos expostos foi maior. A concentração sérica de diversos poluentes e marcadores de poluição foi maior nos expostos: metemoglobina, sulfemoglobina, chumbo, zinco e óxidos de nitrogênio e de enxofre.

Guven et al. (141) realizaram um estudo bastante similar, envolvendo 38 homens trabalhadores de pedágios e 35 controles que trabalhavam em escritórios. Não havia diferença entre os grupos em relação à idade ou consumo de cigarro. Os resultados da análise seminal revelaram diminuição em todos os parâmetros avaliados no grupo exposto, incluindo a contagem (44 ± 36 versus 71 ± 50 milhões/ml, $p = 0.002$), motilidade ($55 \pm 24\%$ versus $70 \pm 16\%$, $p = 0.003$) e morfologia espermática (25% versus 58%, $p=0.01$).

Uma correlação negativa entre a concentração atmosférica de $PM_{2.5}$ e a motilidade espermática após dois e três meses ($r = -0.330$; $p=0.018$) foi recentemente demonstrada em um estudo transversal envolvendo 1699 análises seminais de homens residentes na cidade de Salt Lake, nos Estados Unidos (142). Esta correlação permaneceu mesmo após correção para temperatura e estação do ano. Para cada aumento em $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $PM_{2.5}$ a motilidade após 2 e 3 meses diminuiu 3.4% e 2.7%, respectivamente. Concentração e morfologia espermáticas não se correlacionaram com a poluição. No mesmo estudo, um grupo de 561 homens que realizaram

espermogramas seriados em clínicas de reprodução assistida foi isoladamente avaliado. Também neste caso foi encontrada uma correlação negativa entre a motilidade espermática e a concentração atmosférica de $PM_{2.5}$ 3 meses antes.

Sokol et al. (143) realizaram um estudo em doadores de sêmen de um banco de sêmen de Los Angeles, EUA. O perfil dos doadores, homens férteis e saudáveis rigorosamente selecionados que doam várias amostras ao longo de um longo período de tempo, faz com que sejam um grupo ideal para análise. Além disso, foram obrigados a aderir a normas rigorosas de coleta, e todas as amostras foram analisadas no mesmo laboratório. Dados sobre a concentração de O_3 , NO_2 , PM_{10} , CO e condições climáticas foram analisados em três períodos: 0-9 dias, 10-14 dias e 70-90 dias antes da coleta. Os pesquisadores demonstraram uma correlação negativa entre os níveis atmosféricos de O_3 e a concentração espermática. Para cada aumento de um intervalo interquartil na concentração de O_3 (14.3 ppb) a concentração espermática diminuiu 2.8% (0-9 dias, $p = 0.04$) e 2.36% (10-14 dias, $p = 0.04$). Outros poluentes não se associaram com alterações nas características seminais.

Estudos Experimentais

Watanabe e Oonuki (144) realizaram um estudo experimental em ratos no qual escape de motor a diesel (ED) era inalado durante 6 horas por dia, 5 dias por semana, durante os três primeiros meses de vida (Tabela 1). Havia três grupos: 1) exposição total; 2) partículas filtradas; 3) gases e partículas filtradas (controle). A concentração de poluentes aferida na câmara de exposição era bastante elevada: 5630 $\mu g/m^3$ de PM_{10} e 4.1 ppm de NO_2). O resultado principal encontrado foi um aumento da testosterona total e do estradiol séricos e diminuição do FSH nos ratos dos grupos 1 e 2 em relação aos do grupo 3. Além disso, uma diminuição da contagem de espermátides resistentes a homogeneização e do número de espermátides redondas em vários estágios da espermatogênese foram observada nos grupos expostos 1 e 2. Já o peso dos testículos não variou entre os grupos. A hipótese elaborada por estes pesquisadores para o aumento dos níveis hormonais foi de um aumento da secreção de esteróides androgênicos pela adrenal, com conseqüente inibição do FSH e da espermatogênese.

Utilizando a mesma metodologia de exposição ao ED, Watanabe ainda publicou mais dois estudos experimentais em ratos. No primeiro, foi descrito um aumento da masculinização de fetos (exposição na gravidez) dos grupos 1 e 2 em relação ao grupo controle, com aumento da distância anogenital (entre o anus e a base do pênis). Dos hormônios medidos no sangue materno, a testosterona sérica era maior e o estradiol menor para os grupos 1 e 2 em relação ao grupo 3 e a hipótese foi de que a fase gasosa da poluição provocou estas alterações através da inibição da síntese e atividade da aromatase (145). No segundo, fêmeas grávidas foram expostas a diferentes concentrações de ED, e os filhotes machos, expostos apenas enquanto fetos, acompanhados por três meses. O estudo demonstrou uma diminuição na produção diária de espermatozoides associada a aumento do FSH sérico nos grupos expostos (mesmo nos grupos com filtro para PM e sem filtros para gases), associada a uma diminuição do número de células de Sertoli (146).

Yoshida et al. (147) demonstraram, em um estudo experimental em camundongos durante doze horas por dia por seis meses, uma progressiva associação da exposição ao ED em diferentes concentrações (300, 1000 e 3000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM) com degeneração de células de Leydig, dano aos túbulos seminíferos e redução da produção espermática diária (respectivamente de 29%, 36% e 53% quando comparados ao grupo controle). Um inexplicável aumento do peso corporal total nos ratos expostos foi observado.

Tabela 1: Estudos experimentais dos efeitos da exposição à poluição atmosférica na função testicular (em ordem de publicação)

MODELO	EXPOSIÇÃO	RESULTADOS	REFERÊNCIA
Camundongos Exposição: 6 meses	ED	Degeneração de células de Leydig Dano aos túbulos seminíferos ↓ produção de espermatozoides ↑ peso corporal total	(YOSHIDA <i>et al.</i> , 1999)

Ratos Exposição: 3 meses	ED e EDF		↑ testosterona total e do estradiol ↓ FSH e ↓ LH ↓ produção de espermatozóides ↓ contagem espermátides redondas	(WATANABE <i>et al.</i> , 1999)
Ratos com 1 ano de vida Exposição: 8 meses	ED		Peso testicular inalterado Produção de espermatozóides inalterada ↑ testosterona sérica e intratesticular ↑ discreto LH	(TSUKUE, <i>et al.</i> , 2001)
Ratos Exposição: pré-natal Análise fetal e materna	ED e EDF		masculinização de fetos ↑ da distância anogenital ↑ testosterona total do sangue materno ↓ estradiol do sangue materno	(WATANABE <i>et al.</i> , 2001)
Camundongos Exposição 10 semanas Coito após 6 semanas Análise dos testículos da geração F1	10	Ar siderúrgica (24-240 µg/m ³ de PM) versus ar de área rural	usina (24-240 µg/m ³ de PM) ↑ 1.5 – 2.0 vezes na taxa de mutação ESTR Hereditariedade da mutação	(SOMMERS <i>et al.</i> , 2002)
Ratos Exposição pré-natal Análise: 3 meses	ED e EDF		↓ FSH ↓ produção de espermatozóides ↓ contagem espermátides redondas ↓ contagem células de Sertoli	(WATANABE <i>et al.</i> , 2005)
Camundongos Exposição pré-natal Análise: 5 e 12 semanas	ED		Presença de células multinucleadas nos túbulos ↓ produção de espermatozóides (5 ^a e 12 ^a s) ↓ testosterona total na 5 ^a semana ↑ testosterona total na 12 ^a semana ↑ mRNA para receptor de FSH no testículo	(ONO <i>et al.</i> , 2007)
Camundongos Exposição pré-natal Análise: 5 e 12 semanas	EDF		Presença de células multinucleadas nos túbulos ↓ produção de espermatozóides (12 ^a semana) ↑ testosterona total na 5 ^a semana ↑ mRNA para receptor de LH no testículo	(ONO <i>et al.</i> , 2008)
Camundongos Exposição 10 semanas Análise seminal após 6 semanas	10	Ar siderúrgica com e sem filtro HEPA	usina com e sem filtro HEPA ↑ 1.6 vezes na taxa de mutação ESTR Hipermetilação do DNA global Relaciona a mutação ao material particulado	(YAUK <i>et al.</i> , 2008)
Camundongos Exposição pré-natal Análise: 170 dias	EPD		↓ produção de espermatozóides testosterona total inalterada distância anogenital inalterada	(HEMMINGSEN <i>et al.</i> , 2009)

Ratos		↓ testosterona, progesterona e corticosterona
Exposição pré-natal	ED e EDF	↓ FSH e ↑ inibina
Análise: 28 dias		↓ transcrição testicular do mRNA para stAR (<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>) e mRNA para 17β-HSD (<i>hydroxysteroid dehydrogenase</i>) (LI, et al., 2009)
		↑ mRNA para receptor de FSH no testículo

ED = escapamento do motor a diesel; EDF = ED com filtro HEPA para partículas (fase gasosa apenas); EPD = extrato de partículas do diesel

Ono et al. (148) conduziram um estudo experimental em camundongos no qual fêmeas grávidas foram expostas ao ED até o momento do parto. Os ratos machos eram sacrificados para análise após cinco e doze semanas. Os resultados demonstraram uma diminuição na produção diária de espermatozoides (diminuição da contagem de espermátides resistentes a homogeneização) na 5ª e 12ª semanas. Surpreendentemente, a concentração sérica da testosterona total dos camundongos expostos em comparação com a dos controles foi 33% menor na 5ª semana e 4.5 vezes maior na 12ª semana. Além disso, houve um aumento de 30,8% na expressão do mRNA do receptor de FSH no homogeneizado do testículo na 5ª semana.

No ano seguinte, os mesmos pesquisadores publicaram um estudo nos mesmos moldes, só que neste o fator em estudo era a exposição ao ED filtrado para partículas (149). A conclusão do estudo é que a fase gasosa do ED mantém sua capacidade tóxica seguindo exposição pré-natal. Após 12 semanas, foi detectada diminuição de 25% na produção diária de espermatozoides, presença de células gigantes multinucleadas e vacuolização parcial à histologia, aumento da concentração sérica da testosterona total na 5ª semana e elevação do mRNA para receptor de LH no homogeneizado de testículo.

Hemmingsen et al. (150) realizaram inalação pré-natal (fêmeas grávidas) de um extrato de partículas de diesel re-suspendido (EPD), na dose de 20000 µg/m³ de PM, durante 1 hora por dia por 12 dias, e acompanharam os filhotes machos por 170 dias. O estudo demonstrou uma diminuição na produção diária de espermatozoides. Nenhuma alteração hormonal foi observada.

Yauk et al. (151) analisaram dois grupos de ratos adultos machos expostos a uma câmara de exposição próxima às usinas siderúrgicas. Em um dos grupos o ar era

filtrado para PM com filtros HEPA. A concentração de PM aferida no local variou entre 23.6 – 239.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Os ratos permaneceram 10 semanas nas câmaras de exposição e mais seis semanas no laboratório. Após este período, os autores avaliaram a indução de mutações genéticas da linha germinativa pela avaliação de repetições em tandem expandidas simples (ESTR) por PCR de molécula única (SM-PCR) diretamente no sêmen dos ratos. As ESTR estudadas em camundongos compreendem dois loci seletivos (Ms6-hm e Hm-2) de DNA neutros repetidos. A taxa metilação global do DNA foi também avaliada. A técnica direta permite concluir que mutações presentes se deram na gametogênese, e o tempo de seis semanas que as alterações foram nas espermatogônias.

Os autores observaram um aumento em 1.6 vezes na taxa de mutações e a presença de hipermetilação do DNA, concluindo que o material particulado da poluição atmosférica em concentrações ambientes é capaz de induzir mutações em células germinativas.

Em um estudo prévio, o mesmo grupo já havia descrito uma taxa similar de mutações (1.5 – 2.0 vezes) detectada no testículo de ratos de geração F1, nascidos de pais que haviam sido expostos na mesma câmara de poluição por 10 semanas e reproduzido após um período de 6 semanas, em comparação com descendentes de ratos que haviam permanecido em ambiente rural com ar não poluído. A importante conclusão foi que as mutações germinativas induzidas pela poluição atmosférica podem ser transmitidas à prole (117).

Uma importante consideração a ser feita em relação a estes estudos em animais sentinela que demonstram um número aumentado de mutações em loci de repetições tandem (microsatélites e ESTR) é que as potenciais implicações na saúde humana ainda são desconhecidas. Entretanto, embora estes estudos não possam provar que a exposição humana à poluição atmosférica aumenta a incidência de doenças genéticas herdáveis ou adquiridas, certamente eles sugerem que este fenômeno é possível (152).

Por fim, vários estudos clínicos e experimentais vêm descrevendo de forma consistente a capacidade de diversos metais pesados encontrados no PM de provocar efeitos tóxicos aos testículos, entre eles vanádio, chumbo, cádmio, zinco e cobre (153-156).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição em níveis habituais de poluição atmosférica em um ambiente urbano na função testicular de ratos Wistar adultos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar alterações de volume gonadal através da mensuração da massa dos testículos;
2. Identificar alterações dos níveis séricos e intra-testiculares de testosterona total;
3. Avaliar os níveis de estresse oxidativo dos testículos através da quantificação da lipoperoxidação pelo teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e da atividade da superóxido dismutase e catalase;
4. Avaliar a integridade do epitélio germinativo, através de análise histológica testicular qualitativa, observando a presença de infiltração intersticial, vacuolização celular, formação de células gigantes multinucleadas e falha da liberação das espermatídes no estágio IX;
5. Avaliar a integridade do epitélio germinativo, através de análise histológica testicular quantitativa, pela contagem celular histológica bruta e verdadeira e cálculo de razões celulares.

REFERÊNCIAS

1. Kampa M, Castanas E. Human health effects of air pollution. *Environ Pollut.* 2008 Jan;151(2):362-7.
2. Elson DM. *Atmospheric pollution: a global problem.* Oxford: Blackwell 1992.
3. Anderson HR. Air Pollution and mortality: A history. *Atmospheric Environment.* 2009;43(1):142 - 52.
4. Bell ML, Davis DL. Reassessment of the lethal London fog of 1952: novel indicators of acute and chronic consequences of acute exposure to air pollution. *Environ Health Perspect.* 2001 Jun;109 Suppl 3:389-94.
5. Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet.* 2002 Oct 19;360(9341):1233-42.
6. Cohen AJ, Ross Anderson H, Ostro B, Pandey KD, Krzyzanowski M, Kunzli N, et al. The global burden of disease due to outdoor air pollution. *Journal of toxicology and environmental health.* 2005 Jul 9-23;68(13-14):1301-7.
7. WHO. Air Quality Guideline: Global Update 2005; 2005.
8. WHO. Health impacts of indoor air pollution. 2009 [cited 14 de dezembro de 2009]; Available from: http://www.who.int/indoorair/health_impacts/en/
9. Samet JM, Dominici F, Curriero FC, Coursac I, Zeger SL. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994. *The New England journal of medicine.* 2000 Dec 14;343(24):1742-9.
10. Dockery DW, Pope CA, 3rd, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, et al. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *The New England journal of medicine.* 1993 Dec 9;329(24):1753-9.
11. Jerrett M, Burnett RT, Ma R, Pope CA, 3rd, Krewski D, Newbold KB, et al. Spatial analysis of air pollution and mortality in Los Angeles. *Epidemiology.* 2005 Nov;16(6):727-36.
12. Krewski D, Jerrett M, Burnett RT, Ma R, Hughes E, Shi Y, et al. Extended Analysis of the American Cancer Society Study of Particulate Air Pollution and Mortality. *The Health Effects Institute Publications* 2009:1 - 154.

13. Pope CA, 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Jama*. 2002 Mar 6;287(9):1132-41.
14. Katsouyanni K, Touloumi G, Samoli E, Gryparis A, Le Tertre A, Monopoli Y, et al. Confounding and effect modification in the short-term effects of ambient particles on total mortality: results from 29 European cities within the APHEA2 project. *Epidemiology*. 2001 Sep;12(5):521-31.
15. Samet JM, Zeger SL, Dominici F, Curriero F, Coursac I, Dockery DW, et al. The National Morbidity, Mortality, and Air Pollution Study. Part II: Morbidity and mortality from air pollution in the United States. *Res Rep Health Eff Inst*. 2000 Jun;94(Pt 2):5-70; discussion 1-9.
16. Koenig JQ. Properties and sources of common ambient air pollution. *Health effects of air pollution: How safe is the air we breathe?* Norwell: Kluwer Academic Publishers 2000:29 - 48.
17. Bernstein JA, Alexis N, Barnes C, Bernstein IL, Bernstein JA, Nel A, et al. Health effects of air pollution. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Nov;114(5):1116-23.
18. Chow JC, Watson JG, Lowenthal DH, Solomon PA, Magliano KL, Ziman SD, et al. PM10 source apportionment in California's San Joaquin Valley. *Atmospheric Environment*. 1992;18:3335 - 54.
19. Vand Dingenen R, Raes F, Putaud J, Baltensperger U, Charron A, Facchini M, et al. A european aerosol phenomenology-1: physical characteristics of particulate matter at kerbside, urban, rural and background sites in Europe. *Atmospheric Environment*. 2004;38:2561-77.
20. Zhang Y, Zhu X, Slanina S, Shao M, Zeng L, Hu M, et al. Aerosol pollution in some Chinese cities: (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*. 2004;76:1227-39.
21. Kreyling WG, Tuch T, Peters A, Pitz M, Heinrich J, Stolzel M, et al. Diverging long-term trends in ambient urban particle mass and number concentrations associated with emission changes caused by the German unification. *Atmospheric Environment*. 2003 Apr 15;37(27):3841 - 8.

22. Hoek G, Forsberg B, Borowskac M, Hlawiczkac S, Vaskövid E, Welindere H, et al. Wintertime PM10 and black smoke concentrations across Europe: results from the PEACE study. *Atmospheric Environment*. 1997;31:3609–22.
23. Hoek G, Welinder H, Vaskovi E, Ciacchini G, Manalis N, Royset O, et al. Interlaboratory comparison of PM10 and black smoke measurements in the peace study. *Atmospheric Environment*. 1997(31):3341–9.
24. Vichit-Vadakan N, Ostro BD, Chestnut LG, Mills DM, Aekplakorn W, Wangwongwatana S, et al. Air pollution and respiratory symptoms: results from three panel studies in Bangkok, Thailand. *Environ Health Perspect*. 2001 Jun;109 Suppl 3:381-7.
25. Wei F, Teng E, Wu G, Hu W, Wilson WE, Chapman RS, et al. Ambient Concentrations and Elemental Compositions of PM10 and PM2.5 in Four Chinese Cities. *Environmental Science & Technology*. 1999;33:4188–93.
26. SMAM-RS. Controle da Qualidade do Ar em Porto Alegre. 2009 [cited 14 de dezembro de 2009]; Available from: http://www2.portoalegre.rs.gov.br/smam/default.php?p_secao=130
27. Council NR. Research priorities for airborne particulate matter. IV. Continuing research progress. Washington, DC, 2004.
28. Pozzi R, De Berardis B, Paoletti L, Guastadisegni C. Inflammatory mediators induced by coarse (PM2.5-10) and fine (PM2.5) urban air particles in RAW 264.7 cells. *Toxicology*. 2003 Feb 1;183(1-3):243-54.
29. Kreyling WG, Scheuch G. Clearance of particles deposited in the lungs. In: Gehr P, Heyder J, eds. *Particle–lung interactions*. New York: Marcel Dekker 2000:323 - 76.
30. Zanobetti A, Schwartz J, Gold D. Are there sensitive subgroups for the effects of airborne particles? *Environ Health Perspect*. 2000 Sep;108(9):841-5.
31. Donaldson K, Stone V, Borm PJ, Jimenez LA, Gilmour PS, Schins RP, et al. Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM10). *Free Radic Biol Med*. 2003 Jun 1;34(11):1369-82.
32. Nemmar A, Delaunois A, Nemery B, Dessy-Doize C, Beckers JF, Sulon J, et al. Inflammatory effect of intratracheal instillation of ultrafine particles in the rabbit: role of C-fiber and mast cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999 Nov 1;160(3):250-61.

33. Nemmar A, Hoet PH, Dinsdale D, Vermylen J, Hoylaerts MF, Nemery B. Diesel exhaust particles in lung acutely enhance experimental peripheral thrombosis. *Circulation*. 2003 Mar 4;107(8):1202-8.
34. Donaldson K, Gilmour MI, MacNee W. Asthma and PM10. *Respir Res*. 2000;1(1):12-5.
35. Karlsson HL, Nygren J, Moller L. Genotoxicity of airborne particulate matter: the role of cell-particle interaction and of substances with adduct-forming and oxidizing capacity. *Mutation research*. 2004 Dec 31;565(1):1-10.
36. Karlsson HL, Holgersson A, Moller L. Mechanisms related to the genotoxicity of particles in the subway and from other sources. *Chem Res Toxicol*. 2008 Mar;21(3):726-31.
37. Knaapen AM, Schins RP, Polat D, Becker A, Borm PJ. Mechanisms of neutrophil-induced DNA damage in respiratory tract epithelial cells. *Mol Cell Biochem*. 2002 May-Jun;234-235(1-2):143-51.
38. Gilmour PS, Morrison ER, Vickers MA, Ford I, Ludlam CA, Greaves M, et al. The procoagulant potential of environmental particles (PM10). *Occup Environ Med*. 2005 Mar;62(3):164-71.
39. Brook RD, Urch B, Dvonch JT, Bard RL, Speck M, Keeler G, et al. Insights into the mechanisms and mediators of the effects of air pollution exposure on blood pressure and vascular function in healthy humans. *Hypertension*. 2009 Sep;54(3):659-67.
40. Kunzli N, Jerrett M, Mack WJ, Beckerman B, LaBree L, Gilliland F, et al. Ambient air pollution and atherosclerosis in Los Angeles. *Environ Health Perspect*. 2005 Feb;113(2):201-6.
41. Mills NL, Donaldson K, Hadoke PW, Boon NA, MacNee W, Cassee FR, et al. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2009 Jan;6(1):36-44.
42. Brook RD, Brook JR, Rajagopalan S. Air pollution: the "Heart" of the problem. *Curr Hypertens Rep*. 2003 Feb;5(1):32-9.
43. Peters A, Dockery DW, Muller JE, Mittleman MA. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation*. 2001 Jun 12;103(23):2810-5.

44. CETESB. Qualidade do Ar. 2009 [cited 14 de dezembro de 2009]; Available from: <http://www.cetesb.sp.gov.br/>
45. Bush ML, Asplund PT, Miles KA, Ben-Jebria A, Ultman JS. Longitudinal distribution of O₃ absorption in the lung: gender differences and intersubject variability. *J Appl Physiol*. 1996 Oct;81(4):1651-7.
46. Sarangapani R, Gentry PR, Covington TR, Teeguarden JG, Clewell HJ, 3rd. Evaluation of the potential impact of age- and gender-specific lung morphology and ventilation rate on the dosimetry of vapors. *Inhal Toxicol*. 2003 Sep;15(10):987-1016.
47. Calderon-Garciduenas L, Reed W, Maronpot RR, Henriquez-Roldan C, Delgado-Chavez R, Calderon-Garciduenas A, et al. Brain inflammation and Alzheimer's-like pathology in individuals exposed to severe air pollution. *Toxicol Pathol*. 2004 Nov-Dec;32(6):650-8.
48. McMillan DR, Gething MJ, Sambrook J. The cellular response to unfolded proteins: intercompartmental signaling. *Curr Opin Biotechnol*. 1994 Oct;5(5):540-5.
49. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:239-67.
50. Vallyathan V, Shi X. The role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung diseases. *Environ Health Perspect*. 1997 Feb;105 Suppl 1:165-77.
51. Castleman WL, Dungworth DL, Schwartz LW, Tyler WS. Acute respiratory bronchiolitis: an ultrastructural and autoradiographic study of epithelial cell injury and renewal in rhesus monkeys exposed to ozone. *Am J Pathol*. 1980 Mar;98(3):811-40.
52. Herbert RA, Hailey JR, Grumbine S, Chou BJ, Sills RC, Haseman JK, et al. Two-year and lifetime toxicity and carcinogenicity studies of ozone in B6C3F1 mice. *Toxicol Pathol*. 1996 Sep-Oct;24(5):539-48.
53. Uhlsom C, Harrison K, Allen CB, Ahmad S, White CW, Murphy RC. Oxidized phospholipids derived from ozone-treated lung surfactant extract reduce macrophage and epithelial cell viability. *Chem Res Toxicol*. 2002 Jul;15(7):896-906.
54. Macchione M, Lorenzi-Filho G, Guimaraes ET, Junqueira VB, Saldiva PH. The use of the frog palate preparation to assess the effects of oxidants on ciliated epithelium. *Free Radic Biol Med*. 1998 Mar 15;24(5):714-21.

55. Postlethwait EM, Cueto R, Velsor LW, Pryor WA. O₃-induced formation of bioactive lipids: estimated surface concentrations and lining layer effects. *Am J Physiol*. 1998 Jun;274(6 Pt 1):L1006-16.
56. Devlin RB, McDonnell WF, Becker S, Madden MC, McGee MP, Perez R, et al. Time-dependent changes of inflammatory mediators in the lungs of humans exposed to 0.4 ppm ozone for 2 hr: a comparison of mediators found in bronchoalveolar lavage fluid 1 and 18 hr after exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996 May;138(1):176-85.
57. Park JW, Taube C, Swasey C, Kodama T, Joetham A, Balhorn A, et al. Interleukin-1 receptor antagonist attenuates airway hyperresponsiveness following exposure to ozone. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 Jun;30(6):830-6.
58. Koren HS, Hatch GE, Graham DE. Nasal lavage as a tool in assessing acute inflammation in response to inhaled pollutants. *Toxicology*. 1990 Jan-Feb;60(1-2):15-25.
59. Kafoury RM, Pryor WA, Squadrito GL, Salgo MG, Zou X, Friedman M. Lipid ozonation products activate phospholipases A₂, C, and D. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998 Jun;150(2):338-49.
60. Longphre M, Zhang L, Harkema JR, Kleeberger SR. Ozone-induced pulmonary inflammation and epithelial proliferation are partially mediated by PAF. *J Appl Physiol*. 1999 Jan;86(1):341-9.
61. Wright DT, Adler KB, Akley NJ, Dailey LA, Friedman M. Ozone stimulates release of platelet activating factor and activates phospholipases in guinea pig tracheal epithelial cells in primary culture. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1994 Jul;127(1):27-36.
62. Inoue H, Aizawa H, Nakano H, Matsumoto K, Kuwano K, Nadel JA, et al. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate ozone-induced airway inflammation in guinea pigs. Possible role of interleukin-8. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Jan;161(1):249-56.
63. Johnson DA, Winters RS, Lee KR, Smith CE. Oxidant effects on rat and human lung proteinase inhibitors. *Res Rep Health Eff Inst*. 1990 Dec(37):1-39.
64. Stenfors N, Pourazar J, Blomberg A, Krishna MT, Mudway I, Helleday R, et al. Effect of ozone on bronchial mucosal inflammation in asthmatic and healthy subjects. *Respir Med*. 2002 May;96(5):352-8.
65. Calderon-Garciduenas L, Maronpot RR, Torres-Jardon R, Henriquez-Roldan C, Schoonhoven R, Acuna-Ayala H, et al. DNA damage in nasal and brain tissues of

canines exposed to air pollutants is associated with evidence of chronic brain inflammation and neurodegeneration. *Toxicol Pathol.* 2003 Sep-Oct;31(5):524-38.

66. Laskin DL, Pendino KJ, Punjabi CJ, Rodriguez del Valle M, Laskin JD. Pulmonary and hepatic effects of inhaled ozone in rats. *Environ Health Perspect.* 1994 Dec;102 Suppl 10:61-4.

67. US-EPA. Air quality criteria for oxides of nitrogen. Research Triangle Park, NC: US Environmental Protection Agency; 1993.

68. Bauer MA, Utell MJ, Morrow PE, Speers DM, Gibb FR. Inhalation of 0.30 ppm nitrogen dioxide potentiates exercise-induced bronchospasm in asthmatics. *Am Rev Respir Dis.* 1986 Dec;134(6):1203-8.

69. Berglund M. Health risk evaluation of nitrogen oxides. Exposure. *Scand J Work Environ Health.* 1993;19 Suppl 2:14-20.

70. Sagai M, Ichinose T, Kubota K. Studies on the biochemical effects of nitrogen dioxide. IV. Relation between the change of lipid peroxidation and the antioxidative protective system in rat lungs upon life span exposure to low levels of NO₂. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1984 May;73(3):444-56.

71. Hussain I, Jain VV, O'Shaughnessy P, Businga TR, Kline J. Effect of nitrogen dioxide exposure on allergic asthma in a murine model. *Chest.* 2004 Jul;126(1):198-204.

72. Koenig JQ. Health effects of sulfur oxides: sulfur dioxide and sulfuric acid. *Health effects of air pollution: How safe is the air we breathe?* Norwell: Kluwer Academic Publishers 2000:99 - 112.

73. US-EPA. Air quality criteria for particulate matter 2004.

74. Zanobetti A, Schwartz J, Dockery DW. Airborne particles are a risk factor for hospital admissions for heart and lung disease. *Environ Health Perspect.* 2000 Nov;108(11):1071-7.

75. Bell ML, McDermott A, Zeger SL, Samet JM, Dominici F. Ozone and short-term mortality in 95 US urban communities, 1987-2000. *Jama.* 2004 Nov 17;292(19):2372-8.

76. Anderson HR, Atkinson RW, Peacock JL, Marston L, Konstantinou K. Meta-analysis of time-series studies and panel studies of Particulate Matter (PM) and Ozone (O₃): Report of a WHO taskgroup: World Health Organization; 2004.

77. Anderson HR, Bremner SA, Atkinson RW, Harrison RM, Walters S. Particulate matter and daily mortality and hospital admissions in the west midlands conurbation of the United Kingdom: associations with fine and coarse particles, black smoke and sulphate. *Occup Environ Med*. 2001 Aug;58(8):504-10.
78. Dockery DW. Health effects of particulate air pollution. *Ann Epidemiol*. 2009 Apr;19(4):257-63.
79. Abbey DE, Nishino N, McDonnell WF, Burchette RJ, Knutsen SF, Lawrence Beeson W, et al. Long-term inhalable particles and other air pollutants related to mortality in nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Feb;159(2):373-82.
80. McDonnell WF, Abbey DE, Nishino N, Lebowitz MD. Long-term ambient ozone concentration and the incidence of asthma in nonsmoking adults: the AHSMOG Study. *Environ Res*. 1999 Feb;80(2 Pt 1):110-21.
81. Miller KA, Siscovick DS, Sheppard L, Shepherd K, Sullivan JH, Anderson GL, et al. Long-term exposure to air pollution and incidence of cardiovascular events in women. *The New England journal of medicine*. 2007 Feb 1;356(5):447-58.
82. Maclure M. The case-crossover design: a method for studying transient effects on the risk of acute events. *Am J Epidemiol*. 1991 Jan 15;133(2):144-53.
83. Barnett AG, Williams GM, Schwartz J, Best TL, Neller AH, Petroeschevsky AL, et al. The effects of air pollution on hospitalizations for cardiovascular disease in elderly people in Australian and New Zealand cities. *Environ Health Perspect*. 2006 Jul;114(7):1018-23.
84. Salvi S. Health effects of ambient air pollution in children. *Paediatr Respir Rev*. 2007 Dec;8(4):275-80.
85. Salvi SS, Nordenhall C, Blomberg A, Rudell B, Pourazar J, Kelly FJ, et al. Acute exposure to diesel exhaust increases IL-8 and GRO-alpha production in healthy human airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Feb;161(2 Pt 1):550-7.
86. Stenfors N, Nordenhall C, Salvi SS, Mudway I, Soderberg M, Blomberg A, et al. Different airway inflammatory responses in asthmatic and healthy humans exposed to diesel. *Eur Respir J*. 2004 Jan;23(1):82-6.

87. Nordenhall C, Pourazar J, Ledin MC, Levin JO, Sandstrom T, Adelroth E. Diesel exhaust enhances airway responsiveness in asthmatic subjects. *Eur Respir J*. 2001 May;17(5):909-15.
88. Braga AL, Saldiva PH, Pereira LA, Menezes JJ, Conceicao GM, Lin CA, et al. Health effects of air pollution exposure on children and adolescents in Sao Paulo, Brazil. *Pediatr Pulmonol*. 2001 Feb;31(2):106-13.
89. Dales RE, Cakmak S, Doiron MS. Gaseous air pollutants and hospitalization for respiratory disease in the neonatal period. *Environ Health Perspect*. 2006 Nov;114(11):1751-4.
90. Koren HS, Devlin RB, Graham DE, Mann R, McGee MP, Horstman DH, et al. Ozone-induced inflammation in the lower airways of human subjects. *Am Rev Respir Dis*. 1989 Feb;139(2):407-15.
91. Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of inhaled ozone on exhaled nitric oxide, pulmonary function, and induced sputum in normal and asthmatic subjects. *Thorax*. 1999 Dec;54(12):1061-9.
92. Kaneko T, Ikeda H, Fu L, Nishiyama H, Okubo T. Platelet-activating factor mediates the ozone-induced increase in airway microvascular leakage in guinea pigs. *Eur J Pharmacol*. 1995 Mar 16;292(3-4):251-5.
93. Krishna MT, Blomberg A, Biscione GL, Kelly F, Sandstrom T, Frew A, et al. Short-term ozone exposure upregulates P-selectin in normal human airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 May;155(5):1798-803.
94. Koenig JQ, Pierson WE, Horike M, Frank R. Effects of SO₂ plus NaCl aerosol combined with moderate exercise on pulmonary function in asthmatic adolescents. *Environ Res*. 1981 Aug;25(2):340-8.
95. Jalaludin BB, Chey T, O'Toole BI, Smith WT, Capon AG, Leeder SR. Acute effects of low levels of ambient ozone on peak expiratory flow rate in a cohort of Australian children. *Int J Epidemiol*. 2000 Jun;29(3):549-57.
96. Jalaludin BB, O'Toole BI, Leeder SR. Acute effects of urban ambient air pollution on respiratory symptoms, asthma medication use, and doctor visits for asthma in a cohort of Australian children. *Environ Res*. 2004 May;95(1):32-42.

97. Glinianaia SV, Rankin J, Bell R, Pless-Mulloli T, Howel D. Particulate air pollution and fetal health: a systematic review of the epidemiologic evidence. *Epidemiology*. 2004 Jan;15(1):36-45.
98. Pereira LA, Loomis D, Conceicao GM, Braga AL, Arcas RM, Kishi HS, et al. Association between air pollution and intrauterine mortality in Sao Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect*. 1998 Jun;106(6):325-9.
99. Hansen CA, Barnett AG, Jalaludin BB, Morgan GG. Ambient air pollution and birth defects in brisbane, australia. *PLoS One*. 2009;4(4):e5408.
100. Neuwinger J, Behre HM, Nieschlag E. External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertil Steril*. 1990 Aug;54(2):308-14.
101. Creasy DM. Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: the appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicol Pathol*. 1997 Mar-Apr;25(2):119-31.
102. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction. *Curr Opin Urol*. 2006 Nov;16(6):428-34.
103. Evenson DP, Wixon R. Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Sep 1;207(2 Suppl):532-7.
104. Takayama S, Akaike M, Kawashima K, Takahashi M, Kurokawa Y. Studies on the optimal treatment period and parameters for detection of male fertility disorder in rats--introductory summary. *J Toxicol Sci*. 1995 Aug;20(3):173-82.
105. Russel LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Clearwater, FL, USA: Cache River Press 1990.
106. Creasy DM. Evaluation of testicular toxicology: a synopsis and discussion of the recommendations proposed by the Society of Toxicologic Pathology. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2003 Oct;68(5):408-15.
107. Linder RE, Strader LF, Slott VL, Suarez JD. Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposures to fourteen reproductive toxicants. *Reprod Toxicol*. 1992;6(6):491-505.
108. Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol*. 1965;27:137-8.

109. Leblond CP, Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci.* 1952 Nov 20;55(4):548-73.
110. Blazak WF, Ernst TL, Stewart BE. Potential indicators of reproductive toxicity: testicular sperm production and epididymal sperm number, transit time, and motility in Fischer 344 rats. *Fundam Appl Toxicol.* 1985 Dec;5(6 Pt 1):1097-103.
111. Mangelsdorf I, Buschmann J, Orthen B. Some aspects relating to the evaluation of the effects of chemicals on male fertility. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2003 Jun;37(3):356-69.
112. Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation. *Reprod Toxicol.* 1996 May-Jun;10(3):237-44.
113. Pauluhn J. Overview of inhalation exposure techniques: strengths and weaknesses. *Exp Toxicol Pathol.* 2005 Jul;57 Suppl 1:111-28.
114. Gerde P. Animal models and their limitations: on the problem of high-to-low dose extrapolations following inhalation exposures. *Exp Toxicol Pathol.* 2005 Jul;57 Suppl 1:143-6.
115. Wong BA. Inhalation exposure systems: design, methods and operation. *Toxicol Pathol.* 2007;35(1):3-14.
116. Pereira P, Saldiva PH, Sakae RS, Bohm GM, Martins MA. Urban levels of air pollution increase lung responsiveness in rats. *Environ Res.* 1995 May;69(2):96-101.
117. Somers CM, Yauk CL, White PA, Parfett CL, Quinn JS. Air pollution induces heritable DNA mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Dec 10;99(25):15904-7.
118. Bhaskaran K, Hajat S, Haines A, Herrett E, Wilkinson P, Smeeth L. Effects of air pollution on the incidence of myocardial infarction. *Heart.* 2009 Nov;95(21):1746-59.
119. Alvarez JG, Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 1995 Nov;42(3):334-46.
120. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis.* 1999 Sep;14(5):505-12.

121. Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl.* 2002 Nov-Dec;23(6):737-52.
122. de Lamirande E, Leduc BE, Iwasaki A, Hassouna M, Gagnon C. Increased reactive oxygen species formation in semen of patients with spinal cord injury. *Fertil Steril.* 1995 Mar;63(3):637-42.
123. Padron OF, Brackett NL, Sharma RK, Lynne CM, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Seminal reactive oxygen species and sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. *Fertil Steril.* 1997 Jun;67(6):1115-20.
124. Sikka SC. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci.* 1996;1:e78-86.
125. Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril.* 1997 Sep;68(3):519-24.
126. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod.* 1997 Mar;56(3):602-7.
127. Izawa H, Kohara M, Watanabe G, Taya K, Sagai M. Effects of diesel exhaust particles on the male reproductive system in strains of mice with different aryl hydrocarbon receptor responsiveness. *J Reprod Dev.* 2007 Dec;53(6):1191-7.
128. Adamopoulos DA, Pappa A, Nicopoulou S, Andreou E, Karamertzanis M, Michopoulos J, et al. Seminal volume and total sperm number trends in men attending subfertility clinics in the greater Athens area during the period 1977-1993. *Human reproduction (Oxford, England).* 1996 Sep;11(9):1936-41.
129. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Bmj.* 1992 Sep 12;305(6854):609-13.
130. Comhaire FH, Mahmoud AM, Schoonjans F. Sperm quality, birth rates and the environment in Flanders (Belgium). *Reprod Toxicol.* 2007 Feb;23(2):133-7.
131. Horak S, Kaminska J, Olejek A. The fertilization potential of donor semen between 1982 and 2004 in the industrial area of Upper Silesia (Poland). *Ann Agric Environ Med.* 2008 Jun;15(1):113-8.
132. Joffe M. What has happened to human fertility? *Hum Reprod.* 2009 Nov 19.

133. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *The New England journal of medicine*. 1995 Feb 2;332(5):281-5.
134. Sharpe RM, Fisher JS, Millar MM, Jobling S, Sumpter JP. Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ Health Perspect*. 1995 Dec;103(12):1136-43.
135. Sharpe RM, Skakkebaek NE. Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertil Steril*. 2008 Feb;89(2 Suppl):e33-8.
136. Sram RJ, Binkova B, Rossner P, Rubes J, Topinka J, Dejmek J. Adverse reproductive outcomes from exposure to environmental mutagens. *Mutation research*. 1999 Jul 16;428(1-2):203-15.
137. Selevan SG, Borkovec L, Slott VL, Zudova Z, Rubes J, Evenson DP, et al. Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution. *Environ Health Perspect*. 2000 Sep;108(9):887-94.
138. Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, Zudova D, Vozdova M, Zudova Z, et al. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2005 Oct;20(10):2776-83.
139. Rubes J, Rybar R, Prinosilova P, Veznik Z, Chvatalova I, Solansky I, et al. Genetic polymorphisms influence the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutation research*. 2010 Jan 5;683(1-2):9-15.
140. De Rosa M, Zarrilli S, Paesano L, Carbone U, Boggia B, Petretta M, et al. Traffic pollutants affect fertility in men. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2003 May;18(5):1055-61.
141. Guven A, Kayikci A, Cam K, Arbak P, Balbay O, Cam M. Alterations in semen parameters of toll collectors working at motorways: does diesel exposure induce detrimental effects on semen? *Andrologia*. 2008 Dec;40(6):346-51.
142. Hammoud A, Carrell DT, Gibson M, Sanderson M, Parker-Jones K, Matthew Peterson C. Decreased sperm motility is associated with air pollution in Salt Lake City. *Fertil Steril*. 2009 Feb 11.

143. Sokol RZ, Kraft P, Fowler IM, Mamet R, Kim E, Berhane KT. Exposure to environmental ozone alters semen quality. *Environ Health Perspect.* 2006 Mar;114(3):360-5.
144. Watanabe N, Oonuki Y. Inhalation of diesel engine exhaust affects spermatogenesis in growing male rats. *Environ Health Perspect.* 1999 Jul;107(7):539-44.
145. Watanabe N, Kurita M. The masculinization of the fetus during pregnancy due to inhalation of diesel exhaust. *Environ Health Perspect.* 2001 Feb;109(2):111-9.
146. Watanabe N. Decreased number of sperms and Sertoli cells in mature rats exposed to diesel exhaust as fetuses. *Toxicology letters.* 2005 Jan 15;155(1):51-8.
147. Yoshida S, Sagai M, Oshio S, Umeda T, Ihara T, Sugamata M, et al. Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice. *Int J Androl.* 1999 Oct;22(5):307-15.
148. Ono N, Oshio S, Niwata Y, Yoshida S, Tsukue N, Sugawara I, et al. Prenatal exposure to diesel exhaust impairs mouse spermatogenesis. *Inhal Toxicol.* 2007 Mar;19(3):275-81.
149. Ono N, Oshio S, Niwata Y, Yoshida S, Tsukue N, Sugawara I, et al. Detrimental effects of prenatal exposure to filtered diesel exhaust on mouse spermatogenesis. *Arch Toxicol.* 2008 Nov;82(11):851-9.
150. Hemmingsen JG, Hougaard KS, Talsness C, Wellejus A, Loft S, Wallin H, et al. Prenatal exposure to diesel exhaust particles and effect on the male reproductive system in mice. *Toxicology.* 2009 Oct 1;264(1-2):61-8.
151. Yauk C, Polyzos A, Rowan-Carroll A, Somers CM, Godschalk RW, Van Schooten FJ, et al. Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jan 15;105(2):605-10.
152. Somers CM, Cooper DN. Air pollution and mutations in the germline: are humans at risk? *Hum Genet.* 2009 Mar;125(2):119-30.
153. Apostoli P, Kiss P, Porru S, Bonde JP, Vanhoorne M. Male reproductive toxicity of lead in animals and humans. ASCLEPIOS Study Group. *Occup Environ Med.* 1998 Jun;55(6):364-74.

154. Aragon MA, Ayala ME, Fortoul TI, Bizarro P, Altamirano-Lozano M. Vanadium induced ultrastructural changes and apoptosis in male germ cells. *Reprod Toxicol*. 2005 May-Jun;20(1):127-34.
155. Benoff S, Jacob A, Hurley IR. Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Hum Reprod Update*. 2000 Mar-Apr;6(2):107-21.
156. Siu ER, Mruk DD, Porto CS, Cheng CY. Cadmium-induced testicular injury. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Aug 1;238(3):240-9.

ARTIGO CIENTÍFICO

Encaminhado para publicação no Journal of Urology.

Does ambient air pollution exposure at usual urban concentrations impair testicular function? An experimental study in rats.

Eduardo Ribeiro¹, Ernani Rhoden¹, Grazielle Halmenschlager², Ana Zanchi³, Cláudia Rhoden³

1. Postgraduate Course of Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS),
2. Postgraduate Course of Medical Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA),
3. Laboratory of Oxidative Stress and Atmospheric Pollution, Health Basic Sciences Department, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA)

RUNNINGHEAD: Ambient air pollution and testicular function

KEYWORDS: air pollution; testis; spermatogenesis; testosterone; testicular toxicity

ABSTRACT

PURPOSE: The aim of the present study is to evaluate the effects of ambient air pollution exposure on testicular function and oxidative stress in rats.

METHODS: Twenty Wistar rats were randomly placed since fetal period in two exposure chambers, filtered (FC) and non-filtered (NFC). The chambers were built nearby a high density traffic area, with an average PM_{2.5} ambient air concentration (NFC) of 22.1 µg/m³. After 150 days testicular weight, testicular oxidative stress and serum and intratesticular total testosterone (TT) mean concentrations were evaluated. Also, each rat had 10 consecutive round seminiferous tubules at spermatogenic stage VII-VIII evaluated for the mean seminiferous tubular diameter measurement and histological count and cell ratios of round spermatids, pachytene spermatocytes and Sertoli's cells with evident nucleoli.

RESULTS: Absolute testicular weights (gm) were greater in the FC group (1.86 ± 0.18 vs 1.64 ± 0.13; p < 0.01). Serum (ng/dL) and intra testicular (ng/gm of testis) TT mean values were approximately 2.8 times higher in the NFC group (208 ± 109 vs 577 ± 395; p = 0.02 and 26.6 ± 17.2 vs 106.3 ± 76.5; p = 0.01). There was no statistical difference between FC and NFC groups regarding oxidative stress or any testicular histological endpoint evaluated.

CONCLUSIONS: Male rats exposed to urban ambient air pollution concentration had smaller testis volume and significantly higher serum and intratesticular testosterone concentrations than rats breathing filtered air. Spermatogenesis evaluated by histological testicular cell counts was not influenced by air pollution exposure at these levels.

INTRODUCTION

Anthropogenic air pollution is a major global problem. Rapid urbanization and industrialization with their associated increase in vehicular and industrial emissions have deteriorated the quality of the air we breathe. It has been consistently shown by many epidemiological studies that air pollution is associated with cardiovascular and respiratory diseases, lung cancer and mortality.

Noxious inhaled substances not only are trapped within the lungs causing local damage but may also diffuse across the alveolar capillary membrane into systemic circulation directly affecting distant organs ¹. Besides, pulmonary inflammation increases blood levels of inflammatory substances such as cytokines which may contribute indirectly to systemic effects through oxidative stress ². Additionally, some particulate matter components such as polyaromatic hydrocarbons, dioxin derivatives and nitrophenols may act as endocrine disruptors, potentially altering testicular regulation and function ³.

There are a few epidemiological studies suggesting that air pollution may impair semen quality ⁴⁻⁸. Air pollution components have been reported by some experimental studies to cause male reproductive toxicity ^{3, 9}. Exposure to extremely high levels of diesel exhaust (DE) has been shown to decrease sperm production in mice and rats and to increase testosterone levels and decrease FSH and LH levels in rats ¹⁰⁻¹⁵. In this context, we evaluated the effects of exposure to urban ambient levels of air pollution on testicular function and testicular oxidative stress in rats.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Twenty male Wistar rats were kept in standard plastic cages (47 x 34 x 18 cm), six animals per cage, with free access to food and water, inside exposure chambers with controlled temperature of $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. The principles contained in the guide for the care and use of laboratory animals of the Institute of Laboratory Animal Resources (Commission on Life Sciences, National Research Council, USA) were followed throughout the experiment, and the study was approved by the Animal Care and Ethics Committee of the author's Institution.

Exposure Chambers

The experiment was conducted in exposure chambers situated in the courtyard of the University (UFCSPA), just nearby a high density traffic area, with the source of air pollution predominantly automotive. The exposure chambers were specifically designed by two of the authors (CRR and ACZ) for conducting air pollution studies.

Two 11.8 m^3 exposure chambers entirely covered by a white plastic film with ultraviolet protection were built over a two-story metallic structure, such as a greenhouse (Figure 1). Controlled air supply with constant flow rate of 33L/min was provided for the exposure chambers, one filtered (F) and the other non-filtered (NF). Filtered air passed by particulate pre filters (PP-30® and a 60% efficiency 18" bag filter), chemical filters (48 pounds of PK-12 Chemi Select® and 30 pounds PK-12 Purakol®) and final particulate filters (one JFL-90 and two HEPA PH-97) before reaching the chamber (Purafil® side access B07-8338, Doraville, USA) (Figure 2). Outside air passed only by a coarse particulate pre filter before it was delivered to the NF chamber. Air pressure inside the chambers never exceeded the atmospheric pressure by more than 3 cm H₂O. Air flow was provided by a fan assembled between the filtration unit outlet and the chamber inlet. NO₂ and PM_{2.5} concentrations measured inside the NF chamber were 17.0 µg/m³ and 22.1 µg/m³. Concentrations measured inside the F chamber were, respectively, 84% and 78% smaller ($p < 0.001$).

Experimental Design

Pregnant females were maintained in the F and NF chambers during the whole gestation and feeding periods. After the weaning period (21 days), the male pups were separated and maintained in their same environment (F or NF) throughout the experiment. After 150 days of exposure, 8 rats from the F chamber (F group) and 12 rats from the NF chamber (NF group) were killed by decapitation, between 8:00 AM and 11:00 AM. Cervical blood was collected and serum samples separated by centrifugation and stored at – 80°C until analysis. The testes were carefully dissected out and weighted (analytical balance Marte®, precision 0.01g).

Testicular Histology

The right testes were fixed by immersion in Karnovsky's solution immediately after removal. Additionally, just after removal, a tiny hole was made in the albuginea and the testicular parenchima slowly irrigated with the solution with a 13 Fr needle. The testes were sectioned after 2 hs and kept in the solution for 24 hs. They were then dehydrated and embedded in glycol methacrylate resin (Technovit 7100®, Heraeus Kulzer Co., Germany). The testes were transversely cut into 5 µm sections, stained with periodic acid Schiff's reagent (PAS) and hematoxylin. Leblond and Clermont stages of the spermatogenesis¹⁶ were combined into 5 different stages (I-VI, VII-VIII, IX-X, XI-XIII e XIV). The crude number of Sertoli cell nuclei with evident nucleoli, pachytenes spermatocytes and round spermatids were recorded in 10 round (long / short diameter < 1.5) tubular cross-sections at stage VII-VIII per rat. The mean nuclear diameter of pachytenes spermatocytes and round spermatids was also determined. The crude nuclear count of these germ cells, which represented both whole and sectioned nuclei, was then corrected to the true cellular count, using the Abercrombie's correction factor (crude cellular count X section thickness / [section thickness + nuclear diameter])¹⁷. The mean diameter of these 10 round tubules per rat and the ratios of the different cell types were also determined. Quantitative analysis was done manually with the aid of an image editor (Adobe photoshop®) and an image analyzer (Image J®). The presence of retained maturation-phase spermatids was determined at the postspermiation stage IX-X. The presence of interstitial infiltration, cellular vacuolation, and giant multinucleated

cells was also investigated.

Oxidative stress determination

The left testes were separately homogenized (1:9) in a phosphate buffer (pH 7.4) with protein inhibitors (1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml soybean trypsin inhibitor, 1 µg/ml pepstatin, and 0.5 mM PMSF). The suspension was centrifuged at 600 g for 10 min at 0-4°C to remove nuclei and cell debris. The pellets were discarded and the supernatants were used as homogenates. Levels of malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity were measured.

Lipid peroxidation was estimated by monitoring the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), following the reaction of TBA with MDA, an aldehyde by-product of cellular lipoperoxidation¹⁸. Briefly, 0.5 ml of the crude homogenate was incubated with 1.5 ml of 10% trichloroacetic acid (TCA) at 4°C for 30 min. After centrifugation (15 min at 3000 rpm), 1.5 ml of the supernatant was transferred to a tube containing 1.5 ml of TBA 0.67% (Sigma®), agitated, and heated during 15 min in a boiling water bath. After cooling to room temperature, 3 ml of butanol was added to the mixture, which was then vigorously agitated for 40 seconds and centrifuged at 2000 rpm. The absorbance of the butanol containing the MDA-TBA pigment was read at 535 nm in a spectrophotometer (Perkin Elmer® Lambda 35, Fremont, CA, USA). Total protein concentration in the homogenate samples was determined using the Bradford Protein assay at 595 nm, considering serum albumin (1mg/mL) as standard¹⁹. Results were expressed in nmol MDA mg⁻¹ of protein.

SOD activity was evaluated as previously described²⁰. Briefly, the inhibition of pyrogallol auto-oxidation by SOD activity was measured in a spectrophotometer at 420 nm. One unit of SOD is defined as the amount of enzyme capable of inhibiting 50% of the auto-oxidation reaction. The results were expressed in Units of SOD / mg total proteins.

CAT activity was determined by measuring the decomposition of hydrogen peroxide (H₂O₂) at 240 nm for 120 s according to the method of Aebi at 240 nm²¹. The results were expressed in pmol/mg of total proteins.

Total Testosterone Determination

The serum total testosterone and intra-testicular concentrations were determined by chemiluminescence (Imunnolite®, DPC, CA, USA). The intra and interassay coefficients of variation were 6.7% and 7.7%. The testicular homogenate was further diluted (1:5) in a phosphate buffer (pH 7.4) and centrifuged at 4000 rpm for 15 minutes at 4°C. The supernatant was used for intra-testicular measurement. Results were expressed in ng/gm of testes. The correlation between serum and intra-testicular total testosterone concentrations was measured by the Pearson correlation coefficient.

Statistical Analysis

The histological crude count of round spermatids at stage VII-VIII of the seminiferous epithelium cycle was the endpoint used for sample size calculation. The mean crude count \pm standard deviation was estimated in 182 ± 15 ²². With significance level set at 0.05, power at 0.9 and minimum difference of means to be detected at 15% (reduction of 27 round spermatids), a total of 8 animals per group was required.

All histological analyses were done by the same examiner (E.P.R) who was blind in relation to the samples groups. Student's t-test was conducted, and a *p*-value less than 0.05 was considered to be statistically significant. The number of round spermatids and pachytenes spermatocytes was recounted in one randomly selected tubule per rat (10%), and the intraclass correlation coefficient was calculated. Accordingly, the statistical software package (SPSS® version 12.0) was used.

RESULTS

Absolute testicular weights were greater in F group ($p < 0.05$; Table 1). Serum total testosterone and intra-testicular mean values were higher in NF group. ($p < 0.05$; Table 1). Serum and intra-testicular testosterone concentrations were highly correlated (Pearson coefficient = 96%; $p < 0.01$). Mean MDA, SOD and CAT concentrations in the testicular homogenate of both groups were similar (Table 1).

No histopathological qualitative alteration was observed in the examined seminiferous tubules of control and experimental rats (Figure 3). Neither the diameter of the seminiferous tubules, nor the crude number of round spermatids, pachytene spermatocytes and Sertoli cells and the corrected true germ cell counts differ between the two groups. The true spermatid and pachytene counts ratio was slightly higher in the F group (2.82 ± 0.18 vs 2.66 ± 0.15 ; $p = 0.048$). The other cell ratios were similar (Table 2). A high reliability of the germ cell counts was observed (intraclass correlation coefficient of 0.96).

DISCUSSION

The current study was performed to verify whether air pollution in urban ambient concentrations may impair testicular function in rats. The most consistent finding was that total testosterone serum and intra-testicular mean levels were 2.8 times greater in the group of rats exposed to air pollution.

Total testosterone serum levels have been found to be increased as a result of diesel exhaust (DE) exposure at high concentrations in previous studies in rats and mice^{10-14, 23}. Watanabe and Oonuki described an increase of approximately 1.8 times in the serum mean concentration of testosterone and estradiol and a decrease in serum mean concentration of FSH and LH in rats exposed to high concentrations of DE¹⁰. Exposure period was 6 hour daily, 5 days/week for 3 months, starting after birth. An increase in the mean adrenal volume associated with DE exposure was also observed, and they speculated that an increase androgen secretion from the adrenal cortex might explain their findings. In a subsequent study, it was found that inhalation of DE during pregnancy masculinizes fetuses through accumulation of testosterone in mother rats²⁴. While estradiol and LH serum levels of DE exposed pregnant rats were lower than pregnant controls, urinary 17-ketosteroids and 17-hydroxycorticosteroids levels and adrenal weight were similar. Their hypothesis was that excessive maternal testosterone was not the result of elevated adrenal gland function, but possibly from aromatase deficiency. In another study, Leydig cell degeneration and histological evidence of tubular damage was described in mice after 6 months of DE exposure¹².

Studies of serum testosterone in adult rats and mice exposed to DE exclusively during fetal period have found controversial results^{11, 13-15, 25}. While in Hemmingsen et al and Watanabe studies the total testosterone serum levels did not change, Li et al found a decrease in its levels by the 4th week and Ono et al found a decrease by the 5th week and an increase by the 12th week^{11, 13, 15, 25}. An increase already by the 5th week was subsequently described when exposing to DE filtered for particles¹⁴. An increase in the testicular mRNA expression of FSH and LH receptors and a marked decrease in the testicular mRNA transcription of steroidogenic acute regulatory protein (stAR) and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD) has also been described^{13, 14, 25}. It has been

described that prenatal exposure to materials known to have anti-androgenic effects induces these mRNA expression alterations, causing endocrine disruption after birth ²⁵.

No statistically significant difference between F and NF groups could be observed through our primary endpoint, the histological true germ cell count, which is considered one of the most sensitive methods for testicular toxicity evaluation ^{16, 26}. The only histological difference observed was that true spermatid and pachytene cell ratio was marginally higher in the F group. Nevertheless, F group had a mean testicular weight approximately 13% greater than the NF group ($p = 0.006$), suggesting that an impairment in spermatogenesis did occur. Histological qualitative testicular alterations such as interstitial edema and tubular vacuolization did not occur.

Air pollution has been linked to a decrease in semen quality and an increase in the percentage of sperm with DNA fragmentation measured by sperm chromatin structure assay (SCSA) in epidemiological studies ^{4-8, 27, 28}.

Previous experimental studies have associated DE and resuspended aerosolized DE particles (DEP) exposures with reduction in daily sperm production in mice and rats ¹⁰⁻¹⁵. This reduction occurred even in animals exposed exclusively during fetal period ^{11, 13-15}. Watanabe and Oonuki have also histologically shown decreased numbers of round spermatids in stages VI – VIII tubules and increased numbers of degenerated cells in DE exposed animals ¹⁰.

The elimination of the particulate matter from DE exposure by HEPA filtration has not seriously influenced the results in several studies suggesting that the gaseous or nano particle phases of DE are behind spermatogenesis impairment and endocrine disruption ^{10, 11, 14, 25}. Nevertheless, if there is a single culprit or testicular toxicity is caused by a mixture of noxious substances is still to be defined. Polyaromatic hydrocarbons and nitrophenols present in air pollution have been pointed as plausible testicular toxic agents ^{3,9}.

While the present study was designed to reproduce a usual urban atmospheric environment, previous papers have all worked with highly above normal levels of pollutant exposures. In fact, that air pollution exposure of rats at usual urban concentrations could cause a substantial increase in serum testosterone had not yet been described. And it is reasonable to assume that the lower dose administered in our

model may provide better estimates of human exposure risks. For instance, the concentrations used in the Watanabe and Onuki study were 60 – 100 times higher than those found in an average urban area ¹⁰. In a subsequent study, Watanabe have shown that fetal exposure to lower ($PM_{10} = 170 \mu\text{g}/\text{m}^3$ and $NO_2 = 123 \mu\text{g}/\text{m}^3$) and higher ($PM_{10} = 1700 \mu\text{g}/\text{m}^3$ and $NO_2 = 972 \mu\text{g}/\text{m}^3$) DE concentrations produced the same adverse effects in spermatogenesis ¹¹. Even though their lower concentration exposure model may reproduce the peak times of highly polluted urban areas, it was still highly above the World Health Organization air quality guidelines (PM_{10} and NO_2 annual means of $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ and $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$) and 4 – 7 times greater than ours (PM_{10} and NO_2 means of, respectively, $44.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ and $17 \mu\text{g}/\text{m}^3$).

CONCLUSIONS

In conclusion, male rats exposed to usual urban ambient air pollution concentration had smaller testis volume and significantly higher serum and intratesticular testosterone concentrations than rats breathing filtered air. Based on the data in the current study, spermatogenesis evaluated by histological testicular cell counts was not influenced by air pollution exposure at ambient concentration.

REFERENCES

1. Bhaskaran, K., Hajat, S., Haines, A. et al.: Effects of air pollution on the incidence of myocardial infarction. *Heart*, **95**: 1746, 2009
2. Brook, R. D., Brook, J. R., Rajagopalan, S.: Air pollution: the "Heart" of the problem. *Curr Hypertens Rep*, **5**: 32, 2003
3. Izawa, H., Kohara, M., Watanabe, G. et al.: Effects of diesel exhaust particles on the male reproductive system in strains of mice with different aryl hydrocarbon receptor responsiveness. *J Reprod Dev*, **53**: 1191, 2007
4. Sram, R. J., Binkova, B., Rossner, P. et al.: Adverse reproductive outcomes from exposure to environmental mutagens. *Mutat Res*, **428**: 203, 1999
5. De Rosa, M., Zarrilli, S., Paesano, L. et al.: Traffic pollutants affect fertility in men. *Hum Reprod*, **18**: 1055, 2003
6. Guven, A., Kayikci, A., Cam, K. et al.: Alterations in semen parameters of toll collectors working at motorways: does diesel exposure induce detrimental effects on semen? *Andrologia*, **40**: 346, 2008
7. Hammoud, A., Carrell, D. T., Gibson, M. et al.: Decreased sperm motility is associated with air pollution in Salt Lake City. *Fertil Steril*, 2009
8. Sokol, R. Z., Kraft, P., Fowler, I. M. et al.: Exposure to environmental ozone alters semen quality. *Environ Health Perspect*, **114**: 360, 2006
9. Li, X., Li, C., Suzuki, A. K. et al.: 4-Nitrophenol isolated from diesel exhaust particles disrupts regulation of reproductive hormones in immature male rats. *Endocrine*, **36**: 98, 2009
10. Watanabe, N., Oonuki, Y.: Inhalation of diesel engine exhaust affects spermatogenesis in growing male rats. *Environ Health Perspect*, **107**: 539, 1999
11. Watanabe, N.: Decreased number of sperms and Sertoli cells in mature rats exposed to diesel exhaust as fetuses. *Toxicol Lett*, **155**: 51, 2005
12. Yoshida, S., Sagai, M., Oshio, S. et al.: Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice. *Int J Androl*, **22**: 307, 1999
13. Ono, N., Oshio, S., Niwata, Y. et al.: Prenatal exposure to diesel exhaust impairs mouse spermatogenesis. *Inhal Toxicol*, **19**: 275, 2007
14. Ono, N., Oshio, S., Niwata, Y. et al.: Detrimental effects of prenatal exposure to filtered diesel exhaust on mouse spermatogenesis. *Arch Toxicol*, **82**: 851, 2008

15. Hemmingsen, J. G., Hougaard, K. S., Talsness, C. et al.: Prenatal exposure to diesel exhaust particles and effect on the male reproductive system in mice. *Toxicology*, **264**: 61, 2009
16. Russel, L. D., Ettlin, R. A., Sinha Hikim, A. P. et al.: *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Clearwater, FL, USA: Cache River Press, 1990
17. Abercrombie, M., Johnson, M. L.: Quantitative histology of Wallerian degeneration: I. Nuclear population in rabbit sciatic nerve. *J Anat*, **80**: 37, 1946
18. Buege, J. A., Aust, S. D.: Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, **52**: 302, 1978
19. Schleicher, E., Wieland, O. H.: Evaluation of the Bradford method for protein determination in body fluids. *J Clin Chem Clin Biochem*, **16**: 533, 1978
20. Marklund, S., Marklund, G.: Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, **47**: 469, 1974
21. Aebi, H.: Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, **105**: 121, 1984
22. Ribeiro, E. P., Rhoden, E. L., Horn, M. M. et al.: Effects of subchronic exposure to radio frequency from a conventional cellular telephone on testicular function in adult rats. *J Urol*, **177**: 395, 2007
23. Tsukue, N., Toda, N., Tsubone, H. et al.: Diesel exhaust (DE) affects the regulation of testicular function in male Fischer 344 rats. *J Toxicol Environ Health A*, **63**: 115, 2001
24. Watanabe, N., Kurita, M.: The masculinization of the fetus during pregnancy due to inhalation of diesel exhaust. *Environ Health Perspect*, **109**: 111, 2001
25. Li, C., Taneda, S., Taya, K. et al.: Effects of in utero exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on testicular function in immature male rats. *Toxicol Lett*, **185**: 1, 2009
26. Creasy, D. M.: Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: the appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicol Pathol*, **25**: 119, 1997
27. Selevan, S. G., Borkovec, L., Slott, V. L. et al.: Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution. *Environ Health Perspect*, **108**: 887, 2000
28. Rubes, J., Selevan, S. G., Evenson, D. P. et al.: Episodic air pollution is

associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. Hum Reprod, **20**: 2776, 2005

Table 1. Testicular weight, serum and intra-testicular testosterone and testicular oxidative stress status in rats exposed to filtered and non filtered exposition chambers

Endpoint	Filtered Group	Non filtered Group	<i>P</i> value
	$X \pm SD$	$X \pm SD$	
Absolute organ weight			
Right testes (gm)	1.86 ± 0.18	1.64 ± 0.13	0.006
Left testes (gm)	1.85 ± 0.17	1.64 ± 0.13	0.006
Total testosterone			
Serum (ng/dL)	208 ± 109	577 ± 395	0.02
Intratesticular (ng/gm)	26.6 ± 17.2	106.3 ± 76.5	0.01
Oxidative Stress			
MDA (nmol MDA g ⁻¹ prot)	40.5 ± 22	43.5 ± 38	0.85
Catalase (pmol mg ⁻¹ prot)	10.2 ± 4.1	7.9 ± 4.5	0.25
SOD (SOD units mg ⁻¹ prot)	17.7 ± 2.8	20.7 ± 7.2	0.28

Table 2. Quantitative histological endpoints in rats exposed to filtered and non filtered exposition chambers

Testicular histological endpoints	Filtered Group	Non filtered Group	P value
	X ± SD	X ± SD	
Tubular diameter (µm)	375 ± 14	369 ± 26	0.56
Crude nuclear count			
Round spermatids	153 ± 24	150 ± 11	0.71
Pachytenes	63 ± 8	66 ± 6	0.31
Sertoli cell with nucleoli	14.6 ± 2.8	14.7 ± 1.4	0.92
True nuclear count *			
Round spermatids 7	54.6 ± 7.3	53.7 ± 3.4	0.70
Pachytenes	19.4 ± 2.1	20.2 ± 1.5	0.31
Cell ratios			
Round spermatids / Pachytenes	2.82 ± 0.18	2.66 ± 0.15	0.048
Round spermatids / Sertoli cell	3.8 ± 0.3	3.7 ± 0.3	0.42
Pachytenes / Sertoli cell	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.1	0.62

* After Abercrombie's correction factor¹⁷.



Figure 1. External view of the exposition chamber, located at the university courtyard.



Figure 2. Internal view of the first floor of the exposition chamber with the air filter.

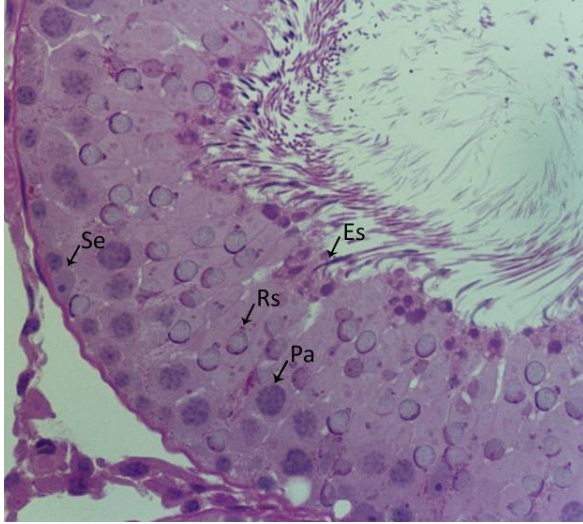


Figure 3. Histologic testicular section of a rat from the non filtered chamber, showing a normally organized seminiferous epithelium at stage VII-VIII. Rs = round spermatid; Es = Elongated spermatid; Pa = pachytene spermatocyte; Se = Sertoli cell; PI = preleptotene spermatocyte; Me = meiosis (Karnowsky's immersion fixation; glycol methacrylate embedding; periodic acid Schiff - hematoxylin staining; final magnification X 800).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, observamos que ratos expostos a concentrações habituais de poluição atmosférica em ambientes urbanos apresentaram peso absoluto dos testículos em média 13% menor que no grupo de ratos da câmara filtrada (1.86 ± 0.18 vs 1.64 ± 0.13 ; $p < 0.01$). Nenhum outro marcador de espermatogênese avaliado, incluindo a contagem celular histológica, demonstrou diferença entre os grupos. As medidas de estresse oxidativo avaliadas no homogeneizado testicular também foram similares entre os grupos. Por outro lado, o achado mais consistente do estudo foi que o grupo de ratos da câmara não filtrada, ou seja, o grupo de ratos respirando o mesmo ar poluído que nós respiramos em ambientes externos como àquele, apresentaram níveis de testosterona sérica e intra-testicular 2.8 vezes maiores que os ratos da câmara filtrada (208 ± 109 vs 577 ± 395 ng/dL; $p = 0.02$ e 26.6 ± 17.2 vs 106.3 ± 76.5 ng/g de tecido; $p = 0.01$, respectivamente).

ANEXO 1 – Descrição do processamento histológico e contagem celular histológica

A análise histopatológica testicular se firmou como o indicador mais sensível e confiável para avaliação da toxicidade testicular, capaz de detectar sutis alterações da produção espermática. Para tanto, é imprescindível que sejam observadas técnicas adequadas de preparo (fixação, plano de corte, inclusão, coloração) e avaliação histopatológica. Na sequência, serão descritas as técnicas empregadas no presente estudo.

1. Fixação testicular

Os testículos são dissecados, pesados e imediatamente fixados por imersão em solução de Karnovsky (glutaraldeído 10% + paraformaldeído 8% + tamponado com cacodilato de sódio para um pH entre 7.2 e 7.4). Inicialmente, a cápsula testicular é multi-perfurada em uma de suas extremidades, com o cuidado para não se lesar o parênquima testicular. Na sequência, a outra extremidade é puncionada com uma agulha de insulina, e o parênquima testicular lentamente irrigado com a solução fixadora, por cerca de 2 minutos. Após 4 horas de imersão, os testículos são seccionados transversalmente em rodela de 5 mm, para um total médio de 5 rodela por testículo, com objetivo de melhor penetração tecidual do fixador. As rodela de testículo ficam por mais 20 horas imersas no fixador, num total de 24 horas.

Uma opção para ainda melhor preservação da estrutura histológica é a perfusão vascular com glutaraldeído, mas a necessidade de aproveitamento de órgãos a fresco (pulmão, cérebro, coração) dos animais deste estudo impossibilitou a utilização desta alternativa.

2. Inclusão em resina de glicol metacrilato

Após 24 horas, uma rodela de cada testículo foi lavada abundantemente em água e posteriormente preparada para inclusão em resina de glicolmetacrilato. O processo se inicia com desidratação progressiva em álcool, conforme o seguinte esquema:

Álcool 70% - 1 hora – 2 vezes
Álcool 80% - 50 minutos – 1 vez
Álcool 90% - 50 minutos – 1 vez
Álcool 95% - 50 minutos – 1 vez
Álcool 100% - 50 minutos – 2 vezes

Após a desidratação, inicia-se o processo de inclusão em resina. É utilizada a resina de glicolmetacrilato Technovit 7100 ® (Heraeus Kulzer Co., Alemanha).

O processo de embebição é realizado conforme instruções do fabricante, em temperatura ambiente (23°C), em formas apropriadas (histoform C ®). Inicialmente, mistura-se a solução básica com o ativador em pó. As peças histológicas são colocadas nas formas e totalmente cobertas com uma solução contendo partes iguais de solução básica ativada e álcool 95%, ficando assim por 24 horas. Na sequência, são transferidas para formas contendo apenas solução básica ativada, novamente por um período de 24 horas. Na terceira etapa, as peças são colocadas em novas formas, e submersas em uma mistura contendo solução básica ativada e o endurecedor. Este processo deve ser realizado com certa rapidez, pois após cerca de 5 minutos já inicia o processo de polimerização, que deve ser realizado em completo repouso. Polimeriza-se 1 hora em temperatura ambiente, e depois por mais uma hora a 35°C. Após este período, as peças já estão completamente incluídas na resina, com o processo de polimerização concluído. O processo de polimerização envolve liberação de calor. Por este motivo, é importante que as formas apropriadas sejam utilizadas. Formas impróprias podem esquentar, fazendo com que a temperatura aumente, em prejuízo do processo de polimerização. Os blocos de resina contendo as peças histológicas são então retirados das formas e colados com cola super bonder ® em suporte plástico ou de madeira, para prensão no micrótomo.

3. Secção das peças

Os blocos de resina podem ser cortados com navalhas descartáveis de aço apropriadas (Histoknife H ®) ou com navalhas de vidro. Para as navalhas Histoknife H

é necessário ter disponível um suporte universal híbrido para navalhas descartáveis para resina e parafina (Easy path®, Erviagas, Brasil). São realizados cortes com 3 – 5 micrômetros de espessura (a técnica permite secção de cortes finos. Para o presente estudo, cortes de 5 micrômetros foram utilizados). Inicialmente se desbasta a peça até atingir uma região de fragmento de tecido bem representativo. As secções de resina iniciamente saem enrodilhadas, logo após o corte. Devem ser colocadas com uma pinça na lâmina, sobre uma gota de água. Desta forma, rapidamente, esticam-se sobre a gota. Remove-se o excesso de água, e deixa-se a lâmina secar. Não há necessidade de remoção da resina para continuar o processamento, como é o caso para as análises em parafina.

4. Coloração em Ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina

Os seguintes passos compõem o processo de coloração:

- 1) Oxidação das secções com ácido periódico 0.4% por 30 minutos a 57°C
- 2) Lavagem em água corrente (evita o fundo cor de rosa)
- 3) Enxaguar 3 vezes em água destilada
- 4) Reagente de Schiff por 15 minutos
- 5) Lavagem abundante em água corrente
- 6) Enxaguar em água destilada
- 7) Contracoloração com Hematoxilina por 10 minutos
- 8) Desidratação em álcool 95%
- 9) Lavagem em xilol e colocação da lamínula

5. Análise histopatológica

Os estágios do ciclo espermatogênico de Leblond e Clermont foram combinados em 5 (I-VI, VII-VIII, IX-X, XI-XIII e XIV). Para contagem celular, desenvolvemos um método novo, prático e confiável e reprodutível (coeficiente de correlação intra-observador de 0.96 e interobservador de 0.90).

Os túbulos redondos em estágio VII-VIII são inicialmente fotografados, em câmara digital acoplada ao microscópio de boa resolução, em um aumento que o túbulo apareça por inteiro. Caso a câmara tenha menor resolução, uma alternativa é realizar fotografias em maior aumento, que depois são reconstruídas no photoshop ® através de colagem, remontando o túbulo em uma só foto. Embora mais trabalhoso, este processo oferece fotos de excelente resolução, porque a ampliação para a contagem é óptica, e não digital.

No photoshop ®, as células que se pretende contar são marcadas com círculos, um diâmetro para cada célula (figura 1). Terminada esta marcação, utiliza-se um filtro do programa que recorta apenas os círculos, se cola em um arquivo novo, e se configura para preto e branco (figura 2).

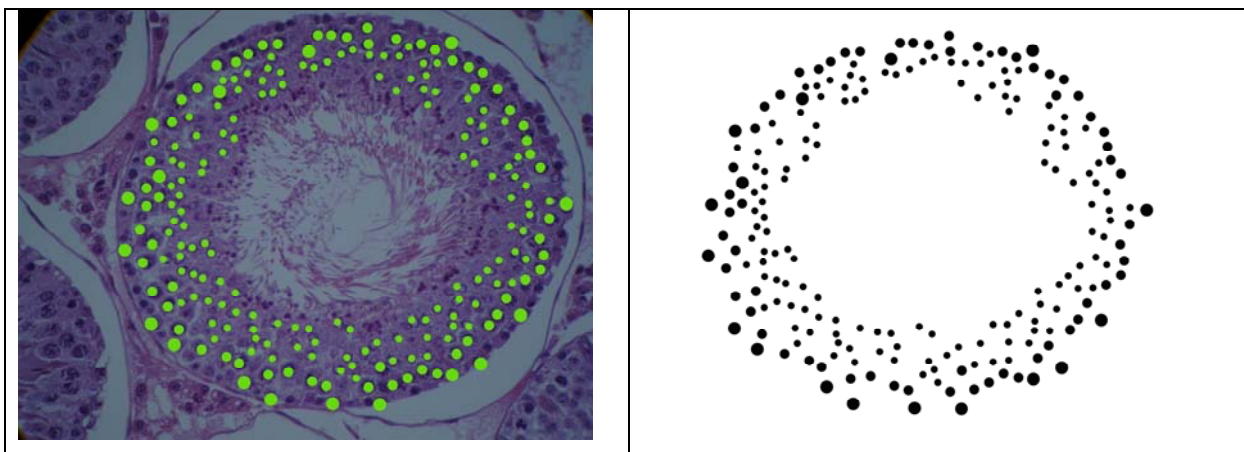


Figura 1 – Marcação das células com círculos; Figura 2 – subtração da imagem, restando apenas os círculos, em preto e branco.

Este novo arquivo é aberto no programa Image J ® (foi utilizada a versão 1.42). Inicialmente, a imagem deve ser passada pelo comando do ajuste do limiar (image – adjust – threshold). Na sequência, se analisa o número de partículas (analyze – analyze particles). Por fim, o programa conta os círculos, através da contagem da distribuição, com o parâmetro ajustado por área (analyze – distribution), figura 3.

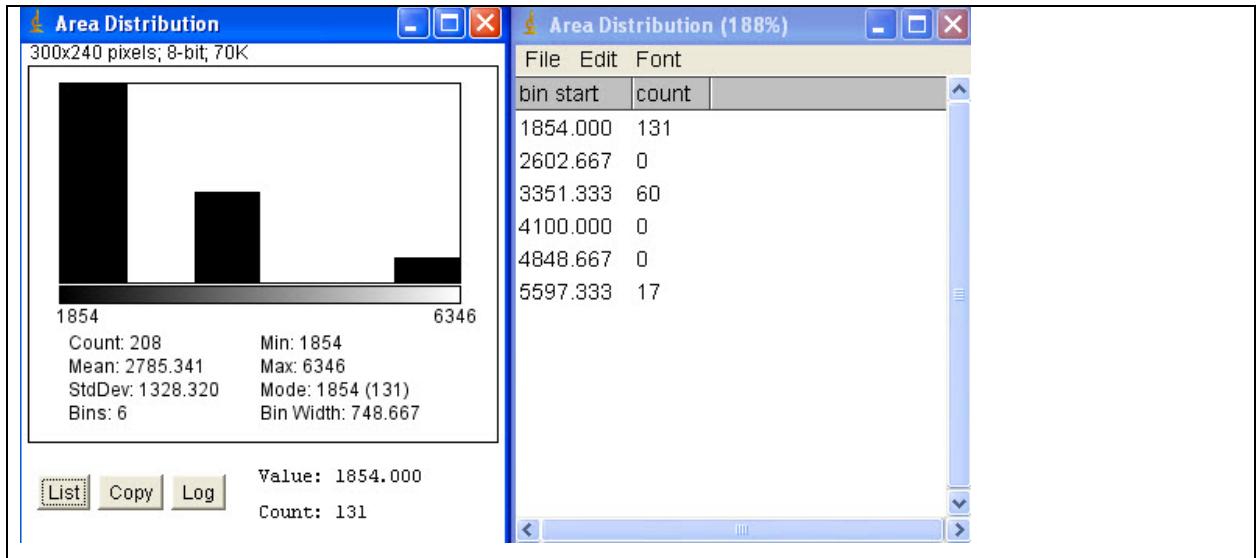


Figura 3 – Contagem celular pelo programa Image J[®]. Cada coluna é a contagem de círculos de cada diâmetro. Assim, para este caso, foram 131 espermatídes, 60 paquítenos e 17 células de Sertoli.

Para a correção para a espessura do corte, é necessário que se verifique o diâmetro tubular. O programa image J[®] permite o cálculo do diâmetro das estruturas (figura 4). É importante calibrar a sua medida. Para tanto, se utiliza uma fotomicrografia (em aumento idêntico ao utilizado para as fotografias dos túbulos) de uma câmara de Neubauer. A câmara de Neubauer possui quadrados de dimensões conhecidas, permitindo a calibração (figura 5).

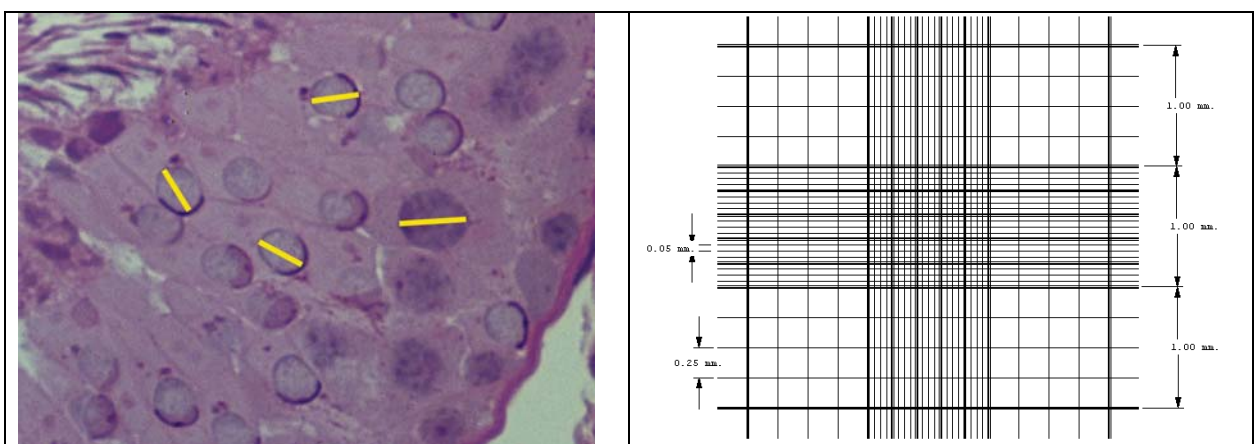


Figura 4 – medida do diâmetro dos núcleos; Figura 5 – Câmara de Neubauer

