Fabiana Moura Novaes Mendez

Estudo dos efeitos dos elementos traços presentes nas partículas provenientes da queima do diesel no sistema reprodutivo de *Danio rerio* (*zebrafish*): análise morfológica e histológica

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientador: Profª. Dra. Elaine Maria Frade Costa

São Paulo

2012

Fabiana Moura Novaes Mendez

Estudo dos efeitos dos elementos traços presentes nas partículas provenientes da queima do diesel no sistema reprodutivo de *Danio rerio* (*zebrafish*): análise morfológica e histológica

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientador: Profª. Dra. Elaine Maria Frade Costa

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Mendez, Fabiana Moura Novaes
Estudo dos efeitos dos elementos traços presentes nas partículas provenientes da queima do diesel no sistema reprodutivo de *Danio rerio* (*zebrafish*) : análise morfológica e histológica / Fabiana Moura Novaes Mendez. -- São Paulo, 2012.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Elaine Maria Frade Costa.

Descritores: 1.Emissão de veículos 2.Diesel 3.Material particulado 4.Sistema reprodutivo 5.Peixe zebra 6.Receptor de estrógeno

USP/FM/DBD-339/12

Este trabalho pertence ao Instituto Nacional de Análise Integrada do Risco Ambiental (INAIRA) com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq): 08/57717-6.

Teve apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): 2009/03980-0 (bolsa individual) e 2010/51685-5 (Auxílio Pesquisa).

Foi realizado:

Na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

No Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE) do departamento de Patologia da FMUSP LIM 05.

No Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP na Unidade de Endocrinologia de peixes.

No Centro de Bioterismo da FMUSP na Unidade de Zebrafish.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, Adalberto e Vera, pelo apoio e incentivo, e aos meus avós, exemplo de perseverança e sabedoria.

AGRADECIMENTOS

Dedico este item da dissertação especialmente a pessoas que participaram direta ou indiretamente da realização desse processo tão gratificante que é a conclusão do Mestrado.

Agradeço em especial à minha Orientadora, a Profa. Dra. Elaine Maria Frade Costa por acreditar no trabalho, e acreditar que eu poderia fazê-lo, por me apoiar e por me passar seus ensinamentos, por sempre achar uma solução para os problemas e dificuldades encontrados no decorrer desses anos. Serei sempre grata pelos imensos ensinamentos, tanto profissionais quanto como ser humano.

À Profa. Dra. Berenice Bilharinho Mendonça por permitir a minha entrada no Laboratório de Hormônios, e fazer parte desse brilhante grupo de pesquisa que compõe o departamento.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, pelas ideias inovadoras o por ter me apresentado ao laboratório através da Dra. Ana Cláudia.

A Cidinha, pelos ensinamentos nas aulas de pipetagem e pro prontamente providenciar a compra de materiais para a realização desse trabalho.

A Profa. Mirian Yumie Nishi, sempre muito atenciosa que me acompanhou nos experimentos de Biologia Molecular, me passando seus ensinamentos e dedicando seu tempo ao meu projeto.

As secretárias Nilda e Senária, sempre muito prestativas e atenciosas, facilitando nossas vidas em meio a tanta papelada, documentação, e burocracia.

A Cida, secretária de Pós-Graduação sempre dando um jeitinho para solucionar os problemas de prazo que vim enfrentando no decorrer desses anos.

A todos os funcionários do Lim 42.

A todos os funcionários do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, Lim 05, que direta ou indiretamente estiveram presentes na realização deste projeto.

A todos os funcionários do Laboratório de Endocrinologia do ICB, em especial a Maria Inês por me sugerir ideias e por acompanhar de perto todo o processo de realização do trabalho. Agradeço também a sua aluna, Chayrra Chehade Gomes, pelos ensinamentos e dedicação do seu tempo e pela ótima companhia durante as tardes "histológicas". Também ao seu funcionário Cruz, por confeccionar lâminas para histologia com muita precisão e eficiência em prazos curtíssimos.

Ao Paulo Dirceu Luchini, químico da empresa Toxikón, que participou ativamente do planejamento do projeto e nos forneceu material proveniente da sua empresa para o trabalho.

A Luciana Britto que me auxiliou na parte de estatista, tão temida pela maioria dos pesquisadores.

Ao pessoal do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP, em especial ao Carlos Eduardo de Lemos, responsável por ceder um espaço para a realização do trabalho, e também um agradecimento especial para toda equipe do Biotério que sempre esteve de prontidão para me ajudar durante as reformas e instalações para a criação do Instituto Zebrafish.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas e Prof. Dr. José Xavier Neto que junto com o Carlos ajudaram a disponibilizar a sala no Biotério.

Agradeço à FAPESP pelo financiamento do projeto.

À minha família, aos meus pais e a minha irmã, que fazem parte do meu dia a dia, e com quem divido todas as minhas alegrias e dificuldades.

Aos demais familiares, pela admiração, torcida e momentos de união e alegria, que fazem compensar qualquer esforço.

A todos os meus amigos queridos e colegas que me ajudaram e participaram desse processo e compartilharam comigo as ansiedades, tristezas, aflições e alegrias no decorrer desses anos, em especial à Priscila Iovine, que me trouxe a essa Instituição tão renomeada que é a Faculdade de Medicina da USP, me apresentando ao Dr. Paulo Saldiva que enxergou meu potencial e percebeu o meu interesse em pesquisa, me encaminhando ao laboratório da Dra. Berenice. Além disso, a Priscila acompanhou todos os passos durante esses anos, e juntas passamos por inúmeras adversidades, e comemoramos juntas cada conquista.

Aos amigos e colegas do Lim 42: Daiane Beneduzzi, Cíntia Tusset, Thatiana Silva, Aline Zamboni, Rosana, Acácio, Mariana, Ricardo, entre outros.

Pessoas queridas que me acompanharam indiretamente ficando na torcida, mas que foram essenciais durante esses anos: Maitê Bueno, Soiti Ogata, Michelle Giantti, amigas da pós, queridíssimas que mesmo as conhecendo há pouco tempo, já se tornaram grandes amigas. Entre outros amigos e colegas, que participaram indiretamente me trazendo alegria, apoio, diversão e carinho nesse período tão estressante.

A CETESB e seus funcionários, que além de me fornecerem diversos dados para esse trabalho, também me admitiu como funcionária durante esse período.

A todos que acreditaram em mim e se importaram com o andamento do projeto, e que de alguma forma compartilharam meus anseios e me ajudaram a crescer....

Aqui se conclui mais uma etapa da minha vida, foram muitos momentos de superação, crescimento pessoal e profissional, e sem essas pessoas, nada disso seria possível.

...Muito Obrigada...

EPÍGRAFE

“Se soubermos que um obstáculo é intransponível, deixa de ser

um obstáculo para se

tornar um ponto de partida.

(József Eotvos)

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de siglas

Resumo

Summary

Introdução.....1

1. 1. Poluição Atmosférica: classificação e níveis recomendados.....2

1. 2. Poluição do ar na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP).....4

1. 3. Partículas de exaustão do diesel (PED).....5

1. 4. Poluição atmosférica e saúde.....7

1. 4. 1. Poluição atmosférica e saúde reprodutiva.....8

1. 5. Desreguladores Endócrinos: definição e mecanismo de ação.....9

1. 6. Estudos e evidências experimentais.....14

1. 7. Biomarcadores : vantagens da utilização do *zebrafish* como modelo complementar.....17

1. 7. 1. Sistema reprodutivo feminino dos teleósteos.....19

Objetivo.....26

Métodos.....28

3. 1. Animais.....29

3. 2. Partículas de Exaustão do Diesel (PED): coleta e caracterização.....30

3. 2. 1. Análise dos componentes metálicos.....30

3. 2. 2. Análise dos componentes orgânicos.....32

3. 2. 3. Caracterização das partículas de Exaustão do Diesel.....33

3. 2. 4. Exposição isolada dos elementos: solução de metais.....34

3. 2. 5. Diluição dos metais.....35

3. 2. 6. Exposição das fêmeas aos metais.....35

3. 4. Análise histológica das gônadas.....39

3. 5. Análise molecular.....40

3. 5. 1. Extração de RNA total para PCR em Tempo Real.....40

3. 5. 2. Análise da qualidade e quantificação do RNA total.....42

3. 5. 3. Síntese de cDNA pela reação de transcrição reversa (RT- PCR).....42

3. 5. 4. Estudo da expressão por reação de PCR em tempo real.....43

3. 5. 5. Validação do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ 44

3. 5. 6. Escolha dos genes endógenos.....49

3. 6. Análise estatística.....51

Resultados 52

4. 1. Implantação de estudos toxicológicos com *zebrafish* (*Danio rerio*) na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.....53

4. 2. Desenvolvimento do protocolo de diluição e exposição das PED para *zebrafish*.....55

4. 2. 1. Padronização da diluição e da dose subletal.....55

4. 2. 2. Análise histológica de ovário de zebrafish.....59

4. 3. PCR em tempo real.....64

Discussão.....66

Conclusão.....74

Referências bibliográficas.....76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos.....12

Figura 2 - Peixe paulistinha, *zebrafish*.....18

Figura 3 - Corte histológico axial de fêmea adulta de *zebrafish*. Em destaque, nas setas, os ovários direito e esquerdo. Coloração por H&E.....20

Figura 4 - Crescimento do oócito caracterizando as diferentes fases que constituem a oogênese. Classificação segundo Brown - Peterson, *et al*. [58]. **A.** Vtg1 : oócito vitelogênico primário; Vtg2 : oócito vitelogênico secundário; Vtg3 : oócito vitelogênico terciário, PG: oócito de crescimento primário; CA: oócito alvéolo-cortical; POF: folículo pós-ovulatório. **B.** A: oócito atrésico. 23

Figura 5 - Exposição aguda dos peixes *zebrafish* fêmeas à concentrações de metais.....36

Figura 6 - Unidade de *Zebrafish* no Centro de Bioterismo da FMUSP.....53

Figura 7- Exposição do *zebrafish* às partículas de exaustão do diesel. Protocolo de experimentação. Os aquários com água de coloração escura representam os animais expostos às concentrações decrescentes de PED, os de conteúdo límpido representam os que contém os animais controle.....57

Figura 8 - Secções histológicas de ovário de fêmeas adultas de *zebrafish* expostas aos metais e controles apresentando as diferentes fases do desenvolvimento oocitário. Coloração por H&E. **A:** controle 1- PG: oóvito em crescimento primário, OM: oócito maduro; **B:** controle 2 - POF: folículos pós-ovulatório, OM: oócito maduro; **C:** controle 3 - A : oócito atrésico; **D:** controle 4 - OM: oócito maduro, CA: oócito cortical-alveolar, POF: folículo pós-ovulatório, Vtg3: oócito vitelogênico terciário; **E:** exposto 1- Vtg1: oócito vitelogênico primário ; **F:** exposto 2 - OM: oócito maduro; **G:**exposto 3 - Vtg2: oócito vitelogênico secundário; **H:**exposto 4 – POF: folículo pós-ovulatório, A: folículo atrésico.....62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração dos principais compostos metálicos (ppb) e orgânicos (ppb) presentes na amostra de PED.....34

Tabela 2 - Valores do comprimento total, comprimento padrão, peso corpóreo e peso das gônadas das fêmeas expostas às PED e controle.....38

Tabela 3 - Genes alvos e endógenos estudados por PCR em tempo real.....50

LISTA DE ABREVIATURAS

CO	monóxido de carbono
SO_2	dióxido de enxofre
MP	material particulado
O_3	ozônio
NO_X	óxido de nitrogênio
HC	hidrocarbonetos
PED	partículas de exaustão do diesel
HPA	hidrocarboneto(s) policíclico(s) aromático(s)
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DNA	ácido desoxirribonucléico
RNA	ácido ribonucleico
cDNA	DNA complementar
mRNA	RNA mensageiro
As	arsênio
Cd	cádmio
Ni	níquel
Be	berílio

Fe	ferro
Pb	chumbo
Cr	cromo
Cu	cobre
CP	crescimento primário
CS	crescimento secundário
PG	oócito em crescimento primário
CA	oócito alvéolo- cortical
Vtg1	oócito vitelogênico primário
Vtg2	oócito vitelogênico secundário
Vtg3	oócito vitelogênico terciário
OM	oócito maduro
POF	folículo pós-ovulatório
A	oócito atrésico
BMP15	proteína morfogenética ossea 15
H&E	Hematoxilina e Eosina

LISTA DE SIGLAS

CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
OMS	Organização Mundial da Saúde
US-EPA	U.S. Environmental Protection Agency
RMSP	Região Metropolitana de São Paulo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
UKEA	Agência Ambiental do Reino Unido
OSPAR	Comissão de Paris e Oslo
JEA	Agência Ambiental do Japão
WWF	Organização não Governamental
LPAE	Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da FMUSP
CAPPesq	Comissão de Análise para Projetos de Pesquisa

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
µg	microgramas
µL	microlitro
g	gramas
h	hora
mg/mL	miligrama por mililitro
ppm	partes por milhão
ppb	partes por bilhão
sc	subcutânea
iv	injeção intravenosa

RESUMO

Mendez FMN. Estudo dos efeitos dos elementos traços presentes nas partículas provenientes da queima do diesel no sistema reprodutivo de *Danio rerio* (*zebrafish*): análise morfológica e histológica [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

A qualidade do ar nas áreas urbanas tende a apresentar concentrações indesejáveis de contaminantes provenientes da queima de biomassa, não havendo um sistema abrangente de monitoramento. Achados *in vivo* mostram que o diesel pode conter compostos que modulam a atividade do estrógeno. Estudos *in vitro* apoiam essa ideia, como o estudo realizado com cloreto de metileno extraído do diesel que comprova atuar como ativadores de ligação para os receptores de estrógeno. Esse trabalho tem por objetivo avaliar o efeito da exposição à metais presentes nas partículas de exaustao de diesel (PED) na morfologia do ovaário através da histologia, e análise do padrão de expressão dos receptores de estrógeno (ERs) no ovário de *zebrafish* (*Danio rerio*) usando a metodologia de PCR em tempo real. Fêmeas adultas de *zebrafish* foram expostas à concentrações ambientais de combinado de metais (Ni = 0,181 mg/L ; Fe = 0,07455 mg/L ; Pb= 0,05 mg/ L; Cd = 0,029 mg/ L; Cr = 0,161 mg/L ; Cu = 0,017 mg / L) por 3 dias. Em relação a contagem de ovócitos atrésicos a média observada nos animais expostos foi de 1,5 ± 0,4 e nos controles foi de 1,34 ± 0,3. Contudo, não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Na expressão dos três genes receptores de estrógeno (*esr1, esr2a, esr2b*) as médias foram:

0,68; 1,32; 0,54; respectivamente. No entanto, não houve alteração significativa na expressão desses genes em relação aos controles. Os elementos traços presentes nas PED em concentração ambiental e em exposição aguda na fase adulta não alteram a expressão dos ERs o também não afetam o número de folículos atrésicos nos ovários

Descritores: Emissões de veículos; Diesel; Material particulado; Sistema reprodutivo; Peixe zebra; Receptor de estrógeno.

SUMMARY

Mendez FMN. Effects of trace elements present in Diesel Exhaust Particulates in the reproductive system of Danio rerio (zebrafish): Morphological and histological analysis [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012.

The air quality in urban areas tends to have undesirable concentrations of contaminants from biomass combustion, without a monitoring system. *In vivo* findings show that diesel may contain compounds that modulate the activity of estrogen. *In vitro* studies support this idea, as the study with methylene chloride extract from diesel proves that this substance act as activators binding to the estrogen receptors (ERs). This study aims to evaluate the effect of exposure to metals present in diesel exhaust particles (PED) in ovary morphology through histology, and analysis of expression pattern of ERs in ovary of zebrafish (*Danio rerio*) using real time PCR metodology. Adult females were exposed to ambient concentrations of combined metals (Ni = 0.181 mg / L, Fe = 0.07455 mg / L Pb = 0,05 mg / L; Cd = 0.029 mg / L; = 0.161 mg Cr / L, Cu = 0.017 mg / L) for 3 days. The mean of atretic oocytes counting observed in animals exposed was 1.5 ± 0.4 and the controls was 1.34 ± 0.3. However, no significant difference between groups was observed (p> 0.05). The expression of the three genes estrogen receptor (*esr1, esr2a, esr2b*) mean were: 0.68, 1.32, 0.54, respectively. However, no significant change in the expression of these genes in relation to controls was observed. In conclusion, the trace elements present in the PED concentration in

environmental and acute exposure in adulthood not alter the expression of ERs and does not affect the number of atretic follicles in the ovary

Descriptors: Vehicle emissions; Diesel; Particulate matter; reproductive system; Zebrafish; Estrogen receptor.

INTRODUÇÃO

Embora o desenvolvimento mundial seja indispensável, a falta de conhecimento e planejamento e a despreocupação com as consequências futuras, além de gerar danos ao meio ambiente afeta a saúde e o bem estar da população.

1. 1. Poluição Atmosférica: classificação e níveis recomendados

Apesar das atividades físicas naturais serem as grandes responsáveis pelo nível de poluição na atmosfera, atividades antropogênicas utilizadas desde a pré-história para produção de energia, tem sido uma das principais fontes de poluição atmosférica [1, 2, 3].

Conforme a Resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) Nº 3 de 28/06/1990 [4], considera-se poluente atmosférico:

"(...) qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos 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 a flora (...) e às atividades normais da comunidade".

Os poluentes universalmente utilizados como indicadores da qualidade do ar são: monóxido de carbono (CO), dióxido de enxofre (SO_2), material particulado (MP), ozônio (O_3) e óxido de nitrogênio (NO_x). A razão da escolha desses parâmetros como indicadores de qualidade do ar está

ligada à maior frequência de ocorrência e aos efeitos adversos que causam ao meio ambiente [5].

O MP engloba um conjunto de poluentes constituído de poeiras, fumaças e todo tipo de material sólido e líquido que se mantém suspenso na atmosfera por causa de seu pequeno tamanho, embora variem em dimensão, composição e origem.

O nível de poluição atmosférica é determinado pela quantificação dessas substâncias poluentes presentes no ar e a distribuição do tamanho das partículas é ditada pelo processo que gera o aerossol. As partículas inaláveis classificam-se conforme o seu tamanho: em fina ($MP_{2,5}$ com diâmetro aerodinâmico inferior a 2,5 μm) ou grossa ($MP_{2,5}$ - MP_{10}, com diâmetro aerodinâmico entre 2,5 μm e 10 μm). As partículas inaláveis grossas são provenientes basicamente de emissão direta da queima de combustíveis originados dos veículos, de ressuspensão de poeira do solo em vias devido ao tráfego, material da crosta terrestre ressuspendido, atividades industriais e material de origem biológica [5] .

Partículas de dimensões superiores a 10 μm são retidas pelas vias respiratórias, enquanto que aquelas com diâmetros entre 2,5 e 10 μm atingem os brônquios e bronquíolos. Já os alvéolos são afetados somente com partículas menores que 2,5 μm. Ou seja, o tamanho das partículas está indiretamente associado ao potencial causador de problemas à saúde, isto é, quanto menores em tamanho, maiores os danos provocados [3]

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelece, como valor guia para o $MP_{2,5}$, uma concentração anual média de 10 µg/m^3 e de 25 µg/m^3 (percentil 99) para 24 horas de exposição. Os padrões da U.S. Environmental Protection Agency (US-EPA) estabelecem que a média aritmética das médias anuais não pode ultrapassar 15 µg/m³ e o percentil 98 das médias de 24 horas em três anos não pode ultrapassar 35 µg/m^3. A União Europeia estabeleceu, em 2008, o valor de 25 µg/m³ como concentração média anual [(6)]. No Brasil o CONAMA estabelece um valor de 50 µg/m³ de concentração média aritmética anual, e a concentração média de 24 horas de 150 µg/m³ [(4)].

1. 2. Poluição do ar na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP)

São Paulo sofre, como uma grande metrópole, os efeitos da poluição do ar. Agrava o fato que, na RMSP, residem cerca de 20 milhões de habitantes (Censo IBGE 2010) [(7)], ou 48% do total do Estado.

Dentre as fontes emissoras, as veiculares desempenham um papel de destaque no nível de poluição do ar dos grandes centros urbanos, ao passo que as emissões industriais afetam significativamente a qualidade do ar em regiões mais específicas [(8)].

A frota circulante da RMSP registrada, até dezembro de 2010, era de aproximadamente 6,3 milhões de veículos, sendo 3,7 milhões movidos a

gasolina, 2 milhões de veículos Flex (álcool e gasolina), 348 mil movidos a diesel e 243 mil movido a etanol, concentrando cerca de 50% da frota do Estado de São Paulo em apenas 3,2 % do território [8].

Desde a década de 70, a CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) mantém redes de monitoramento da qualidade do ar para avaliar os níveis de poluição atmosférica em diferentes escalas de abrangência, publicando relatórios anuais de qualidade do ar. De acordo com as estimativas de 2010, as fontes de poluição veiculares são responsáveis pelas emissões para a atmosfera dos seguintes poluentes: 97% de CO, 77% de HC, 82% de NO_x, 36% de SO_x e 40% de MP [8].

Segundo a CETESB [5], a contribuição automotiva para a emissão de MP é de 40%. Desse valor, 71,2% são emissões do tubo de escapamento dos motores a diesel. Assim sendo, as partículas de exaustão do diesel (PED) representam 28,46% da contribuição relativa das fontes de MP_{10} na RMSP.

1. 3. Partículas de exaustão do diesel (PED)

O diesel é um combustível derivado do petróleo constituído por, predominantemente, hidrocarbonetos alifáticos contendo de 9 a 28 átomos de carbono na cadeia. Durante o processo de produção, o diesel é destilado em temperaturas na faixa de 159 a 410 Cº, enquanto que a gasolina destila na faixa de 80 a 120 Cº. O diesel contém ainda outros compostos que

porventura destilam na mesma faixa de temperatura, tais como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e seus derivados alquílicos [9].

A formação das PED no escapamento do veículo é fortemente dependente da queima de combustível e do óleo lubrificante, e do desgaste de rolamentos e materiais dos motores. Segundo Braun *et al.* [9] a composição do diesel varia muito devido a diferentes origens do petróleo utilizado como matéria-prima e diferentes processos de refino. Além disso, a qualidade do diesel tem mudado constantemente desde sua introdução no mercado como combustível. Entretanto, apresenta como composição básica: 70% em massa de carbono, 20% de oxigênio, 3% de enxofre, 1,5% de hidrogênio, menos que 1% de nitrogênio e, aproximadamente, 1% de elementos traços (metais).

A Europa, o Japão e muitos outros países utilizam um diesel com 10 ppm (partes por milhão) de enxofre. Nos EUA, o limite é 15 ppm. No Brasil, é fabricado diesel com 1.800-2.000 ppm para a frota em geral e 500 ppm para consumo somente em algumas cidades onde a poluição é crítica, sendo que o limite determinado pelo CONAMA (2002) é de 50 ppm, nos tornando o país que consome um dos piores Diesel no mundo [8].

A toxicidade das PED pode ser atribuída à própria partícula, aos componentes adsorvidos em sua superfície, ou a ambos, e representa uma importante fonte de preocupação devido ao seu caráter universal de distribuição nas grandes cidades. Estas partículas, correlacionadas às propriedades químicas dos compostos adsorvidos, podem causar doenças

respiratórias [9,14,15], danos ao DNA [10], induzir proliferação e apoptose celular [11, 12] e diminuição da fertilidade [13].

Apesar do conhecimento de que muitos dos compostos presentes nas PED estão relacionados à toxicidade e prejuízos à saúde humana e ambiental, os efeitos biológicos destes compostos ainda não são bem compreendidos.

1. 4. Poluição atmosférica e saúde

Os primeiros dados associando os efeitos negativos da poluição ambiental sobre a saúde surgiam entre as décadas de 30 e 50 do século XX, tendo como fonte o repentino aumento das taxas de mortalidade observado durante elevações extremas dos níveis de poluição urbana (Vale de Meuse, Bélgica, 1930; cidade de Donora, Pensilvânia, EUA, 1948; Londres, Inglaterra, 1952) [16].

Efeitos na saúde podem variar de náuseas e dificuldade em respirar ou irritação da pele, ao câncer. Eles também incluem defeitos de nascimento, grave atraso no desenvolvimento em crianças, e uma redução da atividade do sistema imune, levando a uma série de doenças [3].

As diferentes composições dos poluentes do ar, a dose, o tempo de exposição e o fato de que os seres humanos são normalmente expostos a misturas de poluentes do que às substâncias isoladas, podem resultar em impactos diversos sobre a saúde humana. Além disso, existem vários

fatores de susceptibilidade como idade, estado nutricional e condições predisponentes. Saldiva *et al.* [17]. demonstraram que esses efeitos da poluição atmosférica eram exacerbados na população idosa quando comparada à adulta em geral. Estudos avaliando os efeitos da exposição à poluição na infância demonstram que esse grupo etário também é mais vulnerável do que a população geral [18]. Evidências recentes apontam as gestantes como um novo grupo de risco, demonstrando que a poluição atmosférica está associada a complicações fetais na gestação e no nascimento [3].

Modelo de dados epidemiológicos e em animais indicam que os sistemas afetados são principalmente o cardiovascular e o sistema respiratório. No entanto, a função de vários outros sistemas também pode ser alterada como no reprodutivo [3].

1. 4. 1. Poluição atmosférica e saúde reprodutiva

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a infertilidade ocorra em cerca de 80 milhões de pessoas ao redor do mundo. Em geral, cerca de 10% a 15% dos casais apresentam infertilidade primária ou secundária, mas sua incidência varia de menos de 5% a mais de 30% entre os diferentes países [19]. No Brasil o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) estima que a taxa de fertilidade em mulheres diminuiu de 2,54 para 1,95 (número de filhos por mulher) entre os anos de 1997 a 2007, e a

proporção de casais sem filhos aumentou de 12,9% para 16% durante o mesmo período [20, 21] .

Embora a infertilidade possa ser causada por inúmeros fatores e com incidências variáveis em populações distintas, a produção anormal de gametas (oócitos e/ou espermatozóides), os defeitos tubários ou a ocorrência de endometriose pélvica representam as suas causas mais frequentes. Contudo, é importante ressaltar que uma proporção significativa dos casos de infertilidade não apresenta uma causa aparente. Inúmeros estudos têm sugerido que a exposição a agentes ambientais têm o potencial de alterar os tecidos reprodutivos masculinos e femininos e, portanto, afetar a capacidade reprodutiva da população [22].

Exposição materna aos metais pesados aumenta os riscos de aborto espontâneo e redução do crescimento fetal (parto prematuro, baixo peso ao nascer). Há também evidências sugerindo que a exposição dos pais ao chumbo também é responsável por malformações congênitas e lesões do sistema nervoso em desenvolvimento, causando prejuízo motor e habilidades cognitivas no recém-nascido [3].

1. 5. Desreguladores Endócrinos: definição e mecanismo de ação

A hipótese de certos compostos ambientais serem perigosos para os seres vivos e para sua respectiva descendência criou uma nova área de

investigação em toxicologia ambiental, dedicada ao estudo de substâncias susceptíveis a produzir alterações endócrinas nos seres vivos.

Embora já existissem, desde o início do século XX, hipóteses prevendo alterações no funcionamento do sistema endócrino de algumas espécies animais expostos a determinadas substâncias químicas tóxicas, apenas recentemente esta importante questão tem recebido atenção por parte da comunidade científica. Há um crescente número de publicações que relatam o aumento da incidência de disfunções no sistema endócrino de seres humanos e, mais significativamente, efeitos fisiológicos adversos observados em espécies animais para as quais a relação causa/efeito é mais evidente [22].

Esses compostos, capazes de interferir com a função endócrina, foram chamados de Desreguladores Endócrinos [22, 23]. De acordo com a "Environmental Protection Agency" (US-EPA), um desregulador endócrino é definido como um:

" (...) agente exógeno que interfere com síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais no corpo que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos".

Os primeiros relatos de substâncias químicas desreguladoras endócrinas ressaltam o Dietilestilbestrol, medicamento usado por mulheres entre os anos 50 e 70 para evitar aborto, que determinou consequências desastrosas, dentre elas o câncer da vagina, infertilidade e deformações

irreversíveis nas filhas nascidas de mães que o utilizaram, provando o seu efeito teratogênico [22, 25]. Muitas destas filhas só vieram a descobrir os problemas aos vinte anos de idade [26].

Também os homens que trabalhavam nas fábricas do medicamento tiveram crescimento das mamas [26] e meninos filhos de mães que usaram o medicamento durante a gravidez vieram a apresentar criptorquidia (ausência de testículo no escroto) [26].

Um receptor hormonal possui elevada sensibilidade e afinidade por um hormônio específico, produzido no organismo. Portanto, concentrações extremamente baixas de um determinado hormônio geram um efeito, produzindo uma resposta natural. Entretanto, estes receptores hormonais também podem se ligar a outras substâncias químicas. Isso explica o porquê de determinados desreguladores endócrinos presentes no organismo, mesmo em baixíssimas concentrações, serem capazes de gerar um efeito biológico [25, 26].

Os desreguladores endócrinos podem interferir no funcionamento do sistema endócrino pelo menos de três formas possíveis: mimetizando a ação de um hormônio produzido naturalmente pelo organismo, como o estrogênio ou a testosterona, desencadeando deste modo reações químicas semelhantes; bloqueando os receptores celulares, impedindo assim a ação dos hormônios naturais; ou afetando a síntese, o transporte, o metabolismo e a excreção, com consequente alteração das concentrações dos hormônios naturais (figura 1) [22].

Muitos desreguladores endócrinos competem com o estradiol (hormônio sexual feminino) através dos receptores de estrogênio. Outros competem com a diidrotestosterona (hormônio sexual masculino) através dos receptores de androgênio. Portanto, estas substâncias exercem efeitos de feminização ou masculinização sobre o organismo [22].

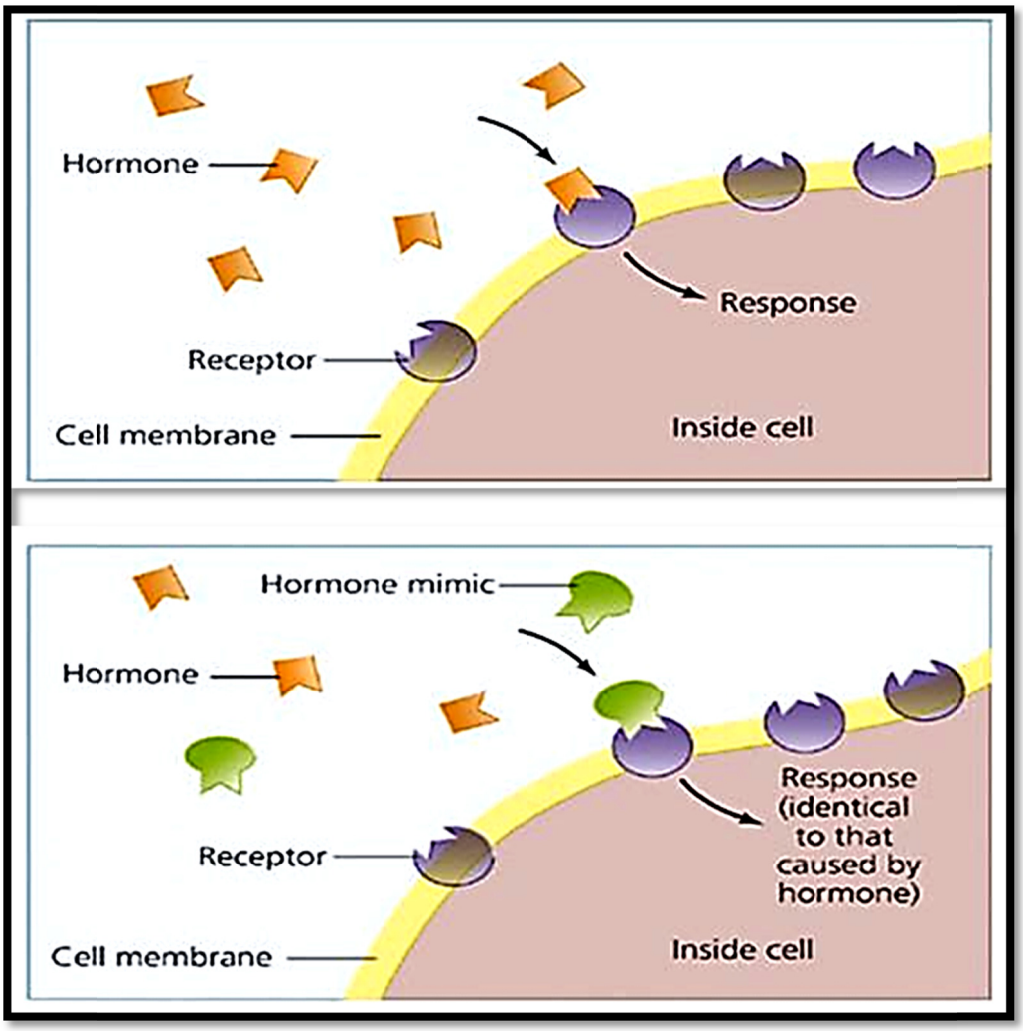


Figura 1. Mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos [22].

Diversas organizações mundiais basearam–se em seus estudos, tanto em seres humanos como de espécies diferentes de animais, para

classificarem as substâncias químicas como suspeitas de interferir no sistema endócrino. Dentre as agências então presentes a UKEA: Agência Ambiental do Reino Unido; a US-EPA: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos; OSPAR: Comissão de Paris e Oslo; JEA: Agência Ambiental do Japão e a WWF: Organização não Governamental. Das substâncias classificadas como desreguladoras endócrinas então os esteroides (ex. 17β – Estradiol), os alquinofenóis , os compostos poliaromáticos (ex. os Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPA), compostos com oxigênio (ex. Bisfenol A), Pesticidas (ex. Endossufan) e dioxinas e furanos (compostos presentes na queima de combustível diesel) [28, 29].

Vários desses poluentes orgânicos antropogênicos persistem no ambiente por muito tempo, visto que são substâncias químicas resistentes à degradação física e química, permanecendo disponíveis para absorção e bioacumulação [28]. Algumas dessas, como o pesticida Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT), possuem uma ação muito bem definida, enquanto outras mostram resultados ainda controversos, sem considerar inúmeras substâncias, amplamente utilizadas pelo homem, que ainda não tiveram esse efeito descoberto. Além do grande número de substâncias, a dificuldade de estudo dos desreguladores deve-se também aos vários mecanismos pelos quais uma mesma substância pode agir. Muitas vezes, os efeitos da exposição depende do tempo e estágio do desenvolvimento, e os primeiros efeitos podem aparecer após anos do contato inicial, sendo difícil

estabelecer o efeito exato desses contaminantes. Também se deve considerar que, no ambiente, os desreguladores não são encontrados de forma isolada, podendo haver interação destes com possível potencialização dos efeitos.

Até o momento, a maioria das substâncias classificadas como desreguladores endócrinos são pesticidas. Alguns metais, como cádmio e mercúrio, também apresentaram atividade semelhante no sistema endócrino, especialmente nas suas formas orgânicas [22].

Substâncias provenientes da queima do diesel apresentam tanto atividade anti-estrogênica como atividade anti-androgênica *in vitro e* influenciam no sistema reprodutivo *in vivo* [30], além de apresentar potencial de bioacumulação [31].

1. 6. Estudos e evidências experimentais

Muitos poluentes ambientais já foram comprovados como cancerígenos para o ser humano, dos quais os metais de maior importância são: arsênio (As), cádmio (Cd), níquel (Ni) e berílio (Be). Todos estão associados a um risco de desenvolver tumores, incluindo câncer pulmonar, dérmico e nasal. Entretanto, poucos estudos têm-se centrado aos efeitos da exposição a esses metais na reprodução [31].

O cádmio já foi descrito como um dos elementos mais perigosos para o homem mesmo em baixas concentrações [32]. Os riscos para a saúde são

maiores quando há inalação deste composto. Assumindo uma inalação diária de 20 m^3 de ar e que a concentração é similar em ambientes fechados e abertos, a quantidade média de cádmio inalado por dia por um ser humano na zona rural, urbana ou industrializada não deve exceder 0,01, 0,2 e 0,4 µg, respectivamente [33,34].

Estudos têm demonstrado que o cádmio, o cobre e o chumbo, mesmo em baixas concentrações agem como desreguladores endócrinos [34, 35]. Injeções subcutâneas (sc) de Cd (0, 3 ou 5 mg / kg) no dia do diestro e no 7º e 16º dia de gestação, em ratos Sprague-Dawley produziu uma inibição da síntese de progesterona [35]. Um resultado similar foi obtido in vitro em células da granulosa de ovário humano obtidas de 41 mulheres submetidas a indução da ovulação e recuperação do óvulo com o propósito de fertilização in vitro [36]. As células foram tratadas com concentrações crescentes de CdCl2 por períodos de 2 a 48 h e houve redução da produção de progesterona no período de exposição de 48h, e a resposta foi dependente da concentração. Resultado semelhante também foi observado em células obtidas a partir de ovários de ratos Sprague-Dawley sacrificados no dia do proestro ou no dia 6 ou 16 de gestação [35]. A produção de progesterona, testosterona e estradiol foi determinada durante o período de 1h e os resultados mostraram que, a produção de progesterona e testosterona foi mais afetada, enquanto que a do estradiol permaneceu inalterada. Assim, os dados sugerem que o Cd pode interferir diretamente na produção de esteróides sexuais em células de ovário [35].

Em ratos virgens albinos NMRI, injeção intravenosa (iv) de 75 ppm de cloreto de Chumbo (Pb), produziu uma redução significativa em implantes de embriões em relação ao controle. As concentrações de 17b-estradiol e progesterona foram semelhantes nos animais em exposição e controles, sugerindo que os efeitos deste metal estão ligados à atividade alterada de receptores de estrogênio uterino e sua afinidade para esteróides ovarianos [37]

Em recentes estudos com partículas de diesel (MP) foram avaliados efeitos tóxicos em reprodução de machos e fêmeas. Em ratas grávidas C57BL que foram injetadas com partículas extraídas do diesel tiveram um aumento significante no número de abortos, e o diesel provocou o aumento do peso uterino e a contratibilidade miometrial de ratas C57BL [38]. Esses achados in vivo mostram que o diesel pode conter compostos que modulam a atividade estrogênica. Vários estudos *in vitro* apoiam essa ideia, como Meek *et. al* [39] que reportaram que o cloreto de metileno extraído do diesel pode atuar como ativador de ligação para os receptores de estrógeno.

Tsukue *et al*. [40] , demonstraram que os fetos fêmeas de ratas expostas às mesmas concentrações de MP do estudo anterior apresentaram expressão normal de MIS e AD4BP/SF-1. No entanto, a expressão do gene BMP15 (Proteína Morfogenética Óssea 15), relacionado ao desenvolvimento dos oócitos, estava diminuída em relação ao grupo controle.

Arukwe *et al.* [41], em 2008, demonstraram que a exposição do *zebrafish* à frações hidrossolúveis do petróleo exibiam um aumento da

expressão de mRNA de receptores de hidrocarbonetos aril (AhR1), CYP1A1 e 3beta-hidroxiesteroide desidrogenase. A indução da atividade das enzimas CYP, especialmente CYP1A1, ocorre através do AhR1 na maioria das espécies de vertebrados. Por outro lado houve uma diminuição da expressão dos receptores de estrógenos da proteína StAR e das enzimas P450scc e P450arom. Além disso, os autores demonstraram um aumento dos níveis de estrógeno e diminuição dos níveis de testosterona nesses animais [41].

1. 7. Biomarcadores : vantagens da utilização do *zebrafish* como modelo complementar

Biomarcadores são comumente usados como indicadores bioquímicos, fisiológicos, e histológicos de exposição à xenobióticos ou de efeitos de contaminantes químicos [42]. Leonzio e Fossi [43] ampliaram a definição proposta pela *National Academy of Sciences*, definindo o que propuseram chamar de biomarcadores ecotoxicológicos, como:

"(...) variações bioquímicas, celulares, fisiológicas ou comportamentais que possam ser medidas em amostras de tecidos ou fluidos orgânicos, em organismos ou populações, que possam evidenciar exposição ou efeitos de um ou mais poluentes químicos ou radiações"

Nos últimos 20 anos, experimentos utilizando a espécie de teleósteo, *zebrafish* (*Danio rerio*), tem aumentado dramaticamente. O *zebrafish*, conhecido popularmente como peixe paulistinha (figura 2), é um membro da família Cyprinidae nativo da Índia e do Paquistão [44]. A razão da sua popularidade é a praticidade, facilidade de criação e de manutenção, baixo custo, fecundação externa, produção de um grande número de embriões, ovos transparentes que facilitam a visualização durante o desenvolvimento e por conter homólogos próximos de muitas proteínas humanas incluindo cinases, receptores de estrógeno e aromatase [45, 46].

Ele tem sido utilizado em estudos biológicos de drogas e também em estudos com poluentes, especialmente os desreguladores endócrinos que afetam a ligação de receptores de estrógenos [47, 48, 49, 50].

Figura 2. Peixes paulistinha, *zebrafish.*

1. 7. 1. Sistema reprodutivo feminino dos teleósteos

Os processos do sistema reprodutivo dos teleósteos normalmente apresentam ritmos endógenos estimulados por sinais ambientais, de modo que o período da reprodução ocorre em uma época ambiental favorável ao desenvolvimento de larvas e alevinos. Alterações de fatores ambientais, como fotoperíodo e temperatura, são detectadas por receptores específicos, transmitidas ao cérebro e, depois, para o hipotálamo, alterando a produção e liberação de hormônios. Variações do fotoperíodo alteram a glândula pineal, que funciona como um fotorreceptor em peixes. Conforme o fotoperíodo, a secreção de melatonina e serotonina por esta glândula, sofre variação. Esses hormônios atuam no hipotálamo, promovendo alterações no seu funcionamento, modificando a reprodução do peixe [(51)].

O sistema reprodutivo feminino do *zebrafish* é constituído por um par de ovários pareados, localizados bilateralmente entre a parede abdominal e da bexiga natatória. No corte histológico representado na figura 3, o ovário é limitado pelo fígado e intestinos. Parte do pâncreas está localizado na cavidade peritoneal anterior, entre fígado, intestino, bexiga [(52)].

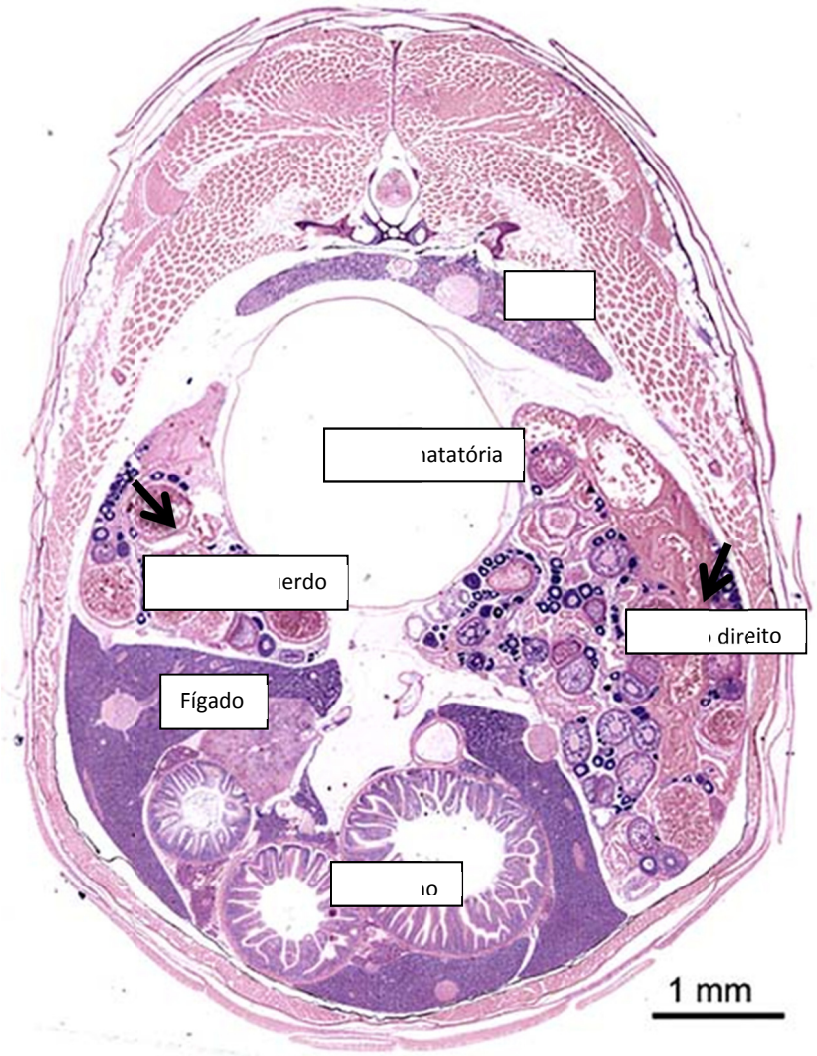


Figura 3. Corte histológico axial de fêmea adulta de *zebrafish*. Em destaque, nas setas, os ovários direito e esquerdo. Coloração por H&E [52].

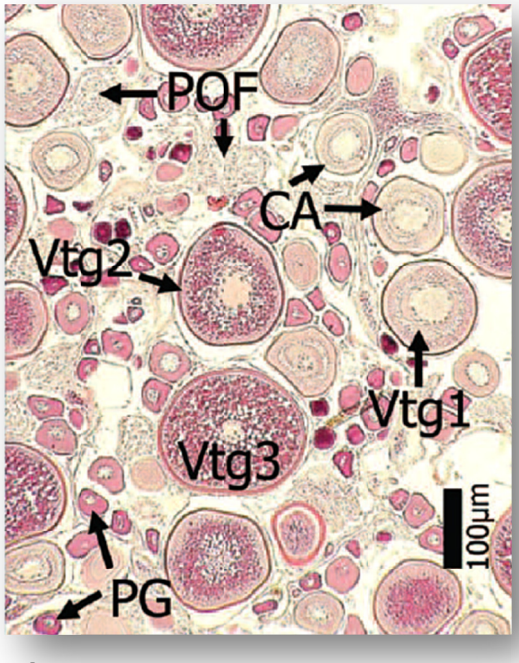
O ciclo de reprodução do *zebrafish* deve assegurar uma quantidade suficiente de células somáticas maduras, que só é possível dentro do processo de regular da oogênese [53].

A oogênese nos teleósteos é um processo dinâmico, em que os oócitos passam por várias fases de desenvolvimento. De acordo com o padrão do desenvolvimento do oócito os ovários dos peixes são classificados em três tipos [54]. No caso de oogênese (a) sincrônica, todos os ovócitos desenvolvem ao mesmo tempo, e a ovulação também é simultânea. O ovário do (b) grupo- sincrônico consiste em pelo menos dois grupos de ovócitos em diferentes estádios de desenvolvimento: teleósteos com este tipo de ovário geralmente geram ovos uma vez por ano e têm uma gestação em um período relativamente curto [54]. Já na oogênese (c) assincrônica, podem ser encontrados oócitos em estágios diferentes de maturação e ovulação [55,56]. No caso do *zebrafish* a oogênese é assincrônica, e, portanto, fases diversas de maturação do oócito estão presentes simultaneamente.

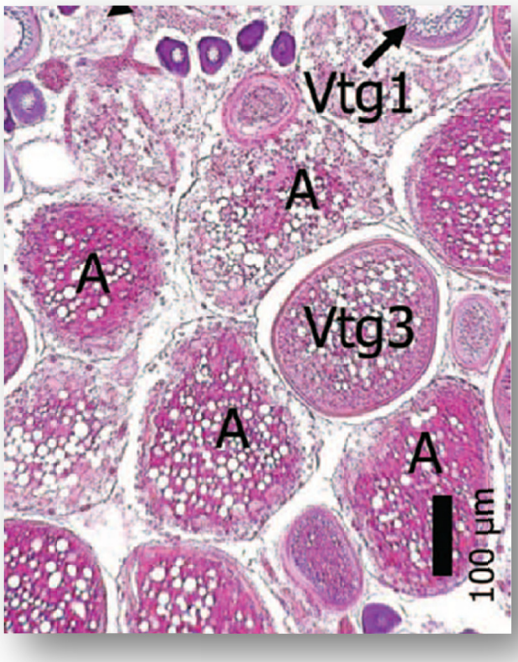
O desenvolvimento folicular pode ser dividido em três fases: crescimento primário (CP), crescimento secundário (CS) e ovócito maduro (OM). O crescimento primário é caracterizado por uma intensa proliferação de organelas, acúmulo de RNA materno no citoplasma e diferenciação das células foliculares e tecais. Nesta fase, ocorre também o início da formação da zona pelúcida. No ooplasma justanuclear, a proliferação de organelas membranosas ocorre em área conhecida como corpo de Balbiani ou núcleo

vitelínico. Durante este período, os ovócitos aumentam em tamanho e a basofilia citoplasmática torna-se mais intensa. Grandes quantidades de glicoproteínas são sintetizadas na fase final do crescimento primário e são incorporados em vesículas formadas na periferia do ooplasma, chamadas de alvéolos corticais [(57)]. Os alvéolos corticais liberam seu conteúdo durante a reação cortical no espaço perivitelínico, sendo responsáveis pelo endurecimento da zona pelúcida dificultando a polispermia durante a fertilização [(58)].

Os oócitos dos teleósteos, como em outros vertebrados, são rodeados por duas camadas de células: a camada mais externa de células da teca, e a mais interna da granulosa. À medida que os oócitos crescem as células foliculares multiplicam-se e formam uma camada contínua folicular chamada camada de células da granulosa. O desenvolvimento do oócito de peixe pode ser dividido em 6 fases de acordo com a classificação de Brown-Peterson *et al*. [(58)] : crescimento primário (PG); oócito alvéolo- cortical (CA); oócito vitelogênico, que se divide em vitelogênico primário (Vtg1); vitelogênico secundário (Vtg2), vitelogênico terciário (Vtg3) de acordo com o diâmetro do oócito, a quantidade de citoplasma preenchido pelo núcleo, e a presença de gotas de óleo; oócito maduro (OM); oócito pós-ovulatório (POF) e oócito atrésico (A) [(58)].



A



B

Figura 4. Crescimento do oócito caracterizando as diferentes fases que constituem a oogênese. Classificação segundo Brown Peterson, *et al*. [58]. **A.** Vtg1 : oócito vitelogênico primário; Vtg2 : oócito vitelogênico secundário; Vtg3 : oócito vitelogênico terciário, PG: oócito de crescimento primário; CA: oócito alvéolo-cortical; POF: oócito pós-ovulatório. **B.** A: oócito atrésico.

No *zebrafish*, o fígado é o responsável pela liberação do estrógeno. Enquanto que os humanos e ratos possuem dois receptores de estrógeno (ERα e ERβ) o z*ebrafish* possui além do ERα dois subtipos de ERβ, o ERβ1 e o ERβ2. Estes subtipos foram renomeado pela Rede de Informação *Zebrafish* (ZFIN) (http://zfin.org) para *esr1, esr2b e esr2a*, respectivamente [59].

Assim como nos seres humanos, os receptores de estrógeno no *zebrafish* apresentam diferentes atribuições teciduais e afinidades ligantes. No entanto, em ambos os peixes e os seres humanos, a estrutura geral e os domínios funcionais destes receptores são semelhantes [60].

Em certas circunstâncias é difícil detectar a presença de substâncias poluentes no ar, solo, ou amostras de águas pela sua baixa concentração ou sazonalidade de sua emissão no ambiente. No entanto, considerando que muitos poluentes induzem o efeito através de bioacumulação, a identificação de sua concentração em sistemas vivos indica com grande precisão seu impacto ambiental [61, 62].

Uma vez que as PED correspondem à maior parte do material particulado urbano, avaliar os efeitos delas é de grande importância para elucidar seus efeitos biológicos e bioquímicos, e pode ser importante para entender os efeitos adversos sobre a saúde reprodutiva.

Existem inúmeros trabalhos com exposição isolada de componentes, mas muitas vezes o efeito deles em conjunto pode potencializar ou causar efeitos diferentes dos conhecidos com as substâncias isoladas.

Com todas as vantagens do *zebrafish* em estudos experimentais, nosso trabalho se propõe a introduzir e padronizar uma nova linha de pesquisa no Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP que já vem sendo amplamente utilizada nos mais conceituados centros de pesquisa com animais ao redor do mundo, avaliando os efeitos da combinação de metais presentes nas PED sobre os ovários de *zebrafish*.

OBJETIVOS

2. Objetivos:

- Implantar estudos toxicológicos com *zebrafish* (*Danio rerio*) na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- Desenvolver um protocolo de diluição e exposição das PED para *zebrafish.*
- Avaliar os efeitos da exposição aos metais presentes nas PED provenientes da frota de ônibus da cidade e São Paulo no ovário de *zebrafish:*

1. Na morfologia das gônadas femininas dos animais expostos e controles: análise histológica.

2. No padrão de expressão dos Receptores de Estrógeno (ERs) nas gônadas femininas dos animais expostos e controles.

MÉTODOS

Os protocolos utilizados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq nº 0571/09).

3. 1. Animais

Nesse estudo foram utilizados peixes da espécie *Danio rerio*, também conhecido como "peixe paulistinha" ou *zebrafish,* adquiridos em loja de aquários, todos adultos com mais de 3 meses de idade e maduros sexualmente. Seguindo o protocolo de US-EPA [63] modificado, esses peixes foram mantidos em aquários com 10 litros cada, com água filtrada e desclorada, aeração constante, temperatura 27°C± 2 °C, pH entre 7 e 7,4 e fotoperíodo de 14h/10h dia/noite. Assim que os peixes chegaram ao laboratório eles passaram por um período de quarentena. Período necessário para a ambientalização dos animais. Os peixes foram alimentados com ração comercial *TetraMin*® duas vezes ao dia através de alimentador automático (*Meadow*®) e artêmia (pequeno crustáceo vivo altamente rico em proteínas) 2 vezes por semana.

3. 2. Partículas de Exaustão do Diesel (PED): coleta e caracterização

As partículas de exaustão de diesel (PED) foram doadas pelo Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE) da Faculdade de Medicina de São Paulo. A coleta das partículas foi feita através de um dispositivo retentor de partículas adaptado ao tubo de escape de um ônibus da frota de transporte público de São Paulo, equipado com um motor Mercedes Benz MB1620, 210 hp, sem controle eletrônico de injeção de combustível, alimentado com diesel metropolitano. Esse tipo de ônibus foi escolhido por ser o mais frequente operando em São Paulo, com base nas informações fornecidas pelo poder municipal. O filtro acoplado ao escapamento é formado por uma esponja de aço inoxidável colocada na linha do cano de descarga do veículo. As partículas de diesel foram coletadas após um dia de operação de rotina do ônibus e armazenadas a 4°C para estudos toxicológicos posteriores.

3. 2. 1. Análise dos componentes metálicos

A análise da composição elementar foi feita por espectrometria de fluorescência dispersiva de raios X de acordo com metodologia previamente descrita por Laks*et al*. [64], realizada no Laboratório de Poluição Atmosférica, Departamento de Patologia, Universidade de São Paulo.

A análise por fluorescência de raios X é um método quali-quantitativo baseado na medida das intensidades (número de raios X detectados por unidade de tempo) dos raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra. Os raios X emitidos por tubos de raios X, ou raios X ou gama por uma fonte radioativa, excitam os elementos constituintes, os quais, por sua vez, emitem linhas espectrais com energias características do elemento e cujas intensidades estão relacionadas com a concentração do elemento na amostra.

Quando um elemento de uma amostra é excitado, este tende a ejetar os elétrons do interior dos níveis dos átomos, e como consequência disto, elétrons dos níveis mais afastados realizam um salto quântico para preencher a vacância. Cada transição eletrônica constitui uma perda de energia para o elétron, e esta energia é emitida na forma de um fóton de raio X, de energia característica e bem definida para cada elemento. Assim, de modo resumido, a análise por fluorescência de raios X consiste de três fases: excitação dos elementos que constituem a amostra, dispersão dos raios X característicos emitidos pela amostra e detecção desses raios X.

Desse modo ao se considerar a intensidade (número de raios X detectados por unidade de tempo) dos raios X característicos emitidos pela amostra obtemos linhas espectrais com energias características de cada elemento, onde a intensidade está relacionada à concentração do elemento na amostra. A concentração de cada elemento é, normalmente, expressa em

termos de massa desse elemento dividido pela massa total da amostra, sendo habitualmente expressa em % ou em mg/g.

Há dois tipos de análise uma que envolve os elementos de “Na a U” na forma de metais e a outra onde o espectro resultante é analisado em uma segunda etapa, para obter-se o resultado quantitativo dos elementos K, Ca, Cl, Mg, Si, S, Al, Fe, P, Sr, Br, Ti, Cu, Zn, Ni, Cr, V e Co.

As análises foram feitas com o espectrômetro da marca Shimadzu Co. Este utiliza um tubo gerador de raios-X de ródio (Rh-target tube). As análises quantitativas foram feitas utilizando o software da Shimadzu, com a calibração dos parâmetros fundamentais com a utilização de amostras padronizadas da NIST (*National Institute of Standards and Technology*, NIST, Gaithersburg, MD, USA).

3. 2. 2. Análise dos componentes orgânicos

As concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) foram analisadas no Laboratório de Radioisópotos Eduardo Penna Franca, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Na análise utilizou-se um espectrofotômetro de absorção atômica (*Varian*, modelo AA-1475,Victoria, Austrália).

3. 2. 3. Caracterização das partículas de Exaustão do Diesel

A tabela 1 mostra a composição elementar e orgânica das PED.

Conforme a espectrometria de fluorescência dispersiva de raios X as PED utilizadas nesse trabalho apresentaram as seguintes concentrações de metais: níquel (Ni) – 181 ± 37 ppb;ferro (Fe) – 74,556 ± 2,266 ppb;chumbo (Pb) – 50 ± 47 ppb; cádmio (Cd) – 29 ± 8 ppb; cromo (Cr) – 161 ± 116 ppb e cobre (Cu) – 17 ± 1 ppb. Onde ppb significa partes por bilhões e corresponde à uma micrograma da substância por litro de água.Os componentes orgânicos identificados na amostra (peso seco em ng/g) incluem: naftaleno, 49,23ppb; acenaftileno, 179,48ppb;fluoreno, 683.94ppb; antraceno, 94,73ppb; pireno, 12.838,27ppb; benz[a]antraceno, 1162,73ppb; benzo[b]fluoranteno, 789.93ppb; benzo[k]fluoranteno, 562,8ppbe benzo[a]pireno, 1642.28ppb.

Tabela 1: Concentração dos principais compostos metálicos (ppb) e orgânicos (ppb) presentes na amostra de PED.

Metais	PED	HPAs	PED
Níquel (Ni)	181±37	Acenaftileno	179,48
Ferro (Fe)	74,556±2,266	Fluoreno	683,94
Chumbo (Pb)	50±47	Pireno	12838,3
Cádmio (Cd)	29±8	B[a]antraceno	1162,73
Cromo (Cr)	161±116	B[b]fluoranteno	789,93
Cobre (Cu)	17±1	B[k] fluoranteno	562,28
		B[a] pireno	1642,28

NOTA .Concentração dos metais foi determinada por espectrometria de fluorescência dispersiva de raios X, valores apresentados em médias ± DP. A concentração dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica.

3. 2. 4. Exposição isolada dos elementos: solução de metais

Experimento realizado no Centro de Bioterimos da FMUSP.

A partir da análise dos hidrocarbonetos e metais, descritas anteriormente,foi realizada uma exposição utilizando o grupo dos metais. Essa exposição teve por finalidade a avaliaçãodo efeito da exposição aguda á combinação de metais, presentes nas PED, no sistema reprodutivo de fêmeas de *zebrafish.*

3. 2. 5. Diluição dos metais

Os elementos utilizados foram o Níquel (Ni) (solução padrão da *SCP Science*®); Ferro (Fe) (solução padrão da *Sigma-Aldrich*®); Chumbo (Pb) (solução padrão da *Fluka*®); Cádmio (Cd) (solução padrão da *SPC Science*®); Cromo (Cr) (solução padrão da *Fluka*®) Cobre (Cu) (solução padrão da *SPC Science*®).

As soluções padrões dos elementos utilizados nas exposições toxicológicas foram doadas pela empresa *Toxikón*® - Assessoria Toxicológica LTDA, através do químico Paulo Dirceu Luchini.

Os compostos foram diluídos em água deionizada (*Milli-Q*) de acordo com as concentrações encontradas na tabela 1. Por serem solúveis em água, os metais não necessitam de solventes orgânicos na sua diluição, evitanto com que haja possíveis reações químicas com os outros elementos. Os elementos foram diluídos a partir do padrão de concentração de 1000mg/L.

3. 2. 6. Exposição das fêmeas aos metais

As fêmeas foram expostas à combinação de metais em ensaio estático e o controle em aquários de 3 litros durante o período de 3 dias, com 6 fêmeas água com temperatura ambiente, fotoperíodo 14h/10h dia/noite, com aeração constante e sem alimentação durante o período de

exposição (os peixes foram alimentados antes da exposição). Experimento realizado em triplicata (figura 5).

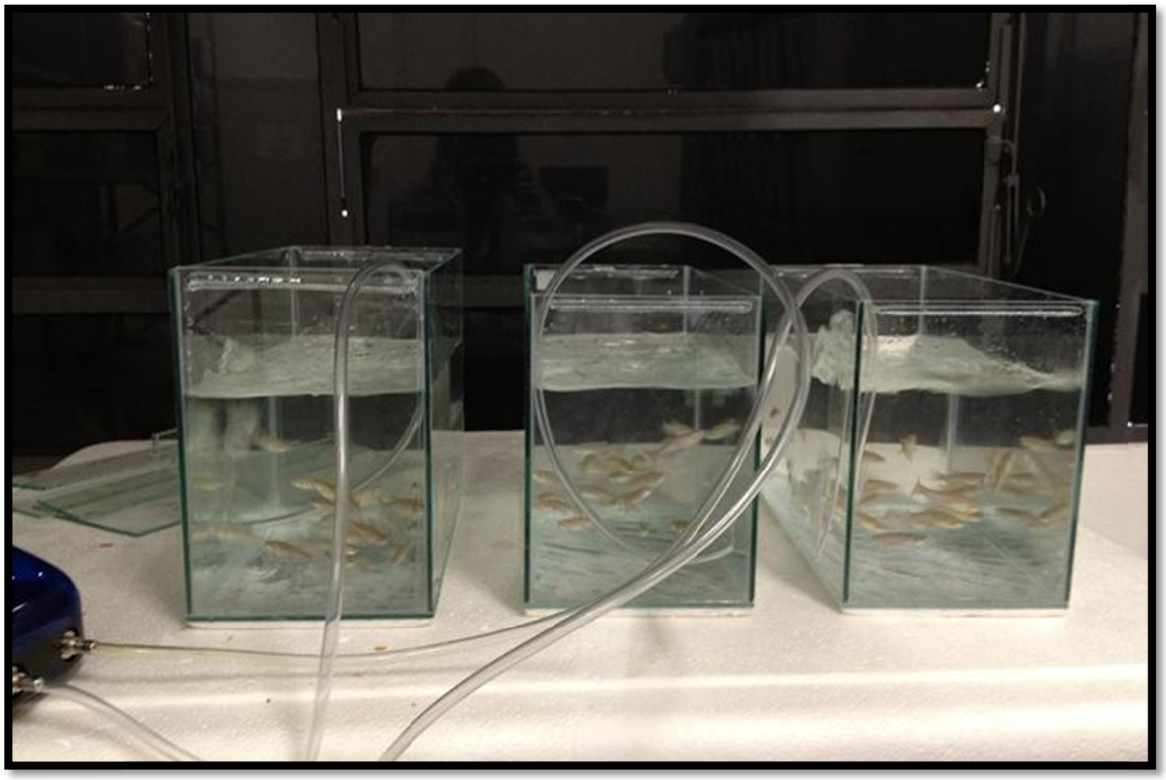


Figura 5. Exposição aguda dos peixes *zebrafish* fêmeas à concentrações de metais.

Após a exposição, 4 fêmeas de cada aquário foram separadas para análise molecular e 2 fêmeas de cada aquário foram separadas para análise histológica.

As fêmeas de *zebrafish* foram anestesiadas com benzocaína, sacrificadas, medidas e pesadas. Foi medido o comprimento total do animal, o comprimento padrão (medida da cabeça até a extremidade da última vértebra). Os valores apresentaram-se variando entre 3,1cm a 4,4 cm para

comprimento total; 2,6 cm a 3,5 cm para comprimento padrão e 0,275 g a 0,710g de peso corpóreo. Após a pesagem do animal, as gônadas femininas (ovários) foram retiradas e pesadas apresentando intervalo de valores 0,011g a 0,037g, como representado na tabela 2.

Tabela 2. Valores do comprimento total, comprimento padrão, peso corpóreo e peso das gônadas das fêmeas expostas às PED e controle.

	Comp. Total (cm)					Comp. Padrão (cm)				Peso (g)				Peso Gônada (g)			
	N	**Min**	**Max**	**Média**	**D.P.**	**Min**	**Max**	**Média**	**D.P.**	**Min**	**Max**	**Média**	**D.P**	**Min**	**Max**	**Média**	**D.P**
Expostos	9	3,400	4,400	3,800	0,310	2,700	3,500	3,100	0,200	0,376	0,710	0,531	0,119	0,011	0,037	0,026	0,008
Controle	9	3,100	3,900	3,500	0,250	2,600	3,100	2,700	0,200	0,275	0,461	0,339	0,061	0,011	0,034	0,017	0,011

N - número de indivíduos avaliados por grupo (expostos/controle), **Min**- valor mínimo encontrado, **Max** - valor máximo encontrado, **D.P**- desvio padrão

3. 4. Análise histológica das gônadas

A análise morfológica das gônadas foi feita através da histologia no Laboratório de Endocrinologia de Peixes do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP. Após a pesagem, as gônadas foram fixadas em solução de *Bowin* por 24 horas. Posteriormente, foram desidratadas em álcool 70%, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina, sendo este um processamento de rotina para confecção de lâminas histológicas. Após o material ser cortado em micrótomo manual na espessura de 5µm, o mesmo foi corado com Hematoxilina-Eosina (HE). Posteriormente, as lâminas histológicas foram analisadas em microscopia de luz (AxioScope - A1, Carl Zeiss, Alemanha) para descrição morfológica, com o intuito de avaliar o estado de maturação do animal e a presença de ovócitos atrésicos. A contagem de ovócitos atrésicos foi utilizada como indicativo de possível alteração decorrente da exposição.

Os ovócitos atrésicos perdem sua forma arredondada típica e apresentam zona radiata fragmentada e grânulos de vitelo desorganizados. Para a sua contagem foi utilizada uma função do software Axiovision 4.8 (Carl Zeiss, Alemanha) chamada “grelha”, comumente utilizada para contagens em microscopia, na qual uma tela de quadrados sobrepõe a imagem proveniente do microscópio. Foram contadas as intersecções dos

quadros em que continham ovócitos atrésicos selecionando 10 planos aleatórios de cada lâmina, tomando cuidado para não repeti-los.

3. 5. Análise molecular

3.5.1. Extração de RNA total para PCR em Tempo Real

O RNA total foi extraído a partir de ovários retirados do *zebrafish*, utilizando o RNA*easy Mini Kit*®(*Quiagen*, Hilden, Germany).

Após a retirada e pesagem das gônadas, os tecido gonadais foram transferidos imediatamente para frascos contendo RNA*later (Ambion*, Austin, TX, USA) e armazenados a -20ºC.

Antes de iniciar o protocolo foi adicionado 10 ul de B-mercaptoetanol por 1 ml de tampão RLT e adicionado 4 volumes de etanol ao tampão RPE.

O tampão RPE é fornecido como um concentrado. Portanto antes do procedimento foi adicionado 4 volumes de etanol (96-100%), como indicado no frasco, para se obter uma solução de trabalho.

Os tecidos estabilizadas no RNA*later* foram removidos com auxilio de uma pinça. Foi feito um *pool* de ovários contendo três ovários de cada grupo (C1, C2, C3; T1 ,T2, T3) representando um total de cerca de 30mg de tecido de cada amostra. Os tecidos foram homogeneizado sem 600 ul Buffer RLT contendo 10 ul de Beta-mercaptoetanol (β-ME) e centrifugados em uma minicentrífuga em velocidade máxima por 3 minutos. Foi adicionado 1 volume de etanol a 70% ao produto e homogeneizado por pipetagem. Foi

transferido 700 uL da amostra, incluindo qualquer precipitado que possa ter se formado, para uma coluna de *spin*RN*easy,* proveniente do kit, colocado em um tubo coletor de 2 ml e centrifugado durante 15 segundos à 10.000 rpm para remover o sobrenadante. Descartou-se o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta. Adicionou-se 350 ul de buffer RW1, este tampão atua no tratamento das DNAses. Centrifugou-se por 15 segundos a 10.000 rpm para lavar a membrana da coluna. Descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 10ul de DNAse I à 70ul de tampão RDD invertendo o tubo gentilmente para misturar o produto e imediatamente centrifugado rapidamente para coletar resíduos restantes na parede do tubo. Foi adicionado 80ul da mistura de DNAse I à membrana da coluna de *spin* RNA*easy* e foi depositada na bancada por 15 minutos em temperatura ambiente (20-30°C) para aumentar o rendimento da extração. Foi adicionado 350ul de tampão RW1 à coluna de spin RN*easy* e centrifugado por 15 segundos à 10.000 rpm. O produto foi descartado.

Adicionou-se 500 ul do tampão RPE à coluna, centrifugou-se por 15 segundos à 10.000 rpm e descartou-se o sobrenadante. Repetiu-se a etapa anterior para aumentar a eficiência. Porém a última foi centrifugada por 2 minutos a 10.000 rpm. A coluna foi colocada em outro tubo coletor de 2 ml e centrifugada durante 1 minuto em velocidade máxima. Em sequência a coluna foi colocada em um novo tubo coletor de 1,5 ml e foi adicionado 50ul de RNA*se-free Water* diretamente à membrana da coluna e centrifugado por 1 min a 10.000 rpm para eluição do RNA.

Os tubos foram armazenados a -80ºC.

3. 5. 2. Análise da qualidade e quantificação do RNA total

Duas alíquotas de 5uL foram separadas, sendo que uma foi utilizada para quantificação e avaliação da pureza do RNA total extraído em espectrofotômetro (*Biophotometer, Eppendorf*, Alemanha) e a outra alíquota foi submetida a eletroforese em gel de agarose a 1% com posterior visualização em transiluminador ultravioleta e fotografadas com sistema digital de captura de imagem ou filme Polaroid® para avaliação da integridade do RNA extraído. O RNA extraído foi então submetido á transcrição reversa (*RT - reverse transcriptionstep*) no qual o DNA complementar (cDNA) foi produzido através do uso de *primers* randômicos provenientes do kit *High Capacity cDNA Archive Kits*®(*Applied Biosystems, The Perkin-Elmer Corporation*, CA, USA), como descrito abaixo .

3. 5. 3. Síntese de cDNA pela reação de transcrição reversa (RT-PCR)

O cDNA foi sintetizado a partir de 1µg de RNA por reação de transcrição reversa utilizando- se o *High-capacity cDNA Reverse Transcription Kits*®(*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, foram adicionados ao RNA:

2µl de do tampão 10x, 0,8 µl do mix de dNTP 100 mM, 2 µl de *randon primer*, 1 µl de inibidor de RNase, 1 µl da enzima *Transcriptase* Reversa e 3,2 µl de água livre de nuclease. Em seguida, a amostra foi incubada a 25ºC por 10 minutos, 37ºC por 120 minutos, 85ºC por 5 segundos e mantida a 4ºC.

Ao final da reação a amostra foi mantida em gelo e o cDNA foi estocado em freezer −20°C.

3. 5. 4. Estudo da expressão por reação de PCR em tempo real

O cDNA obtido na transcrição reversa foi submetido a reações de PCR em tempo real para a quantificação da expressão dos genes *esr1*, *esr2a*, *esr2b* de *zebrafish*. A quantificação dos produtos de RT-PCR foi realizada por um sistema de detecção de seqüências (SDS) *ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Forster City, CA, EUA)* utilizando-se um ensaio 5' nuclease do sistema *TaqMan*®. Para tanto, foi utilizado o Kit *TaqMan Universal PCR Master Mix* 2X ®(*Applied Biosystems, The Perkin-Elmer Corporation*, CA, USA) que contem pares de *primers* exônicos específicos para cada gene, além de sonda específica para o fragmento amplificado pelos *primers*, devidamente testados e otimizados (concentração de *primers* e sondas) por um sistema desenvolvimento de ensaios (*assays by designs* ou *on demand*) desenvolvido pela *Applied Biosystems*, de forma a garantir a amplificação apenas dos produtos desejados, bem como a não amplificação

de DNA genômico. As sondas dos genes alvos*esr1*, *esr2a*, *esr2b* foram marcadas com uma fluorescência FAM, enquanto as dos genes endógenos*ef1a, tuba1, β-actin1, ensa*a, *b2m* foram marcadas com VIC. Estas sondas incitam comprimentos de ondas bem distintos, que emitem sinal captados pela câmera CCD do aparelho.

As reações de amplificação por PCR em tempo real foram realizadas em triplicata e *singleplex* em um volume total de 25 μl contendo 12,5 μl de *TaqMan® Universal Master Mix,* 2μL de Cdna (25ng/ μl), 1,25 μl do ensaio contendo *primers* e sonda específicos para cada gene, em um volume final de 25μL e H_20 a completar. Visando garantir a acurácia das reações, o desvio padrão máximo aceito entre as triplicatas foi de até 0,3. O ensaio foi repetido para confirmação da reprodutibilidade dos resultados.

No final da PCR em tempo real, os resultados foram arquivados em um *software* do *SDS 7000*, para posterior análise.

3. 5. 5. Validação do método $2^{-\Delta\Delta CT}$

Foi realizada a quantificação relativa dos genes em estudo, utilizando como calibrador um *pool* comercial. O cálculo da quantificação de forma a permitir uma comparação expressa em número de vezes foi realizado utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ conforme descrito por Livak em 2001, onde o ΔCT é diferença de expressão entre o gene alvo e o endógeno de uma determinada amostra e o ΔΔCT corresponde a diferença entre o ΔCT de

uma determinada amostra e o ΔCT do calibrador. Para validação do $2^{-\Delta\Delta CT}$ como método de quantificação padronizou-se uma curva de diluição de forma a demonstrar que a eficiência de amplificação do gene alvo e endógeno são as mesmas. Para tanto realizou-se diluições ½ progressivas de amostras de cDNA (100 ng a 0,01ng) de forma a verificarmos se a diferença entre elas é de um ciclo (CT). A curva padrão foi realizada em um experimento de mesmo tubo (*singleplex*), e em tubos separados *(multiplex)* de forma a padronizarmos os dois experimentos; a mesma, como recomendado, é realizada tanto para o gene endógeno, quanto para os genes alvos. Cada ponto da reta é estabelecido pela relação do *log* da quantidade da amostra no eixo das abscissas e o C_T da mesma no eixo das ordenadas. O experimento é validado por uma equação da reta, em que a inclinação da mesma seja mais próximo de -3,3 com uma relação $r > 0.99$.

Os dados foram analisados em software “Sigma Stat for Windows” (Systat Software, Inc.)

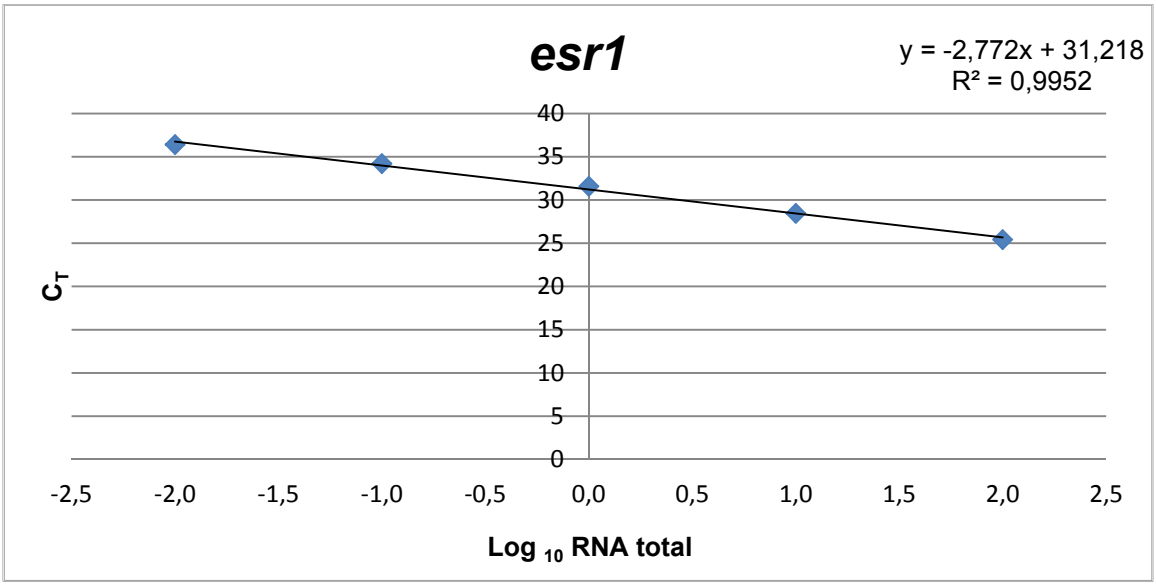


Gráfico 1. Curva – padrão de amplificação do gene alvo *esr1*.

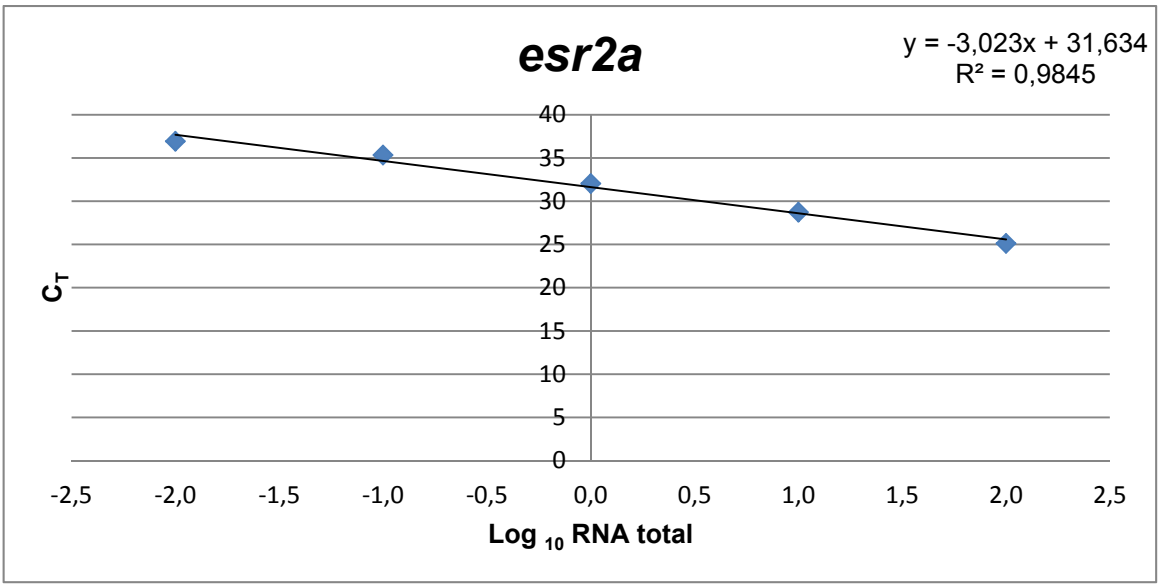


Gráfico 2. Curva – padrão de amplificação do gene alvo *esr2a*.

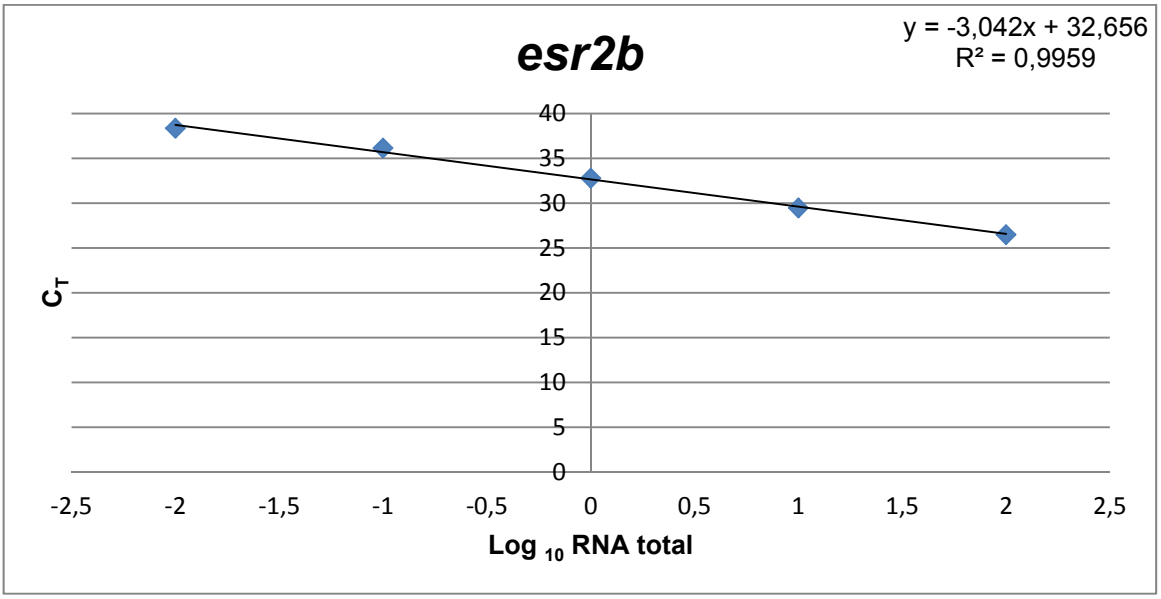


Gráfico 3. Curva – padrão de amplificação do gene alvo *esr2b*.

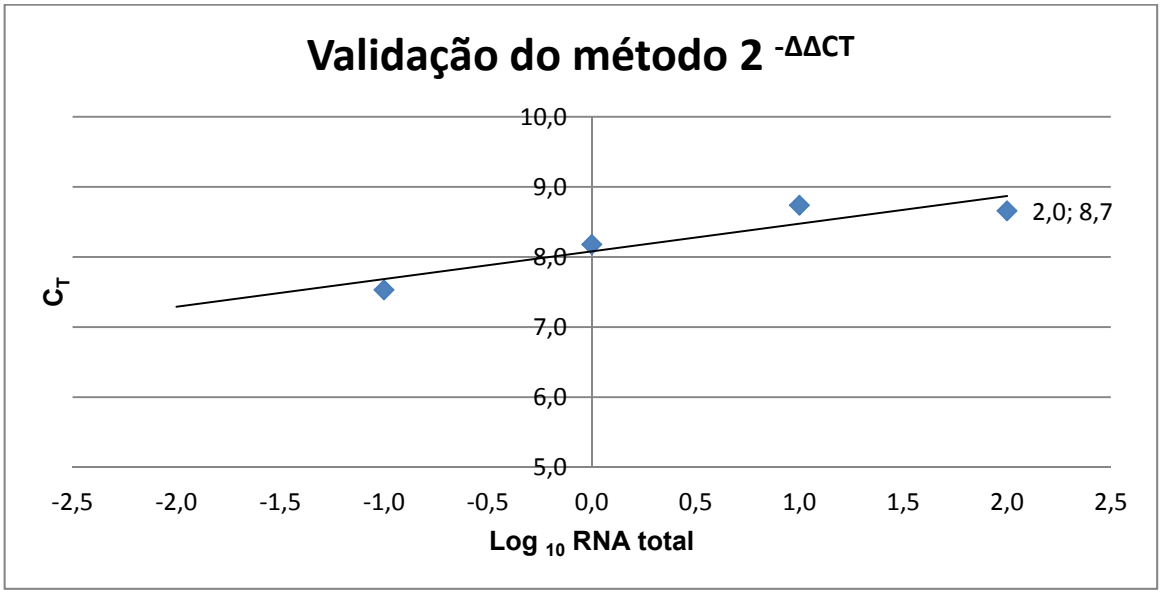


Gráfico 4. Experimento de validação do método 2 $^{-\Delta\Delta CT}$. Validação para os genes alvo *esr1* e gene endógeno *β-actin*.

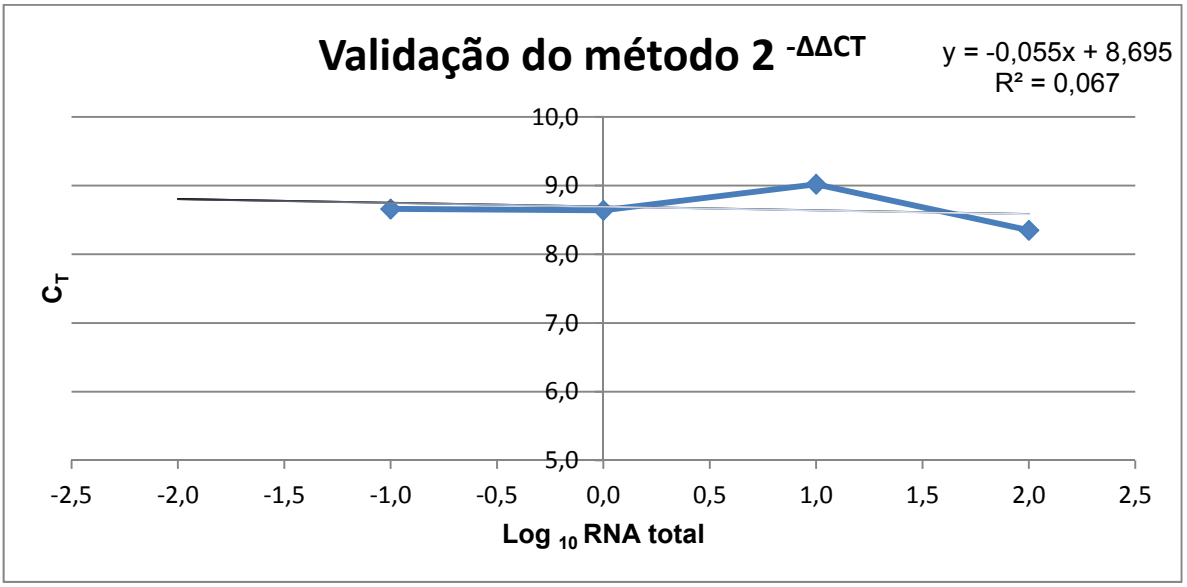


Gráfico 5: Experimento de validação do método 2 $^{-\Delta\Delta CT}$. Validação para os genes alvo *es2a* e gene endógeno *β-actin*.

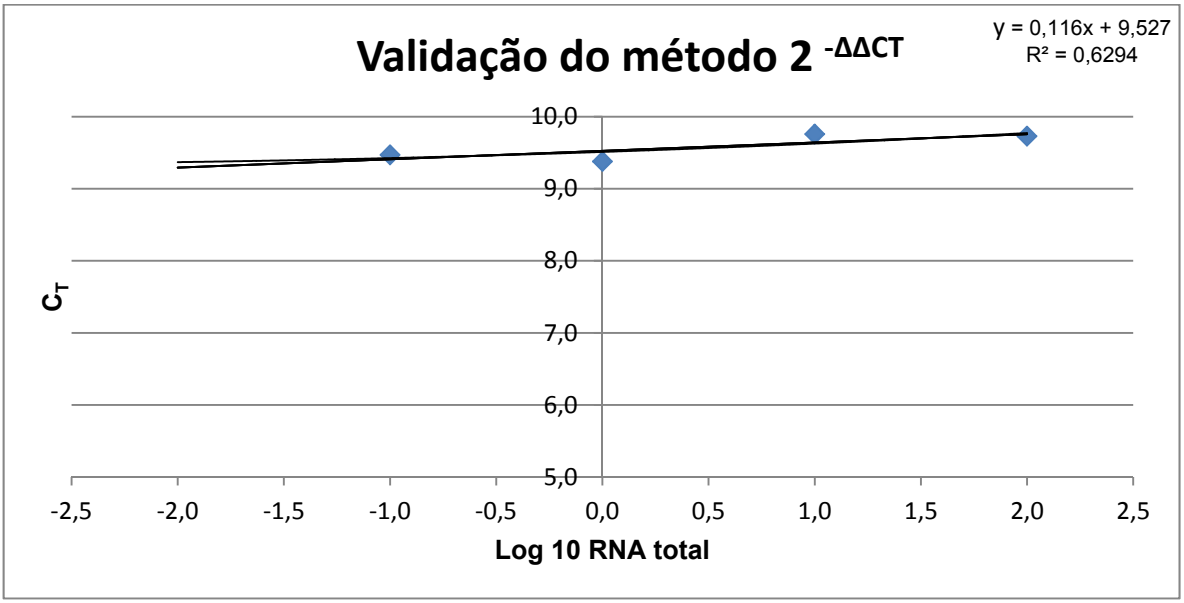


Gráfico 6. Experimento de validação do método 2 $^{-\Delta\Delta CT}$. Validação para os genes alvo *es2b* e gene endógeno *β-actin*.

3.5.6. Escolha dos genes endógenos

Quando se emprega a técnica de estudo de expressão em tempo real, para se obter uma interpretação confiável dos resultados bem como ser capaz de detectar pequenas mudanças nos níveis de expressão, é necessária uma normatização precisa. Nos cálculos da quantificação relativa uma estratégia comum de normalização é a amplificação de um ou mais genes endógenos controles, em paralelo ao gene alvo. Um gene endógeno considerado ideal deve exibir uma expressão constitutiva e estável nas amostras investigadas. A escolha de um gene endógeno inadequado pode gerar resultados alterados. Sendo assim, para escolhermos quais seriam os melhores genes endógenos para os tecidos de ovário de *zebrafish* neste estudo, foram testados 5 genes endógenos (tabela 6). Dentre eles foram escolhidos a *β-actin,o b2m* e o *ef1-α.* A média geométrica da expressão dos três genes foi usada então, como gene endógeno no cálculo $2^{-\Delta\Delta CT}$

Tabela 3. Genes alvos e endógenos estudados por PCR em tempo real

Símbolo	Nome do gene	Função	Número de identificação
esr1 (A)	Receptor de estrógeno 1	Sequencia específica de ligação de DNA	NM_152959
esr2a (A)	Receptor de estrógeno 2a	Sequencia específica de ligação de DNA	AAH44349
esr2b (A)	Receptor de estrógeno 2b	Sequencia específica de ligação de DNA	AAH86848
ensaa (E)	Endosulfina alfa a	Proteína inibidora de fosfatase	NM_001045184
β-actin (E)	*Beta-actina1*	Proteína ligadora de ATP	NM_131031
b2m (E)	beta-2-microglobulina	Processamento de antígenos e apresentação de antígeno do peptídeo via MHC classe 1	NM_131163
ef1-α (E)	*Fator de alongamento 1- α*	Fator de alongamento/Ligante da proteína GTP	NM_131263
tuba1 (E)	*Tubulina*	Processo catabólico de GTP	NM_194388

(A) genes alvos (E) genes endógenos

NOTA. Informações obtidas através do site: http://zfin.org/

3. 6. Análise estatística

Para a análise comparativa do número de ovócitos atrésicos encontrados nos animais expostos e controles foi utilizado o test t de Student em virtude da distribuição normal das variáveis numéricas.

A análise estatística foi realizada com o programa SPSS (versão 13.0, SPSS *Incorporation*). As variáveis contínuas foram expressas como média e desvio padrão. E o teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as variáveis numéricas.

Para toda análise estatística tomou-se como valor significante $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. 1. Implantação de estudos toxicológicos com *zebrafish* (*Danio rerio*) na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

De acordo com o protocolo de USEPA o *zebrafish* necessita de condições ambientais adequadas para a sua sobrevivência e reprodução em cativeiro, como descrito anteriormente na metodologia.

Inicialmente foi cedido um espaço temporário e limitado no laboratório de poluição atmosférica experimental (LPAE - LIM 5) da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP) para a instalação de parte dos aquários para a ambientação e manutenção de nossas matrizes obtidas em lojas especializadas. Porém esse local não oferecia as condições necessárias, provocando elevado nível de estresse nos animais, crescimento de algas devido à incidência de luz solar direta nos aquários, determinando alto índice de morte.

Com o intuito de adquirir um espaço definitivo e adequado para os nossos animais, fizemos contato com o Biotério Central da FMUSP, responsável por manter e criar animais para pesquisa. Este mostrou grande interesse em iniciar trabalhos experimentais com o *zebrafish*, disponibilizando uma sala exclusiva para a instalação dos aquários, criação dos animais e desenvolvimento do nosso projeto que é pioneiro no Brasil. Após o contato com alguns pesquisadores que trabalham com *zebrafish*, percebemos que o desenvolvimento do projeto seria muito menos trabalhoso, mais rápido e adequado se utilizássemos o sistema de aquários *Zebrafish Housing System* (ZEBTEC, *Tecniplast*) (figura 6).

Entramos em contato com o fornecedor para obter maiores informações e para discutir a exeqüibilidade do projeto utilizando esse sistema, uma vez que seria a primeira vez que um pesquisador o utilizaria para pesquisa com poluição atmosférica. Após contato com o representante da *Tecniplast* no Brasil e com os técnicos da *Tecniplast* na Itália, confirmamos a exeqüibilidade do projeto através desse sistema, assim, solicitamos a FAPESP a compra do ZEBTEC por meio de Auxílio à Pesquisa - Regular (2009/03980-0).

A sala disponibilizada pelo Biotério Central da FMUSP permaneceu em reforma durante um ano para a preparação do encanamento, da rede elétrica, da ventilação e da iluminação para a instalação do sistema ZEBTEC, além de criar as condições ideais para a sobrevivência e reprodução dos animais.

Apesar de a sala ter ficado adequada, a demora do processo de importação do ZEBTEC não permitiu que esse trabalho fosse desenvolvido no sistema. Portanto, foi necessário desenvolver o projeto em aquários convencionais.

Figura 6. Unidade de *zebrafish* no Centro de Bioterismo da FMUSP.

4. 2. Desenvolvimento do protocolo de diluição e exposição das PED para *zebrafish*

4. 2. 1. Padronização da diluição e da dose subletal

Experimento realizado no laboratório de poluição atmosférica experimental (LPAE - LIM 5).

Esse procedimento foi realizado com a finalidade de avaliar os efeitos comportamentais e de sobrevivência dos animais, a fim de obter as concentrações subletais das PED, já que não há evidência literária sobre o

comportamento do peixe *zebrafish* enquanto exposto às partículas de exaustão do diesel em meio aquoso.

Esse procedimento foi baseado no protocolo realizado por Luiz *et al.*[65] utilizando plantas da espécie *Tradescantia pallida* como bioindicador sendo suas raízes expostas a poluentes provenientes da queima de combustível diesel, em concentrações ambientais, diluídos em meio aquoso, e também baseando-se no guia: *OECD Series on Testing and Assessment: Guidance Documenton Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures* [66].

As diferentes concentrações das soluções utilizadas nesse estudo (400µg/mL, 200µg/mL, 100µg/mL, 50, µg/mL 25 µg/mL, 12,5µg/mL) foram preparadas através de diluição seriada das PED. A partir da concentração 800 µg/mL foram feitas diluições até atingir as concentrações determinadas. O material foi diluído em água filtrada e submetido a um misturador mecânico por duas horas e em seguida transferido para um banho de ultrassom (*Branson® 1510; Branson Ultrasonics Corporation*, Danbury, CT, USA) durante 1 hora para uma maior dissolução das partículas. Em seguida a diluição foi filtrada em filtro de celulose (*Millipore®*) com 3µm de porosidade para eliminar partículas maiores.

Os animais foram separados e colocados em recipientes plásticos com 1L de água com 4 peixes adultos em cada, e expostos às PED em ensaio estático, contendo concentrações decrescentes (400µg/mL, 200µg/mL, 100µg/mL, 50, µg/mL 25 µg/mL, 12,5µg/mL) e o controle durante

o período de 3 dias, água com temperatura ambiente, com aeração constante e sem alimentação durante o período de exposição (os peixes foram alimentados antes da exposição). Experimento realizado em duplicata. (figura 7)

Figura 7. Exposição do *zebrafish* às partículas de exaustão do diesel. Protocolo de experimentação. Os aquários com água de coloração escura representam contém os animais expostos às concentrações decrescentes de PED, os de conteúdo límpido representam os que contém os animais controle.

Os peixes foram avaliados diariamente durante o período do teste observando-se alterações externas como hemorragia, descoloração e malformações. Em caso de morte, os peixes foram retirados dos recipientes.

Comportamentos anormais (em relação ao controle) foram anotados, como os sinais gerais de intoxicação – hiperventilação, natação incoordenada, falta de equilíbrio, inquietude e alteração na alimentação.

Após a exposição dos animais às concentrações decrescentes das PED notou-se que, mesmo nas mais altas concentrações todos sobreviveram e nenhuma alteração comportamental foi observada em relação ao grupo controle, no entanto os animais adquiriram uma coloração escura, sugerindo que as partículas de PED se aderiram ao corpo do animal. Mesmo após agitação e banho de ultra-som, as partículas não se diluíram completamente, e após algumas horas elas começaram a decantar, e no terceiro dia de experimento as partículas já estavam todas aglomeradas no fundo do recipiente deixando a água quase límpida.

Esses resultados sugerem que a parte que seria tóxica para o animal não foi adequadamente absorvida e comprovou o fato de que o diesel é uma substância altamente hidrofóbica, multicomponente e instável em meio aquoso [66].

Diante disso, concluímos que os protocolos de diluição de contaminantes ambientais normalmente utilizados para exposição de animais aquáticos não são aplicáveis às PED por isso desenvolvemos um protocolo de diluição a partir de soluções comerciais de modo que as concentrações de cada elemento permanecesse de acordo com as concentrações encontradas na análise das PED (tabela 1), como descrito no item 3.3.2. da metodologia.

4. 2. 2. Análise histológica de ovário de zebrafish

Em relação ao desenvolvimento oocitário das fêmeas de *zebrafish* foram encontrados os seguintes tipos de fase de maturação:

Oócitos na fase de crescimento primário (PG): células germinativas jovens que estão reunidas em ninhos em regiões vascularizadas. São células pequenas, com um núcleo arredondado e o citoplasma é escasso (figura 8 - A);

Oócito na fase cortical-alveolar (CA): essa fase é caracterizada pelo surgimento de estruturas citoplasmáticas esféricas (deposição lipídica), semelhantes a vacúolos aparentemente vazios, localizados no citoplasma cortical, próximas à membrana. Esses oócitos são caracterizados por estarem em um processo de vitelogênese lipídica, representando a transição entre a fase pré-vitelogênica e vitelogênica. A zona radiata aparece mais espessa e as estriações radiais são mais nítidas quando observadas em um maior aumento no microscópio (figura 8- D);

Oócitos na fase de vitelogênese (Vtg1, Vtg2, Vtg3): o oócito aumenta de tamanho devido à deposição de vitelo de origem endógena e exógena. Os glóbulos de vitelo distribuem-se por todo o citoplasma e o núcleo apresenta

contorno irregular. No início dessa fase a posição do núcleo é central ou levemente excêntrica, evidenciando nucléolos menores. As camadas foliculares e a zona radiata não apresentam mudanças em relação à fase anterior (figura 8- D, E, G);

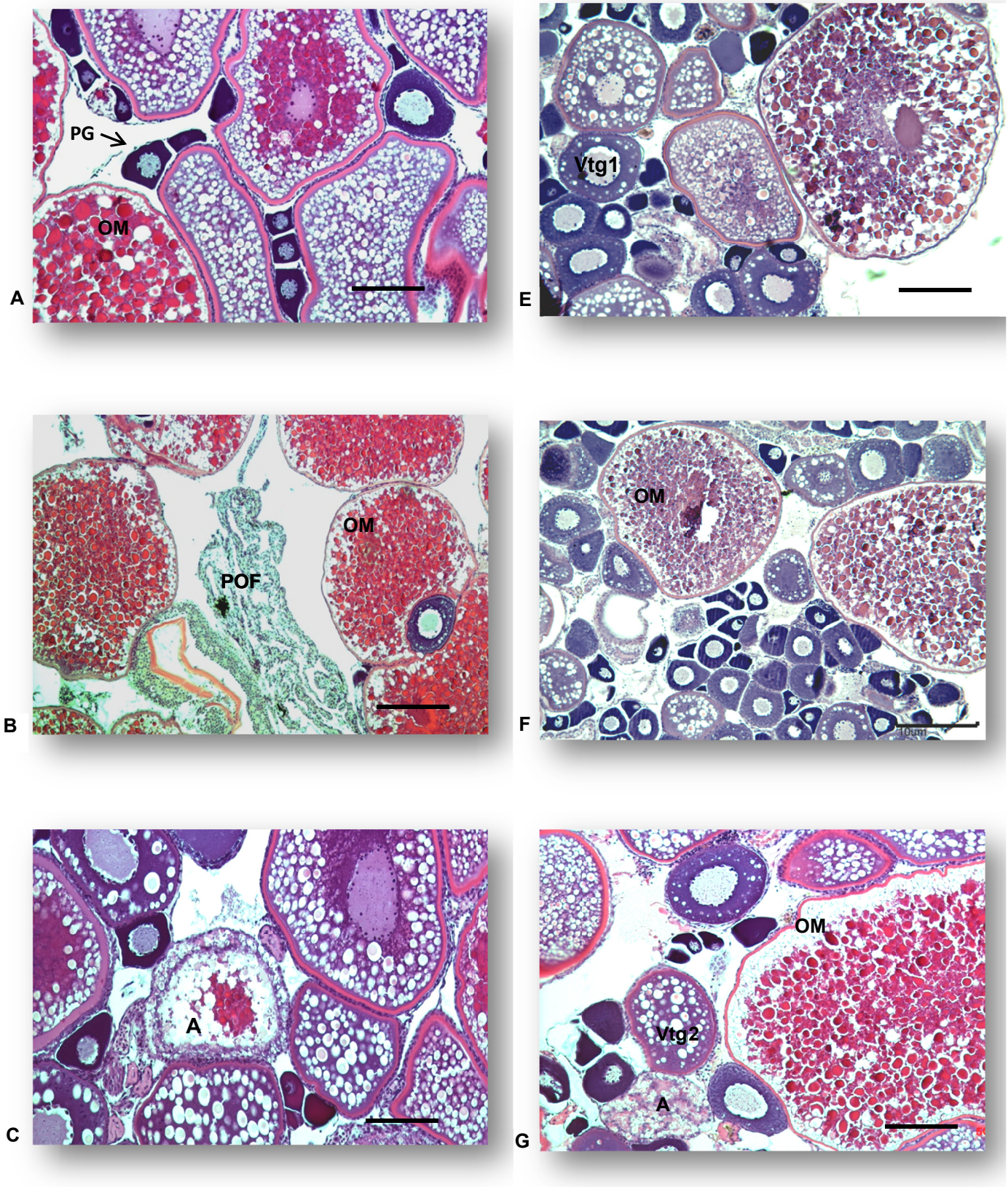
Oócitos na fase madura (OM): nos animais de ambiente natural, o processo de maturação final inicia-se quando os exemplares estão próximos à ovulação. Neste caso, ocorre a migração do núcleo (ou também chamado de vesícula germinativa) em direção à micrópila, região localizada na periferia do oócito, na qual, ocorre a entrada do espermatozóide e posteriormente a fusão dos núcleos dos gametas . Observando apenas a zona radiata é possível identificar as típicas estrias radiais. Nota-se também, o núcleo desorganizado e nucléolos na periferia do oócito (figura 8- A, B, D, F, G);

Folículo pós-ovulatório (POF) : é uma estrutura enovelada e sem células em seu lúmen, formada durante o período de desova, após a ruptura da camada folicular e liberação do oócito para o meio externo. A camada folicular (granulosa e teca) permanece no ovário após a desova, tendendo a colapsar devido à pressão mecânica. Essa estrutura, com o passar do tempo, também será reabsorvida pelo organismo, sendo assim indicadora de desova iminente (figura 8 – B, D, H);

Oócitos atrésicos (A): constitui-se de oócitos que, por alguma razão (ambiental – mudanças de temperatura, salinidade, fotoperíodo, exposição a compostos químicos, entre outros fatores – ou alteração fisiológica), não foram liberados e são absorvidos pelo organismo. Todas as estruturas constituintes de um folículo ovariano (oócitos e camadas foliculares) serão absorvidas. Os grânulos de vitelo, quando presentes, perdem sua individualidade, constituindo uma massa amorfa de substância acidófila. O aspecto é de um oócito sem forma, apresentando vacúolos dependendo da fase de degeneração, sendo observado também um floculado amarelado. O oócito atrésico pode ocorrer em qualquer fase de desenvolvimento oocitário (figura 8- C, G, H).

O indício de que o animal é adulto e que está apto à reprodução é observado pela presença de ovócito maduro e de ovócito pós-ovulatório. Neste trabalho foram encontrados tanto nos ovário de animais controles quanto nos expostos a presença de ovócitos maduros e pós–ovulatórios (figura 8), comprovando que todos os animais utilizados no experimento estavam em idade adulta e atingiram idade reprodutiva.

Em relação a contagem de ovócitos atrésicos a média observada nos animais expostos foi de 1,5 ± 0,4 e nos controles foi de 1,34 ± 0,3. Contudo, não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).


PG
OM
A
Vtg1
E
OM
POF
B
OM
F
A
C
OM
Vtg2
A
G

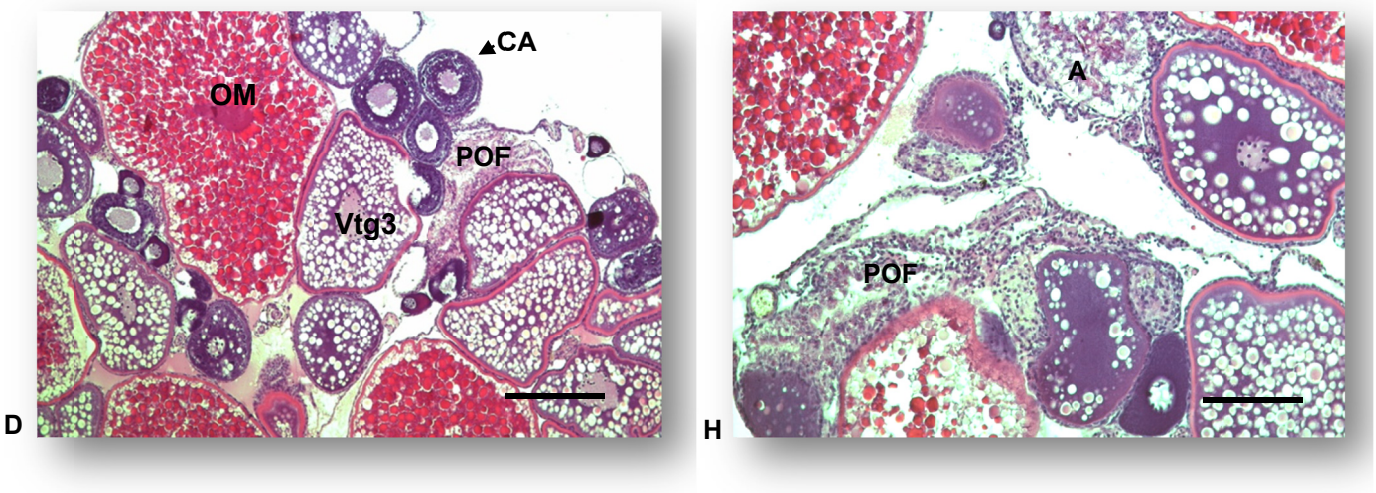


Figura 8. Secções histológicas de ovário de fêmeas adultas de *zebrafish* expostas aos metais e controles apresentando as diferentes fases do desenvolvimento oocitário. Coloração por H&E – Hematoxilina e Eosina. **A:** controle 1- PG: oóvito em crescimento primário, OM: oócito maduro; **B:** controle 2 - POF: folículos pós-ovulatório, OM: oócito maduro; **C:** controle 3 - A : oócito atrésico; **D:** controle 4 - OM: oócito maduro, CA: oócito cortical-alveolar, POF: folículo pós-ovulatório, Vtg3: oócito vitelogênico terciário; **E:** exposto 1- Vtg1: oócito vitelogênico primário ; **F:** exposto 2 - OM: oócito maduro; **G:**exposto 3 - Vtg2: oócito vitelogênico secundário; **H:**exposto 4 – POF: folículo pós-ovulatório, A: folículo atrésico.

4. 3. PCR em tempo real

O PCR em tempo real é uma ferramenta para estabelecer os níveis de expressão de mRNA de moléculas específicas em tecidos. Nesse estudo essa metodologia foi utilizada para avaliar a expressão de três receptores de estrógenos, *esr1, esr2a e esr2b* em um *pool* de tecido ovariano de *zebrafish*.

Na análise da quantificação absoluta utilizada para a escolha dos genes endógenos controles (validação do método $2^{-\Delta\Delta CT}$), os resultados mostraram que dentre os genes selecionados, a *β-actin,* o *b2m,* e o *ef1-α* foram os que apresentaram valores de *threshold* mais estável dentre os outros genes testados, sendo estes selecionados para a análise por PCR em tempo real.

Já na análise de expressão por quantificação relativa, os três genes receptores de estrógeno (*esr1, esr2a, esr2b*) obtiveram média: 0,68; 1,32; 0,54; respectivamente. O gene *esr2a* apresentou um aumento de expressão em relação aos demais, contudo, não houve alteração significativa na expressão desses genes em relação aos controles. Todos os valores se apresentaram dentro do intervalo de normalidade (0,5 - 2,0) (gráfico 7).

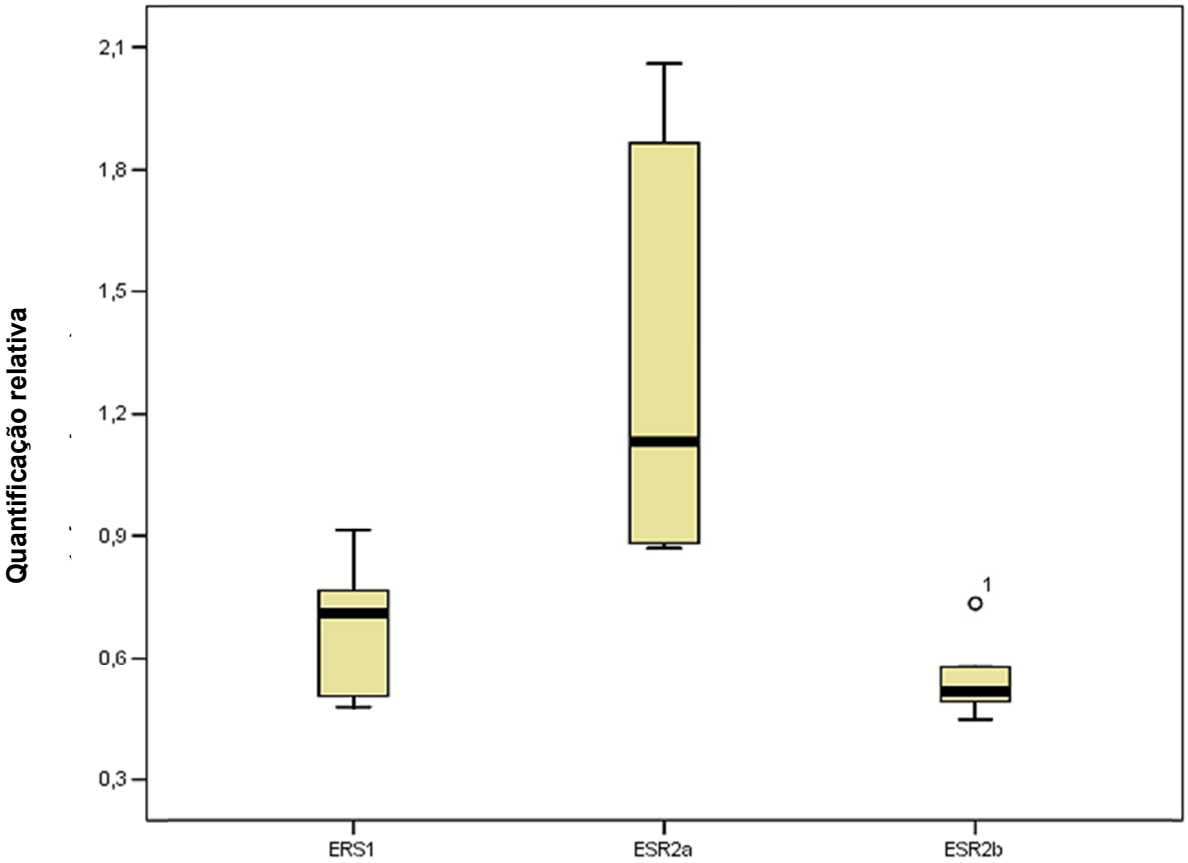


Gráfico 7 : Quantificação relativa da expressão gênica dos três receptores de estrógenos (*esr1, esr2a, esr2b*) em ovário de *zebrafish* por PCR em tempo real. A linha preta (▬) dentro de cada caixa representa os valores médios e as extremidades (T) os valores máximos e mínimos, e o *outlier* (°) representa um valor aberrante. A variação dos níveis de expressão de cada gene encontra-se dentro do intervalo de normalidade em relação ao grupo controle (0,5 – 2,0).

DISCUSSÃO

Apesar do número de estudos toxicológicos *in vivo* que utilizam o *zebrafish* como biomarcador estar crescendo exponencialmente nas últimas décadas, não há, até o momento, nenhuma descrição da utilização de PED diluída no meio aquoso.

Com o intuito de introduzir simultaneamente duas novas frentes de pesquisa na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, estudos com *zebrafish* e estudos envolvendo substâncias do meio ambiente com atividade de desregulador endócrino, criamos a Unidade de *Zebrafish* no Biotério Central e desenvolvemos um protocolo de exposição às partículas de exaustão de diesel.

A escolha das PED no desenvolvimento deste trabalho advém do fato de este ser um sub-projeto do INCT-CNPq: INAIRA sob coordenação do Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, cuja linha de pesquisa envolve principalmente os efeitos da poluição atmosférica na saúde humana. Experimentos com PED já vêm sendo desenvolvidos no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da FMUSP (LPAE) em camundongos há vários anos. Considerando as vantagens do *zebrafish* como biomarcador, levantamos a hipótese que poderíamos mimetizar a exposição humana às PED através das vias respiratórias.

A partir dos resultados obtidos no protocolo pré – experimental, baseado em estudos anteriores desenvolvidos no LPAE com plantas [(66)] e embriões de galinha [(67)], observamos que as PED são se diluíam na água,

mas depositavam-se no fundo do aquário de modo que, após algumas horas, a água tornava-se límpida. Arukwe *et al,* analizaram a biotransformação xenobiótica e a esteroidogênese em zebrafish expostos a diferentes concentrações da fração solúvel em água extraída de óleo crú biodegradável (Troll B) que contamina os mares [(41)]. Os autores utilizaram protocolos de caracterização de óleos crus para estudos ambientais descritos anteriormente [(68)] evidenciando que os estudos envolvendo poluentes em animais aquáticos devem utilizar apenas os compostos solúveis em água para que a absorção pelo animal seja adequada.

Desenvolvemos então uma nova metodologia com a finalidade de avaliar o efeito da interação dos elementos traços (metais) presentes nas PED no sistema reprodutivo de *zebrafish*. Os efeitos de alguns destes elementos isoladamente no sistema reprodutivo já está bem elucidado na literatura, no entanto, o efeito da combinação destes nas concentrações emitidas pelos escapamentos dos motores à diesel ainda não foi relatado

Um trabalho realizado *in vitro* com embriões de camundongos expostos ao mesmo material obtido nesse estudo, porém em maiores concentrações (20 µg/cm²) mostrou que o Diesel afeta o desenvolvimento e a qualidade de embriões, sendo capaz de alterar o processo de formação de blastocisto, diminuindo a taxa de células vivas e aumentando a taxa de células em apoptose [(69)].

Tem sido demostrado que a exposição aos metais tem impacto negativo no sistema reprodutivo. Um estudo demostrou que níveis

sangüíneos maternos de chumbo (Pb) de aproximadamente 10 mg / dL têm sido associados a aumento do risco de hipertensão gestacional, aborto espontâneo e desenvolvimento da prole reduzida [72]. Pillai e col. [73] descobriu que o Pb pode afetar a função da membrana pituitária e provocar alterações na ligação ao receptor e mecanismo secretor de hormônios hipofisários.

Das et al. [70] relataram que os ovários de peixes ciprinídeos asiáticos (*Labeo bata*) expostos ao Cd nas concentrações de 4 - 10 mg/L apresentaram uma diminuição de ovócitos maduros e também uma proporção significativamente maior de folículos atrésicos em comparação com os ovários de fêmeas não expostas. Concentrações maiores que>10 mg/L deste metal foram fatais para os peixes. O valor de toxicidade aguda de Cd neste peixe foi de 2,8-10,5 mg/L, já em baixas concentrações não provoca muitas alterações em ovários [70].

Chouchene *et al.* [71] investigaram os efeitos da exposição subcrônica (3 semanas) ao Cd na concentração de 0.4 mg/L em ovários de *zebrafish*. Os resultados mostraram que a exposição de fêmea adulta ao metal afeta negativamente a histologia gonadal, evidenciada por um aumento da proporção de folículos atrésicos, proporção reduzida de ovócitos vitelogênicos e redução da formação do vitelo nestes últimos.

Ovócitos atrésicos são de ocorrência relativamente comum em ovários de teleósteos [71]. A degeneração dos ovócitos, ou atresia folicular, é

um processo que pode ocorrer antes e após a desova, em ambientes naturais ou artificiais. Ocorre normalmente antes da desova nos ovócitos que não alcançaram a maturidade e, após a desova, naqueles que deixaram de ser eliminados [71].

No entanto, o aumento da atresia, particularmente nas fases posteriores de desenvolvimento de ovócitos, pode indicar uma condição patológica e tem sido associado com a exposição aos contaminantes ambientais. O aumento da frequência de folículos atrésicos tem sido observado após a exposição dos animais a vários compostos desreguladores endócrinos com diferentes modos de ação. Em vários estudos, o aumento da atresia foi acompanhado por diminuição do débito reprodutivo, que se traduz pelo sucesso de fertilização e fecundidade.

O nosso estudo baseou-se na exposição aguda dos animais aos metais existentes nas PED, de acordo com os protocolos de exposição aguda já padronizados em outros estudos [60,64,67]. O Cd e o Pb foram utilizados em concentrações mais baixas que as referidas nos estudos acima [71], porém em combinação com os demais elementos traços encontrados nas PED observamos que a exposição aguda de fêmeas adultas à concentrações ambientais do combinado de metais presentes nas partículas de exaustão de diesel (Ni =0,181 mg/L ; Fe =0,07455 mg/L ; Pb= 0,05 mg/ L; Cd = 0,029 mg/L; Cr = 0,161 mg/L ; Cu = 0,017 mg / L) não alterou o número de folículos atrésicos nos ovários dos animais expostos.

Da mesma forma, o nosso estudo demonstrou que a exposição aguda aos metais não provocou alteração na expressão dos receptores de estrógeno de fêmea adulta de *zebrafish.* O gene *esr2a* apresentou-se mais expresso em relação aos genes *esr1* e *esr2a* em ambos os grupos de animais, expostos e controles. Menuet e col. [74], demostraram que o gene *esr2a* apresenta maior sensibilidade ao estradiol (E_2), e é capaz de induzir um gene repórter em concentrações mínimas (10^{-11} M E_2). Esta alta sensibilidade pode ser devido a uma maior afinidade para o E^2..

A análise dos níveis de mRNA dos receptores α eβ no tecido cerebral de *zebrafish* após exposição a fração solúvel em àgua de óleo crú mostrou que a expressão diminuía com o aumento das concentrações do poluente sugerindo que o(s) composto(s) presentes na fração solúvel em àgua do óleo crú exerce um efeito de *downregulation* nesses receptores, provavelmente alternado a esteroidogênese cerebral dos animais [41].

Uma possibilidade para o resultado negativo obtido é que a dose da exposição tenha sido insuficiente para alterar os parâmetros escolhidos, bem como o tempo de exposição. A resposta a poluentes além de depender da concentração e do tempo de exposição, também depende da fase de desenvolvimento em que se encontra o indivíduo. O estudo realizado por Reis e col. em um município industrializado no Rio de Janeiro evidenciou que, mesmo em níveis mais baixos que os recomendados pela legislação vigente, é possível observar os efeitos negativos da poluição sobre a gravidez, como baixo peso ao nascer e prematuridade. Além disso, a relação

entre a exposição aos desreguladores endócrinos intra-útero e na fase neonatal com os distúrbios reprodutivos na mulher adulta está bem estabelecido em ambos estudos epidemiológicos e em animais [75].

Outra possibilidade seria em relação ao desenho do estudo. Os efeitos dos compostos com atividade de desreguladores endócrinos devem ser, preferencialmente, avaliados por duas ou mais gerações, pois os compostos que podem atingir diretamente o ovário podem alterar mecanismos epigenéticos no oócito, levando a efeitos epigenéticos transgeracionais [75]. Devido às dificuldades enfrentadas na instalação dos aquários e de um local adequado para reprodução dos animais, não foi possível a análise de diferentes gerações.

Não há dúvidas que a poluição ambiental, particularmente o Diesel, tem efeito negativo sobre o sistema reprodutivo. Há um vasto número de publicações e evidências que comprovam essa afirmação, porém a resposta provocada pela exposição é dependente da concentração, do tempo de exposição, e do estágio de desenvolvimento do indivíduo.

A exposição a esses agentes tóxicos, incluindo outros desreguladores endócrinos, frequentemente ocorre através de fontes que não são previstas pelo indivíduo ou pela comunidade. Tanto a água quanto os alimentos podem conter uma grande variedade de substâncias tóxicas (resíduos de pesticidas, agrotóxicos, metais, hormônios, antibióticos e resíduos industriais).

As possíveis conseqüências da exposição aguda ou crônica a estas substâncias em relação ao sistema reprodutivo ainda não estão bem definidas. Resultados conflitantes na literatura podem ser conseqüência da grande variedade de desenhos de estudos sobre o tema.

Com a implantação da Unidade de *Zebrafish* no Biotério Central da FMUSP, o aperfeiçoamento dos protocolos de exposição às substâncias presentes na poluição atmosférica e novos estudos toxicológicos envolvendo substâncias com atividade de desregulador endócrino poderão ser realizados em diferentes gerações, auxiliando de forma significativa na identificação de novos mecanismos de ação destes compostos nos sistemas endócrinos.

Os resultados destes estudos experimentais poderão elucidar os efeitos dos compostos presentes na poluição atmosférica com atividade de desreguladores endócrinos em seres humanos uma vez que estas observações têm um impacto importante sobre a saúde reprodutiva das mulheres que vivem nas grandes áreas urbanas que estão sujeitas à poluição do ar diariamente.

CONCLUSÃO

Com base em nossos achados, concluímos que:

- Os protocolos de diluição de contaminantes ambientais utilizados para exposição de animais aquáticos não são aplicáveis às PED.

- A exposição aguda de fêmeas de *zebrafish* adultas à concentrações ambientais do combinado de metais presentes nas partículas de exaustão de diesel:

  a. não altera o número de folículos atrésicos nos ovários dos animais expostos.

  b. não provoca alteração na expressão dos receptores de estrógeno dos animais expostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cançado JED, Braga A, Pereira LAA, Arbex MA, Saldiva PHN , Santos UP. Repercussões clínicas da exposição à poluição atmosférica. *J Bras Pneumol*. 2006;32(Supl 1):S5-S11.

2. Rand GM, Wells PG, Mccarty LS. Introduction to Aquatic Toxicology. In: Rand, G.M. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment. Washington, D.C.: *Taylor & Francis* 1995; (3):67.

3. Kampas M, Castana E. Human health effects of air pollution. *Environmental Pollution* 151 2008; 362e367

4. CONAMA. Resolução nº 003. Brasil: CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE 1990.

5. CETESB. Relatório de Qualidade do Ar no Estado de São Paulo 2008. São Paulo: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Secretaria de Estado do Meio Ambiente do Governo do Estado de São Paulo; 2008.

6. CONSEMA. 245ª Reunião Plenária Ordinária do Conselho Estadual de Meio Ambiente Seminário Internacional Políticas Públicas e Padrões de Qualidade do Ar na Macrometrópole Paulista, 2008. Relatório Final. Acesso em: http://www.ambiente.sp.gov.br/uploads/arquivos/conv176_09/Relatorio_do_Seminario.pdf

7. IBGE. Istituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Ministério do Planejamento. IBGE, Cidades [Disponível em: http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1 – acesso em 5 de outubro de 2011.

8. CETESB. Relatório de Qualidade do Ar no Estado de São Paulo 2010. São Paulo: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Secretaria de Estado do Meio Ambiente do Governo do Estado de São Paulo; 2010.

9. Braun S, Appel LG, Schmal M. The pollution from diesel engines - the particulate matter current experiences and future needs. *Quím. Nova*, São Paulo June 2004; (3):27.

10. Hansen CS, Sheykhzade M, Moller P, Folkmann JK, Amtorp O, Jonassen T, *et al*. Dieselexhaust particles induce endothelial dysfunction in apoE-/- mice. Toxicol Appl Pharmacol.2007 Feb 15;219(1):24-32.

11. Ohyama M, Otake T, Adachi S, Kobayashi T, Morinaga K. A comparison of the production of reactive oxygen species by suspended particulate matter and diesel exhaust particles with macrophages. *Inhal Toxicol.* 2007;19 Suppl 1:157-60.

12. Kagawa J. Health effects of diesel exhaust emissions*/a mixture of air pollutants of worldwide concern. *Toxicol*. 181-182 (2002) 349-353.

13. Chatterjje S. Retrofit emission control tecnologies for heavy duty Diesel engines – The state of art. *Jonhson Matthey Catalysts*. BAQ. 2004.

14. Scheepers PTJ, Bos RP. International Archives of Occupational and *Environmental Health* 1992, 64, 163.

15. Bayram H, Ito K, Issa R, Ito M, Sukkar M, Chung KF. Regulation of human lung epithelial cell numbers by diesel exhaust particles. *Eur Respir J*. 2006 Apr;27(4):705-13.

16. Ming-Ho Y. Environmental toxicology: impacts of environmental toxicants on living systems Boca Raton, Florida: CRC Press LLC; 2001.

17. Saldiva PHN, Pope CA III, Schwartz J, Dockery D, Lichtenfels AJFC, Salge JM, Barone IA, Böhn GM. Air pollution and mortality in elderly people: a times-series in São Paulo. *Archives of Environmental Health*. 1995, 50:159-163.

18. Barnett AG, Williams GM, Schwartz J, Neller AH, Best TL, Petroeschevsky AL, et al. Air pollution and child respiratory health: a case-crossover study in Australia and New Zealand. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jun 1;171(11):1272-8

19. Daar A, Merali Z. Infertility and social suffering: the case of ART in developing countries.In: Vayena E, Rowe P, Griffin P, editors. Current practices and controversies in assisted reproduction: report of a WHO meeting. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2002. p. 15-

20. IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD 2006). Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 30/06/2011

21. IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Perspectiva da população brasileira por sexo e idade – 1980 -2050. Disponível em : www.ibge.gov.br/presidencia/noticias, acesso em : 30/06/2011

22. Ghiselli G, Jardim W F. Interferentes endócrinos no ambiente. *Quim. Nova*. 2007, Vol. 30, No. 3, 695-706.

23. Whaley DA, Keyes D, Khorramil B. Incorporation of endocrine disruption into chemical hazard scoring for pollution prevention and current list of endocrine disrupting chemicals. *Drug and Chemical Toxicology* 2001; (4):359-420.

24. Soto AM, Sonnenschein C. Disruptores endocrinos: una historia muy personal y con múltiples personalidades. Gac Sanit. 2002, vol.16, n.3, 209-211.

25. Colboen T. O futuro roubado. Porto Alegre: L&PM, 2002, 354 p

26. Bowler RM, Cone, JE. Segredos em medicina do trabalho. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001,396 p

27. Birkett JW, Lester JN. Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes, 1st ed., IWA Publishing, Lewis Publishers CRC Press LLC: USA, 2003.

28. Lintelmann J, Katayama A, Kurihara N, Shore L, Wenzel A. Endocrine disruptors in the environment. *Pure Appl. Chem*. 2003**,** 75, 631.

29. Moraes NV, Grando MD, Valerio DAR, Oliveira DP. Exposição ambiental a desreguladores endócrinos: alterações na homeostase dos hormônios esteroidais e tireoideanos.*Revista Brasileira de Toxicologia*. 2008, 21, n.1; 1 – 8.

30. Murahashi T, Sasaki S, Nakajima T. Determination of Endocrine Disruptors in Automobile Exhaust Particulate Matter. *Journal of Health Science*. 2003, 49(1) 72-75.

31. Murahashi T, Sasaki S, Nakajima T. Determination of Endocrine Disruptors in Automobile Exhaust Particulate Matter. *Journal of Health Science*. 2003, 49(1) 72-75.

32. Albertini S, Carmo, LF, Prado FLG. Isotermas de adsorção de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae. Ciênc. Tecnol. Aliment.,* Campinas, v. 21, n. 2, Aug. 2001

33. WHO. World Health Organization. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Sixty-first meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva, 2004. 563 p. Disponível em: <http://www.whqlibdoc.who.int/publications/2004/924166052X.pdf>. Acesso em: 16 maio. 2011.

34. Iavicoli I, Fontana L, Bergamaschi A. The effects of metals as endocrine disruptors. J *Toxicol Environ Health.* 2009;. 12: 206-23.

35. Piasek, M, Laskey JW. Acute cadmium exposure and ovarian steroidogenesis in cycling and pregnant rats. *Reprod. Toxicol.* 1994, 8:495–507.

36. Paksy K, Rajczy K, Forgács Z, Lázár P, Bernard A, Gáti I, Kaáli GS. Effect of cadmium on morphology and steroidogenesis of cultured human ovarian granulosa cells. *J. Appl. Toxicol*. 1997, 17:321–327.

37. Wide M. Interference of lead with implantation in the mouse: effect of exogenous estradiol and progesterone. *Teratology*. 1980, 21:187–191.

38. Furuta C, Suzuki AK, Taneda S, Kamata K, Hayashi H, Mori Y, Li C, Watanabe G, Taya K. Estrogenic activities of nitrophenols in diesel exhaust particles. *Biol Reprod*. 2004; 70: 1527 –1533.

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

40. Tsukue N, Yoshida S, Sugawara I, Takeda K. Effect of Diesel Exhaust on Development of Fetal Reproductive Function in ICR Female Mice, *J. Health Sci.* 2004; (50):174-180.

41. Arukwe A, Nordtug T, Kortner TM, Mortensen AS, Brakstad OG. Modulation of steroidogenesis and xenobiotic biotransformation responses in zebrafish (Danio rerio) exposed to water-soluble fraction of crude oil. *Environ Res*. 2008 Jul;107(3):362-70.

42. Huggett RJ, Unger MA, Seligman PF, Valkirs AO. The marine biocide Tributyltin: Assessing and managing environmental risks. *Environmental Science and Technology* 1992; (26):232–237.

43. Leonzio C, Fossi MC. Nondestructive biomarkers strategy: perspectives and applications. In: M.C. Fossi and C. Leonzio. (eds.). Nondestructive biomarkers in vertebrates. *Lewis Publ*., London 1993; 297-312.

44. Martina Fenske M. Developmental Exposure of Zebrafish (Danio Rerio, Hamilton-Buchanan 1822) to Endocrine-active Substances:

Impact on Vitellogenin, Aromatase and Sexual Differentiation.UFZ, 2002

45. Zhiyuan G, Korzh V. Fish Development and Genetics. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, 2004.

46. Scheil V, Zurn A , Kohler H-R, Triebskorn R. Embryo Development, Stress Protein (Hsp70) Responses, and Histopathology in Zebrafish (Danio rerio) Following Exposure to Nickel. *Environ Toxicol.* 2010 Feb;25(1):83-93

47. Law JM. Mechanistic considerations in small fish carcinogenicity testing. *ILAR J*. 2001;42(4):274-84.

48. Parng C, Seng WL, Semino C, McGrath P. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay Drug Dev Technol.* 2002; (1):41–48.

49. Inohara N, Nunez G. Genes with homology to mammalian apoptosis regulators identified in zebrafish. *Cell Death Differ* 2000; (7):509–510.

50. Costache AD, Pullela PK, Kasha P, Tomasiewicz H. Homology-Modeled Ligand-Binding Domains of Zebrafish Estrogen Receptors , ß1, and ß2: From in Silico to in Vivo Studies of Estrogen Interactions in Danio rerio as a Model System- Molecular Endocrinology. *Endocrine Soc*. 2005.

51. Vazzoler AEAM. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e prática. EDUEM, Maringá, 1996; 169.

52. Histology and Histopathology Atlas of the Zebrafish. Disponível em : http://zfishtoxpat.comoj.com/ovaloc.html). Acesso em : 04/08/2011

53. Koç ND, Aytekin Y, Yüce R.. Ovary maturatıon stages and histological investigation of ovary of the Zebrafish (Danio rerio). *Braz. arch. biol. technol*. 2008, 51, 513-522.

54. Selman K, Wallace RA, Sarka A, Qi X.. Stages of oocyte development in the zebrafish, Brachydanio rerio. *J. Morphol*., 1993, 218: 203-224.

55. Nagahama, Y. The functional morphology of teleost gonads.In: Hoar W.S., Randall D.J., Donaldson E.M. (eds), *Fish Physiology. Academic Press*, New York, 1983 pp. 233-275.

56. Nejedli S, Petrinec S, Ku Ir E, Srebocan E. Annual Oscillation of Ovarian Morphology in European Pilchard (Sardina pilchardus Walbaum) in the Northern Adriatic Sea. *Veterinarski Arhıv*, 2004, 74(2), 97-106.

57. Patiño R, Sullivan CV. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2002, vol. 26, no. 1, p. 57-70.

58. Brown-Peterson NJ, Wyanski DM, Saborido-Rey F, Macewicz BJ, Lowerre-Barbieri SK.: A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes, Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science, 2011, 3:1, 52-70

59. ZFIN: The Zebrafish Model Organism Database. Disponível em :< http://zfin.org>. Data de acesso 15/07/2012.

60. Costache AD, Pullela PK, Kasha P, Tomasiewicz H. Homology-Modeled Ligand-Binding Domains of Zebrafish Estrogen Receptors , ß1, and ß2: From in Silico to in Vivo Studies of Estrogen Interactions

in Danio rerio as a Model System- Molecular Endocrinology. *Endocrine Soc*, 2005.

61. Zunino PAA. Avaliação da desregulação endócrina em peixes expostos a efluente da indústria de papel e celulose. 2006

62. Oliveira-Filho EC. Toxicidade reprodutiva de poluentes ambientais para moluscos de água-doce: estudos com caramujos do gênero biomphalaria. Rio de Janeiro; s.n; 2003; 138 .

63. U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). EPA/68-W-01-023: Fish screening assays for endocrine disruption, Ohio, 2002

64. Laks D, Oliveira RC, André PA, Macchione M, Lemos M, Faffe D, Saldiva PNH, Zin WA. Composition of Diesel Particles Influences Acutre Pulmonary Toxicity: An Experimental Study in mice. *Inhal Toxicol*. 2008.

65. Luiz EJ, Lavendowski IMF, Oliveira GP, Guimarães ET, Domingos M, Saldiva PN. Biomonitoramento da Qualidade do Ar de Santo André com plantas da espécie Tradescantia pallida e a Educação Ambiental, 2005.

66. Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, ENV/JM/MONO 6, 2000.

67. Bueno, HMS, Martins, RSL, Pannuti, C, Santos, RN, Sowmy T, Barbosa-Jr, F, Oliveira, RC, Garcia, MLB, Saldiva, PHN. Metal embryotoxicity from urban particles in São Paulo city: An experimental

study in chicken embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2010, 73: 1385-1390.

68. Dailing, PS, Brandvik, PJ, Mackay, D, Johansen, O, 1990. Characterization of crude oils for environmental purposes. Oil Chem Pollut. 7,199-224; Singer, MM, George, S, Lee,II, Jacobson, S, Weetman, LL, Blondina, G, Tjeerdema, RS, Aurand, D, Sowby,ML, 1998. Effects of dispersant treatment on the acute aquatic toxicity of petroleum hydrocarbons. *Arch Environ Contam Toxicol*. 34, 177-187.),

69. Januário DANF, Perin PM, Maluf M, Lichtenfels AJ, Saldiva PH. Biological Effects and Dose-Response Assessment of Diesel Exhaust Particles on *In Vitro* Early Embryo Development in Mice Toxicol. *Sci*. (2010) 117 (1): 200-208.

70. Das RC. Cadmium toxicity to gonads in a freshwater fish, Labeobata (Hamilton), *Arch. Hydrobiol*. 112 (1988) 467–474.

71. Chouchene L, Banni M, Kerkeni A, Saïd K, Messaoudi I. Cadmium-induced ovarian pathophysiology is mediated by change in gene expression pattern of zinc transporters in zebrafish (Danio rerio). *Chem Biol Interact*. 2011 Sep 5;193(2):

72. Bellinger, DC. Teratogen update: lead and pregnancy.Birth Defects *Res. A Clin. Mol. Teratol*. 2005.73, 409–420.

73. Pillai A, Laxmi Pryiya PN, Gupta S. Effects of combined exposure to lead and cadmium on pituitary membrane of female rats. *Arch. Toxicol*.2002, 76, 671–675

74. Menuet A , Pellegrini E , Anglade I , Blaise O , Laudet V, Kah O, Pakdel2 F. Molecular Characterization of Three Estrogen Receptor

Forms in Zebrafish: Binding Characteristics, Transactivation Properties, and Tissue Distributions. *Biology of Reproduction* June 1, 2002 vol. 66 no. 61881-1892

75. Zama AM, Uzumcu M. Epigenetic effects of endocrin-disrupting chemicals on female reproduction: An ovarian perspective. *Front Neuroendocrinol*. 2010, 31: 420-439.