

KATIA CRISTINA KIMURA

**Avaliação morfológica e de biomarcadores em epitélio respiratório
e olfatório de cães da cidade de São Paulo e sua relação com o
índice de material particulado (PM10) no ar atmosférico**

São Paulo
2006

KATIA CRISTINA KIMURA

Avaliação morfológica e de biomarcadores em epitélio respiratório e olfatório de cães da cidade de São Paulo e sua relação com o índice de material particulado (PM10) no ar atmosférico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli

São Paulo

2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1790
FMVZ

Kimura, Kátia Cristina

Avaliação morfológica e de biomarcadores em epitélio respiratório e olfatório de cães da cidade de São Paulo e sua relação com o índice de material particulado (PM10) no ar atmosférico / Kátia Cristina Kimura. – São Paulo: K. C. Kimura, 2006.

65. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli.

1. Poluição. 2. Cães. 3. DNA (lesões). 4. Biomarcadores. 5. São Paulo (SP). I. Título.

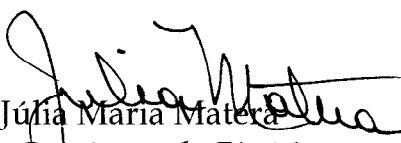
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação morfológica e de biomarcadores em epitélio respiratório e olfatório da cavidade nasal de cães da Cidade de São Paulo e sua relação com o índice de material particulado (PM10) no ar atmosférico", protocolo nº549/2004, utilizando 55 cães, sob a responsabilidade da Profª Drª Maria Lúcia Zaidan Dagli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Morphologic evaluation and detection of biomarkers in olfactory and respiratory epithelia of nasal cavity of dogs of the City of São Paulo and their relationship with particulate material (PM10) in atmospheric air", protocol number 549/2004, utilizing 55 dogs, under the responsibility of Profª Drª Maria Lúcia Zaidan Dagli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 15 de fevereiro de 2005


Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Hospital Veterinário

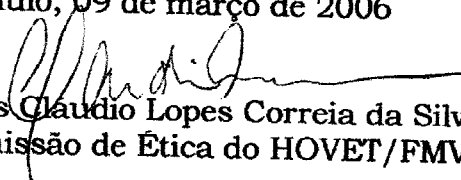
À Ilm^a. Sr^a.
Prof^a. Dr^a. **Maria Lucia Zaidan Dagli**

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto "Avaliação morfológica e de biomarcadores em epitélio respiratório e olfatório da cavidade nasal de cães da cidade de São Paulo e sua relação com o índice de material particulado (PM 10) no ar atmosférico", sob a sua responsabilidade, previamente aprovado pela Comissão de Bioética dessa Faculdade, foi analisado e atende as normas da Comissão de Ética desse Hospital, que acompanhará administrativamente sua execução.

Substituição do responsável, inserção de novos colaboradores e mudanças na metodologia proposta deverão ser imediatamente comunicados a essa comissão, assim como as datas de suspensão ou término do projeto.

São Paulo, 09 de março de 2006


Prof. Dr. Luis Claudio Lopes Correia da Silva
Presidente da Comissão de Ética do HOVET/FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: KIMURA, Katia Cristina

Título: Avaliação morfológica e de biomarcadores em epitélio respiratório e olfatório de cães da cidade de São Paulo e sua relação com o índice de material particulado (PM10) no ar atmosférico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente à minha família, aos meus pais e meus irmãos, que me deram apoio, princípios e permitiram que realizasse o sonho de me tornar uma veterinária.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli e ao Prof. Dr. José Luiz Guerra, graças à oportunidade que eles me deram, cheguei até esta etapa e à todos aqueles que torceram por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente pelo apoio da minha família, pelo apoio da minha orientadora Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli.

Agradeço meus colaboradores: Lucas Martins Chaible, Heidge Fukumasu, Cíntia Esteves de Lima, Maria Aderusa Horst, Patrícia Matsuzaki, Daniel Soares Sanches, Carolina Gonçalves Pires, Tereza Cristina da Silva, Jucélia de Jesus Pereira, Maria Luiza S. Mello.

E amigos Lulis, Daniel, as Carols, Vivi, Claudio, Buga, Dona Romeika e Marguiti, Marta, Grazie, a todos aqueles que não mencionei aqui também e que me deram apoio.

Agradeço pelo apoio e concessão dos filhotes para o experimento da Dra. Cristina Magnabosco, da Divisão Técnica de Controle de Zoonoses-Guarulhos.

Agradeço à profa. Claudia (UNISA) e residente Carol pela concessão de alguns cães oriundos da Zona Sul.

Obrigada ao Heidge Fukumasu por ter me ajudado na padronização do teste do COMETA; ao Lucas Martins Chaible pela brilhante e rápida ajuda na estatística; a Cíntia Esteves de Lima pelo sábio conhecimento laboratorial; Daniel Soares Sanches, Carolina Gonçalves Pires e Patrícia Matsuzaki pela ajuda na coleta dos cães e Tereza Cristina da Silva pela ajuda no sistema de Imagem.

Agradeço pela paciência, simpatia e atenção à Maria Aderusa Horst do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental-FCF-USP para a padronização da técnica de Elisa para marcação do aduto 8hydroxy 2 deoxyguanosine sob orientação do Dr. Franco Maria Lajolo e à ajuda manual da técnica do Carlos Eduardo Chagas do Laboratório Química e Bioquímica de Alimentos.

Obrigada à concessão do speed vac pela técnica Silvia Regina Blanco Ribeiro do Instituto de Biociências IB-USP no Departamento da Botânica-Laboratório de Biomol de Plantas

Obrigada à CETESB pelo fornecimento dos dados anuais do índice de material particulado.

Obrigada pela confecção dos mapas no sistema Arquiview, feitos pela Jucélia de Jesus Pereira do Laboratório de Epidemiologia e Bioestatística, com a ajuda da Fernanda Ywasaki e sob permissão do Prof. Dr. Fernando Ferreira.

Muito obrigada a Elza da biblioteca que foi rápida, atenciosa e competente.

Obrigada pela FAPESP, sem ela não poderia realizar este projeto.

RESUMO

KIMURA, K. C. **Avaliação morfológica e de biomarcadores em epitélio respiratório e olfatório de cães da cidade de São Paulo e sua relação com o índice de material particulado (PM10) no ar atmosférico.** [Morphologic evaluation of biomarkers in respiratory and olfactory epithelium of dogs of the city of Sao Paulo and its relation with the index of particulate material (PM10) in atmospheric air]. 2006. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A poluição atmosférica interfere diretamente com a saúde populacional. Há evidências de que os animais de companhia representam sentinelas para fatores ambientais onde o homem e os demais animais estariam expostos. Animais podem ser usados como indicadores de poluição ambiental. O desenvolvimento industrial e urbano tem originado, em todo o mundo, um aumento crescente da emissão de poluentes atmosféricos. A complexa mistura de gases, partículas sólidas e substâncias químicas presentes no ar ("indoor" e "outdoor") podem gerar a genotoxicidade, levando as alterações citogenéticas, mutações ou produção de adutos de DNA. O trabalho tem o objetivo de avaliar morfológicamente 36 cães coletando o epitélio olfatório e pulmonar de cães saudáveis oriundos das diferentes regiões da cidade de São Paulo (zona Leste, Oeste, Norte e Sul). Analisou-se ainda, a quebra do DNA pela técnica do teste do Cometa (Eletroforese em gel de célula isolada) e Micronúcleo, marcar o aduto 8'hydroxy 2'deoxyguanosine pelo teste do Elisa (Enzyme linked immunosorbent assay), associando-os com o índice de poluição atmosférica (PM10), fornecidos pela CETESB. Não houve resultado significativo na avaliação feita em escore de 0 a 3 pelo exame histopatológico e não há relação entre o índice de Material particulado Atmosférico e a lesão de DNA pelo Teste do Cometa no epitélio olfatório. Não há correlação entre idade e a lesão de DNA pelo Teste do Cometa no epitélio olfatório e pelo epitélio pulmonar. Há correlação significativa entre o índice de Material particulado Atmosférico e a lesão de DNA no epitélio pulmonar pelo Teste do Cometa. A utilização do epitélio pulmonar em cães no teste do COMETA demonstrou resultado significativo, podendo ser indicado como um bioindicador do ar atmosférico. Este projeto mostrou uma tendência da zona Sul ser uma região menos poluída, onde há menor alteração histopatológica pulmonar e menor lesão de DNA em cães comparada à outras

regiões com maior índice de material particulado. O teste do Micronúcleo foi padronizado, porém não mostrou resultado significativo. O teste Elisa teve resultados opostos ao teste Cometa, sugerindo sua relação com o índice de ozônio.

Palavras-chave: Poluição. Cães. DNA (lesões). Biomarcadores. São Paulo (SP).

ABSTRACT

KIMURA, K. C. **Morphologic evaluation of biomarkers in respiratory and olfactory epithelium of dogs of the city of São Paulo and its relation with the index of particulado material (PM10) in atmospheric air.** [Avaliação morfológica e de biomarcadores em epitélio respiratório e olfatório de cães da cidade de São Paulo e sua relação com o índice de material particulado (PM10) no ar atmosférico]. 2006. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The atmospheric pollution directly interferes with the population health. Evidences have been shown that pets represent sentinels for environmental factors which the man and the other animals would be susceptible. Animals can be used as indicatives of the environmental pollution. The industrial and urban developments have originated, in the whole world, an increase of the emission of atmospheric pollutants. The complex indoor "mixture of gases, solid particles and chemical substances in the air can induce genotoxicity, leading the citogenetic alterations, mutations or production of DNA adducts. Thus, this work has the objective to evaluate morforlogically the olfactory and pulmonary epitelia of 36 healthy dogs of the different regions of the city of São Paulo (zone East, West, North and South). The DNA breaks was analyzed by the Comet assay (Eletroforese in gel of isolated cell) and Micronucleus. The analysis of the 8'hydroxy 2'deoxyguanosine adduct was performed by Elisa test (Enzyme linked immunosorbent assay). The parameters were associated with the index of atmospheric pollution (PM10), supplied for the CETESB. The histopathological evaluation of the epithelium included the graduation of 0 to 3. No relationship with the index of atmospheric particulated material with the level of DNA breaks by the Comet assay in the olfactory epithelium was obtained. It does not have correlation between age and the injury of DNA for the Test of the Comet in the olfactory epithelium and neither for the pulmonary epithelium. It has significant correlation between the index of atmospheric particulate material and the injury of DNA in the pulmonary epithelium for the Comet assay. The use of the pulmonary epithelium in dogs in the COMET assay resulted significant, being able to be indicated as a bioindicador of atmospheric air. This project showed that the South region of the Sao Paulo city is apparently a less polluted region. The animals from that region show minor pulmonary alterations and lesser injury of DNA, in comparison

with dogs from other regions. The micronucleus test did not show significant results. The Elisa test showed opposite results when compared to the Comet assay, suggesting its relation with the ozone index.

Key words: Pollution. Dogs. DNA (injury). Biomarkers. São Paulo (SP).

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Média e Desvio Padrão da mensuração de 100 cometas das células do epitélio olfatório de um cão filhote utilizando os como controle negativo e controle positivo (acréscimo da água oxigenada para lesão do DNA) – São Paulo, 2006.....43
- Tabela 1a -Média e Desvio Padrão da mensuração de 100 cometas por animal através das células do epitélio pulmonar e olfatório de cães de diversas regiões da cidade de São Paulo.- São Paulo – 2006.....43
- Tabela 2-Tabela com os resultados da quantificação do aduto 8´hydroxy-2´deoxyguanosine através do kit Elisa no epitélio olfatório e pulmonar - São Paulo - 2006..... 48
- Tabela 3 - Tabela com os resultados da quantificação do aduto 8´ hydroxy -2´ deoxyguanosine através do kit Elisa no pulmão – São Paulo - 2006.....48
- Tabela 4 - Quadro com os resultados da média da quantificação dos micronúcleos dos variados cães oriundos da região Leste, Norte, Oeste e Sul de São Paulo – São Paulo, 2006.....49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	- Dados gerais dos animais utilizados no projeto- São Paulo - 2006.....	32
Quadro 2	- Resultado do exame histopatológico do epitélio olfatório mensurado em escore de 0 a 3 - São Paulo - 2006	36
Quadro 3	- Resultado da avaliação histopatológica do epitélio pulmonar ao microscópio óptico em aumento de 40x, escore de 0 a 3 - São Paulo, 2006.....	39
Quadro 4	- Resultado da mensuração do índice da concentração média anual do ozônio ($\mu\text{g}/\text{m}^3$), mensurado pelas estações.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Emissões relativas de poluentes por tipo de fontes.....	04
Figura 2 - Localização das 29 estações automáticas fixas e 3 estações móveis de monitoramento da região Metropolitana de São Paulo (23 estações) e (6 estações) no interior.....	06
Figura 3 - MP 10 - Médias aritméticas anuais na RMSP.....	07
Figura 4 - Histologia do epitélio olfatório.....	10
Figura 5 - As principais divisões do epitélio pulmonar.....	12
Figura 6 - Figura ilustrando as estações medidoras da poluição com sua respectiva localização da moradia do animal, ilustrada em pontos - São Paulo - 2006	33
Figura 7- Figura ilustrando os distritos das regiões Norte, Sul, Centro, Leste e Oeste da cidade de São Paulo - São Paulo - 2006.....	34
Figura 8 - Fotomicrografia do corte histológico do epitélio olfatório do animal da região Oeste. Hematoxilina & Eosina (Objetiva de 20X) – São Paulo, 2006.....	38
Figura 9 - Fotomicrografia de corte histológico do epitélio olfatório do animal da região Norte. A seta indica discreto infiltrado inflamatório misto localizado na submucosa do epitélio - Hematoxilina & Eosina (Objetiva de 40X) – São Paulo -2006.....	38
Figura 10 - Fotomicrografia de corte histológico do pulmão do animal da região Oeste. Hematoxilina & Eosina (Objetiva de 10X) – São Paulo, 2006.....	42
Figura 11 - Fotomicrografia de corte histológico do pulmão do animal da região Norte. Observar o discreto infiltrado inflamatório mostrando raros neutrófilos localizado em capilar de alvéolos-Hematoxilina & Eosina (Objetiva de 30X) – São Paulo - 2006.....	42
Figura 12 - Fotomicrografia de cometa de células do epitélio respiratório de cão filhote utilizado como controle positivo (tratado com H ₂ O ₂). Observar intensa quebra do DNA. (Objetiva de 20X) - São Paulo- 2006.....	44
Figura 13 - Fotomicrografia de cometas de células do epitélio respiratório de cão filhote utilizado como controle Negativo (sem tratamento com H ₂ O ₂). (Objetiva de 20X) – São Paulo - 2006.....	44
Figura 14 - Fotomicrografia de cometas de células do epitélio olfatório cão da região Norte. (Objetiva de 20X) – São Paulo - 2006.....	45
Figura 15 -Fotomicrografia de cometas de células do epitélio pulmonar de cão da região Norte.(Objetiva de 20X) – São Paulo - 2006.....	45

Figura 16 - Figura mostrando as regiões (zona leste, oeste, norte e sul) e controle em comparação com o resultado da lesão do DNA pelo teste do COMETA no epitélio pulmonar. * significativa a 5% em relação ao controle. ** significativa a 5% em relação à Zona Sul - São Paulo - 2006.....	46
Figura 17 - Figura mostrando as regiões (zona leste, oeste, norte e sul) em comparação com o resultado da lesão do DNA pelo teste do Cometa no epitélio olfatório. – São Paulo -2006.....	46
Figura 18 - Figura mostrando regressão linear entre o índice de Material particulado Atmosférico e a lesão de DNA – São Paulo, - 2006.....	47
Figura 19 - Fotomicrografia de células submetidas à técnica de Feulgen para observação do micronúcleo do epitélio olfatório do cão da região Norte (Objetiva de 40X) – São Paulo -2006.....	50
Figura 20 - Fotomicrografia de células submetidas à técnica de Feulgen para observação do micronúcleo do pulmão do cão da região Oeste (Objetiva de 40X) – São Paulo -2006.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CETESB.....	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
COMETA ou SCGE	Eletroforese em gel de célula isolada
ELISA.....	Enzyme linked immunosorbent assay
FMVZ.....	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
HOVET.....	Hospital Veterinário
8-OhdG	8' hydroxy-2' deoxyguanosine
USP.....	Universidade de São Paulo
VPT.....	Departamento da Patologia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 POLUIÇÃO AMBIENTAL.....	03
2.2 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS.....	09
2.3 ANATOMIA E HISTOLOGIA DO TRATO RESPIRATÓRIO.....	10
2.4 POLUIÇÃO E O CÂNCER.....	13
2.5 AVALIAÇÃO DAS LESÕES DO DNA (GENOTOXICIDADE).....	16
3 OBJETIVOS	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 NECROPSIA E COLETA DE MATERIAIS.....	21
4.2 DADOS DO ÍNDICE DE MATERIAL PARTICULADO.....	22
4.3 PROTOCOLOS.....	23
4.3.1 Exame histopatológico do epitélio olfatório da região nasal (meato dorsal médio) e pulmonar	23
4.3.2 Exame histopatológico do epitélio pulmonar (lobo apical segmento cranial esquerdo)	23
4.3.3 Técnica da eletroforese em microgel para a análise da quebra do DNA (COMETA)	24
4.3.3.1 Quantificação dos cometas.....	25
4.3.3.2 Padronização do cometa.....	26
4.3.4 Protocolo da extração do DNA e do Kit Elisa (Enzyme linked immunosorbent assay) para a detecção do aduto de DNA: 8´ Hydroxy 2´ deoxyguanosine	27
4.3.5 Digestão do DNA extraído do pulmão e epitélio olfatório	28
4.3.6 Protocolo do kit ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)	29
4.3.7 Teste do Micronúcleo	29
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5 RESULTADOS	31
5.1 ANIMAIS UTILIZADOS NO ESTUDO.....	31
5.2 RESULTADO DO EXAME HISTOPATOLÓGICO DO EPITÉLIO OLFATÓRIO E PULMONAR.....	35
5.3 DESCRIÇÃO DO EXAME HISTOPATOLÓGICO DO EPITÉLIO OLFATÓRIO...37	
5.4 FOTOMICROGRAFIA DO CORTE HISTOLÓGICO DO EPITÉLIO OLFATÓRIO.....	38

5.5 DESCRIÇÃO DO EXAME HISTOPATOLÓGICO DO EPITÉLIO PULMONAR.....	40
5.6 FOTOMICROGRAFIA DO CORTE HISTOLÓGICO DO EPITÉLIO PULMONAR	42
5.7 QUANTIFICAÇÃO DO COMETA NO EPITÉLIO PULMONAR E OLFATÓRIO...43	
5.8 FOTOMICROGRAFIA DO TESTE DO COMETA.....	44
5.9 QUANTIFICAÇÃO DO ADUTO 8´HYDROXY-2´DEOXYGUANOSINE ATRAVÉS DO KIT ELISA NO EPITÉLIO OLFATÓRIO E PULMONAR.....	48
6 QUANTIFICAÇÃO DO MICRONÚCLEO ATRAVÉS TESTE DE MICRONÚCLEO NO EPITÉLIO PULMONAR E OLFATÓRIO.....	49
6.1 FOTOMICROGRAFIA DO TESTE DO MICRONÚCLEO.....	50
7 DISCUSSÃO.....	51
8 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

A partir do século XX, em consequência do aumento significativo da mortalidade, inúmeros acidentes ambientais e estudos epidemiológicos e toxicológicos em animais, houve uma maior ênfase para o estudo dos efeitos da exposição humana ao ar poluído (ANDRÉ et al., 2000).

A poluição atmosférica mesmo em condições abaixo do permitido afeta significativamente a saúde dos seres humanos (BRAGA, 1998, 1999; SCHWARTZ, 1992).

Segundo a CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), 2005, a definição do poluente atmosférico é “toda e qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos em legislação, e que tornem ou possam tornar o ar impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde, inconveniente ao bem-estar público, danoso aos materiais, à fauna e à flora ou prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade”.

O desenvolvimento industrial e urbano tem originado, em todo o mundo, um aumento crescente da emissão de poluentes atmosféricos. A complexa mistura de gases, partículas sólidas e substâncias químicas presentes no ar (“indoor” e “outdoor”) pode gerar a genotoxicidade, levando a alterações citogenéticas, mutações ou produção de adutos de DNA. Doll (1978).

A poluição atmosférica é o maior problema em grandes cidades, agindo diretamente na saúde da população, sendo São Paulo, considerada a única federação de maior contingente populacional (em torno de 37 milhões de habitantes), maior desenvolvimento econômico, maior frota automotiva (14,5 milhões de veículos motores) (CALDERÓN-GARCIDUEÑAS et al., 2004; CETESB, 2005; MAGE et al., 1996).

Os animais são particularmente úteis na identificação de efeitos genotóxicos decorrentes de todos os tipos de poluição ambiental. O câncer é uma doença genética associada a mutações, as quais podem ser determinadas por substâncias carcinogênicas presentes no ambiente. Um exemplo da relação poluição ambiental e câncer tem sido determinada no homem. O câncer de pulmão, por exemplo, é mais comum em áreas urbanas do que nas rurais. Doll (1978).

Indivíduos expostos à poluição ocasionada pelo tráfego de veículos em área urbana apresentaram taxas maiores de lesões cromossômicas. Anwar (1994).

Há evidências de que os animais de companhia representam sentinelas para fatores ambientais aos quais o homem e os demais animais estariam expostos. Animais podem ser usados como indicadores de poluição ambiental. Silva (1999).

Saldiva e Bohm (1998), evidenciaram as possibilidades de se usar animais como indicadores de poluição ambiental. Descrevem que os animais sentinelas podem ser acumuladores de elementos ambientais, e que permitirão a identificação de poluentes, principalmente se estes tenderem a se acumular em determinados tecidos.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - POLUIÇÃO AMBIENTAL

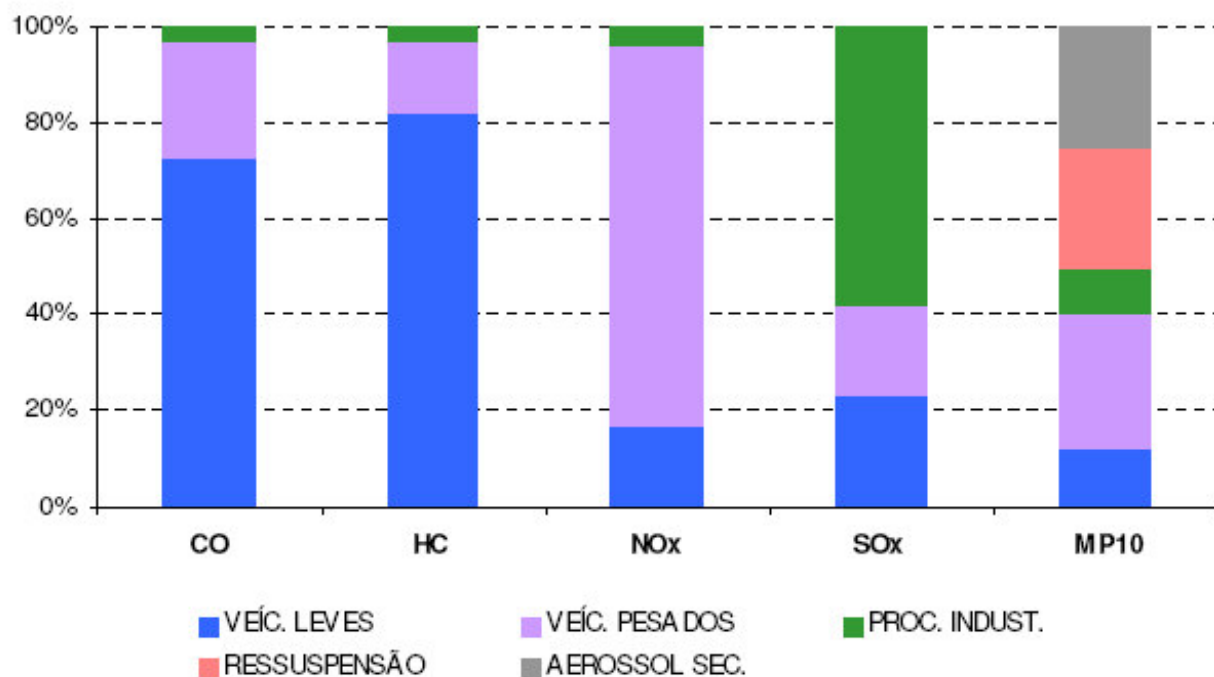
Segundo a Cetesb (2005), a Região Metropolitana de São Paulo está localizada a 23° S e 46°W na porção Sudeste do Brasil, é considerada a maior cidade da América Latina, possui uma população superior a 17 milhões de pessoas, inseridas numa área urbana de 1.747 km², de um total de 8.051 km² (CETESB, 2005). Ela vem sofrendo todo o tipo de problema ambiental, entre o qual está inclusa a deterioração da qualidade do ar atmosférico, causada por uma frota de 7,4 milhões de automóveis representando 1/5 do total nacional e emissões atmosféricas totalizando cerca de 200 indústrias de alto potencial poluidor. De acordo com o relatório de 2005, o ar ambiental sofreu influência de 1,46 milhão de tonelada por ano de monóxido de carbono, 354 mil de tonelada por ano de hidrocarbonetos, 317 mil de tonelada por ano de óxido de nitrogênio, 28 mil de tonelada por ano de material particulado e 12 mil de tonelada por ano de óxido de enxofre.

O ar poluído contém basicamente dois fatores: material particulado, que se constitui de quatro formas: Partícula Total em Suspensão; Fumaça e as Partículas Inaladas (PM 2,5 e PM10), e os gases, representados por: dióxido de enxofre; monóxido de carbono; ozônio e dióxido de nitrogênio. Os materiais particulados (PM10) são partículas de material sólido ou líquido que ficam suspensos no ar, oriundos do processo de combustão (indústria e veículos automotores e aerossóis secundários (formado na atmosfera) e possuem um tamanho menor que 10 micra (CETESB, 2005).

O material particulado é o mais eficiente transportador de poluentes atmosféricos para o interior do organismo e está associado ao aumento de morbidade e da mortalidade (OSTRO et al., 1996 ;WORDLEY; WALTERS;AYRES, 1997).

Estudos mostram um aumento de 30 a 50% do câncer pulmonar associado com a exposição de partículas de poluentes (COHEN;POPE,1995).

A maior parte do material particulado (PM10) segundo a (CETESB, 2005), é oriunda através dos veículos pesados, leves, ressuspensão da poeira, processo industrial, porém a maior parte vem dos aerossóis secundários, como mostra a figura 1, logo a seguir, realizado no ano de 2005.



Fonte: Cetesb 2005

Figura 1 - Emissões relativas de poluentes por tipo de fonte

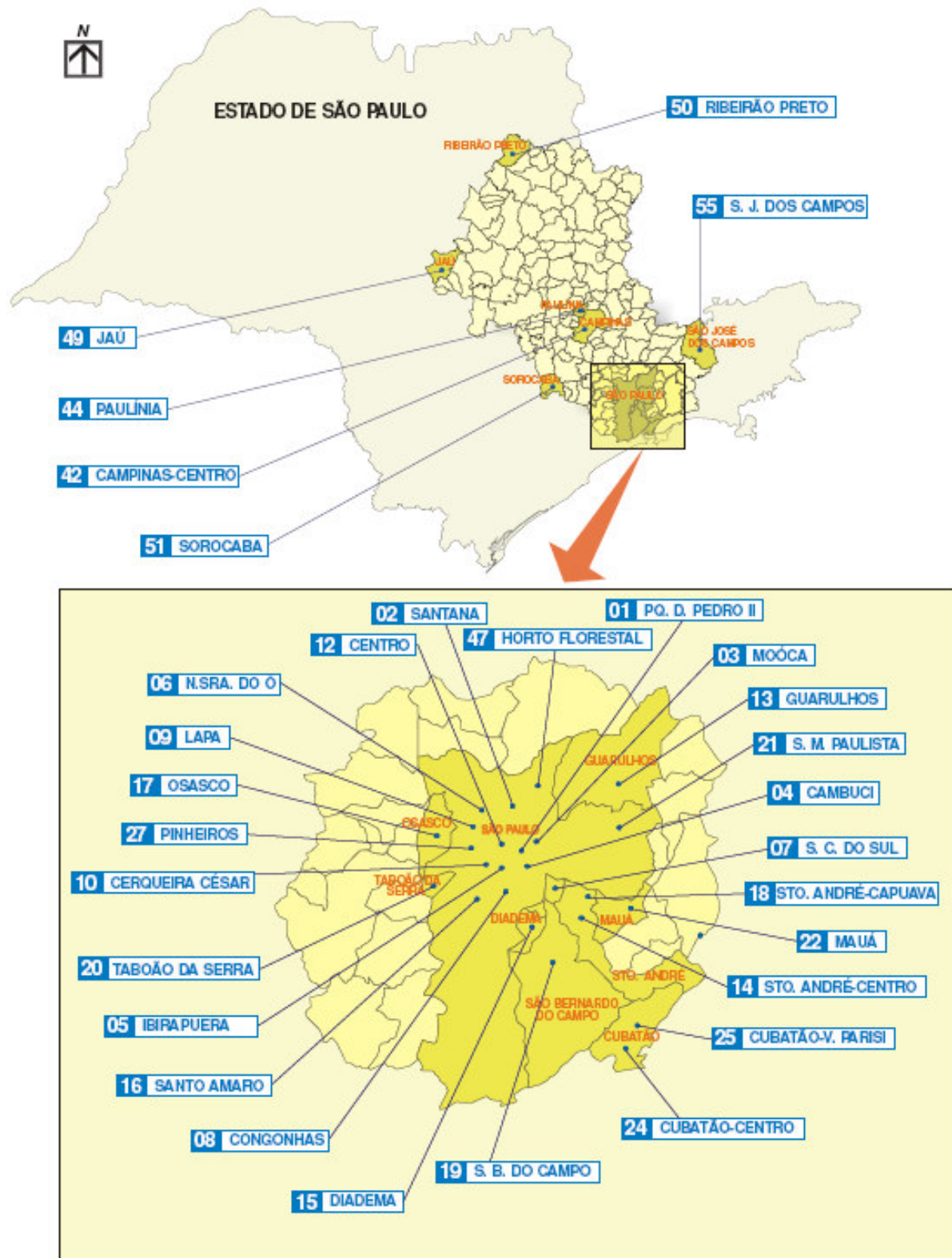
Por este motivo, a CETESB é a agência do Governo do Estado de São Paulo e desenvolve o controle intensivo de fiscalização, monitoramento e licenciamento de atividades geradoras de poluição, no ar, solo e água. Ela tem o papel de fornecer os dados para motivar ações de controle durante os períodos de estagnação do ar atmosférico, quando os mesmos podem representar risco à saúde humana; avaliar a qualidade do ar com finalidade de proteger a saúde e o bem estar das pessoas; obter informações para indicar os impactos sobre a fauna, flora e o meio ambiente em geral; estudar as mudanças da qualidade do ar para estabelecer e planejar ações de controle e informar à população, órgãos públicos e sociedade em geral, os níveis da contaminação do ar.

A rede automática mede parâmetros de partículas inaláveis, dióxido de enxofre, óxido de nitrogênio, ozônio, monóxido de carbono, hidrocarbonetos totais não metano, metano, direção do vento, velocidade do vento, umidade relativa, temperatura, pressão atmosférica e radiação solar (global e ultravioleta).

A rede manual é composta por 9 estações de amostragem que medem a fumaça; 9 estações que medem partículas totais em suspensão; 4 estações que medem partículas inaláveis finas.

O monitoramento do ar concentra-se possui 23 estações medidoras na Região Metropolitana de São Paulo, disponibilizados de hora em hora na internet, e em boletim diário, elaborado às 16 horas, apresentando a situação das últimas 24 horas. Esse boletim é divulgado na Internet e enviado para a imprensa em geral (CETESB, 2005).

A figura 2 a seguir, mostra a localização de todas as estações medidoras do ar, englobando regiões do Estado de São Paulo. Entre as regiões de São Paulo e municípios, estão incluídas o Parque Dom Pedro, Santana, Mooca, Cambuci, Ibirapuera, Nossa Senhora do Ó, São Caetano do Sul, Congonhas, Lapa, Cerqueira César, Centro, Guarulhos, Santo André-centro, Diadema, Santo Amaro, Osasco, Santo André-capuava, São Bernardo do Campo, Taboão da Serra, São Miguel Paulista, Mauá, Cubatão-centro, Cubatão-parisi. Entre as regiões do interior de São Paulo estão presentes as regiões de Jaú, Paulínia, Campinas-centro, Sorocaba, São José dos Campos e Ribeirão Preto.



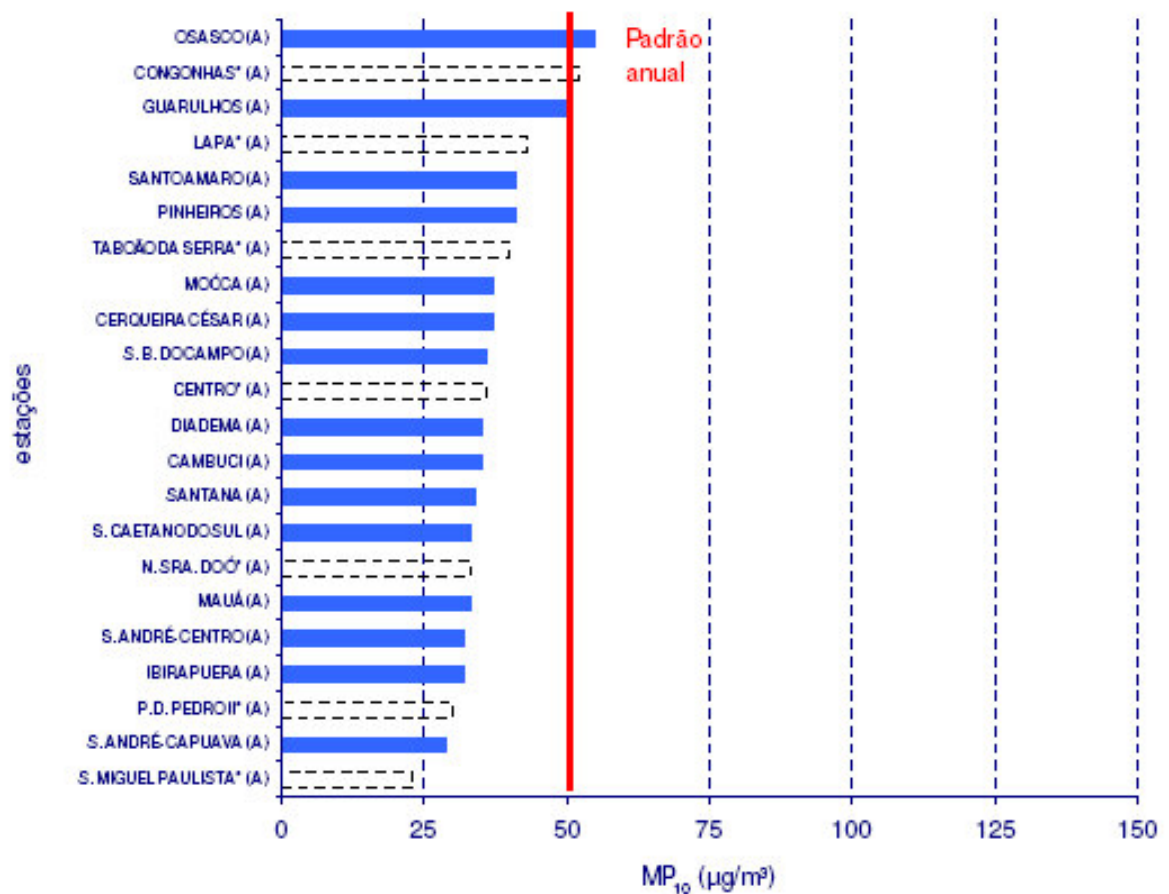
Fonte:Cetesb, 2005

Figura 2 - Localização das 29 estações automáticas fixas e 3 estações móveis de monitoramento da região Metropolitana de São Paulo (23 estações) e (6 estações) no interior

Os padrões nacionais da qualidade do ar definem legalmente o limite máximo para a concentração de um poluente na atmosfera, que garanta a proteção da saúde e do meio ambiente, foram estabelecidos pelo IBAMA - Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e aprovados pelo CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente, por meio da Resolução CONAMA 03/90. São estabelecidos dois tipos de padrões da qualidade do ar: os primários (níveis máximos toleráveis de concentração de poluentes atmosféricos constituindo-se em meta de curto à médio prazo) e padrões secundários das quais se prevê o mínimo efeito adverso sobre o bem estar da população, constituindo-se em meta de longo prazo (CETESB, 2005).

A qualidade do ar pode mudar em função dos parâmetros meteorológicos, que determinam uma maior ou menor diluição dos poluentes. Dessa maneira no inverno a tendência da qualidade do ar é piorar, devido a baixa dispersão dos poluentes, principalmente do dióxido de enxofre; monóxido de carbono e material particulado. Na primavera e no verão devido a grande intensidade na incidência de raios solares há um aumento da formação do poluente ozônio (CETESB, 2005).

O clima no Estado de São Paulo pode ser dividido em duas estações: a estação chuvosa que compreende no período de outubro à abril, influenciada pelo aquecimento continental e convecção tropical, favorece a dispersão dos poluentes e a estação seca que percorre um período de maio à setembro, influenciada pelas frentes frias do sul do continente, diminuindo a dispersão dos poluentes. O período de inverno foi o mais desfavorável em relação à dispersão de poluentes comparado aos anos anteriores (2004, 2003, 2002 e 2001), no período de maio à setembro Alguns estudos mostram que o desenvolvimento industrial acelerado a partir dos anos 50, ocasionou o processo de formação de ilha de calor, podendo ter provocado algumas mudanças de clima na região, tais como diminuição do nevoeiro na região central e da garoa típica da cidade de São Paulo (CETESB, 2005).



* Não atendeu ao critério de representatividade

Períodos monitorados:

- Congonhas: 01/01/2005 a 04/07/2005
- Lapa: 01/01/2005 a 26/03/2005
- Taboão da Serra: 10/03/2005 a 14/03/2005 - 20/05/2005 a 31/12/2005
- N. Sra. Do Ó: 11/07/2005 a 31/12/2005
- P.D. Pedro II: 01/01/2005 a 04/01/2005 – 03/03/2005 a 03/05/2005 – 22/08/2005 a 31/12/2005
- S. Miguel Paulista: 01/01/2005 a 18/02/2005

(A) – Estação Automática

Fonte: Cetesb, 2005

Figura 3 - MP 10 - Médias aritméticas anuais na RMSP

2.2 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS

Um estudo realizado com ratos mostrou que o grupo exposto sob a poluição de São Paulo, teve alterações respiratórias (hiperplasia de células secretórias, alteração ultraestrutural em cílios, alterações no muco) comparadas ao grupo controle exposto ao ar de Atibaia, Saldiva (1990).

Os animais que ficaram expostos por três meses à poluição de São Paulo, que desenvolveram um aumento na resposta à metacolina foram removidos para a região de Atibaia tiveram uma reversão da resposta à metacolina, Pereira (1994).

Outro trabalho exhibe uma correlação positiva entre o aumento de poluição e o aumento da mortalidade neonatal, sugerindo efeito direto da poluição sobre as mortes neonatais, indicando que os níveis de poluição podem estar associados aos efeitos deletérios para a saúde pública, Lin (2004).

Outro estudo realizado no Brasil exhibe que a alta frequência de crianças e adolescentes internadas por problemas respiratórios devido ao ar poluído, ocorre entre a faixa etária abaixo de 2 anos de idade e entre 14 a 19 anos, Braga (2001).

Estudos com pessoas que residem na cidade do México (20 milhões de habitantes), na qual é considerada a cidade que possui um dos mais altos índices de poluição atmosférica do mundo, mostrou alteração significativa no epitélio olfatório em comparação com as pessoas que moravam em Tlaxcala (cidade vizinha menos poluída), Calderón-Garcidueñas (2001,2003).

Sugere-se que os animais podem ser utilizados como indicadores de poluição ambiental na identificação de efeitos genotóxicos, decorrentes de vários tipos de poluentes (BACKER et al., 2001; CALDERÓN-GARCIDUEÑAS et al., 2001; PEREIRA et al., 1994; SALDIVA; BOHM, 1998).

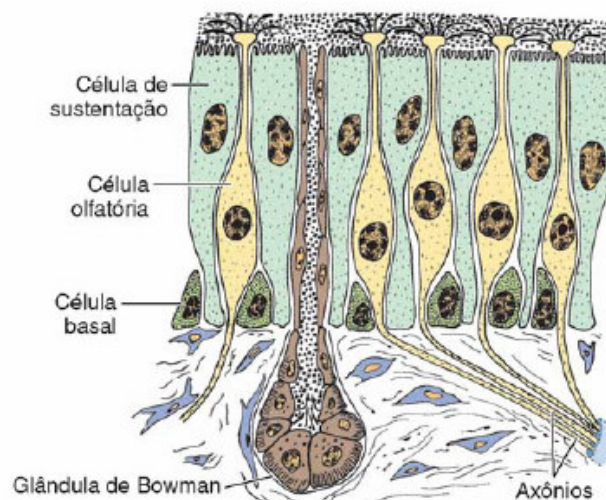
2.3 ANATOMIA E HISTOLOGIA DO TRATO RESPIRATÓRIO:

O epitélio nasal está exposto diretamente ao ar atmosférico, entretanto há uma considerável evidência de que a exposição aos poluentes causam danos ao epitélio nasal, Hastings e Miller (2003).

A cavidade nasal é a porta de entrada para lesão toxicológica do epitélio respiratório e olfatório, Calderón-Garcidueñas et al. (2002).

A estrutura anatômica da narina do cão é mais complexa do que em humanos, pois é estreita e alongada, dependendo do tipo de crânio e pela importância da função do epitélio olfatório, Heyder e Takenaka (1996).

O epitélio olfatório nos animais tem importância primordial para detecção de alimentos, evitar predadores e localização dos objetos, Kovács (2003). Histologicamente epitélio olfatório (colunar pseudo-estratificado) é composto por três tipos celulares: células olfatórias (sensoriais), de sustentação e basais. No interior da lâmina própria há glândulas de Bowman, tubulares e mucosserosas. Junqueira (2004) e Willian (2003):



Fonte: Junqueira, 2004

Figura 4 – Histologia do epitélio olfatório

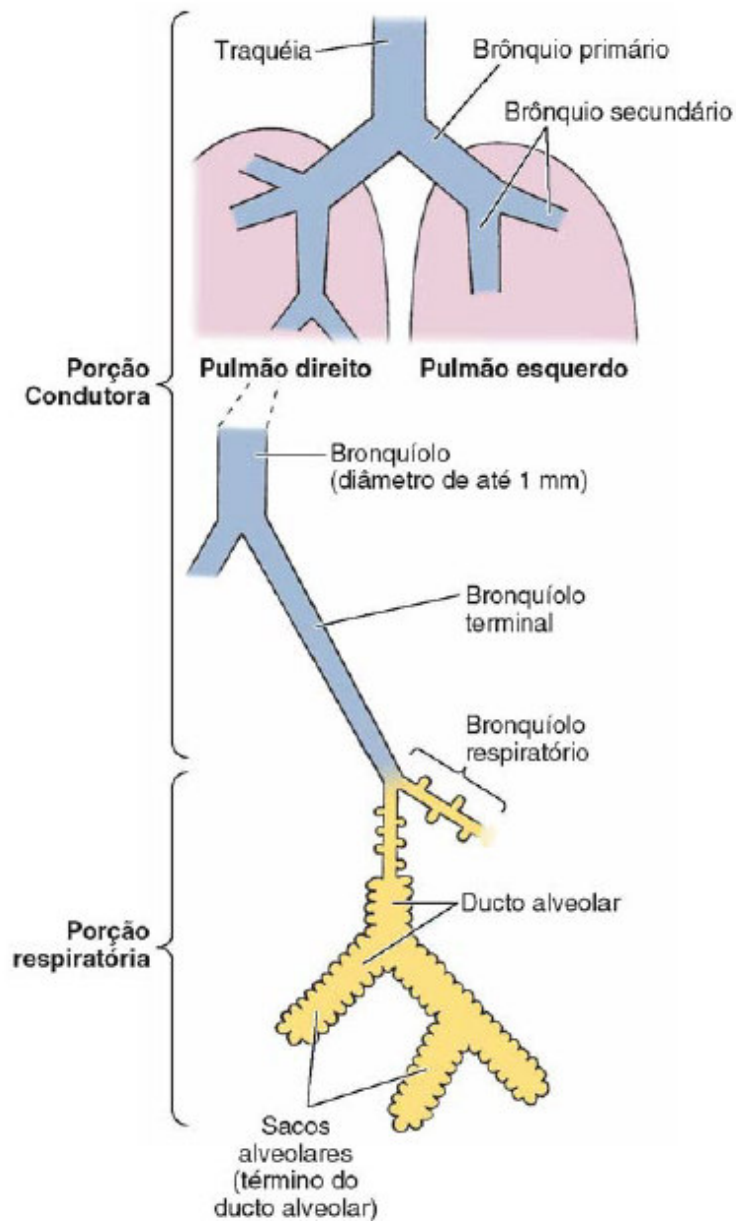
Depois que o ar passa pelas cavidades nasais, conchas (ar é filtrado e aquecido) e nasofaringe, laringe (epitélio escamoso estratificado), são conduzida para a traquéia (epitélio colunar pseudo-estratificado com células caliciformes) em seguida para o brônquio primário. Os brônquios são revestidos por células pseudo-estratificadas ciliadas com células caliciformes, diminuindo em altura à medida que o calibre dos brônquios diminui chegando a medir um milímetro de diâmetro.

Estes se ramificam em bronquíolos terminais, se dividem em dois ou mais bronquíolos respiratórios, compostos por um epitélio cuboidal (porção respiratória), dirigindo-se para os ductos alveolares que, por sua vez drenam em sacos alveolares (troca gasosa). Os bronquíolos não possuem cartilagem e nem glândulas, diferentemente dos brônquios (JUNQUEIRA, 2004):

Os ductos alveolares são revestidos por células cubóides ou achatados. Os alvéolos são compostos por principalmente por células cuboidais do tipo I (célula de revestimento) e células pavimentosas do tipo II (WILLIAN; BACHA; BACHA, 2003).

O epitélio respiratório e olfatório podem ser expostos à espécies de oxigênio reativo (ROS) e espécies de nitrogênio reativo (RNS), diante da grande variedade de poluentes do ar (O_3 , NO_2 , NO , SO_2 , aldeídos, metais de transição, suspensão de partículas que contém radicais), além de bactérias aeróbias, células fagocitárias e metabólitos de substâncias xenobióticas (LOFT; POULSEN, 1996; WRIGHT et al., 1994; WISEMAN; HALLIWELL, 1996).

A figura 5 abaixo, mostra a anatomia do pulmão, dividida em duas partes: a porção condutora (traquéia, brônquio primário, brônquio secundário, bronquíolo, bronquíolo terminal) e a porção respiratória (bronquíolo respiratório, ducto alveolar e sacos alveolares).



Fonte: Junqueira, 2004

Figura 5 - As principais divisões do epitélio pulmonar

2.4 POLUIÇÃO E O CÂNCER

Estudos epidemiológicos indicam que a exposição crônica a altos níveis de poluentes está associada ao aumento da incidência de câncer. Calderón-Garcidueñas et al. (2002) e Kyrtopoulos et al. (2002). A patogênese do câncer vem sendo estudada associando prevenção como o seu tratamento. Sabe-se que espécie de oxigênio reativa é produzida constantemente e algumas vezes o sistema anti-oxidativo não consegue detê-los, envolvendo dessa maneira na carcinogênese e em doenças degenerativas (CLAYSON; MEHTA; IVERSON, 1994; LUNEC, 1990; SPECTOR; WILLIAN, 1981).

A relação entre a poluição ambiental e a neoplasia foi investigada experimentalmente quando (REUMAO; CURY; LICHTENFELS, 1997), mostraram que camundongos tratados com carcinógeno químico apresentaram maior predisposição a neoplasias pulmonares em áreas urbanas quando comparados aos animais que viveram em áreas rurais, em ambiente de ar puro. Segundo (BUKOWSKI; WARTENBERG, 1997) defendem que os pequenos animais, ou animais de companhia podem ser usados para estimar o risco de câncer por conviverem muito próximos do homem.

Segundo (BUKOWSKI; WARTENBERG; GOLDSCHMIDT, 1998) investigaram as causas ambientais de cânceres do seio nasal em cães, e verificaram que o uso de carvão ambiental ou querosene representava fatores de alto risco para o desenvolvimento desses tumores. É necessário comentar que os proprietários dos animais convivem com eles no mesmo ambiente, e que, portanto estão expostos aos mesmos fatores de risco.

Segundo (Gavazza et al.2001), realizaram um estudo caso-controlado para determinar se a exposição residencial a poluentes ambientais estaria ligada ao aumento de risco de desenvolvimento de linfoma em cães. Constararam que o fato de os animais viverem em áreas industriais e o uso de substâncias químicas, como tintas ou solventes, estavam positiva e independentemente associados com o desenvolvimento de linfoma em cães. Deduziram, também, que o parâmetro “linfoma” em cães pode ser considerado sentinela de situações potencialmente perigosas para seres humanos, devido também ao curto período de latência entre a exposição e o desenvolvimento da doença. De acordo com (Bertone et al.2002), determinaram, também, que gatos que conviviam em ambientes em que os proprietários fumavam, tiveram risco aumentado de desenvolver linfoma maligno.

O desenvolvimento da medicina veterinária na área de clínica de cães e gatos nos últimos 20 anos tem permitido uma melhora significativa no padrão de vida dos animais de estimação, obtida através de um manejo nutricional adequado, vacinações e vermifugações periódicas, tratamentos periodontais regulares e outras medidas praticadas em pequenos animais. Conseqüentemente, esta melhora na condição de vida de cães e gatos têm feito com que estes possam atingir faixas etárias mais avançadas. Paralelamente ao aumento do período de vida dos pequenos animais, vem sendo observado, por vários profissionais, um aumento da prevalência de neoplasias em cães e gatos.

No caso, segundo (Hordern, 2002), descrevem a descoberta de um “cluster” de câncer em Fallon, Nevada, EUA. Um “cluster” de câncer indica a presença de um número de casos de câncer maior do que o esperado dentro de um grupo de pessoas, uma área geográfica, num determinado período de tempo. No caso de Fallon, descobriu-se que 15 crianças numa comunidade pequena haviam recebido o diagnóstico de leucemia linfocítica aguda (LLA) num período de 2 anos. Porém as causas do aumento da incidência de LLA não puderam ser detectadas naquele local naquele momento.

Investigando posteriormente o meio ambiente de Fallon, constatou-se que a água fornecida à cidade continha 100 partes por bilhão de arsênico, o que corresponde a nível 10 vezes superior aos permitidos. Esses níveis haviam permanecido elevados por cerca de 60 anos. Houve, ainda, o relato de contaminações com até 500 partes por bilhão de arsênico. Como resultado desse estudo, a população de Fallon foi aconselhada a não beber a água da região; os estudos de contaminantes ambientais continuam no local, com a finalidade de descobrir e eliminar mais poluentes que poderiam ter contribuído para a gênese das neoplasias.

2.5 AVALIAÇÃO DAS LESÕES DO DNA (GENOTOXICIDADE):

As neoplasias primárias de pulmão em cães são relativamente incomuns se comparados aos seres humanos. A incidência em cães tem sido reportada em 4,17 casos para 100 mil cães, porém a prevalência dessas neoplasias tem crescido devido ao aumento do tempo de vida dos animais, aperfeiçoamento das técnicas diagnósticas ou também presença de agentes carcinogênicos no meio ambiente (GINSBERG et al., 1993; MOULTON, 1990).

A injúria celular oxidativa pode lesar o DNA, causando alterações estruturais, alterações na tradução de sinais nucleares e citoplasmáticos, podendo modular a atividade de proteínas e genes em resposta ao estresse celular. Todas essas injúrias podem levar a morte celular ou transformação maligna (MATHISON ; HARMAN ; BOGDANFFY, 1997; WRIGHT et al.,1994; WISEMAN; HALLIWELL, 1995,1996).

Durante a mitose pode-se ocorrer quebras cromossômicas, dando origem a uma estrutura chamada micronúcleo.

O micronúcleo é uma discreta estrutura da cromatina, envolta por membrana nuclear, que aparece no citoplasma da célula, sem qualquer ligação com o núcleo principal (OLIVEIRA;MACHADO-SANTELLI,1987).

A ausência ou o defeito do fuso celular, pode não levar a união dos cromossomos na placa metafisária, levando a dispersão e divisão destes, que posteriormente reúne em um núcleo de constituição tetraplóide ou formam micronúcleos de tamanhos variados (MACHADO-SANTELLI,1987).

O teste do micronúcleo vem sendo utilizado para avaliar a genotoxicidade ambiental e agentes genotóxicos (BOLOGNESI et.al., 2004).

Segundo (TOLBERT; SHY; ALLEN, 1992), classificaram as alterações nucleares encontradas na mucosa bucal, da seguinte maneira: binucleadas (dois núcleos dentro de uma célula); "broken egg" (núcleos que aparecem com uma fina ligação cromatínica; picnose (cromatina picnótica); cromatina condensada (cromatina nuclear agregada); cariorrexis (desintegração nuclear) e cariólise (dissolução nuclear)).

Um novo critério de classificação foi reformulada, já que alterações como cromatina condensada, cariorrexis e picnose, estão associadas com o processo de morte celular, foi re-interpretada de acordo com (MANELLI-OLIVEIRA ; MACHADO-SANTELLI, 2000), classificou as alterações nucleares da seguinte maneira: micronúcleos (estruturas formadas pela cromatina envolvidas pela membrana nuclear e menores que o núcleo principal; brotos nucleares (protuberâncias na superfície do núcleo que podem estar ligadas a uma delgada ponte cromatínica) ; núcleos interligados (estruturas lobuladas de tamanho similar) e apoptose (desintegração nuclear, formando uma massa amorfa e eosinofílica).

Segundo RAMIREZ ; SALDANHA, 2002, analisaram a frequência dos "broken egg" em células da mucosa de indivíduos com carcinomas orais e consumidores de álcool, encontrando diferenças significativas entre esses pacientes e o controle. Porém discutem que o estágio "broken egg" seria um estágio anterior a formação do micronúcleo.

Os estudos que analisam a frequência de broken eggs continuam escassos e nos que existem, muitas vezes eles não são adequadamente discutidos, sendo um significado biológico desconhecido, Ramirez e Saldanha (2002).

Estudo da poluição do ar, na China, em linfócitos retirados do sangue de mulheres que residiam na zona rural e urbana, mostrou-se uma alta frequência de micronúcleo naquelas que residiam em zona urbana, resultados que evidenciam o teste de Micronúcleo como sensível indicador do ar poluído, Ishikawa et al. (2005).

O papel dos adutos de DNA em processos mutagênicos e carcinogênicos induzidos por agentes químicos ocupacionais ou presentes no ambiente também tem sido amplamente investigado. A formação do aduto 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OhdG), foi descrito primeiramente em por Kasai e Nischimura (1984).

Algumas dessas lesões acumulam-se no DNA após exposição crônica ao carcinógeno e levam à incorporação errada de bases após a replicação ou a transcrição (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993; SADOWSKA et al., 2001) propuseram que a lesão oxidativa do DNA, pode ser uma causa significativa do câncer, na qual os animais mamíferos produzem entre 10^4 e 10^5 resíduos de 8'-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OhdG), promovendo a incorporação e mutação das bases G:C e T:A.

A grande produção desse aduto em mamíferos é proveniente principalmente do metabolismo celular, sendo mais alto na mitocôndria, em comparação com o núcleo. Em humanos, é estimado a produção de 8-OhdG no processo metabólico normal em média de 178 resíduos, por célula, ao dia (SHIGENAGA; GIMENO; AMES, 1983).

Dessa maneira, a investigação de biomarcadores de poluentes atmosféricos pode ser utilizada como uma importante ferramenta para o aprimoramento do conhecimento dos efeitos da genotoxicidade e carcinogênese na poluição atmosférica ambiental, Perera et al. 1996 e Kyrtopoulos et al. (2002).

Aproximadamente cinco milhões de pessoas morrem pelo câncer anualmente, sendo que 80% dos casos poderiam ser evitados, se houvesse um aprimorado estudo epidemiológico, Sasco (1995). A detecção de 8-OhdG por imunistoquímica e associada ao uso da eletroforese em gel de célula isolada (teste do COMETA ou SCGE) podem ser, portanto, importantes monitoradores de lesão oxidativa em indivíduos expostos aos poluentes atmosféricos (CALDERÓN-GARCIDUEÑAS et al., 1999).

Há artigos que relatam a utilização do método de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para detecção do 8'-hydroxy-2'-deoxyguanosine através da urina, em pacientes com câncer de pulmão e mama, Chiou et al. (2003).

A técnica de Elisa mostrou-se um valor de seis vezes superior ao método HPLC no trabalho realizado com 33 tecidos de placenta, Yin et al. (1994).

Outros adutos do DNA, tais como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são derivados da queima incompleta de combustível. Os hidrocarbonetos aromáticos (benzeno, tolueno e xileno) são cancerígenos (FROMME et al, 2004). Indivíduos expostos à poluição ocasionada pelo tráfego de veículos em área urbana apresentaram taxas maiores de lesões cromossômicas (ANWAR, 1994).

Os poluentes como o ozônio e formaldeído também podem causar injúrias ao epitélio respiratório (HARKEMA, 1989; MORGAN, 1997; ROMANO, 1999).

3 OBJETIVOS

- 3.1 - Estudar a morfologia do epitélio respiratório de cães provenientes das regiões (zona sul, leste, centro, oeste e norte) da Cidade de São Paulo.
- 3.2 - Analisar a quebra do DNA pela técnica do Cometa no epitélio respiratório de cães provenientes das regiões (zona sul, leste, centro, oeste e norte) da Cidade de São Paulo.
- 3.3 - Analisar a quebra do DNA pela técnica do Micronúcleo no epitélio respiratório de cães provenientes das regiões (zona sul, leste, centro, oeste e norte) da Cidade de São Paulo.
- 3.4 - Avaliar a presença de adutos de DNA (8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine) por Elisa no epitélio respiratório de cães provenientes das regiões (zona sul, leste, centro, oeste e norte) da Cidade de São Paulo.
- 3.5 - Correlacionar os resultados acima, com os dados do índice de poluição (PM10) fornecido pela CETESB.
- 3.6 - Avaliar a importância do cão como sentinela da poluição ambiental.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 NECRÓPSIA E COLETA DE MATERIAIS

Foram utilizados três cães filhotes (sem doença infecto-contagiosa e sem neoplasias), com idade até 30 dias, representante da cidade de São Paulo, sendo utilizado como controle negativo, além de 40 cães saudáveis (sem doença infecto-contagiosa e sem neoplasias), que moravam em residência há mais de cinco anos nas regiões Norte, Sul, Centro, Oeste e Leste da Cidade de São Paulo.

Os animais que vieram a óbito (sem doença infecto-contagiosa e sem histórico de neoplasias) no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, foram imediatamente encaminhados para o Serviço de Patologia (FMVZ-USP), após a devida autorização da Comissão de Bioética da FMVZ-USP e Conselho de Ética do HOVET. A necrópsia e a coleta dos fragmentos do epitélio olfatório (meato dorsal médio) e pulmonar (lobo apical do segmento cranial esquerdo). Uma amostra parcial dos fragmentos retirados foi fixada em metacarn por 12 horas, sendo então transferidos para álcool 95%, onde foram mantidos por 48 horas, sendo posteriormente incluídos em parafina, para o exame histológico.

Outra parte dos fragmentos foi congelada no freezer à -80°C para realização do teste do Cometa e Elisa. Para o teste do micronúcleo, foi realizado em lâmina do esfregaço do epitélio respiratório e olfatório. Posteriormente foram fixados em metanol e corados pelo método de Feulgen.

4.2 DADOS DO ÍNDICE DE MATERIAL ATMOSFÉRICO PARTICULADO

A CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental Ciência e Tecnologia a Serviço do Meio Ambiente – forneceu mapas das áreas da cidade de São Paulo, que informam o nível de diferentes tipos de poluição presentes nestas áreas.

Após a coleta de dados (idade, sexo, região, cep) dos cães foi feita à correlação com a média anual do ano de 2005, referente ao índice de material atmosférico particulado (PM10), mensurado pelas estações móveis de poluição fornecidas pela CETESB.

Foram utilizadas quatro estações da CETESB representando dessa maneira, cada região da cidade de São Paulo: a estação Ibirapuera (representando a região Sul); a estação Móoca (representando a região Leste); a estação Santana (representando a região Norte) e a região de Pinheiros (representando a região Oeste).

Foi feito um rastreamento da localização desses animais, através do CEP e endereço dos proprietários, registrando os possíveis dados na tabela do MICROSOFT® EXCEL, 2002.

4.3 PROTOCOLOS

4.3.1 Exame histopatológico do epitélio olfatório da região nasal (meato dorsal médio) e pulmonar

O exame do epitélio olfatório foi realizado segundo a classificação segundo (Souza et al., 2006). Foi classificado de acordo com escore de 0 (ausência) a 3 (máxima intensidade para as seguintes categorias: infiltrado inflamatório; e hipersecreção de muco (aumento das células caliciformes), por meio do microscópio de luz em aumento de 40x.

O epitélio pulmonar também foi classificado dessa maneira com escore de 0 a 3, para as seguintes categorias: antracose, infiltrado inflamatório e espessamento bronquiolar.

4.3.2 Exame histopatológico do epitélio pulmonar (lobo apical segmento cranial esquerdo):

Foram selecionados cinco animais representantes da região Oeste, Sul e Norte e três animais representantes da região Leste, mensurando a área total do parênquima pulmonar e a área de antracose através do Microscópio Nikon E-800 e sistema de análise de imagens Image Pro-Plus, no aumento de 20x, segundo (SOUZA et al., 2006)

4.3.3 Técnica da eletroforese em microgel para a análise da quebra do DNA (COMETA)

- Preparo das lâminas.
- As lâminas de microscopia foram cuidadosamente limpas com papel toalha e álcool 70% evitando-se riscá-las.
 - Instilou-se sobre a lâmina limpa 2 a 3 gotas de agarose Low Melting Point a 0,5% utilizando uma pipeta Pasteur. Arrastou-se gentilmente uma outra lâmina por cima da primeira, de tal forma que as duas ficassem com agarose. Secou-se em temperatura ambiente, com as lâminas na posição horizontal (para isso utiliza-se uma bandeja de isopor forrada com papel toalha).
 - Pesou-se 50mg de tecido dos fragmentos do meato dorsal médio e pulmão, posteriormente macerou-se em um Dounce Tissue Grinder (Wheaton®) com a adição de 1500µl de solução estoque tampão PBS sempre em gelo.
 - Homogeneizou se o máximo possível com a ajuda de um homogeneizador automático. Acondicionaram-se as amostras em tubos eppendorf de 1.5ml. e mantivemos em gelo por aproximadamente 5 minutos.
 - Posteriormente homogeneizou-se mais uma vez e adicionaram-se 600µl de agarose Low Melting Point (0,8%) à 70µl dessa solução dos fragmentos. Mais uma homogeneização e retiramos-se 100µl dessa nova solução dispensando em 3 a 4gotas sobre as lâminas previamente feitas. Colocou-se uma lamínula sobre as gotas cuidadosamente a fim de distribuir uniformemente essa agarose. Após essa etapa, acondicionaram-se as lâminas em placa de vidro previamente resfriada por 10 minutos em geladeira.
 - Para o controle positivo, utilizou-se amostra de 140-l do eppendorf do grupo controle negativo do experimento e adicionaram-se 100µl de peróxido de hidrogênio 30%. Deixou-se o tubo em temperatura ambiente por 15 minutos, depois se adicionando 1100 µl de agarose.. As lâminas foram preenchidas da mesma maneira.
 - Após 10 minutos na geladeira, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em solução de lise (2,5M de NaCl; 100mM de EDTA; 10mM Trizma Base; 1% de n-lauril sarcosina; pH 10 adicionar 1mL de Triton X-100) a 4° C por 1 hora.

- Após o processo de lise para remoção das membranas celular e nuclear, as lâminas foram lavadas em água bidestilada três vezes com intervalos de 15 minutos. Após as lavagens foram transferidas para a cuba de eletroforese, permanecendo por 20 min em “unwinding”, ou seja, o desenrolamento das fitas de DNA. A eletroforese foi realizada em 25V, 350mA, por 40 min (voltagem para cuba Hoefer-HE 99X), no gelo e no escuro em solução tampão de eletroforese (300mM de NaOH e 1mM de EDTA).
- Ao término da corrida as lâminas foram neutralizadas em três banhos de 5 min em solução de Tris 0,4M, pH 5 e submetidas à secagem na posição vertical em temperatura ambiente ou em estufa a 37 graus.
- Para precipitação de proteínas e dos debrís celulares, as lâminas foram imersas em solução fixadora (150g de TCA, 50g de ZnSO₄, 40mL de glicerina, q.s.p. 1000mL) por 15 minutos. As lâminas foram lavadas por 1 minuto em água bidestilada e colocadas para secar em posição vertical em temperatura ambiente.
- Foram, então, coradas em prata pelo método descrito por Nadin *et al.* (2001). Para isso as lâminas foram colocadas em uma cubeta onde despejamos 32 ml da solução A (50g Na₂CO₃ q.s.p. 1000ml de água bidestilada) e 68 ml da solução B (0.2g de NH₄NO₃, 0.2g de AgNO₃, 1g de Ácido Silicotungstênico, 500µl de formaldeido, q.s.p. 1000ml de água bidestilada).
- As lâminas foram deixadas corando por 10 minutos lavando se a seguir com água bidestilada por 1 minuto. Quando necessário refizemos o processo de coloração.
- Quando terminada a coloração, foi realizado um banho de 5 minutos em solução finalizadora (1 ml de ácido acético q.s.p. 100ml de água bidestilada). Ao término, foi realizado mais um banho em água bidestilada por 1 minuto. Deixamos secar à temperatura ambiente ou em estufa à 37graus.

4.3.3.1 Quantificação dos cometas

A quantificação dos cometas foi realizada pela mensuração do comprimento total da estrutura em objetiva de 40X. A quantificação no teste do Micronúcleo foi feita em objetiva de 40x. Para ambos os testes, foram utilizados o Microscópio Nikon E-800 e sistema de análise de imagens Image Pro-Plus.

4.3.3.2 Padronização do cometa

Para a padronização do teste do Cometa, foram feitos seis testes em diferentes reações e datas, utilizando o epitélio olfatório de um mesmo animal (filhote).

Sendo assim, dividimos as amostras coletadas em controle negativo e controle positivo (utilizando água oxigenada).

O resultado do teste do Cometa de células do epitélio olfatório de um cão filhote utilizado como controle negativo e controle positivo (acréscimo da água oxigenada para lesão do DNA) observado na tabela abaixo foram significantes.

Tabela 1 - Média e Desvio Padrão da mensuração de 100 cometas das células do epitélio olfatório de um cão filhote utilizando os como controle negativo e controle positivo (acréscimo da água oxigenada para lesão do DNA) – São Paulo - 2006

Animais controle negativo	Média / Desvio	Animais controle positivo	Média / Desvio
Negativo 1	33,50 ± 3,45	Positivo 1	122,67 ± 7,39
Negativo 2	37,84 ± 3,30	Positivo 2	126,78 ± 9,35
Negativo 3	41,02 ± 3,81	Positivo 3	109,85 ± 7,69
Negativo 4	42,04 ± 4,14	Positivo 4	115,73 ± 12,06
Negativo 5	42,19 ± 3,88	Positivo 5	122,10 ± 11,67
Negativo 6	41,90 ± 4,02	Positivo 6	124,67 ± 10,42

4.3.4 Protocolo da extração do DNA e do Kit Elisa (Enzyme linked immunosorbent assay) para a detecção do aduto de DNA: 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine

Marcadores para anti 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine: anticorpo primário monoclonal da marca GENOX USA (JAICA JAPÃO).

Extração do DNA:

- Pesou-se 20 a 40mg da amostra.
- As amostras foram embrulhadas e maceradas com o uso de um martelo.
- Colocamos-se 200 µl de tampão lise com proteinase K (50µl de proteinase K para 3 ml de tampão lise).
- Incubou-se por 2 horas em Banho Maria à 65°C ou over night por 37°C na estufa.
- Adicionamos-se 200 µl de tampão lise (sem proteinase K).
- Incubou-se 15 minutos à temperatura ambiente.
- Centrifugou-se 20 minutos à 10.000 rpm à 4 °C.
- Transferiu-se dessa maneira o sobrenadante para um novo tubo eppendorf, aspirando cerca de 250 µl deste, com a ponteira, tomando o cuidado para não pegar a interfase, nem o precipitado.
- Adicionou-se 2x o volume do sobrenadante com etanol à 100% gelado e 10% do volume com acetato de sódio 3M, pH de 5,2 e gelado.
- Homogeneizou-se até aparecer a medusa.
- Centrifugou-se 10 minutos à 6.000 rpm à 4 °C.
- Desprezou-se o sobrenadante por inversão.
- Adicionamos-se 500µl de etanol à 70% para remover o sal que está em excesso.
- Centrifugou-se 10 minutos à 6.000 rpm à 4 °C.
- Deixaram-se os tubos invertidos para retirar o excesso do etanol, secou-se o pellet na bancada.

- Ressuspendeu-se o pellet em 200µl de TE (Tris e EDTA).
- Incubou-se em Banho Maria à 65°C por 30 minutos.
- Homogeneizaram-se as amostras e foram guardadas na geladeira para serem quantificadas.

4.3.5 Digestão do DNA extraído do pulmão e epitélio olfatório

- Depois da extração do DNA pelo método Salting out , secamos a amostra no speed vac;
- Ressuspendeu-se em 30 µl (solução de Tris HCL 200mM (3µl) + MgCl₂ 2M (3µl) + 2µl de DNAase I (diluída 10x)).1U;
- Incubação over night (15 a 18horas) à 37°C;
- Adicionou-se 3µl tampão glicina acetato 0,2M (pH=8,9), 5µl PDEI (0.023U)
- Incubação over night (15 a 18horas) à 37°C;
- Adicionou-se 1µl de fosfatase alcalina (pH=8,0) e Tris/ MgCl₂ 50mM (1µl)
- Incubação de no mínimo duas horas à 37°C.

4.3.6 Protocolo do kit ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

- Adicionamos-se 50µl da solução padrão.
- Adicionamos-se 50µl do anticorpo primário e incubou-se por 1 hora à 37°C.
- A lavagem foi feita com 250µl da solução por 3 vezes.
- Adicionamos-se 100µl do substrato de enzima e incubou-se à temperatura ambiente por 15 minutos.
- Adicionamos-se 100µl da solução finalizadora.
- Leitura da absorbância e cálculo dos resultados através do programa estatístico do PRISMA.

4.3.7 Teste do Micronúcleo

O material coletado do epitélio respiratório foi triturado, fixado em metanol e ácido acético (3:1) por 20 minutos e centrifugado à 1000 rpm por 10 minutos. As células foram esfregadas em lâminas, coradas com Feulgen (1 hora no reagente de Schiff e depois no ácido clorídrico (HCl) por 15 minutos por 60°. C e examinadas no microscópio de luz, segundo (MELLO e VIDAL, 1980).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As informações (dados dos animais) foram mapeadas e submetidas à análise de clusters espaciais, ilustrados com pontos a localização dos possíveis animais e correlacionando com as regiões da cidade de São Paulo e as quatro estações representantes.

A análise estatística foi realizada pela Sra. Jucélia de Jesus Pereira, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ – USP, utilizando-se o programa ESRI® Arc Map™ 9,1, para fazer o mapeamento geográfico.

Todos os demais dados foram analisados quantitativamente pelo programa MiniTab 14, a significância estatística foi feita pela análise de variância (ANOVA), utilizando o teste de Tukey, com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 ANIMAIS UTILIZADOS NO ESTUDO

Os animais encaminhados imediatamente após o óbito, para o Serviço de Patologia do HOVET-FMVZ-USP (Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo) , eram provenientes de diferentes regiões de São Paulo (Zona Leste, Oeste, Norte e Sul).

A maior parte dos cães veio do HOVET-FMVZ-USP e uma minoria era coletada externamente ao HOVET, ou seja, em pequenas clínicas ou em outros estabelecimentos veterinários.

Os prontuários preenchidos pelos proprietários continham dados tais como: espécie, raça, idade, número do prontuário data de óbito e região.

Esses dados foram de essencial importância para o desfecho e pesquisa da dissertação.

Os dados dos prontuários dos cães coletados estão expostos no quadro 1 a seguir.

Número	Animal	Prontuario	Sexo	raça	idade	Data obito	regiao
28	an 31	172442	fêmea	maltes	2	19.04.06	oeste
25	an 28	170538	macho	boxer	8	17.04.06	centro
7	an 09	externo	fêmea	yorkshire	13	05.12.05	leste
32	an 35	171520	fêmea	pastor	8	25.04.06	leste
42	na 45	174366	macho	rotweiler	6	06.07.06	leste
4	an 04	165568	macho	pastor	9	25.08.05	norte
5	an 05	165819	macho	srd	7	03.11.05	norte
18	an 21	externo	macho	pit bull	7	06.04.06	norte
24	an 27	172051	fêmea	srd	8	07.04.06	norte
29	an 32	171508 7	macho	pastor	8	21.04.06	norte
40	an 43	173397	macho	srd	8	01.06.06	norte
43	na 46	174407	fêmea	poodle	6	10.06.06	norte
6	an 08	168238	macho	poodle	7	29.11.05	oeste
8	an 11	148465	macho	basset	13	15.12.05	oeste
9	an 12	169343	macho	poodle	10	05.01.06	oeste
10	an 13	169611	macho	pinscher	7	24.01.06	oeste
11	an 14	164450	macho	cocker	12	02.03.06	oeste
12	an 15	169401	fêmea	husky	10	02.03.06	oeste
13	an 16	170835	fêmea	husky	17	02.03.06	oeste
15	an 18	171617	x	bulldogue	meses	15.03.06	oeste
16	an 19	171521	fêmea	dogue	5	22.03.06	oeste
19	an 22	172086	fêmea	srd	14	10.04.06	oeste
21	an 24	150779	fêmea	srd	9	13.04.06	oeste
26	an 29	172383	fêmea	srd	14	20.04.06	oeste
33	an 36	172740	macho	labrador	?	16.05.06	oeste
34	an 37	172874	fêmea	poodle	3	17.05.06	oeste
35	an 38	173062	fêmea	whippet	10	18.05.06	oeste
37	an 40	99415	fêmea	boxer	8	19.05.06	oeste
39	an 42	173199	macho	bulldogue	4	23.05.06	oeste
41	an 44	173524	macho	rotweiler	8	05.06.06	oeste
14	F 17+	externo	fêmea	srd	13	10.03.06	sul
17	an 20	171716	fêmea	srd	1	27.03.06	sul
20	an 23	171911	fêmea	srd	14	04.04.06	sul
22	an 25	172294	macho	srd	4	18.04.06	sul
23	an 26	172295	fêmea	pinscher	7	18.04.06	sul
27	an 30	externo	fêmea	srd	10	25.04.06	sul
30	an 33	unisa	macho	cocker	13	21.04.06	sul
31	an 34	externo	fêmea	poodle	14	21.04.06	sul
36	an 39	externo	fêmea	daschund	7	19.05.06	sul
38	an 41	externo	fêmea	rotweiler	7	22.05.06	sul
1	03 Filhotes	x	x	x	meses		guarulhos

Quadro 1 - Dados gerais dos animais utilizados no projeto – São Paulo - 2006

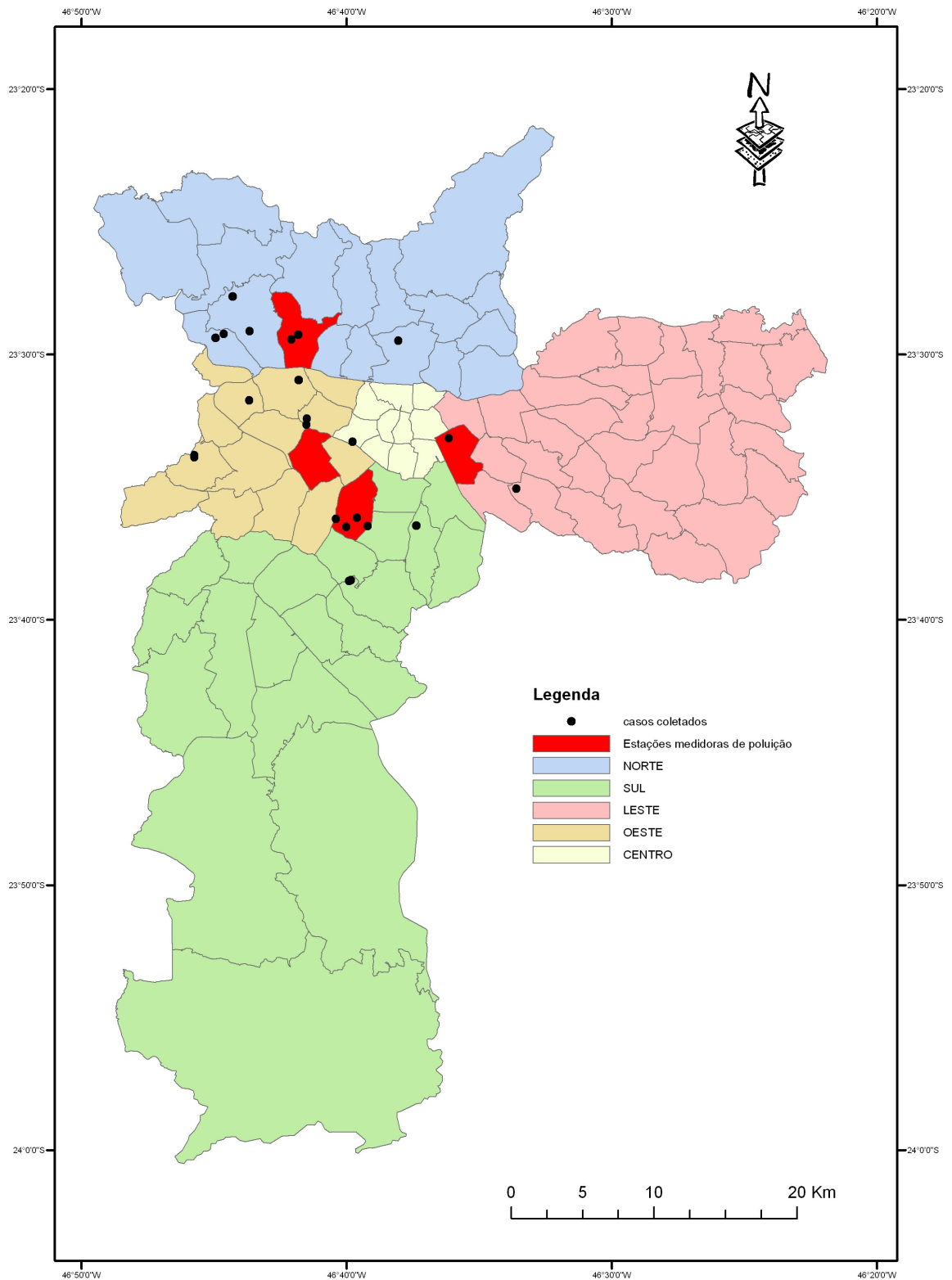
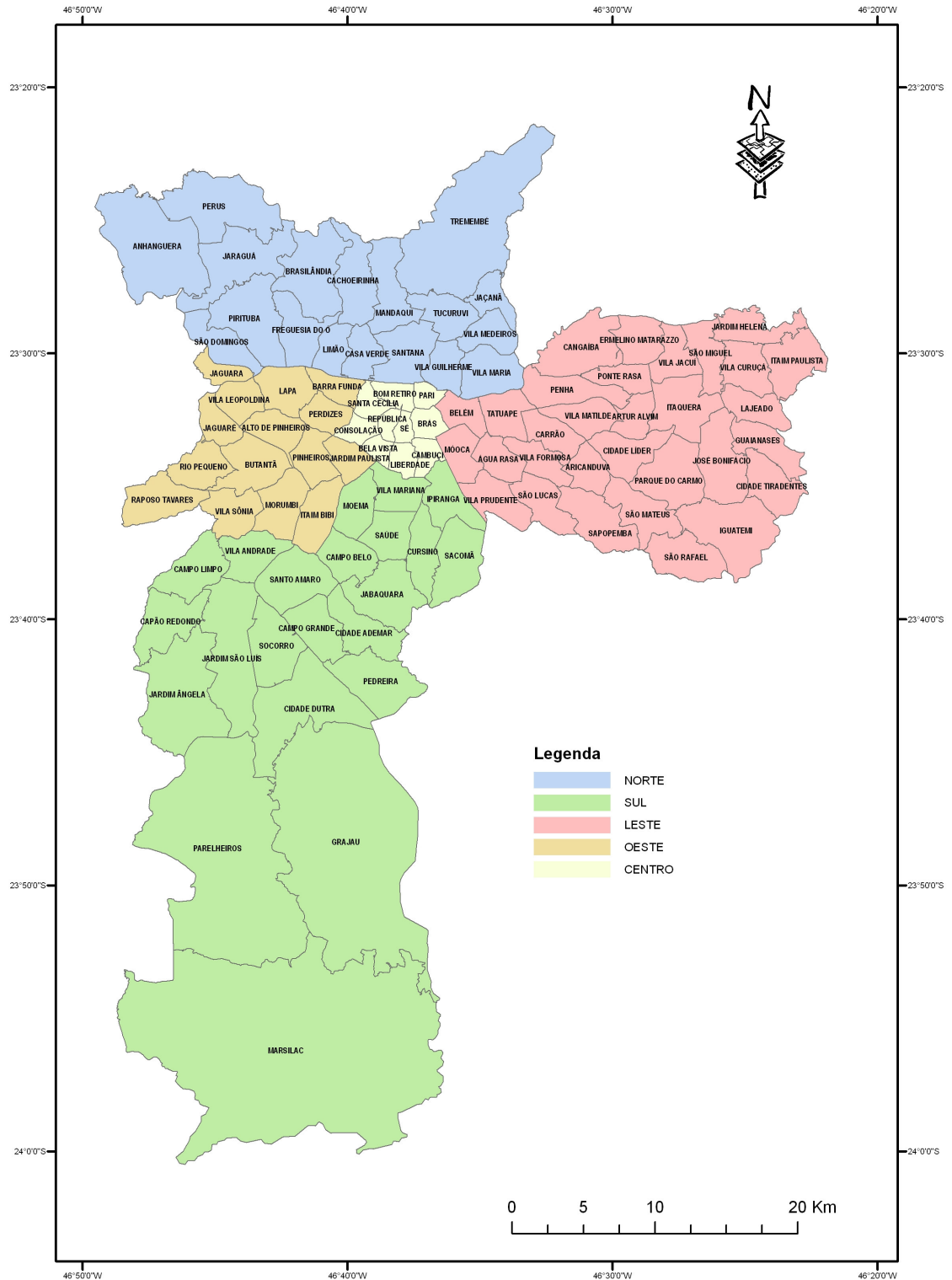


Figura 6 - Figura ilustrando as estações medidoras da poluição com sua respectiva localização da moradia do animal, ilustrada em pontos - São Paulo -2006



Fonte: Fundação SEADE, 2000.

Figura 7 - Figura ilustrando os distritos das regiões Norte, Sul, Centro, Leste e Oeste da cidade de São Paulo - São Paulo -2006

5.2 RESULTADO DO EXAME HISTOPATOLÓGICO DO EPITÉLIO OLFATÓRIO E PULMONAR

Observar abaixo no quadro 2, o resultado do exame histopatológico do epitélio olfatório mensurado com escore de 0 a 3 para os seguintes fatores: infiltrado inflamatório misto e hipersecreção de muco (aumento das células caliciformes).

Número	região	infiltrado inflamatório misto	hipersecreção muco
7	leste	1	1
32	leste	0	0
42	leste	0	0
4	norte	1	0
5	norte	1	1
18	norte	0	0
24	norte	1	0
29	norte	0	0
40	norte	0	0
43	norte	0	0
6	oeste	1	0
8	oeste	1	0
9	oeste	1	1
10	oeste	1	1
11	oeste	1	3
12	oeste	1	1
13	oeste	0	0
16	oeste	0	0
19	oeste	1	0
21	oeste	2	0
26	oeste	0	0
33	oeste	0	0
34	oeste	2	0
35	oeste	1	0
37	oeste	2	0
41	oeste	0	0
20	sul	1	0
22	sul	0	0
23	sul	0	0
27	sul	1	0
31	sul	0	0
36	sul	1	0
38	sul	0	0
43	norte	0	0
F1	x	0	0
F2	x	0	0
F3	x	0	0

Quadro 2 - Resultado do exame histopatológico do epitélio olfatório mensurado em escore de 0 a 3 - São Paulo – 2006

5.3 DESCRIÇÃO DO EXAME HISTOPATOLÓGICO DO EPITÉLIO OLFATÓRIO

No exame histopatológico do epitélio olfatório, observou-se epitélio colunar pseudo-estratificado ciliado dentro do padrão da normalidade, constituído por células olfatórias compostas por neurônios bipolares entremeio as células prismáticas de sustentação e células redondas basais, que localizadas na base do epitélio.

A lâmina própria nota-se glândulas seromucosas sem alteração digna de nota.

O exame histopatológico foi similar a todos os animais da região Sul, Norte, Leste e Oeste. O que variava de um animal para o outro é a presença de hipersecreção de muco pelas células caliciformes e infiltrado inflamatório misto, composto por células linfoplasmocitárias e raros neutrófilos, localizados na submucosa, entremeio às glândulas seromucosas. Entretanto o resultado estatístico mostrou-se não significativo entre animais oriundos das diferentes regiões de São Paulo.

Entre os três cães oriundos da região Leste, apenas um obteve discreta hipersecreção de muco pelas células caliciformes e discreto infiltrado inflamatório misto. Entre os sete animais oriundos da região Norte, apenas três tiveram discreta hipersecreção de muco pelas células caliciformes e um apresentou discreto infiltrado inflamatório. Dos dezesseis cães oriundos da região Oeste, oito cães apresentaram discreta hipersecreção e três tiveram moderada hipersecreção do muco pelas células caliciformes. Em relação ao infiltrado inflamatório, três cães apresentaram discreta inflamação e um notou-se intensa inflamação.

Os sete animais oriundos da região Sul, três animais tiveram discreta hipersecreção do muco pelas células caliciformes.

5.4 FOTOMICROGRAFIA DO CORTE HISTOLÓGICO DO EPITÉLIO OLFATÓRIO

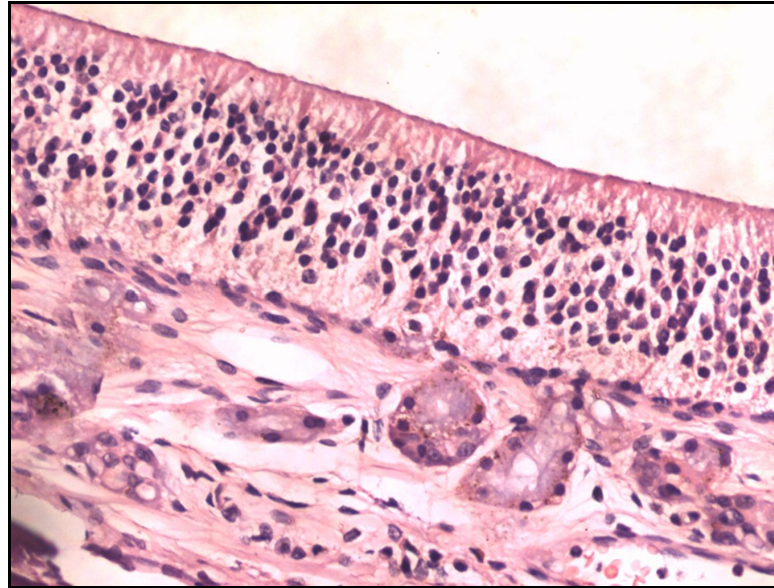


Figura 8 - Fotomicrografia do corte histológico do epitélio olfatório do animal da região Oeste. Hematoxilina & Eosina (Objetiva de 20X) – São Paulo - 2006

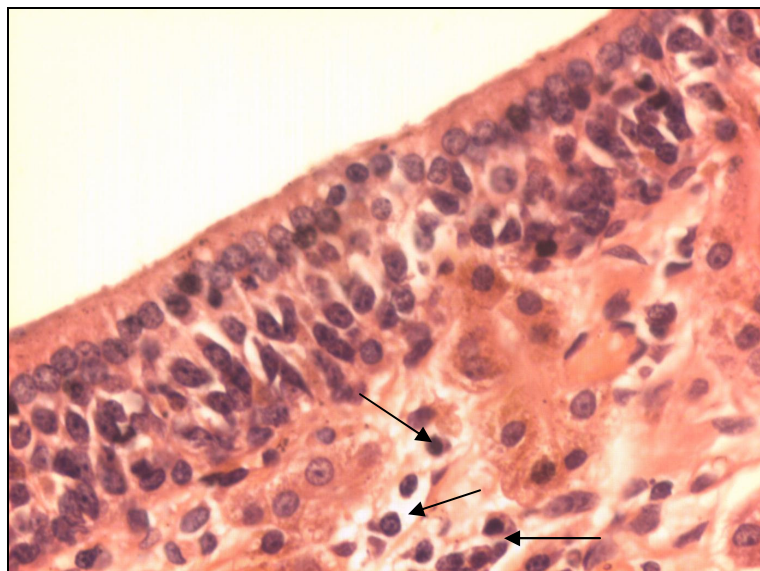


Figura 9 - Fotomicrografia de corte histológico do epitélio olfatório do animal da região Norte. A seta indica discreto infiltrado inflamatório misto localizado na submucosa do epitélio - Hematoxilina & Eosina (Objetiva de 40X) – São Paulo, 2006

Prontuário	região	infiltrado inflamatorio	antracose	Espessamento bronquiolar
externo	leste	0	1	1
171520	leste	1	2	3
174366	leste	0	0	1
165568	norte	0	1	2
165819	norte	2	0	1
externo	norte	0	1	0
172051	norte	1	1	1
1715087	norte	0	2	2
173397	norte	0	1	2
174407	norte	0	0	1
168238	oeste	0	0	1
148465	oeste	1	1	2
169343	oeste	0	2	3
169611	oeste	0	1	2
164450	oeste	0	1	2
169401	oeste	1	2	1
170835	oeste	0	1	2
171521	oeste	2	0	0
172086	oeste	0	3	1
150779	oeste	1	1	0
172383	oeste	1	1	1
172740	oeste	2	1	1
172874	oeste	2	1	3
173062	oeste	2	1	1
99415	oeste	1	2	1
173524	oeste	0	0	3
171911	sul	1	2	1
172294	sul	1	1	0
172295	sul	1	1	1
externo	sul	1	2	3
externo	sul	2	1	2
externo	sul	2	2	0
externo	sul	2	2	1
F1	x	0	0	0
F2	x	0	0	0
F3	x	0	0	0

Quadro 3 Resultado da avaliação histopatológica do epitélio pulmonar ao microscópio óptico em aumento de 40x, escore de 0 a 3 – São Paulo, 2006

5.5 DESCRIÇÃO DO EXAME HISTOPATOLÓGICO DO EPITÉLIO PULMONAR

No exame histopatológico pulmonar observou-se diferenças entre os animais oriundos das diversas regiões da cidade de São Paulo e diferença entre os próprios animais provenientes da mesma região, não havendo diferença significativa entre eles.

Entre os três cães oriundos da região Leste, apenas o primeiro cão coletado obteve discreto infiltrado inflamatório misto com moderada quantidade de macrófagos contendo pigmento enegrecido (antracose) e severo espessamento do músculo liso bronquiolar. O segundo obteve ausência de infiltrado inflamatório misto, moderada quantidade de macrófagos contendo pigmento enegrecido (antracose) e ausência de espessamento do músculo liso bronquiolar, o terceiro mostrou ausência de infiltrado inflamatório misto, ausência de macrófagos contendo pigmento enegrecido (antracose) e discreto espessamento do músculo liso bronquiolar

Entre os sete cães da zona norte, o primeiro apresentou ausência de infiltrado inflamatório misto, discreta quantidade de macrófagos contendo pigmento enegrecido (antracose) e moderado espessamento do músculo liso bronquiolar. O segundo demonstrou moderado infiltrado inflamatório misto, ausência quantidade de macrófagos contendo pigmento enegrecido (antracose) e discreto espessamento do músculo liso bronquiolar. O terceiro mostrou ausência de infiltrado inflamatório misto, discreta quantidade de macrófagos contendo pigmento enegrecido (antracose) e ausência de espessamento do músculo liso bronquiolar. O quarto notou-se discreto infiltrado inflamatório misto, discreta quantidade de macrófagos contendo pigmento enegrecido (antracose) e discreto espessamento do músculo liso bronquiolar.

O quinto verificou-se ausência de infiltrado inflamatório misto, moderada quantidade de macrófagos contendo pigmento enegrecido (antracose) e moderado espessamento do músculo liso bronquiolar. O sexto observou-se ausência de infiltrado inflamatório misto, discreta quantidade de macrófagos contendo pigmento enegrecido (antracose) e moderado espessamento do músculo liso bronquiolar.

E finalmente o sete mostrou-se ausência de infiltrado inflamatório misto, ausência de macrófagos contendo pigmento enegrecido (antracose) e discreto espessamento do músculo liso bronquiolar.

Entre os dezesseis animais oriundos da Oeste, sete tiveram ausência de infiltrado inflamatório misto, cinco cães obtiveram discreto infiltrado inflamatório misto e quatro tiveram moderado infiltrado inflamatório misto. Apenas três animais tiveram ausência de macrófagos contendo pigmento enegrecido (antracose), nove demonstraram discreta quantidade de macrófagos contendo pigmento enegrecido (antracose), três tiveram moderada quantidade de macrófagos contendo pigmento enegrecido (antracose) e um mostrou severa quantidade de macrófagos contendo pigmento enegrecido (antracose). Em relação ao espessamento da musculatura bronquiolar, três animais tiveram ausência de espessamento do músculo liso bronquiolar, sete cães obtiveram discreto espessamento do músculo liso bronquiolar, quatro animais com moderado espessamento do músculo liso bronquiolar e três tiveram severo espessamento do músculo liso bronquiolar.

Entre os setes cães da zona Sul, nenhum teve ausência de infiltrado inflamatório misto, quatro tiveram discreto infiltrado inflamatório misto e três tiveram moderado infiltrado inflamatório misto.

Em relação à antracose, nenhum teve ausência de macrófagos contendo pigmento enegrecido (antracose), três tiveram discreta quantidade de macrófagos contendo pigmento enegrecido (antracose) e quatro tiveram moderada quantidade de macrófagos contendo pigmento enegrecido (antracose).

Dois animais tiveram ausência de espessamento do músculo liso bronquiolar, três tiveram discreto espessamento do músculo liso bronquiolar, um mostrou moderado espessamento do músculo liso bronquiolar e um obteve severo espessamento do músculo liso bronquiolar.

5.6 FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DO EPITÉLIO PULMONAR

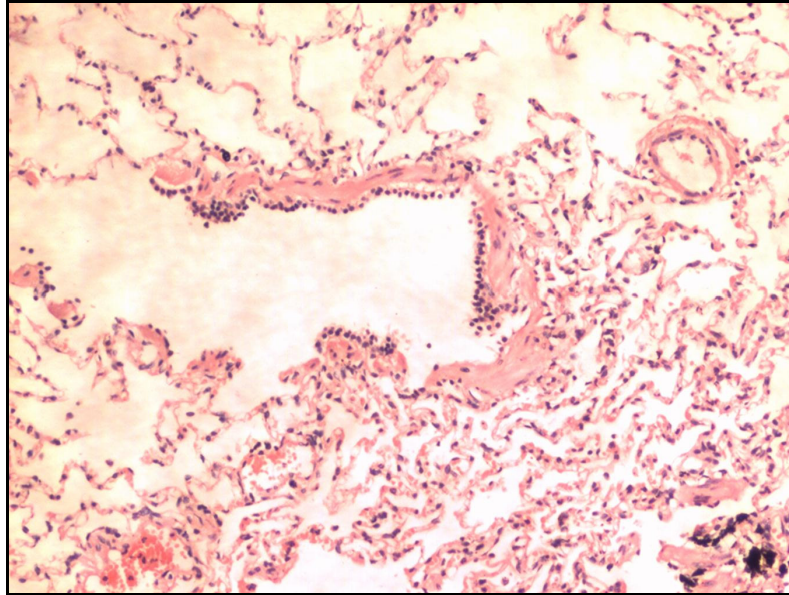


Figura 10 - Fotomicrografia de corte histológico do pulmão do animal da região Oeste. Hematoxilina & Eosina (Objetiva de 10X) – São Paulo - 2006

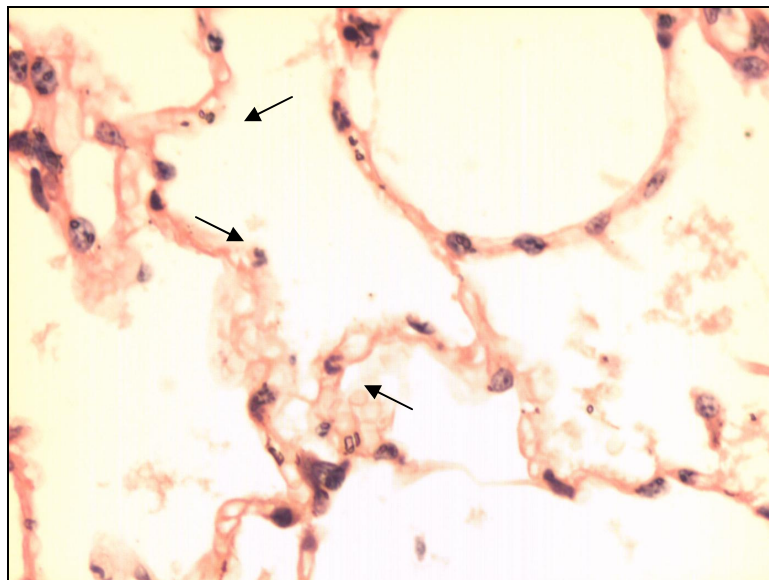


Figura 11 - Fotomicrografia de corte histológico do pulmão do animal da região Norte. Observar o discreto infiltrado inflamatório mostrando raros neutrófilos localizado em capilar de alvéolos - Hematoxilina & Eosina (Objetiva de 30X) – São Paulo - 2006

5.7 QUANTIFICAÇÃO DO COMETA NO EPITÉLIO PULMONAR E OLFATÓRIO

Tabela 1a. Média e Desvio Padrão da mensuração de 100 cometas por animal através das células do epitélio pulmonar e olfatório de cães de diversas regiões da cidade de São Paulo - São Paulo - 2006

	Animal	região	cometa Pulmão	cometa Epitélio Olfatório
1	F1	guarulhos	55,67 ± 5,04	55,87 ± 5,04
2	F2	guarulhos	46,79 ± 3,69	33,50 ± 3,45
3	F3	guarulhos	56,55 ± 16,92	53,72 ± 2,66
4	an 04	norte	64,9 ± 4,33	71,69 ± 5,67
5	an 05	norte	63,70 ± 12,70	71,69 ± 7,91
6	an 08	oeste	82,74 ± 3,17	71,19 ± 11,33
7	an 09	leste	79,96 ± 6,95	73,12 ± 6,83
8	an 11	oeste	58,87 ± 15,62	76,19 ± 14,79
9	an 12	oeste	71,11 ± 12,14	66,69 ± 17,62
10	an 13	oeste	70,12 ± 14,00	76,19 ±
11	an 14	oeste	78,26 ± 5,87	55,24 ± 7,20
12	an 15	oeste	69,08 ± 4,20	48,80 ± 8,61
13	an 16	oeste	71,79 ± 5,99	51,81 ± 8,80
14	F 17+	sul	85,57 ± 6,40	73,96 ± 7,78
15	an 18	oeste	82,91 ± 3,09	84,77 ± 3,05
16	an 19	oeste	85,78 ± 7,11	69,81 ± 4,26
17	an 20	sul	89,05 ± 6,01	93,71 ± 4,79
18	an 21	norte	73,45 ± 3,81	68,37 ± 5,25
19	an 22	oeste	59,65 ± 4,66	52,95 ± 5,47
20	an 23	sul	48,73 ± 4,57	61,35 ± 5,33
21	an 24	oeste	50,07 ± 4,27	55,28 ± 6,34
22	an 25	sul	57,97 ± 3,69	61,35 ±
23	an 26	sul	66,6 ± 4,81	50,85 ± 7,77
24	an 27	norte	62,41 ± 5,08	70,17 ± 4,57
25	an 28	centro	66,13 ± 4,45	59,54 ± 4,15
26	an 29	oeste	88,15 ± 8,60	76,59 ± 4,51
27	an 30	sul	53,69 ± 4,12	57,22 ± 3,99
29	an 32	norte	74,86 ± 0	57,22 ±
30	an 33	sul	74,77 ± 4,05	68,12 ± 6,20
31	an 34	sul	51,97 ± 4,11	68,68 ± 5,00
32	an 35	leste	77,06 ± 4,89	65,78 ± 4,38
33	an 36	oeste	63,99 ± 3,66	69,13 ± 4,25
34	an 37	oeste	79,58 ± 4,12	94,76 ± 7,66
35	an 38	oeste	79,58 ± 4,12	74,74 ± 11,49
36	an 39	sul	59,15 ± 4,64	53,39 ± 4,38
37	an 40	oeste	79,58 ± 4,12	54,63 ± 3,60
38	an 41	sul	56,97 ± 5,11	41,17 ± 4,26
39	an 42	oeste	110,92 ± 9,93	53,90 ± 3,85
40	an 43	norte	75,93 ± 9,72	93,29 ± 9,14
41	an 44	oeste	86,71 ± 7,38	81,45 ± 7,46
42	na 45	leste	98,77 ± 8,63	94,34 ± 7,75
43	na 46	norte	75,26 v 12,48	77,55 ± 4,70

5.8 FOTOMICROGRAFIA DO TESTE DO COMETA

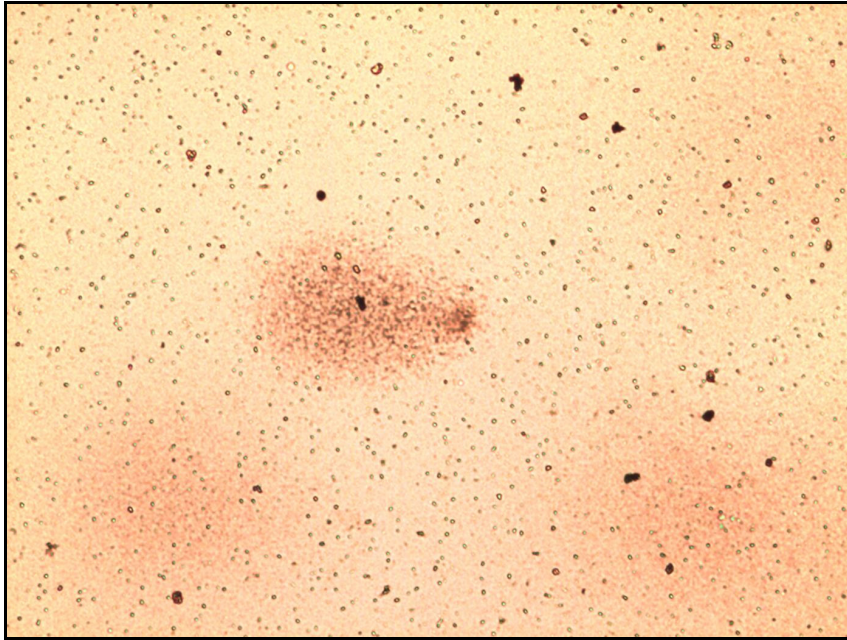


Figura 12 - Fotomicrografia de cometa de células do epitélio respiratório de cão filhote utilizado como controle positivo (tratado com H_2O_2). Observar intensa quebra do DNA. (Objetiva de 20X) – São Paulo - 2006

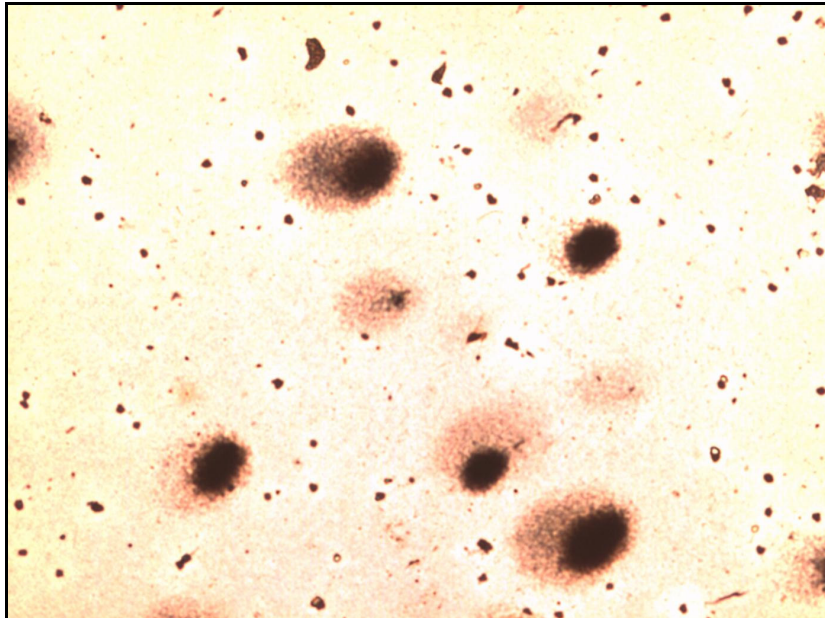


Figura 13 - Fotomicrografia de cometas de células do epitélio respiratório de cão filhote utilizado como controle Negativo (sem tratamento com H_2O_2). (Objetiva de 20X) – São Paulo - 2006

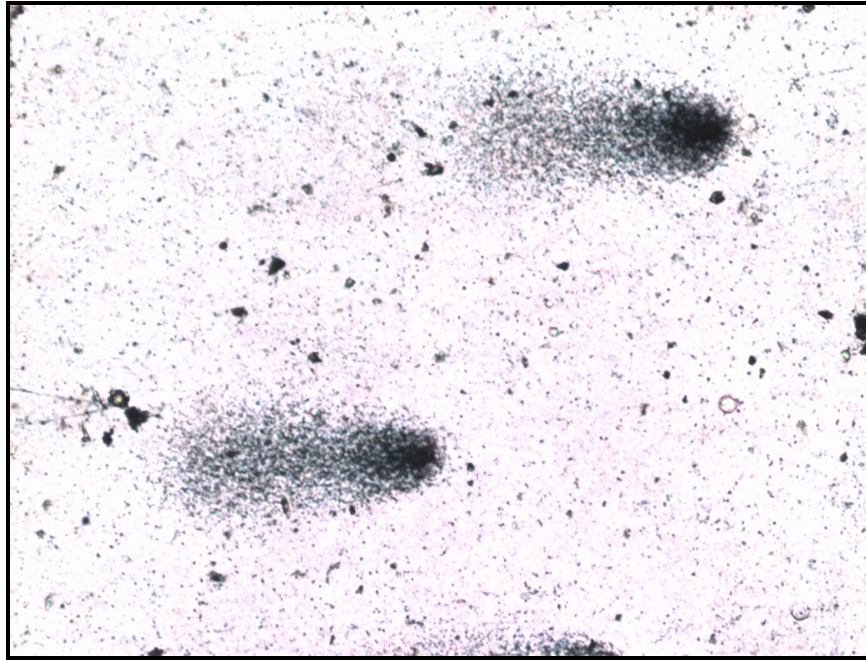


Figura 14 - Fotomicrografia de cometas de células do epitélio olfatório cão da região Norte.(Objetiva de 20X) – São Paulo - 2006

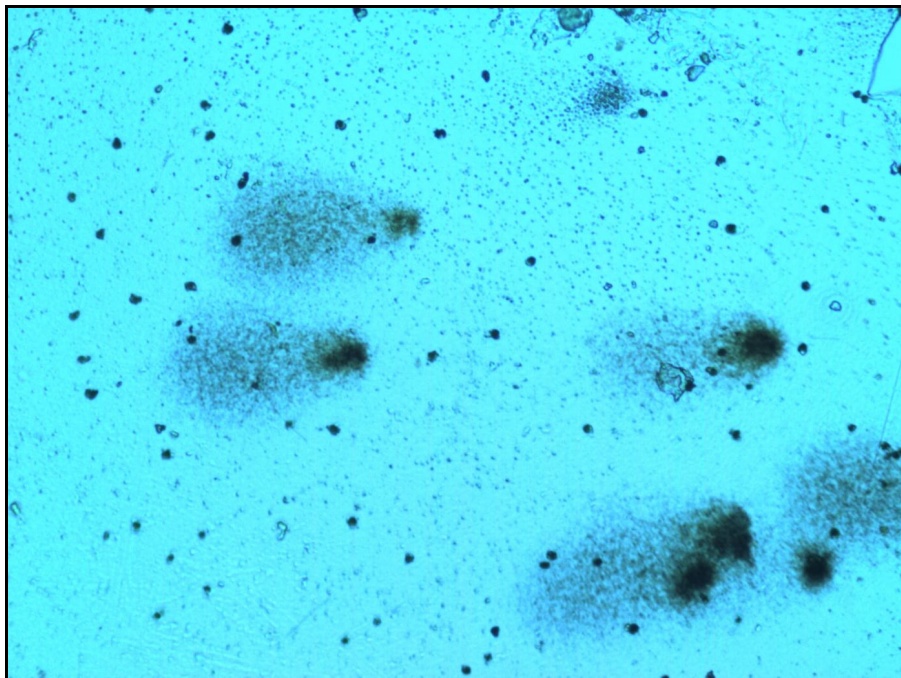


Figura 15 -Fotomicrografia de cometas de células do epitélio pulmonar de cão da região Norte.(Objetiva de 20X) – São Paulo - 2006

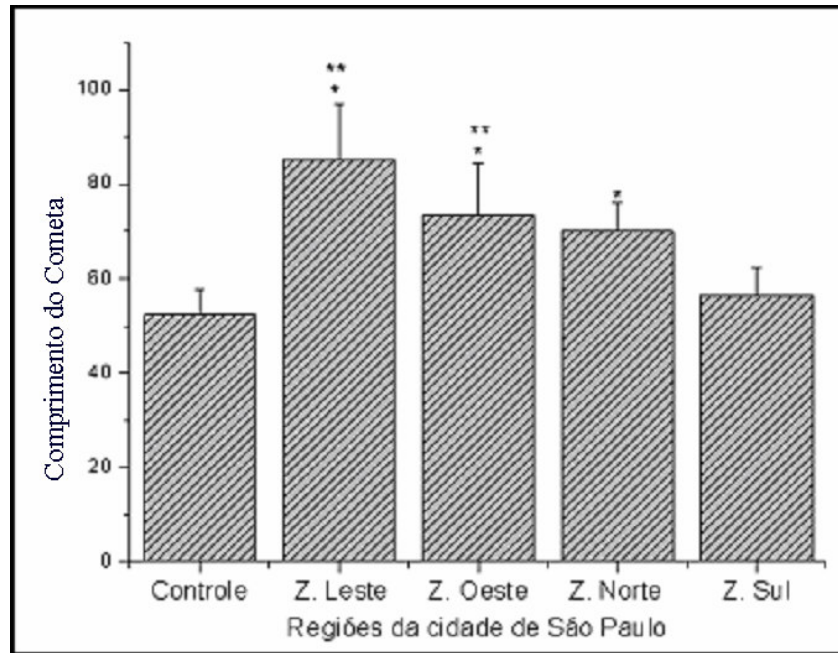


Figura 16 - Figura mostrando as regiões (zona leste, oeste, norte e sul) e controle em comparação com o resultado da lesão do DNA pelo teste do COMETA no epitélio pulmonar. * significativa a 5% em relação ao controle. ** significativa a 5% em relação à Zona Sul - São Paulo - 2006

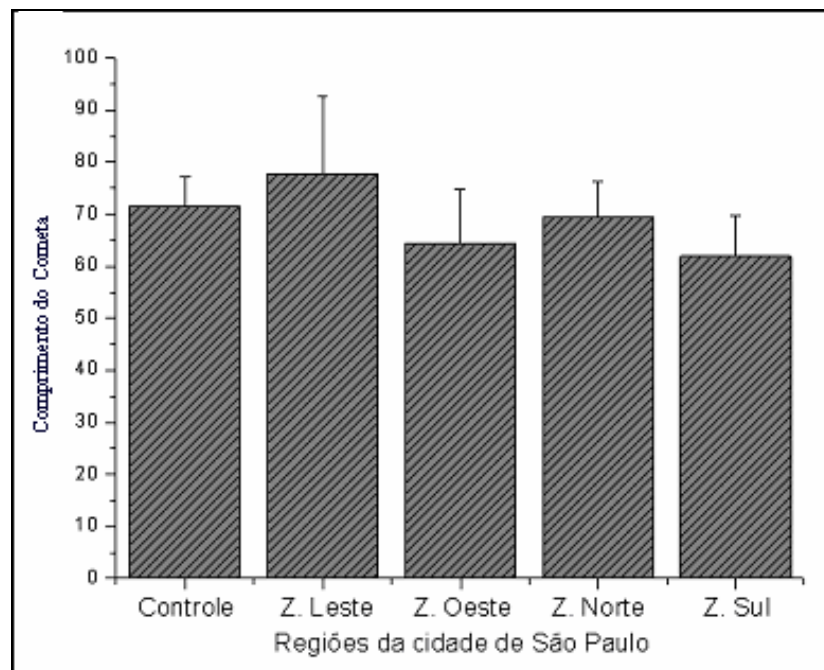


Figura 17 - Figura mostrando as regiões (zona leste, oeste, norte e sul) em comparação com o resultado da lesão do DNA pelo teste do Cometa no epitélio olfatório. – São Paulo - 2006

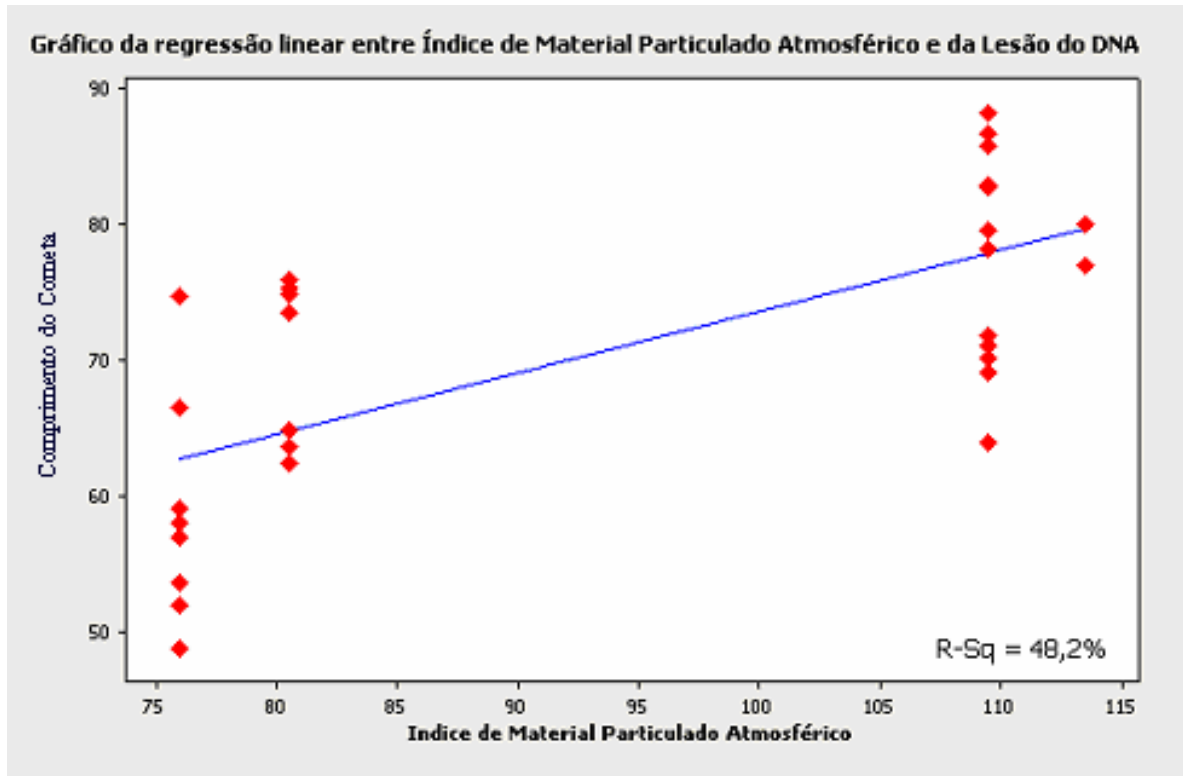


Figura 18 -Figura mostrando regressão linear entre o índice de Material particulado Atmosférico e a lesão de DNA – São Paulo - 2006

5.9 QUANTIFICAÇÃO DO ADUTO 8´HYDROXY-2´DEOXYGUANOSINE ATRAVÉS DO KIT ELISA NO EPITÉLIO OLFATÓRIO E PULMONAR

Tabela 2. Tabela com os resultados da quantificação do aduto 8´hydroxy-2´deoxyguanosine através do kit Elisa no epitélio olfatório – São Paulo -2006

	Quantidade de 8´hydroxy-2´deoxyguanosine EM NG/MG	MÉDIA do POOL	DESVIO
Zona Norte	4,61	2,21	0,81
Zona Sul	3,98	5,55	3,70
Filhote	3,02	3,03	0,25
Zona Leste	2,74	2,87	0,76
Zona Oeste	2,66	2,69	0,39

Tabela 3. Tabela com os resultados da quantificação do aduto 8´hydroxy-2´deoxyguanosine através do kit Elisa no pulmão – São Paulo -2006

	Quantidade de 8´hydroxy-2´deoxyguanosine EM NG/MG	MÉDIA do POOL	DESVIO
Zona Sul	3,82	4,48	2,21
Zona Leste	3,08	3,69	2,15
Filhote	2,52	2,45	0,16
Zona Oeste	1,84	1,90	0,46
Zona Norte	1,33	1,39	0,44

Estações	Quantidade de ozônio µg/m ³
Zona Oeste	360
Zona Sul	341
Zona Leste	346
Zona Norte	x
Filhote	x

Fonte: Cetesb ,2005

Quadro 4 - Resultado da mensuração do índice da concentração média anual do ozônio (µg/m³), mensurado pelas estações

6 QUANTIFICAÇÃO DO MICRONÚCLEO ATRAVÉS TESTE DE MICRONÚCLEO NO EPITÉLIO PULMONAR E OLFATÓRIO

Tabela 4. Quadro com os resultados da média da quantificação dos micronúcleos dos variados cães oriundos da região Leste, Norte, Oeste e Sul de São Paulo – São Paulo, 2006

Região (número de amostras)	Epitélio Olfatório		Pulmão	
	média/ desvio padrão	média / desvio padrão	média / desvio padrão	média / desvio padrão
Leste (3)	3	1,4	1,6	0
Norte (7)	2,14	0	0.85	0
Oeste (16)	3,06	0	1,43	0
Sul(7)	1	0	0.5	0

6.1 FOTOMICROGRAFIA DO TESTE DO MICRONÚCLEO

Observar o micronúcleo apontado pela seta nas figuras abaixo:

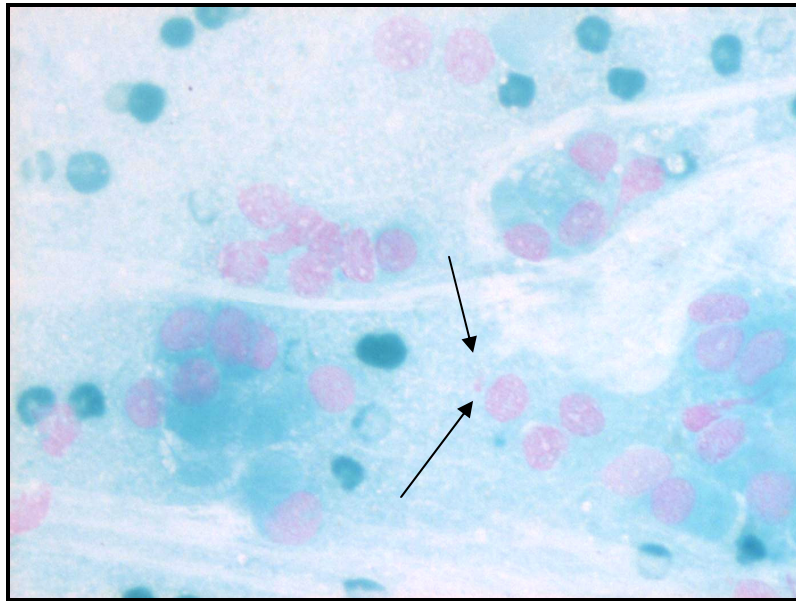


Figura 19 - Fotomicrografia de células submetidas à técnica de Feulgen para observação do micronúcleo do epitélio olfatório do cão da região Norte (Objetiva de 40X) – São Paulo –2006

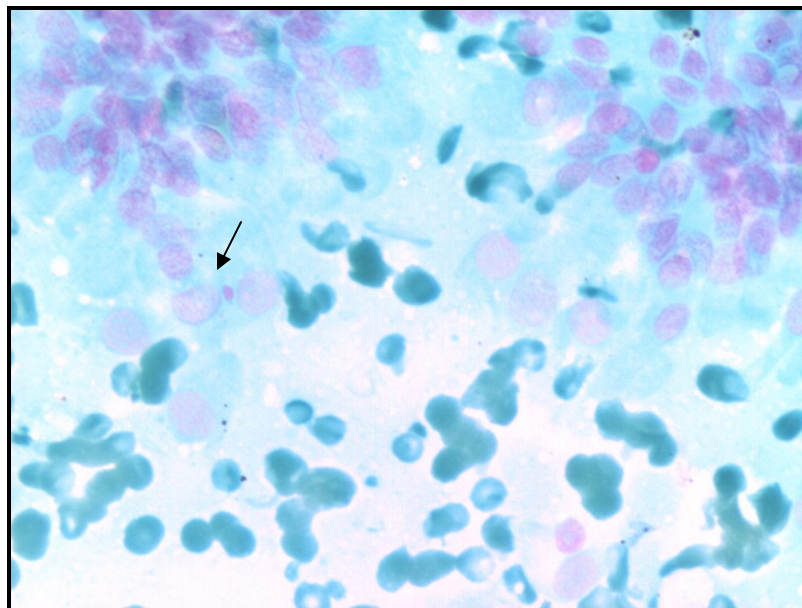


Figura 20 - Fotomicrografia de células submetidas à técnica de Feulgen para observação do micronúcleo do pulmão do cão da região Oeste (Objetiva de 40X) – São Paulo –2006

7. DISCUSSÃO

A idéia do tema da dissertação veio a partir do projeto de Políticas Públicas da FAPESP, “POLUIÇÃO”, realizado no ano de 2004, intitulado como “Estudo epidemiológico das neoplasias em cães e gatos e sua possível utilização como sentinela de contaminações ambientais”. Fiz parte desse trabalho levantando dados estatísticos de cães e gatos com neoplasias atendidos pelo HOVET-FMVZ-USP, durante seis meses. Tais dados permitiam obter informações como: sexo, idade, raça, espécie, CEP, endereço e diagnóstico da neoplasia.

Os dados como CEP e endereço do proprietário possibilitavam a localização e moradia do animal de acordo com as diferentes regiões da cidade de São Paulo.

Realizou-se uma análise do “cluster espacial” procurando evidenciar, nesse estudo retrospectivo, em qual a região (Norte, Sul, Leste, Oeste ou Centro) de São Paulo haveria maior prevalência de animais com neoplasias.

O estudo retrospectivo levantou 3620 casos atendidos pelo Serviço da Cirurgia, revelando desse modo uma porcentagem de 19,8 diagnosticados como neoplasia, ou seja, havia 663 casos de neoplasias em cães e 53 casos de neoplasias em gatos. O levantamento mostrou que houve uma maior incidência de casos relativos de neoplasias na região Leste.

O trabalho de Cálderon-Guarcinuenas (2000), utilizando 152 cães (sem raça definida) e 43 cães que moravam em regiões do México menos poluída, exposta naturalmente com efeitos principalmente do material particulado e camada de ozônio, mostrou histologicamente, alterações como infiltrado inflamatório, com aumento de macrófagos e hiperplasia de musculatura lisa, sugerindo alterações semelhantes ao que foi mostrado no trabalho, no Brasil, utilizando os cães como sentinela da poluição.

O exame histopatológico realizado com o escore de 0 a 3, no epitélio olfatório e pulmonar não mostrou alterações significantes entre as diferentes regiões, diferentemente do epitélio pulmonar.

Segundo SOUZA et al. 2006, há diferença significativa entre o escore de antracose de grupos expostos à baixa e alta taxa de poluentes. Este mesmo trabalho mostra uma alta associação entre o espessamento da parede bronquiolar, inflamação e antracose.

A antracose, segundo Souza et al. (2006), pode ser uma simples ferramenta para mensurar a deposição do pigmento, que pode ser um bioindicador para a exposição à combustíveis fósseis, ar poluído, indústrias e cigarro.

O resultado estatístico do epitélio olfatório mostrou-se não significante entre animais oriundos das diferentes regiões de São Paulo. No exame histopatológico do pulmão, observou-se diferenças entre os animais oriundos das diversas regiões da cidade de São Paulo e diferença entre os próprios animais provenientes da mesma região, porém não há diferença significativa entre eles.

No entanto, 07 animais (indicados na cor vermelha no Quadro 1) foram eliminados do experimento, pois tiveram muita lesão de DNA pelo teste do Cometa. Estes animais foram coletados no período superior a 12 horas após o óbito, havendo muita lesão de DNA, devido à autólise.

A região Central foi eliminada, pois havia apenas um animal representante da região (animal 28), impossibilitando a análise estatística.

O mapa 1 mostra apenas pontos representantes de alguns animais, pois a maior parte não havia cadastro completo e correto da localização da moradia do proprietário através de endereços e CEPs.

O teste do COMETA é um teste muito mais sensível que os métodos tradicionais de análise da quebra da cadeia de DNA e requer uma pequena quantidade de células, utilizado em estudos com pulmão em seres humanos, (LEE et al., 1996).

A padronização da reação por COMETA ocorreu com sucesso em epitélio olfatório e pulmonar de 36 cães.

Os resultados da quantificação dos cometas apontam para a existência de diferença significativa entre cães (filhotes) utilizados como controle negativo e positivo, validando a qualidade da metodologia do teste aplicado.

O teste do COMETA pode ser aplicado em qualquer tecido e pode ser usado como ferramenta para investigação da genotoxicidade em indústrias químicas, agroquímicos e na área farmacêutica (HARTMANN, 2003).

Um estudo realizado com ratos e camundongos mostrou diferentes resultados entre as espécies utilizando diferentes tipos de órgãos, através do teste do COMETA, porém ambos podem ser usados como um teste de genotoxicidade in vivo. (SEKIHASHI, 2001). Neste trabalho, os testes do COMETA realizado em materiais de cães vêm demonstrando resultados eficientes e significantes.

Segundo Tovalin et. al.(2006), sugere-se que os efeitos da poluição podem ter correlação direta com os resultados do teste do COMETA, apresentando extenso comprimento da cauda (lesão do DNA) em pessoas que trabalham expostas ao ar ambiental em relação as pessoas que trabalham dentro do local de trabalho.

O trabalho mostra que existe uma correlação significativa entre o índice de material particulado (PM10), realizado com a média anual do ano de 2005, em relação ao teste do Cometa (lesão do DNA).

Os resultados apresentam uma tendência de que os animais oriundos da zona Sul (menor índice de material particulado atmosférico) exibem menor lesão do DNA (resultado adquirido no teste do COMETA) e mostrou-se estatisticamente diferente no epitélio pulmonar comparada a regiões mais poluídas como a zona Oeste e Leste. As zonas Oeste, Leste e Norte tiveram diferença significativa em relação ao controle (filhote). A correlação com o epitélio olfatório de animais oriundos das diversas regiões de São Paulo não obteve diferença significativa.

Segundo Freitas (2000), o sistema de Vigilância dos efeitos na saúde em virtude da poluição atmosférica do Estado de São Paulo, elegeu o PM10 como sendo o indicador de exposição para acompanhamento do impacto na saúde, visto a quantidade de trabalhos que mostram a alta correlação entre esses dois fatores.

A constância associação do PM10 e do aumento de internações por problemas respiratórios e morte precoce dos idosos foram significativos no período realizado entre 1993 a 1997, (FREITAS, 2004).

Outro estudo reforça a importância do PM10 à taxa de mortalidade entre idosos em todas as seis regiões analisadas (São Miguel, Penha, Santo Amaro, Cerqueira César, Central e Santana) relacionado às condições sócio-econômicas, (MARTINS, 2003). O ar poluído é fortemente associado a processos alérgicos e doenças infecciosas. SIH, 1999.

Não há correlação entre idade dos animais coletados com o teste do Cometa no epitélio olfatório e também no epitélio pulmonar.

A técnica do micronúcleo revelou não haver diferença estatística significativa entre as médias dos animais das regiões Oeste, Norte, Sul e Leste.

Neste estudo utilizou-se a técnica de Elisa (Enzyme linked immunosorbent assay) para a marcação do aduto 8' hydroxy 2' deoxyguanosine. Segundo Shimoy (2002), o kit Elisa, teve um resultado duas vezes maior em comparação com a cromatografia líquida (HPLC), mensurando 8'hydroxy-2'deoxyguanosine na urina.

O resultado realizado com o teste de ELISA exibiu resultados diferentemente observados no teste do COMETA.

Animais pertencentes à região Sul obteve maior quantidade do aduto 8' hydroxy 2' deoxyguanosine, seguido dos animais da região Norte, Sul, filhotes, Leste e Oeste no epitélio olfatório e Sul, Leste, filhote, Oeste e Norte no epitélio pulmonar. Este resultado pode demonstrar uma correlação entre o resultado do índice de ozônio.

A produção de 8-OhdG pode ser utilizado como um sensível marcador de estresse oxidativo em câncer de camundongos, segundo Nagashima et al, 1995.

O ozônio reage na gordura insaturada da membrana celular, produzindo radicais livres e pode induzir a lesão oxidativa no DNA. Quando o ozônio é inalado cronicamente no pulmão possui um efeito genotóxico e pode induzir a formação de neoplasias (ITO et al. 2005).

A exposição por longo tempo em camundongos B6C3F1 leva a um aumento da mutação da K-ras, em neoplasias pulmonares, lesionando diretamente ou indiretamente o DNA (SILLS et al., 1995; MEHLMAN et al.,1995; PRYOR, et al.,1995).

Segundo Whentworth, et al. (2005), demonstrou que os anticorpos podem catalizar uma reação entre o oxigênio simples e a água, produzindo peróxidos de hidrogênio, desse modo, o ozônio atua endogenamente como oxidante, durante a morte da bactéria por neutrófilo, desencadeando uma resposta inflamatória in vivo.

A inflamação crônica pode induzir a produção excessiva de oxigênio e nitrogênio reativos, oriundos das células inflamatórias, podendo levar a lesão do DNA pela ação oxidativa e desenvolver o câncer.

Experimentos realizados através do HPLC-ECD mostraram que o ozônio pode induzir a formação do aduto 8' hydroxy 2' deoxyguanosine, levando a transverso das bases G:C para T:A. BRUNNER et al., 2000.

Segundo Heyder (1996), utilizou-se de cães da raça Beagle, mostrou alterações no epitélio pulmonar, expondo-os a poluentes específicos, porém o autor enfatiza que é preciso mais estudos indoor e outdoor para reproduzir de maneira mais apropriada e semelhante à exposição em humanos expostos por uma complexa mistura de poluentes e não separadamente. Fizemos um estudo outdoor e mostrou a limitação do trabalho frente à restrição do número e a dificuldade de obtenção das amostras. Isso acarreta em coletar animais saudáveis e frescos e de determinada região específica de São Paulo. A região Central foi excluída da estatística porque foi possível coletar apenas um cão (animal 28) desta região.

Outro estudo relacionando ao aumento da mortalidade de pessoas com infarto em miocárdio, poluição e efeitos meteorológicos, mostrou a dificuldade para obter um resultado confiável já que o indivíduo foi exposto à diversos efeitos ambientais, que poderiam limitar o trabalho, causando erros de análise de variância e produzir resultados falso negativos. Sharovsky (2004).

8.CONCLUSÕES:

- Não houve resultado significativo na avaliação feita em escore de 0 a 3 pelo exame histopatológico e não há relação entre o índice de Material particulado Atmosférico e a lesão de DNA pelo Teste do Cometa no epitélio olfatório.
- Não há correlação entre idade e a lesão de DNA pelo Teste do Cometa no epitélio olfatório e pelo epitélio pulmonar.
- Animais oriundos da zona Leste e a zona Oeste (maior índice Material particulado Atmosférico) apresentaram-se com maior lesão de DNA no epitélio pulmonar em comparação com os cães da zona Sul (menor índice Material particulado Atmosférico).
- Todas as regiões Leste, Oeste e Norte tiveram um aumento significativo na lesão do DNA em relação ao controle (filhotes).
- Há correlação significativa entre o índice de Material particulado Atmosférico e a lesão de DNA no epitélio pulmonar pelo Teste do Cometa.
- A utilização do epitélio pulmonar em cães no teste do COMETA demonstrou resultado significativo, podendo ser indicado como um bioindicador do ar atmosférico.
- Pode haver relação com o índice de ozônio e o resultado da marcação do aduto pelo kit Elisa.
- O teste do Micronúcleo foi padronizado, porém não mostrou resultado significativo.
- Este projeto mostrou uma tendência da zona Sul ser uma região menos poluída, onde há menor alteração histopatológica pulmonar e menor lesão de DNA em cães comparada à outras regiões com maior índice de material particulado.

REFERÊNCIAS

- AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.90, n.17, p.7915-7922, 1993.
- AMES, B.N. Endogenous oxidative DNA damage aging and cancer. **Free Radical Research Commun**, v.90, n.7, p.121-128, 1989.
- ANDRE, P.A.; BRAGA, A.L.; CONCEIÇÃO, G.M.; PEREIRA, L.A.; MIRAGLIA, S.G.; BOHM, G.M. Environmental epidemiology applied to urban atmospheric pollution: a contribution from the Experimental Air Pollution Laboratory (LPAE). **Cadernos de Saúde Publica**, v.16, n.3, p.619-28, 2000.
- ANWAR, W.A. Monitoring of human populations a risk by different cytogenetic end points. **Environmental Health Perspectives**, v.102, p.131-134, 1994.
- BACKER, L.C.; GRINDEM, C.B.; CORBETT, W.T.; CULLINS, L.; HUNTER, J.L. Pet dogs as sentinels for environmental contamination. **Science Total Environmental**, v.274, n.1-3, p.161-169, 2001.
- BERTONE, E.R., SNYDER, L.A., MOORE, A.S. Environmental tobacco smoke and risk of malignant lymphoma in pet cats. **American Journal of Epidemiology**, v.156, n.3, p.268-273, 2002.
- BÖHM, G.M.; SALDIVA, P.H.N.; PASQUALUCCI, C.A.G.; MASSAD, E.; MARTINS, M.A.; ZIN, W.A.; CARDOSO, W.V.; CRIADO, P.M.P.; KOMATSUZADI, M.; SAKAE, R.S.; NEGRI, E.M.; LEMOS, M.; CAPELOZZI, V.M.; CRESTANA, C.; SIVLA, R. Biological Effects of Air Pollution in São Paulo and Cubatão. **Environmental Research**, v.49, p.208-216, 1989.
- BUKOWSKI, J.Á.; WARTENBERG, D. An alternative approach for investigating the carcinogenicity of indoor air pollution: pets as sentinels of environmental cancer risk. **Environmental Health Perspect**, v.105, n.12, p.1312-1319, 1997.
- BOLOGNESI, C.; LANDINI, E.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P. Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) with an all chromosome centromeric probe. **Mutation Research**, v.557, p.109-17, 2004.
- BUKOWSKI, J.A.; WARTENBERG, D.; GOLDSCHMIDT, M. Environmental causes for sinonasal cancers in pet dogs, and their usefulness as sentinels of indoor cancer risk. **Journal Toxicology Environmental Health Animal**, v. 54, n.7, p.579-91, 1998.

BRAGA, A.L.F. Quantificação dos efeitos da poluição do ar sobre a saúde da população pediátrica da cidade de São Paulo e proposta de monitoração, 1998. p.Tese de (Doutorado). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

BRAGA, A.L.F. Air pollution and pediatric respiratory hospital admissions in São Paulo, Brazil. **Journal Environmental Medicine**, v.1, p.95-102,1999.

BRAGA, A.L.F.; SALDIVA, P.H.N.; PEREIRA, L.A.A.; MENEZES, J.J.C.; CONCEIÇÃO, G.M.S.; LIN, C.A.; ZANOBETTI, A.; SCHWARTZ, J.; DOCKER, D.W. Health effects of air pollution exposure on children and adolescents in São Paulo, Brazil. **Pediatric Pulmonology**, v.31, n.2, p.106-113, 2001.

BRUNER, S.D.; NORMAN, D.P.; VERDINE, G.L. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA, **Nature**, v.403, p.859–866, 2000.

CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, L.G.; OSNAYA, N.; ALCARAZ, A.R.; VILLARREAL-CALDERON, A. DNA Damage in Nasal Respiratory Epithelium from Children exposed to Urban Pollution. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.30, p.11-20, 1997.

CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, L.G.; WEN-WANG, L.; ZHANG, Y.J.; RODRIGUEZ-ALCARAZ, A.; OSNAYA, N.; VILLARREAL-CALDERON, A.; SANTELLA, R.M. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine, A Major Mutagenic Oxidative DNA Lesion, and DNA Strand Breaks in Nasal Respiratory Epithelium of Children Exposed to Urban Pollution. **Environmental Health Perspect**, v.107, n.6, p.469-74,1999.

CALDERÓN, L.G.; ALCARAZ, A.R.; SALAZAR, G.V.; TASCARENO, A.M.; OSNAYA, N.; CALDERON, A.V.; DEVLIN, R.B.; DYKE, T.V. Nasal Biopsies of Children Exposed to Air Pollutants. **Toxicology Pathology**, v.5, n.29, p.558-564, 2001.

CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, L.; MORA TISCARENO, A. ;FORDHAM, L.A. ;CHUNG, C.J.; GARCIA, R.; OSNAYA, N.; HERNANDEZ, J.; ACUNA, H.; GAMBLING, T.M.; VILLARREAL-CALDERON, A.; CARSON, J.; KOREN, H.S.; DEVLIN, R.B. Canines as sentinel species for assessing chronic exposures to air pollutants: part1.Respiratory pathology.**Toxicology Science**, v.61, n.2, p.342-55, 2001.

CALDERÓN, L.G.; AZZARELLI, B.; ACUNA, H.; GARCIA, R.; GAMBLINGT. M.; OSNAYA, N.; MONROY, S.; TIZAPANTZI, M.D.R.; CARSON, J.L.; CALDERON, A.V.; EWCASTLE, B. Air Pollution and Brain Damage. **Toxicology Pathology**, v.3, n.30, p.373-379, 2002.

CALDERÓN, L.G.; REED, W.; MARONPOT, R.; HENRIQUES, C.R.; CHAVEZ, R.D.; CALDERON, A.G; DRAGUSTINOVIS, I.F.L.; ARAGON, M.F.; SOLT, A.;ALTENBURG,M.J.T.; SWENBERG, J.A. Inflammation and Alzheimer's like pathology in individuals exposed to severe air pollution. **Toxicology Pathology**, v.32, p.650-658, 2004.

COHEN, A.J.; POPE, C.A. Lung Cancer and Air Pollution. **Environmental Health Perspectives**, v.103, n.8, p.219-224, 1995.

CETESB (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL). **Relatório da qualidade do ar do Estado de São Paulo, 2005**. [in portuguese].

CHIOU,C.C.; CHANG,P.Y.; CHAN,E.C.; WU,T.L.; TSAO,K.C.; WU,J.T. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. **Clínica Chimica Acta**, v.334, p.87-94, 2003.

CLAYSON, D.B.; MEHTA, R.; IVERSON, F. Oxidative DNA damage-the effects of certain genotoxic and operationally nongenotoxic carcinogens. **Mutation Research**, v.317, p.25-42, 1994.

DORN, C.R.; PRIESTER, W.A. Epidemiology. In: THEILEN, G.H.; MADEWELL, B.R. **Veterinary cancer medicine**.2nd ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1987, p.27.

DOLL, R. Atmospheric pollution and lung cancer. **Environmental Health Perspectives**, v.22, p.23-31, 1978.

FREITAS, C.U. **Explorando modelos e indicadores para o estabelecimento de vigilância dos efeitos na saúde decorrentes da poluição atmosférica na cidade de São Paulo**, 2000. p. dissertação de (mestrado). São Paulo: Faculdade de Saúde Pública,Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

FREITAS, C.; STEPHEN, A.; BREMNER, S. A.; GOUVEIA, N.; PEREIRA, L. A.; SALDIVA, P.H.N. Internações e óbitos e sua relação com a poluição atmosférica em São Paulo, 1993 a 1997. **Revista Saúde Pública**, v.38, n.6, 2004.

FROMME,T.H;LAHRZ,M.;PILOTY,H.;GEBHARDT,A;ODDOY,H.RÜDEN. Polycyclic aromatic hydrocarbons inside and outside of apartments in an urban area. **Science of The Total Environment**, v.326, n.1-3, p.143-149, 2004.

FUNDAÇÃO SEADE. Grupos de Vulnerabilidade Juvenil Distritos do Município de São Paulo 2000. Disponível em :www.seade.gov.br, 2000. Acesso em 05 de out. 2006.

GAVAZZA, A.; PRESCIUTINNI, S.; BARALE, R.; LUBAS, G.; GUGLIUCCI, B. Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v.15, p.190-195, 2001.

GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 5.ed.2,1975, p.1465-1479.

GINSBERG, R.J.; KRIS, M.G.; ARMSTRONG, J.G. CANCER IN THE LUNG. IN: DEVITA VT JR, HELLMAN S, ROSENBERG, AND SA. **Cancer: principles and practices of oncology**. 4th.ed. Philadelphia. JB Lippincott Co, 1993, 673-730.

GLICKMAN, L.T. **Analytical epidemiology in pet populations for environmental risk assessment**. In: Skandu, S.S. In situ evaluations of biological risk assessment. In: Skandu Ssed. In situ evaluations of biological hazards of environmental pollutants. New York: Plenum Press, 1990, p. 133-143.

HASTINGS, L.; MILLER, M.L. Influence of environmental toxicants on olfactory function. In Doty, R.L. **Handbook of Olfaction and Gustation**, 2nd ed. Marcel Dekker, Philadelphia, PA, p.575-591, 2003.

HARDISTY, J.F.; GRAMAN, R.H; HARKEMA, J.R.; LOMAX, L.G.; MORGAN, K.T. Histopathology of Nasal Olfactory Mucosa from Selected Inhalation Toxicity Studies Conducted with Volatile Chemicals. **Toxicology Pathology**, v.6, n.27, p.618-627, 1999.

HARKEMA, J.R.; HOTCHKISS, J.A.; BARR, E.B.; BENNETT, C.B.; GALLUP M.; LEE, J.K.; BASBAUM, C. Long lasting effects of chronic ozone exposure on rat nasal epithelium. **American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology**, v.20, p.517-529, 1987.

HEYDER, J.; TAKENAKA, S. Long-term canine exposure studies with ambient air pollutants. **Europe Respiratory Journal**, v.9, p.571-584, 1996.

HORDERN, B.B. Can pollution cause cancer? In touch v.4 n.4. Disponível em: www.intouchlive.com/journals/intouch/i0207e.htm. Acesso em 02 agosto 2005.

ISHIKAWA, H.; TIAN, Y; PIAO, F; DUAN, Z.; ZHANG, Y; MA, M.; LI, H; YAMAMOTO, H; MATSUMOTO, Y.; SAKAI, S.; CUI, J; YAMAUCHIA, T.; YOKOYAMA, K. Genotoxic damage in female residents exposed to environmental air pollution in Shenyang city, China. **Cancer Letter**, 2005.

ITO, K.; INOUE, S.; HIRAKU, Y.; KAWANISHI, S. Mechanism of site-specific DNA damage induced by ozone. **Mutation Research**, v.585, p.60-70, 2005.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 353.

KASAI, H.; HAYAMI, Z.; ZAMAIZUMI, Z.; SAITO, H.; NISHIMURA, S. Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives. **Nucleic Acids Research**, v.12, p.2127-2136, 1984.

KASAI, H.; NISHIMURA, S. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. **Nucleic Acids Research**, v.12, p.2137-2145, 1984.

KOVÁCS, T. Mechanisms of olfactory dysfunction in aging and neurodegenerative disorders. **Ageing Research Reviews**, n.3, p.215-232, 2004.

KYRTOPOULOS, S.A.; GEORGIADIS, P.; AUTRUP, H.; DEMOPOULOS, N.A.; FARMER, P.; AUGEN, A.; KATSOUYANNI, K.; LAMBERT, B.; OVREBO, S.; SRAM, R.; STEPHANOU, G.; TOPINKA, J.; STEFANOU, G.; DEMOPOULOS, N. Biomarkers of genotoxicity of urban air pollution. Overview and descriptive data from a molecular epidemiology study on populations exposed to moderate-to-low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons: the AULIS project. **Mutation Research**, v. 514, n.1-2, p.258-8, 2002.

YIN, B.; WHYATT, R.M.; PERERA, F.P.; RANDALL, M.C.; COOPER, T.B.; SANTELLA, R.M. Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography monoclonal antibody based Elisa. **Free Radical Biology & Medicine**, v.18, n.8, p.1023-1032, 1995.

LIN, C.A.; PEREIRA, L.A.A.; NISHIOKA, D.C.; CONCEIÇÃO, G.M.S.; BRAGA, A L.F.; SALDIVA, P.H.N. Air pollution and neonatal deaths in Sao Paulo, Brazil. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**.v.37, n.5, p.765-770, 2004.

LEE, J.G.; MADDEN, M.C.; REED, W.; ADLER, K.; DEVLIN, R. The use of the Single Cell Gel Electrophoresis Assay in Detecting DNA Single Strand Breaks in Lung Cells in Vitro. **Toxicology and applied pharmacology**, v.141, p.195-204, 1996.

LOFT, S.; POULSEN, H.E. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. **Journal Molecular Medicine**, v.74, p.297-312, 1996.

LUNEC, J. Free radicals: their involvement in disease processes. **Annals of Clinic Biochemistry**, v.27, p.173-182, 1990.

MAGE, D; OZLINS, G; PETERSON, P; WEBSTER, A; ORTHOFER, R; VANDEWEERD, V; GWYNNE, M. Urban pollution in megacities of the world. **Atmospheric Environmental**, v.30, p.681-686, 1996.

MANELLI-OLIVEIRA, R.; MACHADO-SANTELLI, G.M. Cytoskeletal and nuclear alterations in human lung tumor cells: a confocal microscope study. **Histochemistry and Cell Biology**, v.115, p.403-11, 2001.

MARTINS, M.C.H.; FATIGATI, F.L.; VÉSPOLI, T.C.; MARTINS, L.C; PEREIRA, L.AA.; MARTINS, M.A; SALDIVA, P.H.N.; BRAGA, A L.F. Influence of socioeconomic conditions on air pollution adverse health effects in elderly people: an analysis of six regions in São Paulo, Brazil. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v.58, p.41-46, 2003.

MATHISON, B.H.; HARMAN, A.E.; BOGDANFFY, MS. DNA damage in the nasal passageway: a literature review. **Mutation Research**, 380:77-96, 1997.
MEHLMAN, M.A.; BOREK, C. Toxicity and biochemical mechanisms of ozone, **Environmental Research**, v.42, p.36–53, 1987.

MELLO, M.L.S; VIDAL, B.C. Práticas de Biologia Celular. Editora Edgard Blücher Ltda, **Fucamp**, 1980.

MORGAN, K.T. A brief review of formaldehyde carcinogenesis in relation to nasal pathology and human health risk assessment. **Toxicology pathology**, v.25, p.291-307, 1997.

MOULTON, J.E. Tumors of the respiratory system. In: **Tumors in domestic animals.3.ed.Los Angeles: University of California Press**,1990, p.319-338.

NAGASHIMA, M.; KASAI, H.; YOKOTA, J.; NAGAMACHI, Y.; ICHINOSE T; SAGAI, M. Formation of an oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in mouse lung DNA after intratracheal instillation of diesel exhaust particles and effects of high dietary fat and beta-carotene on this process. **Carcinogenesis**, v.16, p.1441-1445,1995.

OLIVEIRA, A.R.; MACHADO –SANTELLI, G.M. Diphenylhydantion and mitotic spindle abnormalities in cultured mouse and human cells. **Mutation Research**, v.187, p.91-97, 1987.

OHSHIMA, H.; TATEMACHI, M.; SAWA, T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis, **Archives of Biochemistry Biophysics**, v.417, p. 3–11, 2003.

OSTRO,B;SANCHES,J.;ARANDA,C.;ESKELAND,G.S. Air Pollution and mortality results from a study of Santiago, Chile. **Journal Exposition Analisis Environmental Epidemiology**, Princeton, v.6, n.1, p.97-114,1996.

PEREIRA, P.M.; SALDIVA, P.H.N.; SAKAE, R.S.; BOHM, G.M.; MARTINS, M.A. Urban Levels of Air Pollution Increase Lung Responsiveness in Rats. **Environmental Research** , v.69, p.96-101, 1995.

PERERA, F.P.; MOONEY, L.A.; DICKEY, C.P.; SANTELLA, R.M.; BELL, D.; BLANER, W.; TANG, D.; WHYATT, R.M. Molecular epidemiology in environmental carcinogenesis. **Environmental Health Perspect**, v.104, n.3, p.441-443, 1996.

PRYOR, W.A.; SQUADRITO, G.L.; FRIEDMAN, M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products, **Free Radical Biology Medicine**. v.19, p.935–941,1995.

RAMÍREZ,A.;SALDANHA,P.H.Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas.**Genetics and Molecular Research**,1(3):246-60,2002.

REIF, J.S.; DUNN, K.; OGILVIE, G.K.AND HARRIS, C.K. Passive smoking and canine lung cancer risk. **American Journal Epidemiology**, v.135, p.234-9, 1992.

REYMÃO, M.S.F.; CURY, P.M.P.; LICHTENFELS, A.J.F.C. Urban air pollution enhances the formation of urethane-induced lung tumors in mice. **Environmental Research**, v.74, p.150-158, 1997.

ROMANO, G.; SGAMBATO, A.; BONINSEGNA,A.;LAMINI, G.;CURIGLIANO, G.; YANG, Q.; GIOIA,V.; SIGNORELLI, C.; FERRO, A.; CAPELLI, G.; SANTELLA, R.M.; CITTADINI, A.H. Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in exfoliated oral cells by an immunohistochemical assay. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevent** , v.8, n.1, p.91-6, 1999.

SADOWSKA, A.; PLUYGERS, E.; NIKLINSKA, W.; MARIA, M.R.; OBIDOSKA, G.Use of higher plants in the biomonitoring of environmental genotoxic pollution.**Folia Histochemistry Cytobiol**,v.39, n.2, p.52-3, 2001.

SALDIVA, P.H.N.; KING, M.; DELMONTE, V.L.C.; MACCHIONE, M.; PARADA, M.; DALIBERTO, M.L.; SAKAE, R.S.; CRIADO, P.M.P; SILVEIRA,P.L.P; ZIN, W.A.; BOHM, G.M. Respiratory Alterations due to Urban Air Pollution:An Experimental Study in Rats. **Environmental Research**, v.57, p.19-33, 1992.

SALDIVA, P.H.N.; BÖHM GM Animal indicators of adverse effects associated with air pollution. **Ecosystem Health**, v. 4, n.4, p.230-235, 1998.

SASCO, A J.Epidemiology and prevention of cancer:reflections on the ethics of public health measures.**Bull Academic Natl Medicine**, v.179, n.5, p.987-1004,1995.

SEKIHASHI, K.; YAMAMOTO, A.; MATSUMURA, Y.; UENO, S.; WATANABE-
AKANUMA, M.; KASSIE, F.; KNASMULLER, S.; TSUDA, S.; SASAKI, Y.F.
Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay.
Mutation Research, v.517, p.53-74, 2000.

SILLS, R.C.; HONG, H.L.; GREENWELL, A.; HERBERT, R.A.; BOORMAN, G.A.;
DEVEREUX, T.R. Increased frequency of K-ras mutations in lung neoplasms from
female B6C3F1 mice exposed to ozone for 24 or 30 months, **Carcinogenesis**,
n.16, p.1623–1628, 1995.

SILVA, I.S. **Cancer epidemiology: principles and methods**. International
Agency for Research on Cancer Lyon, França, 1999, p. 442.

SOUZA, M.B.; SALDIVA, P.H.N.; POPE, C.A.3rd, CAPELOZZI, V.L. Respiratory
changes due to long-term exposure to urban levels of air pollution: A
histopathologic study in humans. **The Cardiopulmonary and Critical Care
Journal**, v.113, p.1312-1318, 2006.

SPECTOR A., WILLIAM HG. Hydrogen peroxide and human cataract.
Experimental Eye Research, v.33, p.673-681, 1981.

SHAROVSKY, R.; CÉSAR, L.A.M.; RAMIRES, J.A.F. Temperature, air pollution,
and mortality from myocardial infarction in São Paulo, Brazil **Brazilian Journal
Medicine Biology Research**. v. 37, n.11, p.1651-1657, 2004.

SHIGENAGA, M.K.; GIMENO, C.J.; AMES, B.N. **Proceedings of the National
Academy of Sciences**, v.86, p.487-491, 1983.

SHIMOI, K.; KASAI, H.; YOKOTA, N.; TOYOKUNI, S.; KINAE, N. Comparison
between High-Performance Liquid Chromatography and Enzyme-linked
Immunosorbent Assay for the Determination of 8-Hydroxy-2 deoxyguanosine in
Human Urine. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Preventions**. v.11, p.767-
770, 2002.

SIH, T. Correlation between respiratory alterations and respiratory diseases due to
urban pollution. **Int Journal Pediatric Otorhinolaryngologist** v.49, n.1, p. 261-7,
1999.

SCHWARTZ J. Particulate air pollution and daily mortality: a synthesis. **Public
Health Health**, v;19, p.39-60, 1991/92.

STOCKSTILL, B.L.; CHANG, L.Y.; MENACHE, M.G.; MELLICK, P.W.; MERCER, R.R.; CRAPO, J.D. Bronchiolarized metaplasia and interstitial fibrosis in rat lungs chronically exposed to high ambient levels of ozone. **Toxicology Applied Pharmacology**, v.134, p.251-263, 1995.

TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN J.W. Micronuclei and others nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutation Research**, v. 271, p.69-77, 1992.

TOVALIN, H.; VALVERDE, M.; MORANDI, M.T.; BLANCO, S.; WHITEHEAD, L.; ROJAS, E. DNA damage in outdoor workers occupationally exposed to environmental air pollutants. **Occup Environ Med**. v.63, n.4, p.227-9, 2006.

WENTWORTH, P.J.R.; MCDUNN, J.E.; WENTWORTH, A.D.; TAKEUCHI, C.; NIEVA, J.; JONES, T.; BAUTISTA, C.; RUEDI, J.M.; GUTIERREZ, A.; JANDA, K.D.; BABIOR, B.M.; ESCHENMOSER, A.; LERNER, R.A. Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation, **Science**, v.298, p.2195–2199, 2002.

WILLIAN, J.; BACHA, JR.; BACHA, L.M. **Atlas colorido de histologia veterinária**. 2.ed.Roca, 2003, p.157.

WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochemical Journal**, v.313, p.17-29, 1996.

WISEMAN, H; KAUR, H.; HALLIWELL, B. DNA damage and cancer: measurement and mechanism. **Cancer Letter**, v.93, p.113-120, 1995.

WORDLEY, J.; WALTERS, S. ; AYRES, J .G. Short term variations in hospital admissions and particulate air pollution. **Occupation Environmental Medicine**, Londres, v;54, n.2, p.108-116, 1997.

WRIGHT DT, COHN LA, LI H, FISCHER B, LI CM, ADLER KB. Interactions of oxygen radicals with airway epithelium. **Environmental Health Perspect** , v.102, n.10, p.85-90, 1994.