LUIZ FERNANDO PORTUGAL FUCHS

Efeitos da poluição do ar na adrenal de camundongas.

Aspectos histomorfométricos e imunoistoquímicos

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de: Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Edmund Chada
Baracat

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Fuchs, Luiz Fernando Portugal

Efeitos da poluição do ar na adrenal de camundongas. Aspectos histomorfométricos e imunoistoquímicos / Luiz Fernando Portugal Fuchs. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Edmund Chada Baracat.

Descritores: 1.Glândula adrenal 2.Camundongos 3.Feminino 4.Poluição do ar
5.Material particulado 6.Histologia 7.Proliferação de células 8.Apoptose

USP/FM/DBD-261/14

Dedico este trabalho aos meus pais **Marina Santos Portugal** e **Decio Fuchs**
e à minha avó **Hildete Santos Portugal**.

Agradecimentos

A **Deus**, por me ajudar sempre que preciso, me fazendo entender que neste mundo nada é por acaso.

Aos meus pais **Marina Santos Portugal** e **Decio Fuchs** e à minha avó **Hildete Santos Portugal**. Obrigado por estarem sempre ao meu lado mesmo nas horas mais difíceis.

Ao Prof. Dr. **Edmund Chada Baracat**, pela oportunidade, confiança, paciência, apoio e dedicação fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Paulo Hilário Saldiva**, pela oportunidade em poder usar o Concentrador de Partículas Ambientais, sem o qual este trabalho não teria sido possível.

Ao Prof. Dr. **José Maria Soares Júnior**, por sua atenção, dedicação, apoio e paciência para a feitura deste trabalho e por todos os seus ensinamentos que levarei comigo não só para na vida acadêmica como fora dela.

Ao Prof. Dr. **Manuel De Jesus Simões** (UNIFESP/EPM), ser iluminado que sempre acreditou em mim. Pela calma, paciência, horas agradáveis, ensinamentos, doçura, palavras de apoio, incentivo, dedicado tanto a mim como para este estudo.

À Dra. **Katia Cândido Carvalho**, por me ensinar as técnicas utilizadas no presente estudo.

À Dra. **Mariana Matera Veras**, pelas palavras de incentivo, apoio e paciência para comigo e para este estudo.

A todos do Laboratório de Investigação Médica (LIM) 58, professores, alunos e colegas de estudo Prof. Dr. **Gustavo Arantes Rosa Maciel, Rodrigo Rodrigues Marcondes, Natália Garcia, Leonardo Tomiatti, Giulia Araújo e Faila Adachi**, pela contribuição fundamental, companheirismo e incentivo sem a qual este trabalho não poderia ser realizado.

Aos técnicos **Juciara Silva, Thiago Hideki e Marinalva Almeida** obrigado por sempre me ajudarem e pelo companheirismo.

Às secretarias **Célia, Francesca, Daiana Oliveira, Adriana Festa e Cristiane** obrigado por sempre estarem do meu lado dando apoio e me ajudando com o que preciso.

À Dona **Aparecida e Sônia** pelo sagrado cafezinho sempre presente nos momentos de concentração.

Aos bioteristas **Leandro Ianuzzi, Pedro de Alcântara, André dos Santos de Orlanda e Anderson Militão Pires** por me ajudarem a cuidar dos animais e pelas palavras de incentivo.

Aos Prof. Dr. **Jorge Chammas** e Prof. Dr. **Luiz Fernando Onuchic**, obrigado por permitirem o uso do seu biotério. Sem essa contribuição este trabalho não poderia ser feito.

Aos professores, pós-graduandos, técnicos e funcionários da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural (UNIFESP/EPM), Profa. Dra. **Cristiane Damas Gil**, Profa. Dra. **Sima Katz**, Profa. Dra. **Rejane Reginatto**, Prof. Dr. **Eduardo Katchburian** (*in memoriam*), **Carla Cristina Maganhin**, **Miriam Aparecida dos Santos**, **Regina Célia Teixeira Gomes**, **Adriana Aparecida Ferraz Carbonell**, **Roberta Wolff**, **Cristiane Teixeira**, **Rinaldo Florêncio Da Silva**, **Leandro Mattos**, **Leonardo Lombardi**, **Gisela da Silva Sasso**, **Caio Cesar Stevanovich**, **Alexandre Saeki Fernandes**, **Márcio Faria**, **Paulo Celso Franco**, **Katia Vasconcelos**, **Pedro Nobre**, **Kelen Martins** e **Ednaldo** obrigado por todos estes anos de amizade, apoio, força, ensinamentos e pelas horas agradáveis no laboratório.

Aos meus amigos **Leandro Alexandre**, **Rodrigo Silva**, **Ana Paula Lima Campos**, **José Costa**, **Estevão**, **Zacarias**, obrigado por todo apoio e ajuda.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** por conceder a bolsa de doutorado.

Às **camundongas** por fazerem parte deste estudo. Contribuindo para a minha vida acadêmica.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas:

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.

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

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	9
2.1. Objetivo geral.....	9
2.2. Objetivos Específicos.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. Animais.....	10
3.2. Preparação dos animais.....	11
3.2.1. Exposição no CPA.....	11
3.2.2. Caracterização da exposição.....	13
3.2.3. Filtros de amostragem do CPA.....	14
3.3. Retirada das adrenais.....	15
3.4. Análise histológica.....	15
3.5. Análise histomorfométrica.....	16
3.6. Análise imunoistoquímica.....	17
3.7. Método estatístico.....	19
4. RESULTADOS.....	21
4.1. Avaliação dos filtros de amostragem.....	21
4.2. Análise histológica e histomorfométrica.....	24
4.3. Análise do VEGF-A.....	29
4.4. Análise do Ki-67.....	34
4.5. Análise da caspase-3-clivada.....	39
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
5. ANEXO.....	76

Lista de abreviaturas e siglas

$\mu\text{g}/\text{m}^3$	Micrograma por metro cúbico
μm	Micrômetro
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AhR	Hidrocarboneto de arila
Al	Alumínio
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AP-1	Proteína de ativação-1
APAF-1	Fator de ativação associado a apoptose-1
ATF-1	Fator ativador de transcrição-1
ATP	Adenosina trifosfato
Ca	Cálcio
CPA	Concentrador de Partículas Ambientais
CREB	Proteína ligante ao elemento de resposta ao AMPc
Cu	Cobre
CYP	Citocromo P450
DAB	Diaminobenzidina 3,3'
DDE	1,1-dicloro-2,2-bis (p-clorofenol)
DDT	1,1,1-Tricloro-2,2-di(p-clorofenil)
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERK	Extracellular-signal-regulated kinases
Faz	Fatty Acid Synthase
Fe	Ferro
FGF	Fibroblast growth factor (Fator de crescimento do fibroblasto)
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
G	Grama
H.E.	Hematoxilina e eosina
HPA	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

HEPA	High Efficiency Particulate Air
IgG	Imunoglobulina G
IKK	I κ B kinase
JNK	Jun N-terminal kinases
K	Potássio
LAPAT	Laboratório de Análise dos Processos Atmosféricos
LIM	Laboratório de investigação Médica
MAP	Mitogen Activated Protein Kinases (Quinase ativada por proteína que leva a mitogênese)
MP	Material particulado
Na	Sódio
NF-kB	Fator nuclear kappa-B
Ni	Níquel
OCPs	Pesticidas organoclorados
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Fósforo
Pb	Chumbo
PBBs	Polibrominato bifenil
PBDEs	Polibrominato difenil éter
PBS	Phosphate buffered saline (Tampão fosfato-salino)
PCBs	Policlorodifenil perfluoroquímicos
pH	Potencial Hidrogeniônico
S	Enxofre
Si	Silício
Ti	Titânio
TGF- β	Transforming growth factor beta (Fator de transformação de crescimento beta)
TNFs	Tumor necrosis fator (Fator de necrose tumoral)
TSP-1	Trombospondina-1
USP	Universidade de São Paulo
V	Vanádio
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
Zn	Zinco

Lista de Figuras

- Fig. 1 - Fluxograma resumido do estudo. G0P=mães expostas à poluição; G0NP=mães não expostas à poluição; G1P=filhas de mães expostas à poluição; G1NP=filhas de mães não expostas à poluição. Grupos nos quadros cinza = expostos à poluição. Grupos nos quadros brancos = não expostos à poluição.....14
- Fig. 2 - Fotomicrografias das zonas do córtex da adrenal do grupo de mães expostas à poluição (A - G0P) e não expostas (B - G0NP). ZG=zona glomerulosa, ZF=zona fasciculada, ZR=zona reticulada, M=medula. Coloração H.E. Barra = 50 μm25
- Fig. 3 - Representação gráfica da espessura (μm^2) das diversas zonas da camada cortical das adrenais de mães expostas à poluição (G0P) e mães não expostas à poluição (G0NP). A - zona glomerulosa; B- zona fasciculada; C- zona reticulada. * $p<0,05$ comparado ao G0P.....26
- Fig. 4 - Fotomicrografias das zonas do córtex da adrenal do grupo de filhas de mães expostas à poluição (G1P, A) e não expostas (G1NP,B). ZG=zona glomerulosa, ZF=zona fasciculada, ZR=zona reticulada, M=medula. Coloração H.E. Barra = 50 μm27
- Fig. 5 - Representação gráfica da espessura (μm^2) das zonas do córtex das adrenais de filhas de mães expostas à poluição (G1P) e de filhas de mães não expostas à poluição (G1NP). A - zona glomerulosa; B- zona fasciculada; C- zona reticulada. Não houve diferença estatística entre os grupos.....28
- Fig. 6 - Fotomicrografias da imunoexpressão do VEGF-A da zona glomerulosa do córtex da adrenal pertencentes aos grupos G0P (A) e G0NP (B). Barra = 20 μm . Seta = indica imunoexpressão.....30

Fig. 7 – Fotomicrografias da imunoexpressão do VEGF-A da zona fasciculada do córtex da adrenal pertencente aos grupos G0P (A) e G0NP (B). Barra = 20 µm. Seta = indica imunoexpressão.....	30
Fig. 8 – Fotomicrografias da imunoexpressão do VEGF-A da zona reticulada do córtex da adrenal pertencente aos grupos G0P (A) e G0NP (B). Barra = 20 µm. Seta = indica imunoexpressão.....	30
Fig. 9 - Análise gráfica da imunoexpressão do VEGF-A das zonas do córtex das adrenais de mães expostas à poluição (G0P) e mães não expostas à poluição (G0NP). Não houve diferença estatística entre os grupos. A – zona glomerulosa; B - zona fasciculada; C - zona reticulada.....	31
Fig. 10 – Fotomicrografias da imunoexpressão do VEGF-A da zona glomerulosa do córtex da adrenal pertencentes às filhas de mães poluídas (A) e não poluídas (B). Observar maior expressão nos animais não poluídos (B). Barra = 20 µm. Seta = indica imunoexpressão.....	32
Fig. 11 - Fotomicrografias da imunoexpressão do VEGF-A da zona fasciculada da adrenal pertencente aos grupos G1P (A) e G1NP (B). Barra = 20 µm. . Seta = indica imunoexpressão.....	32
Fig. 12 - Fotomicrografias da imunoexpressão do VEGF-A das zona reticulada da adrenal dos grupos G1P e G1NP. Barra = 20µm. Seta = indica imunoexpressão.....	32
Fig. 13 - Análise gráfica da imunoexpressão do VEGF-A das zonas do córtex das adrenais de filhas de mães expostas à poluição (G1P) e filhas de mães não expostas à poluição (G1NP). A – zona glomerulosa; B- zona fasciculada; C- zona reticulada. *p<0,05 comparado ao G1P.....	33
Fig. 14 – Fotomicrografias da imunoexpressão do Ki-67 da zona glomerulosa das adrenais pertencentes o grupo G0P e G0NP (A e B). Barra = 20 µm. Seta = indica imunoexpressão.....	35

- Fig. 15 – Fotomicrografias da imunexpressão do Ki-67 da zona fasciculada das adrenais pertencentes nos grupos G0P e G0NP (A e B). Barra = 20 μ m. Seta = indica imunexpressão.....35
- Fig. 16 – Fotomicrografias da imunexpressão do Ki-67 da zona reticulada das adrenais pertencentes nos grupos G0P (A) e G0NP (B). Verifica-se menor expressão do Ki-67 nas mães não poluídas (G0NP). Barra = 20 μ m. Seta = indica imunexpressão.....35
- Fig. 17 - Análise gráfica da imunexpressão do Ki-67 das zonas do córtex das adrenais de mães expostas à poluição (G0P) e mães não expostas à poluição (G0NP). A – zona glomerulosa; B - zona fasciculada; C - zona reticulada. * $p < 0,05$ comparado ao G0P.....36
- Fig. 18 – Fotomicrografias da imunexpressão do Ki-67 da zona glomerulosa das adrenais pertencentes o grupo G1P (A) e G1NP (B). Observar maior expressão em A. Barra = 20 μ m. Seta = indica imunexpressão.....37
- Fig. 19 – Fotomicrografias da imunexpressão do Ki-67 da zona fasciculada das adrenais pertencentes o grupo G1P e G1NP (A e B). Barra = 20 μ m. Seta = indica imunexpressão.....37
- Fig. 20 – Fotomicrografias da imunexpressão do Ki-67 da zona reticulada das adrenais pertencentes o grupo G1P (A) e G1NP (B). Barra = 20 μ m. Seta = indica imunexpressão.....37
- Fig. 21 - Análise gráfica da imunexpressão do Ki-67 das zonas do córtex das adrenais de filhas de mães expostas à poluição (G1P) e filhas de mães não expostas à poluição (G1NP). A – zona glomerulosa; B - zona fasciculada; C - zona reticulada. * $p < 0,05$ comparado ao G1P.....38
- Fig. 22 – Fotomicrografias da imunexpressão da Caspase-3 clivada da zona glomerulosa das adrenais pertencentes o grupo G0P (A) e G0NP (B). Barra = 20 μ m. Seta = indica imunexpressão.....40
- Fig. 23 – Fotomicrografias da imunexpressão da Caspase-3 clivada da zona fasciculada das adrenais pertencentes o grupo G0P (A) e G0NP (B). Observar

maior expressão em A. Barra = 20 µm. Seta = indica imunoexpressão.....40

Fig. 24 – Fotomicrografias da imunoexpressão de Caspase-3 clivada da zona reticulada das adrenais pertencentes o grupo G0P (A) e G0NP (B). Barra = 20 µm. Seta = indica imunoexpressão.....40

Fig. 25 - Análise gráfica da imunoexpressão da Caspase-3 clivada das zonas do córtex das adrenais de filhas de mães expostas à poluição (G0P) e filhas de mães não expostas à poluição (G0NP). A – zona glomerulosa; B - zona fasciculada; C - zona reticulada. *p<0,05 comparado ao G0P.....41

Fig. 26 – Fotomicrografias da imunoexpressão de Caspase-3 clivada na zona glomerulosa das adrenais pertencentes o grupo G1P (A) e G1NP (B). Barra = 20 µm. Seta = indica imunoexpressão.....42

Fig. 27 – Fotomicrografias da imunoexpressão de Caspase-3 clivada da zona fasciculada das adrenais pertencentes o grupo G1P (A) e G1NP (B). Observarmos maior expressão em A. Barra = 20 µm. Seta = indica imunoexpressão.....42

Fig. 28 – Fotomicrografias da imunoexpressão da Caspase-3 clivada da zona reticulada das adrenais pertencentes o grupo G1P (A) e G1NP (B). Barra = 20 µm. Seta = indica imunoexpressão.....42

Fig. 29 - Análise gráfica da imunoexpressão da Caspase-3 clivada das zonas do córtex das adrenais de filhas de mães expostas à poluição (G1P) e filhas de mães não expostas à poluição (G1NP). A – zona glomerulosa; B - zona fasciculada; C - zona reticulada. *p<0,05 comparado ao G1P.....43

Lista de tabelas

Tabela 1 - Especificações dos anticorpos primários utilizados na reação imunoistoquímica17

Tabela 2 - Análise descritiva da composição elementar de MP2.5($\mu\text{g}/\text{m}^3$) dos filtros de polycarbonato utilizado na exposição ao meio ambiente.....22

Tabela 3 - Valores referentes à aplicação da técnica de análise dos principais componentes, para o conjunto de dados das medidas elementares dos filtros de material particulado fino concentrado ($\mu\text{g}/\text{m}^3$).....23

Resumo

Fuchs, LFP. Efeitos da poluição do ar na adrenal de camundongas. Aspectos histomorfométricos e imunoistoquímicos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO: A poluição em centros urbanos é produzida, principalmente, pela queima de combustíveis fósseis. Constitui problema que afeta a saúde da população, provocando doenças tanto no sistema respiratório, como sistemicamente em vários órgãos. Dentre as funções afetadas, realça o impacto da poluição sobre o sistema endócrino, podendo acometer as adrenais, tanto, no ser humano, como em roedores. Todavia, pouco se conhece sobre a ação nesta glândula. Assim, propusemo-nos a analisar os efeitos do ar poluído sobre as adrenais em duas gerações consecutivas de camundongas. **OBJETIVOS:** Analisar os efeitos do ar concentrado com material particulado (MP) 2,5µm sobre as adrenais, avaliando as alterações histomorfométricas; a angiogênese pelo fator de crescimento vascular endotelial (VEGF-A); a proliferação celular por meio da proteína Ki-67 e o índice de apoptose pela caspase 3-clivada nas três zonas do córtex da adrenal. **MATERIAL E MÉTODOS:** Utilizaram-se 20 camundongas alocadas em biotério livre de poluentes, as quais foram acasalados na proporção de um macho para duas fêmeas. Após confirmação da cópula, foram divididas em 2 grupos de 10 animais cada. Acondicionou-se um grupo diariamente em uma câmara, onde as camundongas foram expostas a MP 2,5µm à concentração

de 600µg/m³ (G0P). O outro grupo, com 10 animais, foi alocado em outra câmara com ar filtrado (G0NP). A exposição ocorreu diariamente durante toda a prenhez das camundongas. Ao nascimento os conceptos, foram amamentados por 30 dias em amamentação, período onde não houve exposição aos poluentes. Após este período, as mães foram eutanasiadas para coleta das adrenais e as filhas sofreram o mesmo protocolo de exposição (G1P e G1NP – submetidas e não submetidas à poluição), não foram acasaladas, sendo eutanasiadas para coleta das adrenais ao fim do protocolo. As adrenais passaram por processamento histológico para coloração de H.E. e imunoistoquímico. RESULTADOS: As adrenais do grupo G0P apresentaram maior espessura da zona glomerulosa e as do G1P apresentaram maior quantidade de espongíócitos na zona fasciculada. As adrenais do grupo G1P tiveram maior imunoexpressão de VEGF-A na zona glomerulosa do que as do G1NP. A imunoexpressão do Ki-67 foi maior na zona reticulada no grupo G0P; no grupo G1P houve maior expressão do Ki-67 na zona glomerulosa do que no grupo G1NP. A imunoexpressão da caspase-3 clivada foi maior nos grupos G0P e G1P do que nos demais. CONCLUSÃO: A exposição ao ar poluído com material particulado 2.5µm determinou alterações histomorfométricas e imunoistoquímicas nas três zonas do córtex da adrenal de duas gerações consecutivas de camundongas. Estas alterações poderiam causar distúrbios endócrinos e cardiovasculares.

Descritores: Adrenal, Material Particulado 2.5µm, Camundongas, Poluição do ar

Abstract

Fuchs, LFP. Effects of air pollution in the female mice adrenal. Histomorphometric and immunohistochemical aspects [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

INTRODUCTION: The pollution in urban centers is produced mainly by the burning of fossil fuels. It's a concern of public health, causing diseases in both the respiratory system and the other organs. Among the affected functions, it is important to highlight the impact of pollution on the endocrine system and this effect on the adrenal glands, both in humans and in rodents. However, little is known on the action of pollutants on this gland. Therefore, the aim of this study was to analyze the effects of polluted air on the adrenal in two consecutive generations of female mice. **OBJECTIVES:** To assess the effects of concentrate air with particulate matter (PM) 2.5 μ m on the adrenal cortex evaluating histomorphometric changes; angiogenesis by vascular endothelial growth factor (VEGF-A); the cell proliferation by Ki-67 index and apoptosis by cleaved caspase-3 in the three zones of the adrenal cortex. **MATERIAL AND METHODS:** We used 20 female mice in their cages free of pollutants. Those animals were mated at a ratio of one male to two females. After mating confirmation, animals were divided into 2 groups of 10 animals each. A group was daily allocated in a chamber where the female mice were exposed to PM 2.5 μ m at a concentration of 600 μ g/m³ (G0P). The other group of 10 animals was allocated in another chamber with filtered air (G0NP). The exposure

occurred daily throughout pregnancy period. At birth, the fetuses were breastfed for 30 days. During breastfeeding period there was no pollutants exposure. After this period, mothers were euthanized for adrenal collection and daughters suffered the same exposure protocol (G1P and G1NP - exposed and not exposed to pollution), but those were not mated, being euthanized for adrenal collection at the end of the protocol. The adrenal underwent histological processing for H.E. staining and immunohistochemistry. RESULTS: The adrenal of the G0P group had increased thickness of the zona glomerulosa and the G1P presented more espongocytes in the zona fasciculata. The adrenal of the G1P group had higher immunoreactivity of VEGF-A in the zona glomerulosa than one of the G1NP. The immunoreactivity of Ki-67 in the zona reticularis of G0P group was higher one of G0NP; there was a higher expression of Ki-67 in the zona glomerulosa of the G1P group compared to G1NP group. The immunoreactivity of cleaved caspase-3 in G0P and G1P was higher than ones of other groups. CONCLUSION: Exposure to air pollution with particulate matter 2.5µm determined histomorphometric and immunohistochemical changes in the three adrenal cortical zones of the two consecutive generations of mice. These changes could cause endocrine and cardiovascular disorders.

Descriptors: Adrenal, Particulate Matter 2.5µm, Mice, Air Pollution

1. INTRODUÇÃO

A poluição em centros urbanos constitui sério problema que afeta a saúde da sua população (Sioutas et al., 1995). Provém de combustíveis fósseis, principalmente de veículos automotivos, cigarro, produção de outros gases como os de geladeira e queima não autorizada de lixo e produtos químicos (Sioutas et al., 1995). Todos esses fatores prejudicam a população local em virtude do desenvolvendo de diversas doenças que podem ser adquiridas direta ou indiretamente devido a inalação desses gases, como doenças cardiovasculares e neoplasias (Bhatnagar 2006; Brook et al. 2010; Riva et al., 2011). Por todo o globo, 3,7 milhões de mortes são atribuídas à poluição do ar em 2012 de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2012). Cerca de 90% destas mortes ocorrem em países de renda baixa e média, que representam 82 % da população mundial. As regiões do Pacífico Ocidental e do Sudeste Asiático possuem a maior parte, respectivamente, com 1,67 milhão e 936.000 mortes. Sobre 236.000 mortes ocorrem na região do Mediterrâneo Oriental, 200.000 na Europa, 176.000 na África, e 58.000 nas Américas. O restante das mortes ocorre em países de renda alta da Europa (280.000), Américas (94.000), Pacífico Ocidental (67.000) e Mediterrâneo Oriental (14.000).

Estudos epidemiológicos mostraram que níveis aceitáveis de poluição podem causar efeitos deletérios na saúde dos seres humanos, sobretudo no aparelho respiratório, como bronquite, rinite e asma entre outros. Há também

evidências de que a poluição possa levar ao desenvolvimento de câncer e endometriose (Lin et al., 1999; Sharpe e Franks, 2002).

Estudos feitos em ratos expostos à poluição do tráfego automotivo urbano sugerem que as alterações na fertilidade não seriam apenas no macho, como também incluía a fêmea: mudanças no período de duração do ciclo estral, tempo de acasalamento, aumento do peso fetal e de taxa de abortamento (Veras et al., 2009). Salienta-se ainda que há aumento de mortalidade e de redução do peso dos conceptos expostos à fumaça de cigarro no útero da mãe (Zhu et al., 1997).

A exposição ao poluente não precisa ser por tempo prolongado para desenvolver danos ao organismo. De fato ratos expostos uma hora à fumaça de cigarro, tiveram incremento da infertilidade, com maior tempo para haver a concepção, elevação da mortalidade fetal, fetos com alteração pigmentar da pele, redução de tamanho das gônadas (testículos e ovários), bem como diminuição do número de espermatozoides (Audi et al., 2006). Contudo, os mecanismos destas lesões são poucos conhecidos. Portanto, há necessidade de realizar mais estudos, inclusive para avaliar se os poluentes também podem produzir interferência do sistema endócrino (Buck Louis, 2014).

O Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da USP – LIM 05, sob a coordenação do Prof. Dr. Paulo Hilário Saldiva, vem utilizando o Concentrador de Partículas Ambientais (CPA) com o intuito de estudar a ação da poluição urbana. Esse equipamento foi desenvolvido pela Escola de Saúde Pública da Universidade de Harvard em 1995. Com a tecnologia de impactadores virtuais, aumenta 30 vezes a

concentração de partículas ambientais que possuam até 2.5µm de diâmetro aerodinâmico suspensas na atmosfera alimentando uma câmara de exposição (Sioutas et al., 1995). O CPA encontra-se na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP, próximo de uma das ruas mais poluídas da cidade. Neste serviço, há desenvolvimento de vários experimentos em modelo de animais (Veras et al., 2009), principalmente, em camundongos (Mohallem et al., 2005; Veras et al., 2009).

Sabe-se que a poluição pode levar a doenças endócrinas, culminando em infertilidade (Selevan et al., 2000; Somers, 2011; Buck Louis, 2014). Foram identificados os seguintes agentes: 1,1-dicloro-2,2-bis (p-clorofenol); etileno (DDE) e seus compostos relacionados como 1,1,1-Tricloro-2,2-di(p-clorofenil)etano (DDT); dioxina; metais; pesticidas organoclorados (OCPs), polibrominato bifenil (PBBs); polibrominato difenil éter (PBDEs); policlorodifenil (PCBs); e perfluoroquímicos (PFCs). Estas substâncias tem o potencial de interferir com a ação hormonal e afetar a função de órgãos endócrinos (Buck Louis, 2014). Estas substâncias são encontradas em partículas ambientais (Buck Louis, 2014). Contudo, pouco se sabe sobre a sua influência sobre as adrenais dos animais, como os camundongos.

Como modelo de estudo a camundonga tem sido amplamente utilizado, pois tem a vantagem de ter ciclo estral curto, fácil de manuseia e de baixo custo (Mohallem et al., 2005). Por esta razão, este modelo constitui importante instrumento para avaliar as alterações decorrentes da poluição no concentrador de partículas ambientais.

Com relação à adrenal, esta é composta por tecido glandular, especializado, na produção de esteroides, sendo sua localização acima dos rins. O revestimento da adrenal é constituído por cápsula de tecido conjuntivo rico em fibras colágenas, que se estende para o seu interior em forma de trabéculas (Evêncio Neto et al., 1996; Silva et al., 2007; Fuchs et al., 2010).

A adrenal é histomorfologicamente, constituída por duas regiões distintas: medula e córtex. A medula, que se origina da crista neural, secreta adrenalina e noradrenalina em resposta à estimulação simpática. Esses neurotransmissores, por sua vez, provocam quase os mesmos efeitos que a estimulação direta dos nervos simpáticos no organismo em sua totalidade.

O córtex da adrenal origina-se do epitélio celomático e apresenta três zonas bem definidas: glomerulosa, fasciculada e reticulada. Produz esteroides, alguns sexuais (Evêncio Neto et al., 1996; Correia et al., 2002; Fuchs et al., 2010).

Esses esteroides podem ser classificados em três categorias: os mineralocorticoides, os glicocorticoides e os sexuais. Cada categoria é produzida em determinada zona da adrenal. A glomerulosa produz os mineralocorticoides, entre os quais destaca-se a aldosterona, que atua exclusivamente no controle hídrico e nos eletrólitos extracelulares. Na zona fasciculada ocorre a produção dos glicocorticoides, sendo a corticosterona o principal hormônio. Possuem efeito metabólico sobre carboidratos, lipídios e proteínas. O cortisol aumenta a gliconeogênese e a síntese de glicogênio, inibindo a utilização da glicose celular e estimula o armazenamento de glicogênio. A zona reticulada, a mais interna do córtex produz hormônios

sexuais (Correia et al., 2002; Fuchs et al., 2010). Com exceção da zona glomerulosa que é controlada pela angiotensina (Kopf et al., 2011) as outras zonas são controladas pelo ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) (Almeida et al., 2007). Contudo, pode também ter influências locais de outras substâncias (Hinson e Raven, 2006).

Os fatores de crescimento possuem diversas funções regulando grande número de sistemas biológicos, como a divisão celular, angiogênese, indução ou inibição da diferenciação celular, transformação ou indução da síntese de proteínas, entre outras. Possuem uma grande variedade de fontes e alvos celulares, entre elas a camada cortical da adrenal (Medeiros et al., 2003).

Dos fatores de crescimento conhecidos, interessamo-nos pelo fator de crescimento do fibroblasto (FGF) e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), visto que aparecem com mais evidência em relação à renovação tecidual e vascular. O FGF básico (FGF-b) possui o maior número de ações fisiológicas relacionados à proliferação e tumorigênese, enquanto o fator de crescimento vascular endotelial subtipo-A (VEGF-A) está relacionado à angiogênese que pode ser um sinal indireto de aumento da função ou proliferação do órgão alvo (Neufeld et al., 1999).

A angiogênese caracteriza-se como a formação de novos vasos sanguíneos pela migração e proliferação de células endoteliais vindas de vasos existentes (Neufeld et al., 1999; Plendl, 2000). Está relacionada com o aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), considerado o principal fator mitogênico das células endoteliais, que induz migração, diferenciação, e proliferação das células, tendo um papel também na

maturação e estabilização dos vasos sanguíneos (Favier e Corvol, 2001). Contudo, isoladamente, pode ser um sinal com pouca importância para avaliar proliferação, visto que pode estar também aumentado em processo inflamatório (Shinkaruk et al., 2003). Assim, há necessidade de empregar outro marcador para analisar o crescimento do tecido, como o Ki-67.

O Ki-67 é uma proteína não histona onde seu gene se localiza no cromossomo 10 (10q25), de peso molecular entre 345 a 349 kDa. Está presente em todas as células em fase de replicação. Não está expresso na fase G0, mas é detectada em outras fases do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose) sua expressão aumenta na segunda metade da fase S, alcançando maior expressão na G2 e mitose (Tarasenko et al., 2012). Ela estimula o crescimento de tumores por acelerar o ciclo celular, aumentando a proliferação das células e, conseqüentemente dos tecidos. É excelente marcador de proliferação celular podendo estabelecer relação com o prognóstico de tumores (Tarasenko et al., 2012).

Deve-se salientar que os tecidos tendem a entrar em equilíbrio entre a proliferação e a morte celular programada (apoptose), o que é chamado de homeostase tecidual (Wolkersdörfer e Bornstein, 1998; Bozzo et al., 2006). Assim, pode existir muita proliferação celular seguida de incremento da morte, o que poderia anular o efeito de substâncias carcinogênicas (Hinson et al., 2006). Contudo, em alguns casos pode haver a ruptura deste equilíbrio, havendo predominância de um sistema em relação ao outro, o que pode afetar o funcionamento do órgão. Portanto, há necessidade de se avaliar a apoptose celular no controle da população celular.

A apoptose, ou seja, a morte celular programada é processo celular fisiológico essencial para o desenvolvimento dos seres vivos. Sua principal função é eliminar células indesejáveis através de um complexo mecanismo metabólico, geneticamente regulado, levando à retração celular, perda de aderência à matriz extracelular, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação de corpos apoptóticos (Fuchs et al., 2010). Foi descrita pela primeira vez em 1972 por Kerr et al., sendo essencial em processos de organogênese, hematopoiese, reposição tecidual, atrofia de órgãos, respostas inflamatórias e eliminação de células após dano por agentes genotóxicos (Grivicich et al., 2007).

A ativação de certas enzimas específicas, entre as quais as caspases, resultam em alterações morfológicas observadas nas células apoptóticas, modulando-as e servindo como marcadores primários em ensaios de apoptose antes mesmo dos sinais morfológicos aparecerem (Nicholson et al., 1997; Boatright e Salvesen, 2003).

Em seres humanos, são conhecidos 14 tipos de caspases, das quais parte delas têm propriedades pró-apoptóticas (Grivicich et al., 2007). As caspases-1, 4 e 5, por exemplo, possuem grande importância em processos inflamatórios, enquanto as caspases-2, 3 e 10 estão predominantemente envolvidas na apoptose (Nicholson et al., 1997).

São descritas duas vias na apoptose: a extrínseca e a intrínseca, sendo que ambas terminam com a ativação das caspases, levando à morte celular (Bergantini et al., 2005; Grivicich et al., 2007). A via extrínseca começa através de ligantes específicos, como por exemplo, o Fas-L, que se liga a um grupo de

receptores de membrana da superfamília dos TNFs (Fas), ativando receptores de morte específicos. Assim há o recrutamento da caspase-8 e a ativação da caspase-3 com subsequente morte por apoptose (Grivicich et al., 2007). A via intrínseca pode ser ativada intracelular ou extracelularmente, como privação de fatores de crescimento, danos no DNA, entre outros. Com estes estímulos, a mitocôndria modifica o potencial da membrana interna, alterando sua permeabilidade, induzindo o rompimento da organela, liberando proteínas pró-apoptóticas no citoplasma. Tais alterações na mitocôndria provocam o bloqueio na síntese de ATP, levando a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, contribuindo para a ativação de caspases 9 e 3. Além disso, o citocromo C é liberado da mitocôndria para o citoplasma, onde forma um complexo com fator de ativação associado à apoptose-1 (APAF-1) e à caspase-9, o chamado apoptossomo. Com isso há a clivagem da pró-caspase 9, liberando a caspase-9 ativa, que é capaz de ativar a caspase-3 e provocar a apoptose (Grivicich et al., 2007). É importante notar que, tanto na via extrínseca quanto na intrínseca, após a caspase 3 ser ativada (clivada), torna-se irreversível a morte celular.

A poluição atmosférica pode ter, em animais, influência sobre os tecidos produtores de hormônios, entre eles, a adrenal. Além disso, os efeitos diretamente nesta glândula são poucos conhecidos. Assim, propusemo-nos a avaliar as alterações histomorfométricas, imunoistoquímicas, nas três zonas do córtex da adrenal de camundongas adultas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da poluição do ar no córtex da adrenal de duas gerações consecutivas de camundongas expostas ou não à poluição do ar.

2.2. Objetivos específicos

- a) Analisar os aspectos histomorfométricos;
- b) Avaliar a angiogênese pela determinação do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF-A);
- c) Analisar o índice de proliferação celular pela proteína Ki-67;
- d) Avaliar o índice de apoptose pela caspase 3-clivada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizadas 20 camundongas, adultas, virgens, pesando ao redor de 30 g, da linhagem *Balb/C*, fornecidas pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Antes do início deste estudo, o projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da FMUSP e, posteriormente, pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da FMUSP (Nº. 022/11, vide Anexo 1).

Os animais ficaram acondicionados no Biotério Experimental III da FMUSP, em microisoladores medindo 45 x 35 x 15cm (comprimento, largura e altura, respectivamente), com tampa gradeada de metal, com alimentação (ração comercial balanceada - Nuvital-Nutrients Ltda., Colombo, Brasil) e água *ad libitum*, sendo manejados durante todo o período do experimento de acordo com as normas prescritas por Kirkwood e Hubrecht (2010). Os microisoladores ficam em *racks* ventilados, com ar purificado através de filtros HEPA, que não permitem a passagem de partículas com 2,5µm de diâmetro. Os microisoladores e bebedouros foram limpos e trocados a cada dois dias, ao passo que as câmaras de exposição do CPA eram limpas diariamente com álcool a 70%.

3.2. Preparação dos animais

No início do experimento, realizou-se exame colpocitológico. O material foi obtido utilizando-se pipeta *Pasteur* e solução salina (cloreto de sódio a 0,9%). Após a coleta, o conteúdo foi transferido para lâminas histológicas, sendo fixado em solução de álcool-éter (1:1) e corado pelo método de Harris-Shorr (Shorr, 1941). Posteriormente, as lâminas foram submetidas a análise em microscópio de luz. Foram incluídos no estudo apenas os animais com três ciclos estrais regulares (proestro, estro, metaestro e diestro), comprovando atividade ovariana satisfatória (Montes e Luque, 1988).

Em sequência, os animais foram acasalados na proporção de um macho para duas fêmeas. O período de acasalamento foi de 12 horas, no qual os casais foram mantidos juntos na mesma gaiola (das 18:00 às 6:00 horas do dia seguinte). Após este período, os machos foram separados das fêmeas. Salientamos que esses machos não foram expostos à poluição em nenhum momento do estudo. No dia seguinte, verificamos se a cópula ocorreu pela presença de um tampão vaginal (*plug*) e reconfirmado pela presença de espermatozóides no lavado vaginal. Em caso positivo, confirmou-se como o 1º dia de prenhez. A gestação em camundongas dura de 19 a 20 dias. Estes animais compuseram as mães (G0) do estudo, que se estendeu até as filhas (G1). Frisamos que, o grupo G1 será exposto à poluição.

3.2.1. Exposição no CPA

Após confirmação do acasalamento, as 20 camundongas foram divididas aleatoriamente em dois grupos de 10:

a) G0np - grupo de mães não expostas à poluição (MP2.5µm);

b) G0p - grupo de mães expostas à poluição (MP2.5µm)

Os animais foram expostos a poluentes uma vez ao dia (P) e outro nas mesmas condições com ar livre de poluentes (NP). A exposição deu-se durante o período de gestação dos animais.

Para a avaliação dos efeitos da exposição ao material particulado, os animais experimentais foram expostos à concentração de 600µg/m³ de material particulado concentrado (MP), com o auxílio de um Concentrador de Partículas Ambientais (CPA) pertencente ao Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da FMUSP-LIM 05. O CPA, equipamento desenvolvido pela Escola de Saúde Pública de Harvard – EUA utiliza a tecnologia de impactadores virtuais, com o propósito de concentrar em até 30 vezes as partículas ambientais presentes na atmosfera sem modificá-las química ou fisicamente¹. Este equipamento permite o controle da concentração à qual os animais foram expostos, possibilitando estudos de dose resposta. O ar, então carregando uma concentração determinada de partículas, alimenta uma câmara onde os animais foram expostos. Ao mesmo tempo e sob as mesmas condições de pressão, fluxo, temperatura e umidade relativa, outra câmara disposta paralelamente foi alimentada com ar filtrado para exposição sem poluentes. Em ambas as câmaras, no momento da exposição, os animais foram acondicionados em gaiolas apropriadas e estão livres para respirar naturalmente. Nos intervalos entre as exposições os animais foram mantidos em microisoladores (com quatro animais) em *racks* ventiladas recebendo ar filtrado, com ração e água *ad libitum* e ciclo claro/escuro de 12h/12h.

¹ Inaira – Instituto Nacional de Avaliação de Risco Ambiental - CNPq:
<http://www.inaira.org/br/intoxicacao/concentrador.shtml>

3.2.2. Caracterização da exposição

A caracterização da exposição foi feita a partir de filtros de amostragem equipados em impactadores tipo Harvard (Air Diagnostics, Harrison, ME) conectados a cada uma das câmaras. Embora o CPA possua um monitor em tempo real da concentração de partículas, confirmamos gravimetricamente estas concentrações. Ainda utilizando os mesmos filtros, uma análise qualitativa elementar (Na, Al, Si, P, S, K, Ca, Ti, V, Fe, Ni, Cu, Zn e Pb) será realizada com auxílio de um espectrofotômetro de fluorescência de raio X (Shimadzu EDX 700). Estas análises serão efetuadas por pessoal especializado. As concentrações às quais os animais foram expostos foram determinadas com base nas exposições ambientais reais ao MP2,5. A concentração de $600\mu\text{g}/\text{m}^3$ representa a concentração média diária total a que estamos sujeitos vivendo na cidade de São Paulo (CETESB, 2009). Devido a limitações técnicas do CPA, não houve exposição em dias chuvosos ou com umidade acima de 80%.

Ao término da prenhez, todas as matrizes, tanto do grupo de mães não expostas à (G0NP) quanto o de expostas à poluição (G0P) e suas crias, grupo de crias nascidas de mães não expostas à poluição (G1NP) quanto o de mães expostas à poluição (G1P), permaneceram no biotério por um período de 30 dias (período de amamentação), em que não houve exposição à poluição. Ao final desse período, as matrizes (G0P e G0NP) foram eutanasiadas tendo as adrenais coletadas para análise. Em seguida os animais do G1P foram submetidos à exposição no CPA por 20 dias. Os do grupo G1NP não foram

expostos (Fig. 1). Após esse período foram também eutanasiados e suas adrenais foram retiradas para estudo.

Fig 1 - Fluxograma resumido do estudo. G0P=mães expostas à poluição; G0NP=mães não expostas à poluição; G1P=filhas de mães expostas à poluição; G1NP=filhas de mães não expostas à poluição. Grupos nos quadros cinza = expostos à poluição. Grupos nos quadros brancos = não expostos à poluição.

3.2.3. Filtros de amostragem do CPA

Para a análise dos principais componentes, podemos inferir alguns fatores os quais podem explicar a variabilidade da composição do material concentrado (MP2,5 μm) assim como caracterizar a origem das emissões. Os fatores assim determinados, em numero de quatro, podem ser observados na tabela 3.

O fator 1 tem predominância de Mg, Al, Si, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Cu, Ni, Zn e Br. Podem estar associados ao tráfego em geral, onde o Ca possa ser um componente ressuspensionado do solo (Spada et al., 2012). Já o Cu e Ni são

relacionados com fontes fixas, industriais (Monaci et al., 2000; Figueiredo et al., 2007). O fator 2 foi dominado por S, sendo relacionado a queima de diesel, dada a associação deste elemento com as emissões deste combustível (Schauer et al., 2006; Spada et al., 2012). O fator 3, associado ao Na e Pb (Figueiredo et al., 2007 e Carreras et al., 2009) e o fator 4 esteve associado ao P e Se.

3.3. Retirada das adrenais

Ao final do período de exposição, os animais foram pesados, anestesiados com 15 mg/Kg de xilazina (Rompun®) associados a 30 mg/Kg de ketamina (Ketalar®), por via intraperitoneal. A seguir, foram colocados em posição dorsal e os pelos dessa região foram retirados por tração manual. Em sequência foi realizada incisão abdominal longitudinal na linha média, expondo-se os órgãos internos. Em seguida, as glândulas adrenais foram localizadas, retiradas e fixadas em formaldeído a 10% (tampão fosfato), para análise histológica e imunoistoquímica. A seguir, os animais foram eutanasiados pelo aprofundamento do plano anestésico até parada cardiorrespiratória. O descarte dos animais ocorreu de acordo com a Cartilha de Orientação Para Descarte de Resíduos no Sistema FMUSP-HC.

3.4. Análise histológica

Para a análise microscópica, as adrenais foram fixadas em formaldeído a 10% (tampão fosfato), por 24 horas, sendo depois desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80% e 100%), diafanizadas

em xilol e impregnadas pela parafina líquida em estufa regulada à temperatura de 60 °C, segundo a metodologia preconizada por Michalany (1998). Em sequência, os blocos de parafina contendo as adrenais foram cortados em micrótomo do tipo *Minot*, ajustado para 3 µm. Com a ajuda de um microscópio de luz (Carl Zeiss), observou-se o seccionamento das adrenais até atingir todas as zonas da camada cortical. Os cortes foram colocados em lâminas previamente untadas com albumina de *Mayer* e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37 °C, durante 24 horas, para secagem e colagem. Uma lâmina de cada animal foi submetida ao método de coloração pela hematoxilina e eosina (H.E.), para posterior análise histomorfológica, sendo utilizado microscópio de luz, da marca Carl Zeiss, com objetivas variando de 4 a 40 X.

3.5. Análise histomorfométrica

Foi realizada a avaliação histológica e histomorfométrica da espessura das várias zonas da cortical da adrenal conforme as especificações de Silva et al. (2006). Para isto, também foi usado o programa AxioVision. Este equipamento consiste em um microscópio de luz Axiolab Standart 2.0, acoplado a uma vídeo câmera de alta resolução (AxioCam, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) que transmite a imagem a um computador, onde foram armazenadas e analisadas.

3.6. Análise imunoistoquímica

Foram utilizados anticorpos anti-VEGF (Fator de Crescimento Vascular Endotelial subtipo-A), anti-Ki-67 e caspase-3-clivada, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Especificações dos anticorpos primários utilizados na reação imunoistoquímica

Anticorpo	Clone	Fornecedor	Tipo	Recuperação antigênica	Diluição
VEGF	C-1	Santa Cruz Biotechnology Inc.	Monoclonal	Panela de pressão	1:100
Ki-67	SP6	Springer Bioscience Corp.	Monoclonal	Panela a Vapor	1:200
Caspase 3 clivada	Asp 175	Cell Signaling Technology	Policlonal	Panela de pressão	1:100

As lâminas silanizadas com os cortes seguiram o seguinte protocolo:

- a) desparafinação: as lâminas foram deixadas em estufa a 60 °C por 5 minutos, para melhor adesão do tecido, sendo em seguida desparafinadas com três banhos em xilol por 5 minutos cada em temperatura ambiente;
- b) hidratação: as lâminas foram submersas três vezes em concentrações decrescentes (100%, 80% e 70%) de etanol por 5 minutos cada e lavadas em água corrente por 2 minutos para hidratação dos cortes;
- c) recuperação antigênica: as lâminas foram colocadas em solução de citrato de sódio 10mM pH 6,0 por 30 minutos, em panela de vapor (96 °C) ou 30 minutos em panela de pressão (120 °C), deixando-se depois esfriar à

temperatura ambiente por 30 minutos e lavadas em PBS (Tampão Salina Fosfatada) 0,05 M, pH 7,4 por três vezes por 5 minutos cada;

d) bloqueio da peroxidase endógena: as lâminas foram incubadas com peróxido de hidrogênio 3 %, três vezes, por 5 minutos cada, e em seguida, lavadas com água corrente e tampão PBS pH 7,4, três vezes, por 3 minutos cada;

e) bloqueio de sítios inespecíficos: as lâminas foram incubadas em PBS pH 7,4+leite desnatado (Molico®, Nestlé, São Paulo) 1% por 30 minutos, em temperatura ambiente;

f) ligação com anticorpo primário: os cortes histológicos de cada lâmina foram incubados com anticorpo primário, diluídos em diluente Dako em titulação pré-estabelecida pelo fornecedor e deixadas em câmara úmida a 4°C *overnight* e, na sequência, foram lavadas em PBS pH 7,4 por três vezes;

g) ligação do anticorpo secundário biotilado: os cortes foram incubados com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com biotina do kit LSAB (Dako), por 30 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBS pH 7,4 por três vezes e novamente incubação com o Kit de amplificação (estreptavidina conjugada com peroxidase) Dako por 30 minutos. A seguir, foram lavadas com tampão PBS, pH 7,4 por três vezes;

h) revelação: os cortes foram cobertos com solução de cromógeno diaminobenzidina 3,3' (DAB líquido), na diluição de 1:50 utilizando kit Dako. Utilizou-se um microscópio de luz para observar a revelação até o ponto desejado;

- i) contracoloração: os cortes foram lavados em água corrente por cinco minutos e, em seguida, contracolorados com hematoxilina de Harris por cinco minutos;
- j) desidratação e montagem: as lâminas foram lavadas em água corrente por cinco minutos, submersas em etanol absoluto quatro vezes e, a seguir, em xilol por três vezes e levadas para montagem com lamínula e em meio de montagem Erv-Mount® (Erviagas).

Adotou-se, como padrão de positividade, o aparecimento de coloração marrom acastanhada no núcleo ou no citoplasma da célula, conforme a imunolocalização do anticorpo. A imunoexpressão foi avaliada, utilizando-se sistema de captura de imagens, constituído por microscópio de luz (Carl Zeiss), adaptado a uma câmera de alta resolução (AxioCam MRC da Carl Zeiss), monitor de vídeo colorido (Samsung). As imagens foram obtidas utilizando-se o programa de análise de imagens AxioVision REL 4.8 da Carl Zeiss.

Para a avaliação imunoistoquímica do VEGF-A, da proliferação celular (Ki-67) e da apoptose (caspase-3-clivada) utilizamos uma análise quantitativa, onde avaliamos a quantidade de células reativas em quatro campos até perfazer um total de 1000 células por animal.

3.7. Método Estatístico

Para análise dos dados obtidos, comparamos os animais colocados nas câmaras com ar não poluído (NP) em relação aos nas câmaras de ar poluído (P), utilizou-se o teste *t* de *Student* ou Mann Whitman conforme a distribuição

dos dados. Foram comparados separadamente os dados das mães de suas crias. Para tanto, utilizou-se o software GraphPad Prism 4.0 para Windows XP.

Foi fixado em 0,05 ou 5% ($\alpha \leq 0,05$) o nível para rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com asterisco os valores significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação dos filtros de amostragem

Durante o período de estudo, dois filtros de polycarbonato foram expostos semanalmente ao meio ambiente para avaliação da amostragem do material particulado e futura quantificação do seu perfil elementar. As análises foram realizadas no Laboratório de Análise dos Processos Atmosféricos (LAPAT) do Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo. Os resultados das determinações da composição química do material colhido nos filtros de polycarbonato são apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Análise descritiva da composição elementar de MP2.5(ug/m3) dos filtros de polycarbonato utilizado na exposição ao meio ambiente.

Os dados estão apresentados em média e desvio padrão

	Média	Desvio Padrão
MP_{2.5}	646.37	534.06
Na	0.53	0.71
Mg	0.36	1.08
Al	5.61	11.74
Si	6.49	14.92
P	0.58	1.52
S	9.37	8.18
Cl	0.77	1.05
K	3.46	6.51
Ca	3.27	7.26
Ti	0.64	1.45
V	0.01	0.02
Cr	0.01	0.04
Mn	0.16	0.26
Fe	5.30	11.62
Ni	0.01	0.02
Cu	0.10	0.16
Zn	0.50	0.72
Se	0.00	0.00
Br	0.04	0.05
Rh	0.05	0.09
Pb	0.02	0.04

Tabela 3 – Valores referentes à aplicação da técnica de análise dos principais componentes, para o conjunto de dados das medidas elementares dos filtros de material particulado fino concentrado ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)

	Fatores			
	1	2	3	4
Na	-.016	.051	.919	.100
Mg	.980	.026	-.059	.100
Al	.989	.020	-.027	-.006
Si	.993	.045	-.023	-.006
P	.124	-.028	-.134	.877
S	-.038	.926	.108	.075
Cl	.747	.542	-.179	.054
K	.968	.056	-.047	.021
Ca	.990	.095	-.039	-.007
Ti	.742	.220	-.119	-.076
V	.588	.686	-.008	-.011
Cr	.976	.108	-.055	.067
Mn	.958	.083	-.018	.231
Fe	.991	.093	-.024	-.012
Ni	.818	.459	.004	.072
Cu	.962	.215	-.016	.029
Zn	.813	.397	.143	-.072
Se	-.029	.101	.249	.858
Rh	.699	.567	-.203	-.046
Pb	-.074	-.016	.941	-.019
Br	.824	.321	-.049	.119

4.2. Análise histológica e histomorfométrica

Os resultados da análise histológica mostraram que as três zonas do córtex eram bem definidas em todos os grupos - glomerulosa, fasciculada e reticulada em ambos os grupos de mães (Fig. 2). Contudo, a espessura da zona glomerulosa do grupo G0NP (mães não expostas à poluição) foi menor do que os do G0P (mães expostas à poluição, $p < 0,05$, Fig. 3A). Não foram identificadas diferenças significantes nas outras zonas entre G0NP e G0P (Fig. 3B e C).

No grupo G1P (filhas de mães expostas à poluição), as células da zona fasciculada encontravam-se com citoplasma mais vacuolizado, representando imagens negativas de lipídios, denominadas de espongíócitos quando comparadas ao G1NP (filhas de mães não expostas à poluição). A Fig. 4 mostra corte histológico do córtex adrenal dos grupos. Não houve diferença na comparação da análise da espessura das zonas (Fig. 5).

Fig. 2 - Fotomicrografias das zonas do córtex da adrenal do grupo de mães expostas à poluição (A - G0P) e não expostas (B - G0NP). ZG=zona glomerulosa, ZF=zona fasciculada, ZR=zona reticulada, M=medula. Coloração H.E. Barra = 50 µm.

Fig. 3 – Representação gráfica da espessura (μm^2) das diversas zonas da camada cortical das adrenais de mães expostas à poluição (G0P) e mães não expostas à poluição (G0NP). A – zona glomerulosa; B- zona fasciculada; C- zona reticulada. * $p < 0,05$ comparado ao G0P.

Fig. 4 - Fotomicrografias das zonas do córtex da adrenal do grupo de filhas de mães expostas à poluição (G1P, A) e não expostas (G1NP,B). ZG=zona glomerulosa, ZF=zona fasciculada, ZR=zona reticulada, M=medula. Coloração H.E. Barra = 50 µm.

Fig. 5 - Representação gráfica da espessura (μm^2) das zonas do córtex das adrenais de filhas de mães expostas à poluição (G1P) e de filhas de mães não expostas à poluição (G1NP). A – zona glomerulosa; B- zona fasciculada; C- zona reticulada. Não houve diferença estatística entre os grupos.

4.3 Análise do VEGF-A

Na análise da reação de imunoistoquímica do VEGF-A (Fig. 6 a 8), não encontramos diferenças significantes nas zonas glomerulosa, fasciculada e reticulada da adrenal nas mães expostas à poluição (G0P) em relação às não expostas à poluição (G0NP) (Fig. 9).

As Fig. 10 a 12 mostram a imunoexpressão do VEGF-A nos grupos da primeira geração. Na análise das filhas (G1P e G1NP), a expressão do VEGF-A na zona glomerulosa da adrenal no grupo de filhas expostas à poluição G1NP é menor do que nas não expostas (G1P, $p>0,05$; Fig. 10 e 13). Não houve expressão significativa nas outras zonas entre os dois grupos ($p<0,05$, Fig. 13).

Fig. 6 – Fotomicrografias da imunoexpressão do VEGF-A da zona glomerulosa do córtex da adrenal pertencentes aos grupos G0P (A) e G0NP (B). Barra = 20 µm. Seta = indica imunoexpressão.

Fig. 7 – Fotomicrografias da imunoexpressão do VEGF-A da zona fasciculada do córtex da adrenal pertencente aos grupos G0P (A) e G0NP (B). Barra = 20 µm. Seta = indica imunoexpressão.

Fig. 8 – Fotomicrografias da imunoexpressão do VEGF-A da zona reticulada do córtex da adrenal pertencente aos grupos G0P (A) e G0NP (B). Barra = 20 µm. Seta = indica imunoexpressão.

Fig. 9 - Análise gráfica da imunoexpressão do VEGF-A das zonas do córtex das adrenais de mães expostas à poluição (G0P) e mães não expostas à poluição (G0NP). Não houve diferença estatística entre os grupos. A – zona glomerulosa; B - zona fasciculada; C - zona reticulada.

Fig. 10 – Fotomicrografias da imunoexpressão do VEGF-A da zona glomerulosa do córtex da adrenal pertencentes às filhas de mães poluídas (A) e não poluídas (B). Observar maior expressão nos animais não poluídos (B). Barra = 20 µm. Seta = indica imunoexpressão.

Fig. 11 - Fotomicrografias da imunoexpressão do VEGF-A da zona fasciculada da adrenal pertencente aos grupos G1P (A) e G1NP (B). Barra = 20 µm. . Seta = indica imunoexpressão.

Fig. 12 - Fotomicrografias da imunoexpressão do VEGF-A das zona reticulada da adrenal dos grupos G1P e G1NP. Barra = 20µm. Seta = indica imunoexpressão.

Fig. 13 - Análise gráfica da imunoexpressão do VEGF-A das zonas do córtex das adrenais de filhas de mães expostas à poluição (G1P) e filhas de mães não expostas à poluição (G1NP). A – zona glomerulosa; B- zona fasciculada; C- zona reticulada. * $p < 0,05$ comparado ao G1P.

4.4 Análise do Ki-67

As fig. 14 a 16 mostram a reação do Ki-67 nas zonas corticais da adrenal dos grupos de mães (G0P e G0NP). A expressão das mães expostas (G0NP) foi menor do que nas do G0P na zona reticulada da adrenal ($p < 0,05$; Fig. 16 e 17). Não encontramos diferenças significantes nas outras zonas entre estes dois grupos.

As fig. 18 a 20 mostram a reação do Ki-67 nas zonas corticais da adrenal dos grupos de filhas (G1P e G1NP). Observamos que a zona glomerulosa no grupo G1NP apresentou menor expressão do que G1P ($p > 0,05$, Fig. 18 e 21). Não houve diferença de expressão nas outras zonas (Fig. 21).

Fig. 14 – Fotomicrografias da imunoexpressão do Ki-67 da zona glomerulosa das adrenais pertencentes o grupo G0P e G0NP (A e B). Barra = 20 µm. Seta = indica imunoexpressão.

Fig. 15 – Fotomicrografias da imunoexpressão do Ki-67 da zona fasciculada das adrenais pertencentes nos grupos G0P e G0NP (A e B). Barra = 20 µm. Seta = indica imunoexpressão.

Fig. 16 – Fotomicrografias da imunoexpressão do Ki-67 da zona reticulada das adrenais pertencentes nos grupos G0P (A) e G0NP (B). Verifica-se menor expressão do Ki-67 nas mães não poluídas (G0NP). Barra = 20 µm. Seta = indica imunoexpressão.

Fig. 17 - Análise gráfica da imunoexpressão do Ki-67 das zonas do córtex das adrenais de mães expostas à poluição (G0P) e mães não expostas à poluição (G0NP). A – zona glomerulosa; B - zona fasciculada; C - zona reticulada. *p<0,05 comparado ao G0P.

Fig. 18 – Fotomicrografias da imunoexpressão do Ki-67 da zona glomerulosa das adrenais pertencentes o grupo G1P (A) e G1NP (B). Observar maior expressão em A. Barra = 20 μ m. Seta = indica imunoexpressão.

Fig. 19 – Fotomicrografias da imunoexpressão do Ki-67 da zona fasciculada das adrenais pertencentes o grupo G1P e G1NP (A e B). Barra = 20 μ m. Seta = indica imunoexpressão.

Fig. 20 – Fotomicrografias da imunoexpressão do Ki-67 da zona reticulada das adrenais pertencentes o grupo G1P (A) e G1NP (B). Barra = 20 μ m. Seta = indica imunoexpressão.

Fig. 21 - Análise gráfica da imunoexpressão do Ki-67 das zonas do córtex das adrenais de filhas de mães expostas à poluição (G1P) e filhas de mães não expostas à poluição (G1NP). A – zona glomerulosa; B - zona fasciculada; C - zona reticulada. * $p < 0,05$ comparado ao G1P.

4.5 - Análise da Caspase-3-clivada

As fig. 22 a 24 mostram a reação de caspase-3 clivada nas zonas corticais da adrenal dos grupos de mães (G0P e G0NP). Na análise da caspase-3 clivada, na comparação das mães expostas à poluição (G0P) em relação às não expostas à poluição (G0NP), não encontramos diferenças significantes na imunoexpressão das zonas glomerulosa e reticulada.

Contudo, houve menor expressão na zona fasciculada das mães não expostas (G0NP) quando comparadas aos das expostas (G0P) na zona fasciculada ($p < 0,05$, Fig. 25).

As fig. 26 a 28 mostram a reação de caspase-3 clivada nas zonas corticais da adrenal dos grupos de filhas (G1P e G1NP). Na análise das filhas (primeira geração), não encontramos diferenças significantes na zona reticulada ($p > 0,05$, Fig. 29) entre os dois grupos. Contudo, houve diferença na imunoexpressão das zonas glomerulosa e fasciculada pois ocorreu maior expressão da caspase-3 clivada nas filhas de mães poluídas (G1NP) (G1P; $p < 0,05$; Fig. 29).

Fig. 22 – Fotomicrografias da imunopressão da Caspase-3 clivada da zona glomerulosa das adrenais pertencentes o grupo G0P (A) e G0NP (B). Barra = 20 µm. Seta = indica imunopressão.

Fig. 23 – Fotomicrografias da imunopressão da Caspase-3 clivada da zona fasciculada das adrenais pertencentes o grupo G0P (A) e G0NP (B). Observar maior expressão em A. Barra = 20 µm. Seta = indica imunopressão.

Fig. 24 – Fotomicrografias da imunopressão de Caspase-3 clivada da zona reticulada das adrenais pertencentes o grupo G0P (A) e G0NP (B). Barra = 20 µm. Seta = indica imunopressão.

Fig. 25 - Análise gráfica da imunoexpressão da Caspase-3 clivada das zonas do córtex das adrenais de filhas de mães expostas à poluição (G0P) e filhas de mães não expostas à poluição (G0NP). A – zona glomerulosa; B - zona fasciculada; C - zona reticulada. * $p < 0,05$ comparado ao G0P.

Fig. 26 – Fotomicrografias da imunoexpressão de Caspase-3 clivada na zona glomerulosa das adrenais pertencentes o grupo G1P (A) e G1NP (B). Barra = 20 µm. Seta = indica imunoexpressão.

Fig. 27 – Fotomicrografias da imunoexpressão de Caspase-3 clivada da zona fasciculada das adrenais pertencentes o grupo G1P (A) e G1NP (B). Observamos maior expressão em A. Barra = 20 µm. Seta = indica imunoexpressão.

Fig. 28 – Fotomicrografias da imunoexpressão da Caspase-3 clivada da zona reticulada das adrenais pertencentes o grupo G1P (A) e G1NP (B). Barra = 20 µm. Seta = indica imunoexpressão.

Fig. 29 - Análise gráfica da imunoexpressão da Caspase-3 clivada das zonas do córtex das adrenais de filhas de mães expostas à poluição (G1P) e filhas de mães não expostas à poluição (G1NP). A – zona glomerulosa; B - zona fasciculada; C - zona reticulada. * $p < 0,05$ comparado ao G1P.

5. DISCUSSÃO

O efeito da poluição sobre os seres vivos constitui tema muito discutido e de extrema importância, pois pode afetar a saúde e propiciar o surgimento de doenças (Mohallem et al., 2005; Veras et al., 2009; Riva et al., 2011, Brucker et al., 2014). De fato, estudos epidemiológicos e experimentais mostram que a poluição do ar determinaria efeitos deletérios sobre os animais, bem como no ser humano (Mohallem et al., 2005; Veras et al., 2009; Riva et al., 2011, Brucker et al., 2014) que incluem riscos de doença cardiovascular, câncer e infertilidade (Dejmek et al., 2000; Glinianaia et al., 2004). Sabe-se ainda que a poluição pode afetar a função reprodutiva, a ovulação, a evolução da gestação, com maiores taxas de abortamentos ou prematuridade (Dejmek et al., 2000; Glinianaia et al., 2004; Srám et al., 2005).

O conhecimento sobre os efeitos negativos do ar poluído sobre o metabolismo e o sistema endócrino ainda é escasso, principalmente, relacionado com o córtex da adrenal. Nossos dados sugerem que a poluição do ar afetaria a histomorfologia da adrenal de camundongas, de forma diferente, nas mães e filhas expostas.

Para o entendimento do nosso modelo experimental, são necessárias algumas considerações sobre o concentrador de partículas ambientais (CPA). Este equipamento possibilitou avaliar minuciosamente as partículas do ar poluído em que os animais foram realmente expostos. Outro fato relevante é a seleção dos poluentes que podem passar pelo pulmão, atingir a circulação sanguínea e afetar diretamente a adrenal dos animais. Neste particular,

somente o CPA MP_{2,5}µm possibilita a exposição mais controlada do ar inalado contendo as partículas selecionadas, que terão efeito sistêmico (Liu et al. 2014), além disso proporciona controle mais adequado dos experimentos.

Nosso trabalho também difere de outros estudos (Mohallen et al., 2005 e Veras et al., 2009), nos quais os animais eram contidos em câmaras de topo aberto livremente, perto de via pública, expostos continuamente à poluição sonora e às variações climáticas que poderiam influenciar os resultados. Outra vantagem do nosso estudo é que a câmara pode diminuir a influência de fatores ambientais, como variações atmosféricas e, possivelmente, outros agentes agressores (infecções por microorganismos).

Em relação ao equipamento PM 10µm, o CPA usado em nosso experimento é superior para avaliar efeitos sistêmicos, pois o PM 10 µm não permite o mesmo estudo da adrenal visto que a maioria das partículas fica retida nas vias respiratórias superiores (Kampa e Castanas, 2008).

Entre as desvantagens do CPA, salienta-se sua dependência com relação ao clima, como verificamos durante nosso estudo. Devido à sua tecnologia de impactadores virtuais, não pode ser utilizado durante o dia com umidade superior a 80% ou em dia chuvoso. Seu uso sob essas condições bloquearia a passagem de ar, não só podendo danificar o próprio equipamento como não ofertaria a quantidade de MP suficiente para os animais de experimentação. Esta limitação pode vir a ser um problema para exposições contínuas na comparação de várias gerações, bem como na gestação.

O ar poluído pode trazer vários problemas à saúde humana. Alguns autores mostraram que as pessoas muito expostas aos poluentes do ar, como taxistas, teriam maior risco cardiovascular devido ao desenvolvimento de

processo inflamatório crônico sistêmico, acometendo os vasos sanguíneos e produzindo disfunção endotelial (Riva et al., 2011; Brucker et al., 2014).

Estudos anteriores indicam que a exposição a produtos químicos ambientais e ocupacionais, como o material particulado, pode também contribuir para doença cardiovascular crônica (Pope et al., 2004; Brook et al., 2010). Investigações toxicológicas têm relatado que a exposição a poluentes urbanos ambiental pode acelerar o processo de aterosclerose (Kunzli et al., 2005; Hoffmann et al., 2007; Diez Roux et al., 2008), mas existem poucos estudos referentes a esta associação em trabalhadores urbanos com a exposição ocupacional a longo prazo à poluição veicular que apresenta partículas que podem atingir a circulação sanguínea, à semelhança do nosso modelo experimental.

Partículas finas em suspensão são as mais propensas a entrarem facilmente no sistema respiratório após a exposição, levando ao aumento de substâncias da degradação do oxigênio (estresse oxidativo), ou seja, formando radicais livres. Consequentemente, também haveria incremento da peroxidação lipídica e proteica, produzindo substâncias tóxicas que podem levar ao dano celular e aumentar a apoptose (Gutteridge, 1995). Além disso, há também ativação de vários mediadores inflamatórios (VEGF, EGF e TNF) que são capazes de exacerbar o processo inflamatório pulmonar, piorar a disfunção endotelial e ativar o sistema de coagulação sanguínea, propiciando maior risco de tromboembolismo, acidente vascular encefálico e infarto agudo do miocárdio (Seaton et al., 1995; Baccarelli et al., 2007; Delfino et al., 2009; Brook et al., 2011; Huttunen et al., 2012) .

A piora do processo inflamatório crônico foi bem salientada em estudos prévios, mostrando íntima relação tanto com poluentes do ar, como com eventos cardiovasculares (Pope et al., 2004; Brook, 2008). Dados de estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que a exposição a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) presentes na poluição do ar urbano está associada com o risco de aterosclerose acelerada (Curfs et al., 2004; Knaapen et al., 2007), aumento de doenças cardiovasculares e alteração do suprimento sanguíneo para os tecidos, inclusive para a suprarrenal. Contudo, esses estudos não avaliaram o sistema endócrino desses pacientes com afecção cardiovascular.

A aterosclerose é processo inflamatório crônico e degenerativo caracterizado por processo multifatorial de formação de placas (Libby et al., 2002). Além disso, há envolvimento de disfunção endotelial e acúmulo de lipídios, processo que estimula o recrutamento de monócitos e a produção de várias citocinas pró-inflamatórias da parede arterial (Lusis, 2000), piorando o dano vascular. Múltiplos fatores de risco convencionais foram identificados, como estilo de vida, hipertensão, diabetes melito, a predisposição genética, radicais livres e, hoje em dia, a atuação de substâncias químicas ambientais, como poluentes, podem estar envolvidos (Bhatnagar, 2006; Hennig et al., 2007). De fato, há também alteração do sistema endócrino, com maior risco de desenvolvimento de diabetes melito (Eze et al., 2014). Portanto, o sistema endócrino parece ser um alvo dos poluentes, principalmente das partículas que conseguem atingir a circulação sanguínea, ou seja, partículas da composição do MP_{2,5}µm.

O córtex da glândula adrenal é constituído por três zonas com características distintas: glomerulosa, fasciculada e reticulada (Evêncio Neto et

al., 1996; Fuchs et al., 2010; Mitani, 2014). A primeira é a porção mais externa, ficando logo abaixo de fina camada de tecido conjuntivo denominada cápsula de revestimento. Esta zona produz grande quantidade de aldosterona, mineralocorticoide, responsável pelo equilíbrio hidrossalino e que também interfere no controle da pressão arterial sistêmica (Evêncio Neto et al., 1996; Mitani, 2014). O mecanismo de ação da aldosterona seria diretamente sobre os túbulos distais e os ductos coletores dos rins (Bollag, 2014), fazendo com que ocorra eliminação de potássio, retenção de sódio e de água, que é importante para a manutenção da pressão arterial sistêmica (Kopf et al., 2011). Quando a aldosterona está em concentrações supra-fisiológicas, há aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, o que reforça o interesse do estudo da adrenal em camundongas. Talvez, esta zona esteja relacionada com os estudos prévios sobre poluição e doença cardiovascular (Curfs et al., 2004; Knaapen et al., 2007).

Em nosso estudo, os dados mostram que a exposição ao ar com poluentes de MP_{2,5}µm influencia as várias zonas da adrenal em camundongas, mas com ação diferente quando comparamos a exposição das mães em relação à das filhas. Isto parece paradoxal, visto que as alterações histológicas da zona glomerulosa das mães não se repetiram com as filhas. Possivelmente, este resultado possa ser explicado baseado nos achados da imunoistoquímica que evidenciou maior equilíbrio entre a proliferação e a apoptose nessa zona nas camundongas filhas expostas. Além disso, registramos expressão do VEGF-A bem menor. Salienta-se que este fator de crescimento está relacionado com processo inflamatório crônico (Shinkaruk et

al., 2003), proliferação tecidual e maior aporte sanguíneo por incremento da angiogênese (Favier e Corvol, 2001).

Na nossa análise, só observamos alterações da zona glomerulosa nas mães expostas à poluição, ou seja, a geração zero (G0), as quais não foram identificadas nos outros grupos, nem na primeira geração (G1). Segundo nosso raciocínio prévio, essa zona poderia estar mais ativa metabolicamente devido à maior espessura, apesar de não se identificar maior expressão dos marcadores de proliferação celular em nosso material. A expressão do Ki-67 tem correlação positiva com a mitose e a proliferação do tecido, como evidenciado em outros estudos (Tarasenko et al., 2012).

Abaixo da zona glomerulosa, identifica-se a zona fasciculada que ocupa grande dimensão e boa parte da espessura da camada cortical da adrenal de animais. No grupo das filhas expostas à poluição (G1P), as células da zona fasciculada encontravam-se mais volumosas com citoplasma vacuolizado e com imagem microscópica negativa de lipídios, denominadas espongíócitos. Estas estruturas têm gotículas lipídicas com triglicerídeos, ácidos graxos, colesterol e fosfolípidos, que são precursores de esteroides produzidos pelas adrenais (Mitani, 2014). Apesar deste aspecto histológico nas filhas expostas ao ar poluído, não houve aumento significativo da zona fasciculada nos grupos estudados. Talvez este processo pudesse ser atribuído pelo aumento da taxa de apoptose nesta área, como evidenciamos pela imunoexpressão da caspase-3 clivada. Contudo, há a necessidade de mais experimentos para avaliar outras possibilidades e mecanismos compensatórios envolvidos.

Na zona fasciculada, o principal hormônio é a corticosterona, que é um glicorticoide que tem ação no hipotálamo, reduzindo a produção e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) o qual controla atividade da adrenal (Almeida et al., 2007). Possivelmente, a exposição de ar poluído em curto prazo não determina aumento significativo da histologia da adrenal de camundongas. Contudo, deve-se avaliar a longo prazo para verificar se realmente não ocorre proliferação nesta zona, o que determinaria também repercussões sistêmicas.

A zona mais interna da camada cortical antes da medula é a reticulada. Nela, produzem-se os pró-androgênios que podem levar ao desenvolvimento de características sexuais masculinas. De fato, a maior quantidade destes esteroides é composta pela dehidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona as quais podem ser convertidos em testosterona (Mitani, 2014). Nossos dados mostraram que as mães expostas à poluição (GOP) tiveram elevação da imunoexpressão do Ki-67, ou seja, maior proliferação e, possivelmente, maior produção de androgênios.

Em mulheres normais, os androgênios são sintetizados em pequenas quantidades (Voutilainen e Jääskeläinen, 2014), tendo em vista que a maior parte da produção de testosterona estaria relacionada com a produção folicular dos ovários (Gleicher et al., 2014). No entanto, se a adrenal tiver aumento significativo da produção de esteroides pró-androgênicos, pode haver hirsutismo e até, nos casos mais extremos, virilização (Hohl et al., 2014; Voutilainen e Jääskeläinen, 2014). Este fato é bem conhecido nas hiperplasias congênitas da adrenal, onde a deficiência de algumas enzimas pode levar ao

aumento da produção de androstenediona e DHEA (Voutilainen e Jääskeläinen, 2014). Em casos extremos, estas mulheres podem ter também queda de cabelo, crescimento excessivo dos pêlos e alteração da voz (Hohl et al., 2014; Voutilainen, Jääskeläinen, 2014). Esta alteração em camundongas não é possível de avaliar devido ao metabolismo específico deste animal, bem como o comportamento do pelo ser diferente do ser humano. Contudo, os animais com excesso de androgênios desenvolvem estropermanente (Mahamed et al, 2011), que não ocorreu em nossos animais.

Nosso estudo também possibilitou análise dos poluentes aos quais os animais foram expostos que podem causar alterações em vários órgãos e, possivelmente, agir nas suas estruturas e no sinal intracelular (Valko et al., 2005; Kampa e Castanas, 2007). Dentre os mecanismos celulares mais comuns, os poluentes do ar frequentemente exercem seus efeitos sobre as substâncias pró-oxidantes de lipídeos e proteínas ou nos radicais livres, promovendo estresse oxidativo e indução de respostas inflamatórias (Menzel, 1994, Rahman e MacNee, 2000).

Os radicais livres prejudicam os lipídeos, as proteínas celulares, DNA mitocondrial ou nuclear, inibindo sua função normal (Valko et al., 2006). Além disso, podem interferir com vias de sinalização intracelular (Valko et al., 2006). Os radicais livres são continuamente gerados durante o metabolismo normal e em resposta a exposições ambientais exógenas, como irradiação, fumaça de cigarro, metais e ozônio. Quando aumentam a concentração de radicais livres, devido à intensa defesa do organismo, pode ocorrer elevação do estresse oxidativo. Este fenômeno está associado a ampla variedade de doenças

degenerativas, como aterosclerose, infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico, doença inflamatória crônica e afecções que pioram com o envelhecimento, como osteoporose e diabetes. Algumas mulheres também têm maior frequência de desenvolverem neoplasias (Pope et al., 2004; Brook, 2008).

Em pacientes com hiperaldosteronismo primário, alguns investigadores mostraram aumento dos parâmetros bioquímicos do estresse oxidativo em pacientes e redução dos mesmos após a adrenalectomia e melhora dos níveis pressóricos (Petramala et al., 2014). Contudo, os autores não concluíram se o aumento do estresse oxidativo seria responsável pelo hiperaldosteronismo ou vice-versa (Petramala et al., 2014). Outro estudo usando sulfeto de hidrogênio que determina estresse oxidativo mitocondrial, mostrou tanto *in vitro*, quanto *in vivo* à morte celular, diminuição de enzimas da adrenal e insuficiência adrenal em animais (Wang et al., 2014). Todavia, em nossos dados não observamos aumento da apoptose, globalmente, na adrenal das camundongas, tanto nas mães, quanto nas filhas.

Salienta-se ainda que no ar poluído empregado há metais pesados que têm efeitos tóxicos que também podem induzir o estresse oxidativo. De fato, diversos cátions polivalentes (cálcio, zinco e magnésio) funcionam como portadores de carga, intermediários em reações catalizadoras, ou como elementos estruturais na manutenção da formação da proteína e que interferem com a função intracelular, no estresse oxidativo e na morte celular. Com o tempo, os metais se acumulam em organelas celulares e interferem

com a sua função, alterando a atividade hormonal (Valko et al., 2006; Mitani, 2014).

Estudos mostram que o acúmulo de chumbo na mitocôndria induz a várias alterações, tais como a inibição de captação de Ca^{++} , diminuição do potencial de membrana e rápida liberação de Ca^{++} (Chavez et al., 1987). Além disso, estes metais ligam-se a proteínas (Goering, 1993) e inibem grande número de enzimas, incluindo as mitocondriais (Rossi et al., 1993). Proteínas de ligação de ácido nucleico também são envolvidas, ao mesmo tempo em que tem sido demonstrado que os metais podem ainda ligar-se ao DNA, afetando a expressão de genes que podem determinar a proliferação celular ou ao contrário, a apoptose. Talvez, *in vivo* seja muito difícil avaliar esta possibilidade. Assim, futuros estudos *in vitro* com células específicas da adrenal poderiam dar respostas mais sólidas sobre a ação do chumbo e do cálcio sobre o metabolismo destas células.

Outro metal incluído no material particulado seria o níquel, que entra no núcleo, interage com a cromatina e silencia a expressão de genes, como os supressores de tumor, induzindo à carcinogênese (Costa et al., 2003). Por esta ação exclusiva, poderia fazer proliferação das células da adrenal de camundongas. Possivelmente, a combinação com a ação de outras substâncias tóxicas do ar poluído pode ter mascarado este efeito em nossos animais.

O fator nuclear kappa-B (NF- κ B) é importante na transcrição tanto da apoptose como do processo inflamatório sendo ativado pelo níquel. Verificou-se que o fator de transcrição 1 (ATF-1) é ativado em células tratadas com

níquel. O ATF-1 pertence a uma família ATF/CREB originalmente identificado como um alvo da via de sinalização AMPc (Shaywitz et al., 1999). Sugere-se que a ativação do ATF-1 pelo níquel desempenha o papel de um regulador negativo da TSP-1 (Salnikow et al., 1997). A proteína TSP-1 é um potencial regulador de desenvolvimento de tumor *in vivo*, pois o aumento de seus níveis suprime o crescimento de vasos sanguíneos no tumor. Assim, a diminuição da expressão de TSP-1 em tumores aumenta a angiogênese, que por sua vez estimula o crescimento de tumores. Talvez isto possa explicar parcialmente a proliferação da zona glomerulosa das filhas expostas à poluição do ar.

A dioxina provoca vasto leque de efeitos danosos (Birnbaum, 1994), alterando o metabolismo pela indução de grande número de enzimas, como CYPs (citocromo P450), glutathione-transferase, tirosina-quinase, entre outras. Estas enzimas atuam tanto na produção, como na degradação de vários hormônios (estrogênios, androgênios, glicocorticoides, insulina, hormônios da tireóide e seus receptores), como no metabolismo celular, perdendo controle da proliferação e morte celular. Além disso, pode interferir com fatores de crescimento como FGF, TGF- β , TNF- α e seus receptores (Cheng, 2014).

Na célula, as dioxinas podem interagir com o receptor de hidrocarbonetos de arila (AhR) (Schwarz et al., 2000), agindo como fator de transcrição após a translocação nuclear, permitindo a sua interação com o DNA. O complexo receptor-ligante se liga a locais específicos no DNA, alterando a expressão de vários fatores como a metiltransferase (Moskalev et al., 2014). O resultado desta ação seria a morte celular e aumento de apoptose, o que não ficou evidente em nosso material, com exceção da zona fasciculada, tanto das

mães, quanto das filhas. Talvez, esta região seja mais sensível aos poluentes e ao estresse oxidativo. Contudo, não se sabe se este efeito (morte celular) poderá determinar redução de esteróides sexuais e comprometer o sistema reprodutor em longo prazo.

O cobre (Cu), além das necessidades celulares, medeia a produção de radicais livres e de oxidação direta de lipídeos, proteínas e DNA. O equilíbrio entre o conteúdo intracelular e extracelular de cobre é impulsionado por sistemas de transporte que regulam a captação, exportação e compartimentalização intracelular (Harris e Percival, 1991). O equilíbrio entre a quantidade saudável de cobre e de toxicidade é alcançada tanto ao nível celular e no nível dos tecidos dos órgãos (Valko et al., 2005). As células regulam o tráfego de íons de metais de transição, mantendo a quantidade necessária para a função biológica, evitando níveis tóxicos. Este seria outro fator que pode ter influenciado nossos resultados.

Outro metal pesado inalado através do MP 2.5 é o cromo (Cr). Este metal induz à ativação de NF- κ B em células Jurkat (Ye et al., 1995). Tal ativação é atribuída a radicais hidroxila gerados pela Reação Fenton do Cr. Além disso, a atividade de um outro fator de transcrição AP-1 é estimulada pelo Cr, sendo associado com fosforilação de quinase dependente da MAP, p38 e JNK, mas não pela quinase regulada por sinal extracelular (ERK). A indução de AP-1 e NF- κ B por Cr é atenuada pela inibição de p38 e I κ B quinase (IKK), respectivamente. Sugerem que Cr mediado por radicais, como resultado da Reação de Fenton pode servir de sinal para a ativação de ambos (AP-1 e NF- κ B), ao passo que a p38 e JNK atuam como uma quinase inibidora de AP-1 e

NF-kB, respectivamente. A proteína p53 é uma proteína supressora de tumor que desempenha papel importante na proteção das células de alterações tumorigênicas. Para algumas neoplasias descobriu-se que as células continham mutações no gene p53. Este fator de transcrição pode ser ativado por uma variedade de estímulos, envolvendo estresse oxidativo e radiação (Valko et al., 2005). Esta via celular da MAP pode levar à proliferação celular, portanto, o cromo no ar poluído poderia estimular a proliferação celular nas zonas reticulada e glomerulosa, respectivamente, das mães e das filhas. Contudo, nosso resultado histológico não comprovou tal fato, talvez por haver outros mecanismos intracelulares envolvidos.

Finalmente, como pudemos observar no nosso estudo, os mecanismos de ação do MP 2,5 originado da queima de combustíveis fósseis no córtex da adrenal e suas consequências ainda não são totalmente conhecidos. Verificamos que, em cada zona da adrenal, houve um efeito diferente e que a mesma alteração pode não se repetir na geração seguinte (comparação entre mães e filhas). Possivelmente, há múltiplos mecanismos envolvidos que necessitam de estudos mais específicos para elucidar melhor os efeitos do ar poluído nas adrenais.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados permitem as seguintes conclusões:

- a) As adrenais de camundongas mães expostas à poluição apresentaram à histomorfometria, maior espessura da zona glomerulosa. As respectivas crias revelaram maior quantidade de espongíócitos na zona fasciculada;
- b) As adrenais de camundongas filhas de mães expostas à poluição tiveram menor imunoexpressão de VEGF-A na zona glomerulosa do que as filhas do grupo controle;
- c) As adrenais de camundongas mães expostas à poluição mostraram maior imunoexpressão de Ki-67 na zona reticulada do que as mães não expostas. As adrenais de camundongas filhas de mães expostas à poluição apresentaram maior imunoexpressão na zona glomerulosa do que as não expostas;
- d) As adrenais de camundongas mães expostas à poluição e das filhas de mães expostas à poluição revelaram maior imunoexpressão de caspase-3 clivada na zona fasciculada do que as não expostas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Audi SS, Abraham ME, Borker, AS. Effect of cigarette smoke on body weight, food intake and reproductive organs in adult albino rats. *Indian J Exp Biol.* 2006;44(7):562-5.

Almeida H, Matos L, Neves D. Caspase-3 and Bcl-2 expression in aging in adrenal zona reticularis after dexamethasone administration. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1119:190-5.

Baccarelli A, Zanobetti A, Martinelli I, Grillo P, Hou L, Giacomini S, Bonzini M, Lanzani G, Mannucci PM, Bertazzi PA, Schwartz J. Effects of exposure to air pollution on blood coagulation. *J Thromb Haemost.* 2007;5(2):252-60.

Bergantini AP, Castro FA, Souza AM, Fett-Conte AC. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2005;27(2):120-5.

Bhatnagar A. Environmental cardiology: studying mechanistic links between pollution and heart disease. *Circulation Research.* 2006;99(7):692-705.

Birnbaum LS. The mechanism of dioxin toxicity: relationship to risk assessment. *Environ Health Perspect.* 1994;102:9:157-67.

Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin Cell Biol.* 2003;15:725-31.

Bollag WB. Regulation of aldosterone synthesis and secretion. *Compr Physiol.* 2014;4(3):1017-55.

Bozzo A, Soñez CA, Mugnaini MT, Pastorino IC, Rolando AN, Romanini MC, Gauna HF. Chronic stress effects on the apoptotic index of the adrenal cortex of pregnant rats. *Biocell.* 2006;30(3):439-45.

Brook RD. Cardiovascular effects of air pollution. *Clin Sci (Lond).* 2008;115(6):175-87.

Brook RD, Bard RL, Burnett RT, Shin HH, Vette A, Croghan C, Phillips M, Rodes C, Thornburg J, Williams R. Differences in blood pressure and vascular responses associated with ambient fine particulate matter exposures measured at the personal versus community level. *Occup Environ Med.* 2011;68(3): 224-230.

Brucker N, Charão MF, Moro AM, Ferrari P, Bubols G, Sauer E, Fracasso R, Durgante J, Thiesen FV, Duarte MM, Gioda A, Castro I, Saldiva PH, Garcia SC. Atherosclerotic process in taxi drivers occupationally exposed to air pollution and co-morbidities. *Environ Res.* 2014;131:31-8

Buck Louis GM. Persistent environmental pollutants and couple fecundity: an overview. *Reproduction.* 2014;147(4):R97-R104.

Carreras HA, Rodriguez JH, Gonzalez CM, Wannaz ED, Ferreyra FG, Perez CA, Pignata ML. Assessment of the relationship between total suspended particles and the response of two biological indicators transplanted to an urban area in central Argentina. *Atmospheric Environment.* 2009;43:2944-49.

CETESB, Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo. CETESB, 2010 [on-line] (citado 16 nov 2010).Disponível em:

<http://www.cetesb.sp.gov.br/ar/qualidade-do-ar/31-publicacoes-e-relatorios>

Chávez E, Jay D. Control of mitochondrial Ca²⁺ retention by ADP-stimulated glutamic dehydrogenase. *J Bioenerg Biomembr.* 1987;19(5):571-80.

Cheng X, Vispute SG, Liu J, Cheng C, Kharitononkov A, Klaassen CD. Fibroblast growth factor (Fgf) 21 is a novel target gene of the aryl hydrocarbon receptor (AhR). *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;278(1):65-71.

Cleary MA, Kilian K, Wang Y, Bradshaw J, Cavet G, Ge W, Kulkarni A, Paddison PJ, Chang K, Sheth N, Leproust E, Coffey EM, Burchard J, McCombie WR, Linsley P, Hannon GJ. Production of complex nucleic acid libraries using highly parallel in situ oligonucleotide synthesis. *Nat Methods.* 2004;1(3):241-8.

Correia JS, Araújo, ACC, Silva FCA, Maia CS, Júnior PEA, Silva Júnior VA, Teixeira VW, Teixeira AAC. Aspectos morfológicos da adrenal de fetos de ratos (*rattus norvegicus albinus*) submetidos à ausência de luz. *Arq Inst Biol Supl.* 2002;69:108-110.

Costa M, Yan Y, Zhao D, Salnikow K. Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis: gene silencing by nickel delivery to the nucleus and gene activation/inactivation by nickel-induced cell signaling. *J Environ Monit.* 2003;2:222-3.

Curfs DM, Lutgens E, Gijbels MJ, Kockx MM, Daemen MJ, van Schooten FJ. Chronic exposure to the carcinogenic compound benzo[a]pyrene induces larger

and phenotypically different atherosclerotic plaques in ApoE-knockout mice. *Am J Pathol.* 2004;164(1):101-8.

Dadvand P, Ostro B, Figueras F, Foraster M, Basagaña X, Valentín A, Martinez D, Beelen R, Cirach M, Hoek G, Jerrett M, Brunekreef B, Nieuwenhuijsen MJ. Residential Proximity to Major Roads and Term Low Birth Weight: The Roles of Air Pollution, Heat, Noise, and Road-Adjacent Trees. *Epidemiology.* 2014. No prelo.

Dejmek J, Selevan SG, Benes I, Solanský I, Srám RJ. Maternal exposure to dust particles during pregnancy and fetal growth in 2 regions with different levels of air pollution. *Cas Lek Cesk.* 2000;139(6):177-82.

Delfino RJ, Staimer N, Tjoa T, Gillen DL, Polidori A, Arhami M, Kleinman MT, Vaziri ND, Longhurst J, Sioutas C. Air pollution exposures and circulating biomarkers of effect in a susceptible population: clues to potential causal component mixtures and mechanisms. *Environ Health Perspect.* 2009;117(8):1232-8.

Diez Roux AV¹, Auchincloss AH, Franklin TG, Raghunathan T, Barr RG, Kaufman J, Astor B, Keeler J. Long-term exposure to ambient particulate matter and prevalence of subclinical atherosclerosis in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Am J Epidemiol.* 2008;15;167(6):667-75.

Evêncio Neto J, Soares Junior JM, Utumi CE, Simões MJ, Baracat EC. Histofisiologia da supra-renal. *Femina*. 1996;24(9):819-22.

Eze IC, Schaffner E, Fischer E, Schikowski T, Adam M, Imboden M, Tsai M, Carballo D, von Eckardstein A, Künzli N, Schindler C, Probst-Hensch N. Long-term air pollution exposure and diabetes in a population-based Swiss cohort. *Environ Int*. 2014;6;70C:95-105.

Favier J, Corvol P. Physiological angiogenesis. *Therapie*. 2001;56(5):455-63.

Figueiredo CC, Resck DVS, Gomes AC, Ferreira EAB, Ramos MLG. Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana em resposta a diferentes sistemas de manejo em um Latossolo Vermelho no Cerrado. *R. Bras. Ci. Solo*. 2007;31:551-562.

Fuchs LFP, Guimarães CR, Maganhin CC, Simões RS, Baracat MCP, Soares Junior JM, Baracat EC. Aspectos imunoistoquímicos da adrenal de ratas pinealectomizadas e tratadas com melatonina. *Rev. Bras. Gin. Obstet*. 2010;32(8):374-80.

Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. The role of androgens in follicle maturation and ovulation induction: friend or foe of infertility treatment? *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9:116.

Glinianaia SV1, Rankin J, Bell R, Pless-Mulloli T, Howel D. Does particulate air pollution contribute to infant death? A systematic review. *Environ Health Perspect*. 2004;112(14):1365-71.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte celular por apoptose. *Rev Bras Cancerol*. 2007;53(3):335-43.

Goebeler M, Meinardus-Hager G, Roth J, Goerdts S, Sorg C. Nickel chloride and cobalt chloride, two common contact sensitizers, directly induce expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), and endothelial leukocyte adhesion molecule (ELAM-1) by endothelial cells. *J Invest Dermatol*. 1993;100(6):759-65.

Goering PL. Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. *Neurotoxicology*. 1993;14(2-3):45-60.

Harris ED, Percival SS. A role for ascorbic acid in copper transport. *Am J Clin Nutr*. 1991;54:1193S-1197S.

Hennig B, Oesterling E, Toborek M. Environmental toxicity, nutrition, and gene interactions in the development of atherosclerosis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007;17(2):162-9.

Hinson JP, Raven PW. Effects of endocrine-disrupting chemicals on adrenal function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006;20(1):111-20.

Hoffmann B, Moebus S, Möhlenkamp S, Stang A, Lehmann N, Dragano N, Schmermund A, Memmesheimer M, Mann K, Erbel R, Jöckel KH; Heinz Nixdorf Recall Study Investigative Group. Residential exposure to traffic is associated with coronary atherosclerosis. *Circulation*. 2007;31;116(5):489-96.

Hohl A, Ronsoni MF, de Oliveira M. Hirsutism: diagnosis and treatment. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014;58(2):97-107.

Huttunen K, Siponen T, Salonen I, Yli-Tuomi T, Aurela M, Dufva H, Hillamo R, Linkola E, Pekkanen J, Pennanen A, Peters A, Salonen RO, Schneider A, Tiittanen P, Hirvonen MR, Lanki T. Low-level exposure to ambient particulate matter is associated with systemic inflammation in ischemic heart disease patients. *Environ Res*. 2012;116:44-51.

Kampa M, Castanas E. Human health effects of air pollution. *Environ Pollut.* 2008;151(2):362-7.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J. Cancer.* 1972;6:239-57.

Kirkwood J, Hubrecht R. The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals. Wiley-Blackwell, 8° ed;2010.

Knaapen AM, Curfs DM, Pachen DM, Gottschalk RW, de Winther MP, Daemen MJ, Van Schooten FJ. The environmental carcinogen benzo[a]pyrene induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 in vascular tissue: a possible role in atherogenesis. *Mutat Res.* 2007;1;621(1-2):31-41.

Kopf PG, Gauthier KM, Zhang DX, Falck JR, Campbell WB. Angiotensin II regulates adrenal vascular tone through zona glomerulosa cell-derived EETs and DHETs. *Hypertension.* 2011;57(2):323-9.

Künzli N, Jerrett M, Mack WJ, Beckerman B, LaBree L, Gilliland F, Thomas D, Peters J, Hodis HN. Ambient air pollution and atherosclerosis in Los Angeles. *Environ Health Perspect.* 2005;113(2):201-6.

Libby P, Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat Med.* 2002;8(11):1257-62.

Lin CA, Martins MA, Farhat SCL, Pope 3rd CA, Conceição GMS, Anastacio VM, Hatanaka M, Andrade WC, Hamaue WR, Bohm GM, Saldiva PH. Air pollution and respiratory illness of children in Sao Paulo, Brazil. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 1999;13:475–88.

Liu C, Bai Y, Xu X, Sun L, Wang A, Wang TY, Maurya SK, Periasamy M, Morishita M, Harkema J, Ying Z, Sun Q, Rajagopalan S. Exaggerated effects of particulate matter air pollution in genetic type II diabetes mellitus. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11(1):27

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;14;407(6801):233-41.

Mahamed RR, Maganhin CC, Simões RS, de Jesus Simões M, Baracat EC, Soares JM Jr. Effects of metformin on the reproductive system of androgenized female rats. *Fertil Steril.* 2011;95(4):1507-9.

Medeiros AC, Dantas AM. Filho, Aires Neto T, Lima FP, Azevedo TM, Alves SG. The basic fibroblast growth factor enhances the healing of duodenal anastomosis in rats. *Acta Cir. Bras.* 2003;18(1):10-4.

Menzel DB. The toxicity of air pollution in experimental animals and humans: the role of oxidative stress. *Toxicol Lett.* 1994;72(1-3):269-77.

Michalany J. Técnica Histológica em Anatomia Patológica. Editora Michalany, 3° ed., São Paulo;1998.

Mitani F. Functional zonation of the rat adrenal cortex: the development and maintenance. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2014;90(5):163-83.

Mohallem SV, de Araújo Lobo DJ, Pesquero CR, Assunção JV, de Andre PA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of Sao Paulo. *Environ Res.* 2005;98:196-202.

Monaci F, Moni F, Lanciotti E, Grechi D, Bargagli R. Bio-monitoring of airborne metals in urban environments: new tracers of vehicle emission, in place of lead. *Environ Pollut.* 2000;107(3),321-7.

Montes GS, Luque EH. Effects of ovarian steroids on vaginal smears on the rat. *Acta Anat.* 1988;133:192-99.

Moskalev A, Shaposhnikov M, Snezhkina A, Kogan V, Plyusnina E, Peregudova D, Melnikova N, Uroshlev L, Mylnikov S, Dmitriev A, Plusnin S, Fedichev P, Kudryavtseva A. Mining gene expression data for pollutants (dioxin, toluene, formaldehyde) and low dose of gamma-irradiation. *PLoS One*. 2014;9(1):e86051.

Moulin P, Guiot Y, Jonas JC, Rahier J, Devuyst O, Henquin JC. Identification and subcellular localization of the Na⁺/H⁺ exchanger and a novel related protein in the endocrine pancreas and adrenal medulla. *J. Mol. Endocrinol.* 2007;38(3):409-22.

Netter J, Wasferman W, Kutner MH. Applied linear statistical models regression, analyses of variance and experimental designs. 3^a ed. Homewood. Richard D Irving. 1996.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*. 1999;13(1):9-22.

Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*. 1997;22:299-306.

Organização Mundial de Saúde. Burden of disease from Household Air Pollution for 2012.

Petramala L, Pignatelli P, Carnevale R, Zinamosca L, Marinelli C, Settevendemmie A, Concistrè A, Tonnarini G, De Toma G, Violi F, Letizia C. Oxidative stress in patients affected by primary aldosteronism. *J Hypertens*. 2014. No prelo.

Plendl J. Angiogenesis and vascular regression in the ovary. *Anat Histol Embryol*. 2000;29(5):257-66.

Pope CA 3rd¹, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Godleski JJ. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation*. 2004;109(1):71-7.

Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J*. 2000;16(3):534-54.

Riva DR, Magalhães CB, Lopes AA, Lanças T, Mauad T, Malm O, Valença SS, Saldiva PH, Faffe DS, Zin WA. Low dose of fine particulate matter (PM_{2.5}) can induce acute oxidative stress, inflammation and pulmonary impairment in healthy mice. *Inhal Toxicol*. 2011;23(5):257-67.

Rossi E, Taketani S, Garcia-Webb P. Lead and the terminal mitochondrial enzymes of haem biosynthesis. *Biomed Chromatogr.* 1993;7(1):1-6.

Salnikow K1, Wang S, Costa M. Induction of activating transcription factor 1 by nickel and its role as a negative regulator of thrombospondin I gene expression. *Cancer Res.* 1997;57(22):5060-6.

Schauer JJ, Lough GC, Shafer MM, Christensen WF, Arndt MF, DeMinter JT, Park JS. Characterization of metals emitted from motor vehicles. *Res Rep Health Eff Inst.* 2006;133: 1-76.

Schwarz M, Buchmann A, Stinchcombe S, Kalkuhl A, Bock K. Ah receptor ligands and tumor promotion: survival of neoplastic cells. *Toxicol Lett.* 2000;112-113:69-77.

Seaton A, MacNee W, Donaldson K, Godden D. Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet.* 1995;345(8943):176-8.

Selevan SG, Borkovec L, Slott VL, Zudová Z, Rubes J, Evenson DP, Perreault SD. Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution. *Environ Health Perspect.* 2000;108(9):887-94.

Sharpe RM, Franks S. Environment, lifestyle and infertility - an intergenerational issue. *Nat Cell Biol.* 2002;4:33-40.

Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:821-61.

Shinkaruk S, Bayle M, Lain G, Délris G. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2003;3(2):95-117.

Silva BB, Lopes-Costa PV, Rosal MA, Pires CG, dos Santos LG, Gontijo JA, Alencar AP, de Jesus Simes M. Morphological and Morphometric Analysis of the Adrenal Cortex of Androgenized Female Rats. *Gynecol Obstet Invest.* 2007;64(1):44-8.

Sioutas C, Koutrakis P, Burton RM. A technique to expose animals to concentrated fine ambient aerosols. *Environ Health Perspect.* 1995;103(2):172-7.

Shorr E. A new technique for staining vaginal smears. A single differential stain. *Science.* 1941;94:948.

Somers CM. Ambient air pollution exposure and damage to male gametes: human studies and in situ 'sentinel' animal experiments. *Syst Biol Reprod Med*. 2011;57(1 -2):63-71.

Spada N, Bozlaker A, Chellam S. Multi-elemental characterization of tunnel and road dusts in Houston, Texas using dynamic reaction cell-quadrupole-inductively coupled plasma-mass spectrometry: evidence for the release of platinum group and anthropogenic metals from motor vehicles. *Anal Chim Acta*. 2012;735:1-8.

Srám RJ, Binková B, Dejmek J, Bobak M. Ambient air pollution and pregnancy outcomes: a review of the literature. *Environ Health Perspect*. 2005;113(4):375-82.

Tarasenko N, Cutts SM, Phillips DR, Inbal A, Nudelman A, Kessler-Icekson G, Rephaeli A. Disparate impact of butyroyloxymethyl diethylphosphate (AN-7), a histone deacetylase inhibitor, and doxorubicin in mice bearing a mammary tumor. *PLoS One*. 2012;7(2):e31393.

Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 2005;12(10):1161-208.

Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Guimarães Silva RM, Scoriza JN, Saldiva PH, Caldini EG, Dolhnikoff M. Chronic exposure to fine particulate matter emitted by traffic affects reproductive and fetal outcomes in mice. *Environ Res.* 2009;109(5):536-43.

Voutilainen R, Jääskeläinen J. Premature adrenarche: Etiology, clinical findings, and consequences. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014. No prelo.

Wang CN, Liu YJ, Duan GL, Zhao W, Li XH, Zhu XY, Ni X. CBS and CSE Are Critical for Maintenance of Mitochondrial Function and Glucocorticoid Production in Adrenal Cortex. *Antioxid Redox Signal.* 2014. No prelo.

Wolkersdörfer GW1, Bornstein SR. Tissue remodelling in the adrenal gland. *Biochem Pharmacol.* 1998;56(2):163-71.

Ye J, Zhang X, Young HA, Mao Y, Shi X. Chromium(VI)-induced nuclear factor-kappa B activation in intact cells via free radical reactions. *Carcinogenesis.* 1995;16(10):2401-5.

Zhu BQ, Sun YP, Sudhir K, Sievers RE, Browne AE, Gao L, Hutchison SJ, Chou TM, Deedwania PC, Chatterjee K, Glantz SA, Parmley WW. Effects of second-hand smoke and gender on infarct size of young rats exposed in utero

and in the neonatal to adolescent period. *J Am Coll Cardiol.* 1997;30(7):1878-85.

8. ANEXO

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 09.02.2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **022/11** intitulado: **"EFEITOS MORFOLÓGICOS, IMUNOISTOQUÍMICOS E MOLECULARES DA POLUIÇÃO DO AR NA ADRENAL DE CAMUNDONGAS"**, apresentado pelo **Departamento de Obstetrícia e Ginecologia**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Edmund Chada Baracat

Pesquisador (a) Executante: Luiz Fernando Portugal Fuchs

CEP-FMUSP, 09 de fevereiro de 2011.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Daniel Romero Muñoz
Vice-coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa