MAURO TADEU AJAJ SAIEG

**Estudo comparativo da composição das
partículas ambientais depositadas e retidas
nos pulmões e linfonodos hilares pulmonares**

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

Área de concentração: Patologia
Orientadora: Prof^a Dr^a Fabíola Del Carlo Bernardi

**São Paulo
2009**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Saieg, Mauro Tadeu Ajaj

Estudo comparativo da composição das partículas ambientais depositadas e retidas nos pulmões e linfonodos hilares pulmonares / Mauro Tadeu Ajaj Saieg. -- São Paulo, 2009.

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

Área de concentração: Patologia.

Orientadora: Fabíola Del Carlo Bernardi.

Descritores: 1.Material particulado 2.Microscopia eletrônica de varredura
3.Poluição ambiental 4.Pulmão 5.Microdissecção 6.Laser

USP/FM/SBD-375/09

Dedicatória

Aos meus pais, **Jorge** e **Joyce**. Exemplos de ética e respeito.

Obrigado pelo amor incondicional.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a Fabíola Del Carlo Bernardi, por toda dedicação a esse trabalho, pelo ensinamento e incentivo contínuo nestes quatro anos, pela amizade, pelo exemplo de pessoa e profissional.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Saldiva, por acreditar em mim, e acreditar que iríamos conseguir colocar este trabalho em pé. Pela ajuda ininterrupta, graças a seu imenso conhecimento e prazer em lecionar.

À Prof^a. Dr^a Patrícia Maluf Cury, pela ajuda na realização do trabalho, por me ensinar a árdua tarefa de ser um pesquisador, pela amizade em terras estrangeiras.

À Prof^a. Dr^a Thais Mauad, por adicionar a sua visão apurada ao trabalho, tornando-o mais detalhado, mais inteligível. Pelas oportunidades de aprendizado e tempo gasto com a construção do *“paper”*.

Ao Prof. Dr. Dino Martini Filho, pelo eterno incentivo, e compreensão em toda esta jornada até o término desta tese.

A todos meus colegas patologistas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, pela amizade, compreensão, ensinamento e incentivo.

À Prof^a. Liz D’Agostino, pelos ensinamentos em microscopia eletrônica, atenção quase exclusiva e sincera amizade construída graças a este trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Caracterização Tecnológica da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, principalmente nas figuras do Prof. Dr. Henrique Khan e Prof^a. Mariane Brumatti, pela oportunidade de trabalho e dedicação a este projeto.

Aos colegas do laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, principalmente o Prof. Dr. Chin Jia Lin, Prof^a. Dr^a Emilia Modolo Pinto e Prof.Dr. Adriano Coelho, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e compreensão quanto aos horários de estudo e análise.

Às funcionárias do laboratório de histologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, principalmente na figura da Keila, a quem devo sinceros agradecimentos pelo tempo dedicado a este trabalho e capricho com o preparo das lâminas.

Ao colega Luis Fernando Ferreira, pela ajuda na estatística e confecção de tabelas.

Ao Prof. Dr.John Godleski, do Departamento de Poluição Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de Harvard, que me acolheu em sua instituição por um mês, compartilhando seu grande conhecimento na área e provendo a oportunidade de desenvolver parte do projeto em tão renomada instituição.

À Prof^a.Dr^a Regiani Carvalho de Oliveira, pela atenção, ensinamentos em técnicas de fluorescência de Raio-X, pela amizade.

À Prof^a Rebecca Stearns, do Departamento de Poluição Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de Harvard, por sua dedicação ao projeto e ensinamentos em microscopia eletrônica de varredura.

À minha namorada Adriana, pelo amor, paciência, apoio e compreensão durante a realização desta tese. Pela revisão do texto em português e ajuda na confecção das tabelas.

A todos meus amigos e familiares, pela amizade contínua.

Sumário

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

1	Introdução	1
1.1	Poluição e doenças relacionadas	3
1.2	Pigmento de carvão (antracose) e lesão pulmonar	5
1.3	Deposição das partículas nos pulmões	7
1.4	Ação dos metais	10
1.5	Histórico sobre o estudo da caracterização elementar e deposição das partículas no pulmão	13
1.6	Captura por microdissecção a laser	21
2	Justificativa	24
3	Objetivos	26
4	Métodos	28
4.1	Seleção dos casos	29
4.2	Locais de Estudo	30
4.3	Coleta e processamento do material	31
4.3	Cortes de parafina para posterior análise pelo MEV	38
4.4	Análise pelo MEV	39
4.5	Análise Estatística	46
5	Resultados	48
5.1	Características das amostras	49
5.2	Comparação entre resultados das amostras dos cortes de parafina e microdissecadas	49
5.3	Local de deposição na árvore traqueobrônquica	53
5.4	Análise Discriminante	56
5.5	Comparação entre SP e SJRP	57
6	Discussão	59
7	Conclusão	71
8	Anexos	73
9	Referências	80

Lista de Abreviaturas

Dr. - doutor
Dr^a - doutora
ed. - Edição
Et al - e outros
Prof. - professor
Prof^a - professora
rev. - revista
v. - volume

Lista de Símbolos

% - por cento
< - menor que
= - igual
Al - Alumínio
As - Arsênio
Br - Bromo
Ca- Cálcio
Cd- Cádmio
Cl - Cloro
Co - Cobalto
cps/eV - contagens por segundo por Elétron Volt
Cr- Cromo
Cu - Cobre
Fe- Ferro
H₂O₂ - Água oxigenada
K- Potássio
km - quilômetro
kV - kilovolts
Mg - Magnésio
Mn - Manganês
MW/cm² - megawatt por centímetro quadrado
Ni - Níquel
nm - nanômetro
NO₂ - Dióxido de nitrogênio
P - Fósforo
Pb - Chumbo
Rb - Rubídio
S - Enxofre
Sb - Antimônio
Si - Silício
Sr - Estrôncio
Tc - Tecnécio
Ti - Titânio
V - Vanádio
W - Tungstênio
X - vezes
Zn - Zinco
µg/m³ - micrograma por metro cúbico
µm - micrometro
µm² - micrometro quadrado

Lista de Siglas

OMS - Organização Mundial da Saúde

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América

DNA - ácido desoxirribonucléico.

EUA - Estados Unidos da América

HE - Hematoxilina Eosina

IARC - Agência Internacional de pesquisa em Câncer

RNA - ácido ribonucléico

Lista de Figuras

Figura 1.	Microscópio Zeiss Axiovert 200	33
Figura 2.	Exemplo da escolha de áreas para CML na região subpleural.	34
Figura 3.	Exemplo da escolha de áreas para CML nos linfonodos.	34
Figura 4.	Visualização das áreas negativas referentes aos fragmentos catapultados na CML	36
Figura 5.	Visualização das áreas negativas referentes aos fragmentos catapultados em linfonodos	36
Figura 6.	Coleta do material na tampa do tubo coletor	37
Figura 7.	Seqüência de eventos desde a visualização da área de antracose	37
Figura 8.	Placas de grafite com os cortes de tecido	38
Figura 9.	Amostras do material dissecado nas tampas dos tubos coletores após o preparo para o MEV	40
Figura 10.	Exemplo de como o material microdissecado era visto no MEV.	43
Figura 11.	Outro exemplo de material microdissecado, visto no MEV.....	43
Figura 12.	Material obtido através do corte de parafina visualizado no MEV.	44
Figura 13.	Visualização da mesma área marcada com a seta com o aumento de 2000x	44
Figura 14.	Distribuição dos elementos mais comumente encontrados na região peribronquiolar.	54
Figura 15.	Distribuição dos elementos mais comumente encontrados em linfonodos.	55
Figura 16.	Porcentagem de discriminação da origem das amostras (SP ou SJRP) através do perfil elementar das partículas depositadas ao longo do sistema respiratório.....	56

Lista de Tabelas

Tabela 1. Exemplo de como os espectros eram analisados em uma amostra	46
Tabela 2. Lista dos casos de acordo com gênero, causas de óbito, ocupação e tempo vivendo na cidade.....	51
Tabela 3. Dados dos números de pontos contendo elementos, expresso em média e desvio padrão de pontos contendo cada elemento, por região do pulmão e método empregado.....	52
Tabela 4. Dados dos números de pontos contendo elementos, expresso em mediana e intervalo interquartil (IQR), por região do pulmão e cidade de origem.....	58

Resumo

Saieg MTA. *Estudo comparativo da composição das partículas ambientais depositadas e retidas nos pulmões e linfonodos hilares pulmonares* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 94p.

INTRODUÇÃO: A exposição prolongada às partículas ambientais está associada à mortalidade prematura devido às causas cárdio-respiratórias e ao câncer do pulmão. O tamanho e composição destas partículas estão relacionados à maior toxicidade, agravada pela retenção prolongada destas partículas no pulmão. Pode-se postular que partículas com diferentes composições elementares podem ter distribuição diferente ao longo da árvore traqueobrônquica. A captura por micro-dissecção a laser (CML) aparece neste cenário como uma alternativa rápida e eficaz para se obter amostras para estudo da distribuição destas partículas no pulmão. **OBJETIVOS:** Testar a eficácia da CML no estudo de partículas retidas no pulmão comparando com outra técnica de análise de cortes de parafina (P), já consagrada na literatura. Comparar também o perfil elementar de partículas retidas ao longo da árvore traqueobrônquica e linfonodos em duas cidades com perfis distintos de poluição, através da CML, associada à espectrometria de raios-X por dispersão de energia (RX-DE) aliada à microscopia eletrônica de varredura (MEV). **MÉTODOS:** Vinte e quatro casos autopsiados foram obtidos em duas cidades com perfis distintos de poluição (São Paulo e São José do Rio Preto). As amostras de parênquima pulmonar obtidas do lobo médio do pulmão direito foram coletadas em três regiões: tecido peribrônquico, parênquima pulmonar periférico e linfonodos hilares. Para P, a análise foi feita em áreas visualizadas no MEV correspondentes às áreas de antracose. Estas áreas de antracose foram também micro-dissecadas, usando CML e analisadas através do RX-DE aliado ao MEV. **RESULTADOS:** Quando os dois métodos foram comparados, a maioria dos elementos encontrados, mostrando diferença significativa, foi vista na CML, exceto pelo Ca e Mg (mais comumente encontrados em P). A análise elementar das partículas depositadas ao longo da árvore traqueobrônquica mostra dois grupos de distribuição dos elementos, com deposição predominante peribronquiolar ou com deposição predominante linfonodal. A análise elementar das áreas peribrônquicas discrimina melhor (95.8 %), o tipo de exposição à poluição, sem diferença significativa para os outros locais estudados. **CONCLUSÃO:** Os perfis elementares das partículas retidas ao longo da árvore traqueobrônquica mostram dois grupos com padrão de distribuição distinta. A região proximal é o principal local para discriminação do tipo de exposição do indivíduo, sendo a antracose o “carimbo” da exposição à poluição. A CML se mostrou também uma ferramenta útil para discriminar áreas de interesse no estudo da análise elementar de partículas retidas no pulmão quando comparada com a análise nos cortes de parafina.

Descritores: 1.Material particulado 2.Microscopia eletrônica de varredura 3.Poluição ambiental 4.Pulmão 5.Microdissecção 6.Laser

Summary

Saieg MTA. *Comparative study of the composition of the ambient particles deposited and retained in the lungs and hilar lymph nodes* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 94p.

RATIONALE: Prolonged exposure to ambient particles is associated with premature mortality due to cardio respiratory diseases and lung cancer. Size and composition of these particles determine toxicity, aggravated by their long term retention in the lungs. In this context, it is plausible to postulate that different particles with different elemental composition must have distinct distribution patterns along the bronchial tree. Laser capture microdissection (LCM) appears as a rapid and efficient alternative for obtaining representative lung tissue for particle analysis. **OBJECTIVES:** To test laser capture microdissection (LCM) as a new tool for studying particle retention, comparing to a classical method using paraffin sections (PS). To compare the elemental profile of particles retained along the bronchial tree and lymph nodes in two cities with distinct pollution backgrounds by using LCM, through energy dispersive x-ray (EDX) and scanning electron microscopy (SEM). **METHODS:** Twenty-four right lung middle lobes from autopsied cases were obtained in two cities with different pollution backgrounds. Lung samples were collected from three distinct regions in the lungs at the time of autopsy: peribronchial tissue, peripheral parenchyma and hilar lymph nodes. For PS, analysis was performed in areas visualized in the SEM correspondent to anthracotic areas. These areas of anthracosis were also microdissected using LCM and analyzed for elemental composition through EDX allied to SEM. **RESULTS:** When the two methods were compared, the majority of the elements showing significant difference was predominantly found when LCM was used, except for Ca and Mg (more related to PS) Elemental analysis of particles deposited along the bronchial tree shows two groups of distribution: elements with preferable peribronchiolar or preferable lymph node deposition. Elemental profile of peribronchial areas discriminate accurately (95.8 %) the type of pollution exposure, with no statistical difference noted for the other sites. **CONCLUSIONS:** Elemental profiling of the particles retained along the bronchial tree shows two groups with distinct distribution patterns. The proximal bronchial tree is the main site for discrimination of pollution exposure, with an elemental "finger print" of anthracosis. LCM has also proven to be a useful tool in discriminating areas of interest for elemental analysis of particles retained in the lung when compared to analysis in PS.

Descriptors: 1.Particulate matter 2.Scanning electron microscopy
3.Environmental pollution 4.Lung 5.Microdissection 6.Laser

1 Introdução

Há muito tempo tem-se estudado a relação entre a poluição atmosférica e suas conseqüências quanto à mortalidade e morbidade pulmonar. A poluição atmosférica está presente em grandes centros urbanos, representada principalmente pelo material particulado (MP), constituído por uma mistura de partículas sólidas ou líquidas suspensas no ar, tendo três porções: grossa, fina e ultrafina. Esta classificação se dá pelo diâmetro aerodinâmico da partícula, ou seja, seu diâmetro equivalente a outra partícula esférica com mesma velocidade terminal de sedimentação [1]. A fração grossa produzida pela fricção dos pneus dos veículos com o asfalto das ruas, contendo elementos do pavimento e da borracha pneumática, são partículas com diâmetro aerodinâmico maior do que $2,5\ \mu\text{m}$ (MP_{10}). A fração fina constitui de partículas com menos de $2,5\ \mu\text{m}$ ($\text{MP}_{2,5}$) e derivadas de fontes antropogênicas, isto é, a partir da atividade humana, como processos de combustão de automotores, indústrias ou usinas termoeletricas que usam carvão mineral e óleos derivados de petróleo. Estas últimas fontes geram os óxidos de enxofre (SO_2) que são emitidos por fontes fixas, além dos particulados primários, que são lançados diretamente na atmosfera. As partículas secundárias (aerossóis ácidos – ácidos sulfúrico, nítrico e nitrato) são geradas pelo processo de conversão de gás em partículas, a partir de óxidos de enxofre e óxidos de nitrogênio. Fazem parte do $\text{MP}_{2,5}$ partículas de carvão produzidas pela combustão dos combustíveis fósseis,

que possuem adsorvidos à sua superfície diferentes elementos e compostos, tais como metais pesados e hidrocarbonetos. A porção ultrafina refere-se às partículas menores do que $1,0 \mu\text{m}$ [2] e são compostas principalmente por metais, enquanto os silicatos são normalmente partículas maiores [3]. As partículas ultrafinas estão hoje em dia mais relacionadas aos efeitos deletérios do pulmão, pois estão mais presentes no ambiente de trabalho e apresentam maior facilidade de penetrar nos pulmões e maior área de contato [4]. Estudos experimentais em animais mostram uma grande correlação da exposição a tais partículas, com aumento de mediadores inflamatórios [2, 4].

1.1 Poluição e doenças relacionadas

Inúmeros trabalhos correlacionam a exposição à poluição com efeitos a saúde como aumento de mortes por causas cardiovasculares e respiratórias [5-7], por neoplasias [8], ou alterações da função pulmonar e aumento de internações por causas respiratórias no período [9-11].

Em uma ampla revisão da literatura feita por Dockery et al [12], o autor mostrou que há uma correlação positiva entre o aumento da concentração de MP_{10} a curto prazo e mortes registradas, principalmente por causas respiratórias (aproximadamente 3,4% por $10\mu\text{g}/\text{m}^3$ de aumento de MP_{10}) e cardiovasculares (aumento de 1,4%). Além disso, a mesma correlação positiva é vista em casos de internações hospitalares, alteração

da função pulmonar e aumento de sintomas respiratórios em crianças. Os autores salientam ainda a maior incidência de crises de asma durante episódios de piora dos níveis de qualidade de ar.

Pope et al [7] mostram em uma ampla pesquisa de exposição à poluição a longo prazo uma clara correlação entre aumento dos níveis de $MP_{2,5}$ e mortes, com risco aumentado de 4% para mortes em geral, 6% para mortes de causas cardio-respiratórias e 8% para mortes por câncer de pulmão, com um aumento de $10 \mu g/m^3$ de $MP_{2,5}$.

A poluição pode ainda causar efeitos deletérios no sistema nervoso, urinário e digestivo, além de poder alterar também a embriogênese [13] e regulação da pressão arterial [14].

Inúmeros estudos mostraram a relação da poluição com aumento de internações e mortes na cidade de São Paulo [15-20].

Braga et al [21] mostraram que crianças e adolescentes na cidade de São Paulo tinham um maior número de internações hospitalares em episódios de piora da qualidade do ar, onde crianças menores de 2 anos de idade e adolescentes com mais de 13 anos eram os grupos mais susceptíveis.

Rivero et al [22] mostraram um aumento da inflamação pulmonar e alterações da microcirculação cardíaca, mesmo sem grande alteração de parâmetros sanguíneos em ratos expostos à grandes quantidades de $MP_{2,5}$.

Já no interior do Estado, a principal porção do MP atmosférico é originada da queima de biocombustível, como a queima de cana de açúcar, problema que vem aumentando nos últimos anos com o aumento da demanda pela frota veicular a álcool e a frota de carros “flex” [23, 24]. Em

um estudo recente realizado por Mazzoli-Rocha et al [25], a instalação via nasal de uma dose única de partículas em suspensão da região de Araraquara (região com grande quantidade de queima da cana de açúcar) em camundongos mostrou resposta aumentada de inflamação pulmonar por mecanismos distintos quando comparados com as partículas em suspensão da região metropolitana de São Paulo. Esta diferença pode, segundo o trabalho, ser explicada por diferença de composição do MP, sendo o derivado do biocombustível mais rico em metais. A literatura no assunto é ainda restrita e estudos adicionais devem ser conduzidos na área para estabelecer os reais efeitos deletérios destas queimadas [26].

1.2 Pigmento de carvão (antracose) e lesão pulmonar

A antracose é uma forma de pneumoconiose causada pela inalação de partículas atmosféricas com componentes carbonáceos e não carbonáceos. O achado destas áreas enegrecidas com deposição de pigmento de carvão foi relatado na antiguidade, desde que os homens descobriram o fogo e desde que este começou a ser usado para combustão [27]. Tais áreas enegrecidas foram encontradas em múmias egípcias [27] e em múmias italianas da época da renascença, alguns casos relacionados com focos de pneumonia [28].

Em um relato francês de 1965 [29], Grailles et al, através de estudos histológicos de pacientes mineradores operados por tuberculose, fizeram

uma correlação entre o grau de antracose e o tempo de exposição às partículas, dividindo os pacientes em grupos de 1 a 3, com lesões histológicas progressivas correspondentes a tempos de exposição progressivo, correlacionando a antracose à exposição ambiental.

Mais recentemente, em trabalhos onde se correlaciona a antracose com lesão pulmonar e distribuição no pulmão, encontraram-se importantes alterações histológicas com relação à deposição de partículas. Souza et al [30] mostraram em seus resultados que existia uma maior concentração de pigmento de carvão na parede bronquiolar, em pacientes não fumantes vivendo em um ambiente poluído, apontando para um possível papel da antracose como marcador de exposição a poluentes. Nestes pacientes, foram observados também aumento do infiltrado linfocitário na parede bronquiolar, associado à fibrose e aumento de células secretoras no epitélio.

Achados semelhantes foram relatados por Pinkerton et al [31] num estudo com pulmões, provenientes de autópsias por morte de causa não natural, na região de Fresno, Califórnia, onde mostrou-se uma correlação positiva entre a deposição de antracose e alterações histológicas (fibrose, hipertrofia muscular, macrófagos intra-luminais) em bronquíolos respiratórios de primeira, segunda e terceira ordem, com achados mais intensos em regiões mais proximais. Estes achados foram condizentes com os achados prévios de Churg et al [2], que apontaram o bronquíolo respiratório de primeira ordem como o local de maior deposição de partículas.

Churg et al [32], em 2003, usando casos de autópsias por morte de causa violenta, oriundos da cidade do México e de Vancouver, relataram

achados adicionais de maior deposição de pigmento de carvão em bronquíolos respiratórios nos pacientes da Cidade do México, cidade com maior exposição a MP, acompanhados de alterações histológicas (hipertrofia muscular e fibrose). Estes dados complementam estudo prévio do mesmo grupo [33], onde além da caracterização das partículas na amostragem do ar, foi também estudado material digerido das vias aéreas centrais destes mesmos pacientes, sendo realizada contagem e caracterização de partículas por microscopia eletrônica por varredura (MEV) e Fluorescência de raios-X por dispersão de energia (FRX-DE), com maior concentração de partículas em pacientes da Cidade do México do que pacientes provenientes de Vancouver. Além disso, foi feita correlação deste MP com aquele achado na coleta do ar atmosférico, comprovando pela primeira vez a correlação entre as partículas inaladas e as retidas no parênquima pulmonar [33].

1.3 Deposição das partículas nos pulmões

Durante a inspiração, as partículas são transportadas junto com o ar inspirado, através do sistema traqueobrônquico até as regiões de troca gasosa dos pulmões. As regiões pulmonares de maior exposição às partículas são áreas de maior ventilação, ou seja, com maior fluxo de ar [34]. Um número grande destas partículas é retido pelo sistema respiratório quando toca a superfície úmida das vias aéreas, fenômeno denominado genericamente deposição. Esta deposição varia quanto ao tamanho,

densidade e formato das partículas, podendo ocorrer em diferentes regiões do pulmão [35].

Fenômenos físicos envolvidos na deposição das partículas compreendem impactação inercial, sedimentação gravitacional e movimentos brownianos de moléculas de vapor em ambiente alveolar. Estes fatores, aliados à diferença de composição elementar, determinam a cinética da deposição. De maneira geral, partículas com diâmetro aerodinâmico menor que $0,1\mu\text{m}$ (ultrafinas) tendem a se depositar em regiões mais periféricas, tais como as peribronquiolares, e partículas maiores em regiões centrais da árvore traqueobrônquica [35]. A

impactação inercial tem maior importância em partículas maiores, pois a velocidade varia consideravelmente à medida que a árvore traqueobrônquica se divide. Para partículas menores, o fator de maior importância é a sedimentação gravitacional [35].

A retenção destas partículas depositadas no pulmão depende de inúmeros fatores, como tamanho, formato, solubilidade e composição. Além disso, a localização anatômica da deposição e as estruturas do organismo que interagem com a partícula depositada são extremamente importantes para se decidir o destino desta partícula, ou seja, o tempo que ela vai estar retida antes de se dissolver ou ser removida [36-38].

A remoção particular é a fração de partículas eliminadas do trato respiratório em um determinado intervalo de tempo [35]. Esta remoção pode ser feita expelindo-se a partícula até a laringe pelo aparelho mucociliar, onde são deglutidas (remoção rápida) ou removidas pelo sistema linfático,

buscando abrigo nos linfonodos de drenagem pulmonar (remoção lenta), estando esta última mais relacionada com as partículas de longa retenção no pulmão, e conseqüentemente maior efeito patogênico [35]. Partículas solúveis são mais facilmente removidas, sendo absorvidas e transportadas na circulação, enquanto que as partículas insolúveis têm velocidade mais lenta de remoção [1]. A taxa de remoção de partículas varia de acordo com inúmeros fatores que alteram a função mucociliar normal e a atividade macrofágica.

A idade dos indivíduos e sua função pulmonar é outro fator relacionado, como mostra um trabalho de Svartengren et al [39], que constatou uma diminuição da remoção de partículas de vias áreas proximais e distais em pacientes mais idosos.

As partículas mais finas, depositadas nos alvéolos, têm sua remoção por processos absorptivos e não absorptivos, podendo ter o linfonodo como local de migração, ou a fagocitose de partículas pelos macrófagos alveolares, principal mecanismo não absorptivo envolvido [1]. Estas partículas podem ainda atingir a circulação sanguínea sem passar pela fagocitose macrofágica, ou podem acabar depositadas e retidas no parênquima pulmonar [40]. Embora a cinética de distribuição, retenção e remoção das partículas depositadas no pulmão seja amplamente estudada, encontram-se poucos dados na literatura que expliquem a cinética de deposição destas partículas nos linfonodos [41, 42].

Partículas ultrafinas parecem ter maior retenção nas vias aéreas, tendo maior efeito patogênico. Em um estudo de 2008, Moller et al [43] ,

através de espectroscopia gama, observou a deposição e a remoção de Tecnécio (Tc) radioativo em humanos através da inalação destas partículas em dois tempos, com objetivo de análise da deposição na árvore traqueobrônquica e alvéolos. A deposição destas partículas foi maior em pacientes fumantes e com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), os quais apresentaram remoção mais lenta das mesmas, quando comparadas ao grupo controle. A remoção de partículas na área periférica foi ainda mais lenta. Mesmo no grupo controle, foi visualizada retenção de cerca de 75% das partículas após 48 horas, o que mostra uma possível retenção crônica destas partículas, com conseqüente efeito patogênico constante relacionado a exposição repetida.

1.4 Ação dos metais

Além do tamanho e taxa de retenção, um fator extremamente importante para a patogenicidade de uma partícula é sua composição [44-48]. As partículas finas e ultrafinas, como descritas anteriormente, contêm grande quantidade de metais em sua composição. Estes metais têm importante ação no stress oxidativo celular, contribuindo para o aumento da produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO) [49-52]. A lesão oxidativa tem um papel importante na fibrogênese pulmonar. Uma grande variedade de constituintes das partículas causam um aumento na geração de ERO, por ação direta (via reação oxidativa de Fenton), ou

estimulando a célula pulmonar por mecanismos indiretos a aumentar a produção dos EROs [53]. Este aumento na produção de EROs, leva a produção de adutos de DNA e ativação de sinais intracelulares, incluindo receptores de tirosina quinase e fatores de transcrição, o que aumenta a expressão de genes envolvidos na inflamação e fibrose [53-55].

Singh et al [54, 56] mostraram um aumento da produção dos adutos de DNA em populações expostas à poluição, quando comparadas com grupos controles, estabelecendo mais uma relação entre a exposição à poluição e a expressão aumentada destes sinais intracelulares, podendo ser usados como marcadores de exposição de agentes poluentes [57].

Os adutos de DNA estão também envolvidos com a carcinogênese e sua relação com o câncer de pulmão e de outros órgãos têm sido amplamente estudada [58-60].

Um bom exemplo de como os metais geram stress oxidativo celular é o Vanádio (V), que reage com o H_2O_2 formado na célula, gerando a proteína inibidora da tirosina fosfatase. Esta ação é irreversível, culminando com uma fosforilação progressiva de sinais moleculares intracelulares, causando stress celular, padrões alterados de expressão genética e apoptose [61].

O Zinco (Zn) age de forma semelhante, estimulando a ativação do receptor de fator de crescimento epitelial (EGFR), que por sua vez estimula a via das quinases, também contribuindo para fibrogênese e inflamação [53, 62].

No estudo de Godleski et al de 2002 [63], com exposição prolongada de camundongos a um concentrador de partículas, houve correlação positiva entre a resposta inflamatória e a exposição à Br e Pb. Morishita et al [64]

expôs ratos ao concentrador de partículas, com partículas da área urbana de Detroit, EUA, mostrando um aumento de eosinófilos no lavado broncoalveolar quando da exposição às partículas. Além disso, a análise elementar dos pulmões por espectrometria de massa revelou aumento da concentração de V, S e Mn em áreas com aumento de eosinófilos.

O Fe, componente metálico importante da queima de combustíveis, tem correlação positiva com o aumento da produção de EROs. Aust et al [65] mostraram um aumento da produção de EROs em cultura de células epiteliais pulmonares humanas, quando da exposição à partículas finas e ultrafinas, apontando para os metais como causadores do stress oxidativo celular [65]. Além disso, o Fe pode também induzir a formação de radicais livres, levando a stress oxidativo grave [66].

Em outro estudo Molinelli et al [67] mostra através de estudos “in vivo” e “in vitro” a importância dos metais na produção de mediadores químicos e formação de EROs. Exposição de cultura de células e intubação de camundongos com concentrado atmosférico da região do vale de Utah, EUA, apresentou resultados diferentes quando da retirada de metais por um quelante. Na exposição ao concentrado com quelante, houve diminuição da expressão da resposta inflamatória (medida por polimorfonucleados no lavado brônquico), IL-8 e na produção de EROs, apontando para um importante papel dos metais nas lesões causadas por partículas finas e ultrafinas [67]. Estes achados são condizentes com o estudo de Schaumann et al [68], onde a exposição à partículas ricas em metais

induziram maior produção de mediadores químicos e geração de radicais oxidantes em células do lavado brônquioalveolar.

Embora não se tenha certeza de quais grupos de metais estariam mais relacionados à lesão pulmonar, a literatura aponta o V, Fe, Zn, Cu e Ni como os mais potencialmente importantes [48].

1.5 Histórico sobre o estudo da caracterização elementar e deposição das partículas no pulmão

O estudo da composição e distribuição das partículas depositadas nos pulmões data do início da década de cinquenta. Estes estudos mais antigos, de análise de elementos depositados nos pulmões, utilizavam técnicas destrutivas como a microincineração [69, 70]. Além de indireta e tediosa, não detalhava os múltiplos elementos. Outra técnica utilizada era a análise por “*microprobe*” eletrônico, que embora não destrutiva, não permitia multianálise e apresentava tempo de coleta de informações muito longo [71, 72]

O amplo estudo da deposição destas partículas nos pulmões e de sua composição química aliado às alterações morfológicas pulmonares começou na década de setenta, com o advento da microscopia eletrônica de varredura (MEV) associada à espectrometria de raios-X por dispersão de energia (RX-DE), que permitiu análise multielementar de partículas simultaneamente à visualização pelo MEV, para elementos com número atômico maior do que 8, através de excitação por um feixe de elétrons. O

feixe de elétrons originado a partir do MEV gera um número de sinais quando interage com o material. Os elétrons secundários são um produto desta excitação, que podem ser coletados e convertidos em alta resolução gerando a imagem [73]. A análise da composição metálica do material se dá pela análise da emissão de raios-x, outro substrato da excitação causado no material a partir do feixe de elétrons.

Funahashi et al publicaram dois trabalhos de referência nesta época com os modelos para estudo de cortes histológicos de pulmão no MEV, com ênfase na caracterização dos elementos inorgânicos encontrados [73, 74]. No estudo mais antigo, de 1975 [74] foram realizados cortes de parafina para o exame no MEV e para confecção de lâminas de HE para avaliação simultânea em microscopia óptica. Os resultados mostraram uma correlação positiva quanto à concentração de sílica nas áreas de nódulos silicóticos e traves alveolares ($p < 0,005$). Como o trabalho lida com aumentos de até 100x, muitas áreas não correspondentes ao tecido pulmonar foram analisadas. Para correção, foi feita uma curva de regressão e notou-se que a concentração de enxofre, um elemento com presença constante nas análises, poderia ser utilizada para se determinar a quantidade de tecido a ser analisada, já que existia uma correlação positiva entre a concentração de silício e enxofre tanto em pacientes controles quanto em pacientes com silicose. Quando aplicada, esta correlação Si/S mostrou uma significância ainda maior comparada com a concentração de Si sozinho em indivíduos com silicose ($p < 0,001$), diminuindo desta forma a interferência das áreas sem parênquima pulmonar. Esta relação Si/S foi utilizada como fator de

correção em vários outros estudos conseqüentes [73, 75-77]. Em um estudo de 1977 [73], Funahashi et al detalharam a metodologia para estudo de elementos inorgânicos em tecidos proveniente de pacientes com pneumoconioses, e testaram diferentes espessuras de cortes para a realização de análise. A espessura de 10µm mostrou uma correlação Si/S maior, o que permitiu uma maior fidedignidade no estudo de parênquima pulmonar, com menor interferência de contaminantes.

Esta técnica de estudo, através de avaliação direta de cortes de parafina, foi utilizada em inúmeros trabalhos conseqüentes. Brody et al [78] estudaram 1976 pacientes com diagnóstico de asbestose, silicose e pleurite através do MEV e RX-DE, com cortes de parafina dos casos e material digerido, comparando os achados pelos dois métodos. Tanto nos casos de silicose, quanto nos casos de pacientes com pleurite encontraram-se diversos tipos de elementos, gerando a possibilidade de pluralidade na relação causa-efeito de lesão pulmonar.

No final da década de setenta, Abraham fez duas revisões amplas estabelecendo metodologia e aplicações diagnósticas para o método de análise de partículas por raios-X aliados à MEV[79, 80]. Nestas duas revisões de 1979, Abraham pôde rever os detalhes de estudo através da MEV. Segundo o autor, os estudos com MEV e microanálise devem ser reservados aos casos bem documentados em estudo histológico, de correlação com história clínica. Biópsias transbrônquicas podem também ser utilizadas, como pesquisa de elementos depositados em regiões peribronquiolares, o que na microscopia óptica pode corresponder à antracose

ou à área de espessamento fibroso. Os trabalhos cursam também sobre as técnicas de preparo do material, que deve ser cortado da mesma maneira do que para estudo histológico e colocado em placas de carbono para posterior análise no MEV. Além de detalhada atenção com possível contaminação exógena durante o preparo do material, o que poderia falsear os resultados obtidos. Abraham relata ainda sobre os metais endógenos que podiam desviar os resultados, como os depósitos de hemossiderina e as áreas de calcificação.

Já na década de oitenta, Siegesmund et al[76], junto com Funahashi, continuaram os estudos da década anterior, estudando casos de silicose, pneumoconioses sem exposição à sílica e casos controle. Os dados relatados são na forma de relação Si/S. Encontrou-se uma correlação positiva entre altos níveis de Si e pacientes com silicose. O autor relata ainda que o estudo feito em aumentos menores (100x, no caso) possibilitava uma análise mais global do pulmão, enquanto que o estudo com maiores aumentos permitia a análise elementar de partículas isoladas, mas não contemplava as alterações pulmonares como um todo. Outro estudo dos mesmos autores, ainda na década de oitenta, correlacionou a concentração de elementos e particularmente Si, ainda usando a relação Si/S com a espessura de traves alveolares. A correlação do achado de Si com a variação de espessura do septo foi significativa ($p < 0,0001$), sendo significativa também quando correlacionada com Al ($p < 0,0001$) e Mg ($p < 0,01$).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) pode também ser utilizada na pesquisa de partículas e seu perfil elementar. Em 1980, Hayashi et al[81] fizeram um estudo através de MET e RX-DE. A partir da morfologia das

partículas aliada à sua composição eles puderam caracterizar estas partículas, correlacionando-as com as diferentes pneumoconioses. O MEV, porém, tem vantagens quanto à correlação com alterações morfológicas pulmonares, através da correlação direta com a imagem histológica convencional.

O perfil elementar foi também caracterizado quanto à sua distribuição interlobar e hábitos dos indivíduos. Em 1982, Bartsch et al [42] estudaram a diferença de concentração dos elementos no pulmão segundo sua distribuição nos lobos e linfonodos hilares, através de espectrometria de fluorescência de RX. O estudo mostrou que um grupo de elementos como o K, Ca, Cu, Zn e Rb não apresentava diferença quanto à localização nos cinco lobos pulmonares e um segundo grupo composto por Ti, Cr, Ni e Sr aparecia em um gradiente de concentração progressivamente maior, da base para o ápice, seguindo as áreas de maior ventilação pulmonar, o que sugeria que o segundo grupo estaria relacionado à exposição ambiental e o primeiro grupo seria composto de elementos constituintes do pulmão. A distribuição interlobar de deposição dos metais no pulmão foi também estudada por Tsuchiyama et al [82], que comparou a distribuição e concentração dos metais com variação interlobar e interpessoal em moradores de Nagoya, Japão. Neste estudo, os autores mostraram, através de FRX-DE, uma tendência a maior concentração de partículas nos lobos superiores. Al e Cr mostraram maior concentração em homens e o hábito de fumar levou a um aumento na concentração de Cd, Pb, Cr e Ni, possivelmente explicado pela presença de metais no cigarro e alteração da função ciliar destes pacientes. Achados semelhantes quanto ao fumo foram

encontrados por García et al em um estudo de 2001 [83], onde se estudou a concentração de metais em diversos tecidos através de análise por espectrometria de massa, sendo identificado um aumento da concentração de Cd, Cu e Ni em pulmões de pacientes fumantes.

Em 1991, Takemoto et al [84] estudaram 2.274 autopsias no Japão, com coleta do lobo superior do pulmão direito e posterior digestão com estudo por espectrometria de absorção atômica. O estudo comparou a concentração de metais nesta região e sua distribuição quanto ao gênero, idade, relação com enfisema e com a causa de morte, mostrando aumento da concentração de Cr, Pb e Ni com a idade, grupo de metais apontados pelo autor como mais relacionados à exposição à poluição.

A técnica de análise por RX-DE das partículas depositadas no pulmão não se restringe somente ao estudo de cortes histológicos. Johnson et al [85], em 1986, estudaram a composição e morfologia de partículas encontradas em lavado bronquíolo-alveolar em casos de pacientes com pneumoconiose e exposição conhecida à elementos pesados e pacientes sem história de exposição prévia. O lavado é apontado como uma forma de método não invasivo para determinação de deposição de partículas utilizando-se a microanálise por raios-X.

As áreas de depósito de antracose foram estudadas em um trabalho de 1990 [75], em indivíduos provenientes de uma área urbana e de uma área rural do Japão comparando alguns achados como gênero, tipo de trabalho, fumo e concentração de antracose. As amostras foram digeridas, dando-se preferência às áreas de maior concentração de antracose.

O elemento mais encontrado nas análises foi o Si, seguido do Mg, Fe, Ca e Al. Os casos provenientes da área mais urbanizada mostraram uma maior área de antracose e houve diferenças quanto a composição metálica destas áreas, com maior concentração de Si e Al nos pulmões da área rural em ambos os sexos, elementos mais relacionados a re-suspensão do solo. Entre os fumantes, embora não houvesse diferença entre a concentração de partículas, em comparação com não-fumantes, houve maior presença de Ca e Fe (para homens) e Cu (para mulheres). Entre os casos de neoplasia pulmonar, encontrou-se maior presença de elementos traço como Cu, Cr, Pb e Ni, o que segundo o autor pode estar relacionado à etiologia destes metais pesados na carcinogênese pulmonar. O estudo também aponta uma maior concentração de partículas nas áreas de antracose de pulmões masculinos, possivelmente relacionado ao estilo de vida.

O perfil elementar das partículas foi também estudado para indicar alterações de regiões específicas do pulmão. Ferrer et al em um estudo de 1994 [86], estudaram por MEV e RX-DE regiões da pleura visceral, parietal e pulmão (lobo inferior) de pacientes controle, com história de exposição à sílica e com diagnóstico histológico de silicose. Usando o coeficiente elemento/S anteriormente descrito por Funahashi et al [74], os autores mostraram que através da concentração de sílica em material da pleura era possível fazer a distinção entre pacientes com silicose e pacientes sem história de exposição à doença. Porém, um nível baixo deste mesmo elemento não permitia afastar o diagnóstico de silicose.

O linfonodo hilar foi também estudado, em um trabalho feito por Rogero et al [41], com casos controle e casos com doença ocupacional. Os achados de elementos dos linfonodos foram os mesmos encontrados no tecido pulmonar, apontando o linfonodo como porto final de deposição de partículas. Além disso, de forma geral, os elementos tinham uma maior concentração nos indivíduos doentes do que no caso controle, apontando para o fato de que vários elementos são encontrados no pulmão como consequência da exposição à poluição e ao ato de fumar [41].

Técnicas mais modernas para detecção de metais no pulmão incluem a micro análise por emissão de raios-X “in air” (“in-air” micro PIXE) [87]. A técnica permite a estimulação de uma pequena área do pulmão com mapeamento dos metais na região, sem auxílio de um microscópio, tendo como principal vantagem o estudo detalhado de pequenas áreas de tecido com correlação morfológica.

Em relação à concentração dos elementos e neoplasias, Drake et al [88], examinaram diferentes concentrações de elementos traços em tecidos neoplásicos e não neoplásicos oriundos de pulmão, mama e cólon, com achado de diminuição significativa de Cr, Pb, Cu e Zn em amostras neoplásicas. Mais recentemente, De Palma et al [89] estudaram 57 pacientes na Catalunha analisando a presença de metais em 45 casos de carcinoma não pequenas células do pulmão e 8 casos controle. Os metais estudados foram os mais classicamente relacionados à carcinogênese, classificados como carcinogênicos classe 1 pela Agência Internacional de pesquisa em Câncer (IARC). Foram encontrados níveis elevados de Ni, Cd e Pb em casos com neoplasia comparados com os casos controle. Os níveis destes elementos estavam também mais relacionados com o hábito de fumar.

O mesmo grupo catalão apresentou ainda, no mesmo ano, um estudo de meta-análise de trabalhos publicados na área, de 1980 a 2007, através de pesquisa na base de dados “pubmed” [90]. Vários dados foram avaliados, como ano de publicação, tipo e tamanho da população estudada e metais pesquisados. Foram revisados 37 trabalhos, sendo que a maioria obteve estudos a partir de material congelado. Os métodos mais implicados na análise foram absorção atômica e ativação por nêutrons. A maioria dos trabalhos compara casos controle e expostos, ou fumantes, e é feita distribuição quanto à idade e gênero. O resultado da meta-análise mostra que Zn e Cu foram os elementos mais freqüentemente encontrados, seguidos de Cr e Pb. O estudo ainda conclui que certas precauções como evitar a contaminação por metais durante a obtenção, manuseio e estoque do tecido e estudar material de mesmas regiões do pulmão deviam ser tomadas a fim de uma análise mais fidedigna. O uso de formol não foi desaconselhado, mas salientou-se sua influência na composição metálica dos tecidos, sendo necessária a desconsideração na análise final por possível contaminação deste fixador.

1.6 Captura por microdissecção a laser

Desde o advento da microdissecção a laser (ML), em meados da década de 90, tem sido possível conseguir através de um método rápido e eficaz, a coleta de células a partir de visualização microscópica direta [91-93].

A técnica de ML evoluiu rapidamente desde seus primeiros relatos [94]. Vários aparelhos, de diferentes fabricantes, foram desenvolvidos desde então nos Estados Unidos e Europa, sendo o método de captura por microdissecção a laser (CML) um dos mais utilizados. Tal método consiste em captura da área de interesse a partir de uma lâmina com presença de um micropolímero na superfície [93]. Neste método, a área a ser microdissecada é escolhida a partir de um corte fino na lâmina (5 μ m), sendo cortada pelo feixe de laser de nitrogênio com pulso de 337nm e diâmetro de 1 micron. As áreas selecionadas são então ejetadas para a capa do tubo coletor. O mecanismo que possibilita esta catapultagem é um fóton de alta densidade, que se forma abaixo da amostra, impulsionando-a contra a lei da gravidade até o tubo [95]. Toda a visualização e escolha da área de interesse a ser microdissecada pode ser feita pela tela do computador, sendo possível calcular as áreas dos campos escolhidos. O sucesso da ação é comprovado pela evidência da área negativa no tecido referente à área de corte [91].

Muitas são as aplicações deste método na medicina moderna. Tem-se usado a CML para fins diversos, como experimentos com fertilização “in vitro”, biópsia de blastômeros, extração de DNA e RNA, estudo genômico, proteinômico, embriogênese, progressão tumoral e doenças degenerativas cerebrais [91-93, 95, 96].

Em um estudo de 2004 [97], Roberts et al aliam pela primeira vez a CML com o estudo de deposição de partículas ambientais. O estudo analisa a deposição de partículas quando da exposição ao “*residual oil fly ash*” (ROFA) em pulmões de ratos expostos a estas partículas e à solução salina. Utilizando-

se a CML, foram isoladas células das vias áreas dos animais expostos e estudadas as alterações nos sinais intracelulares de ativação do fator de transcrição p-ERK, que se mostraram aumentados quando da exposição à poeira, resultados semelhantes a estudos prévios “in vitro”, provando pela primeira vez a aplicabilidade da CML para determinação de lesão pulmonar aguda induzida por poluentes atmosféricos. Em 2006, Liu et al [98] estudaram a composição metálica de placas amilóides na doença de Alzheimer através de microscopia de fluorescência de raio-X. Estas placas amilóides foram microdissecadas através de CML, com posterior análise elementar por fluorescência de raio-X, evidenciando mais esta utilidade para a CML [98].

2 Justificativa

É de extrema importância o estudo da composição elementar das partículas retidas no pulmão, pois sua composição elementar está relacionada à sua toxicidade, podendo entender como a exposição aos poluentes leva ao desenvolvimento de doenças pulmonares. Desta forma, no presente estudo, aplicamos a CML para isolar áreas de interesse no pulmão, como vias aéreas centrais, periféricas, região subpleural e linfonodos, para determinação da composição elementar de partículas retidas através de estudo por MEV e RX-DE. A técnica CML permite acessar e isolar áreas de interesse visualizadas no microscópio, tornando a análise mais minuciosa, conseguindo desta forma analisar o pulmão de forma mais representativa sem necessidade de múltiplas medições. Comparamos este método com a análise de cortes teciduais de blocos de parafina diretamente no MEV, consagrada na literatura.

3 Objetivos

- Comparar a composição elementar das partículas retidas nas regiões peribrônquica, peribronquiolar, subpleural e em linfonodos hilares, através de CML com análise por MEV aliada à RX-DE em amostras de pacientes de São Paulo e São José do Rio Preto, tentando estabelecer o perfil elementar de retenção destas partículas ao longo da árvore traqueobrônquica.
- Comparar a composição elementar das partículas retidas nestas mesmas regiões do parênquima pulmonar entre as duas cidades, tentando determinar possíveis diferenças segundo os diferentes padrões de exposição ambiental.
- Testar a eficácia da captura por microdissecção a laser como método para selecionar regiões específicas do pulmão para avaliação elementar de deposição de partículas, comparando-a com a técnica de análise por corte de parafina.

4 Métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq-FMUSP) (Anexo 1).

4.1 Seleção dos casos

Os casos para estudo foram selecionados no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVO-USP) e na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, segundo os seguintes parâmetros: pacientes com idade entre 30 e 70 anos, que viveram pelo menos 30 anos na cidade de realização da autópsia, não fumantes, sem história prévia de doença respiratória. Para cada caso, a escolha foi feita após contato com um membro da família, que foi devidamente informado a respeito do objetivo da pesquisa de acordo com uma carta informativa de consentimento assinada pelo pesquisador e pelo responsável do paciente (Anexo 2). Após o consentimento, foi realizada uma entrevista, com coleta de dados de antecedentes pessoais, história de uso de medicamentos, ocupação atual e prévia. Dados adicionais do resultado da autópsia, doença básica, causas contributivas e relacionadas à morte do paciente foram acrescentadas ao protocolo.

Durante a realização da autópsia, os pulmões foram avaliados pelo pesquisador patologista, e a presença de alterações macroscópicas de doença pulmonar ou comprometimento pulmonar por doença sistêmica (como por exemplo, bronquiectasias, tuberculose, outras doenças infecciosas, pacientes com história de doenças do colágeno ou linfangite carcinomatosa) foram avaliados, sendo que a presença destas alterações excluía o caso do estudo.

4.2 Locais de Estudo

A cidade de São Paulo (SP) é a maior cidade da América do Sul, com uma população urbana de aproximadamente 11 milhões de pessoas. Em SP, o tráfego veicular é a principal fonte de poluição atmosférica, com concentrações de MP_{10} , $MP_{2.5}$ e NO_2 normalmente encontradas acima dos níveis aceitáveis [21, 99, 100], com a concentração anual de $MP_{2.5}$ de aproximadamente $25 \mu g/m^3$ [99]. São José do Rio Preto (SJRP) é uma cidade com um milhão de habitantes (Grande SJRP), distando aproximadamente 600 km de SP. A economia regional é baseada na produção agropecuária integrada às atividades agroindustriais, com a área urbana da cidade circundada por plantações de cana de açúcar [109]. Embora não haja caracterização detalhada das partículas ambientais na área ou monitoramento da poluição atmosférica, acredita-se que a maior parte do MP venha da queima da cana de açúcar [23, 24], com uma pequena contribuição de uma frota de aproximadamente 200.000 veículos.

Uma campanha conduzida em Julho de 2007 mostrou que as concentrações diárias de 2,5 foram por volta de $13 \mu\text{g}/\text{m}^3$, 50% mais baixas que as encontradas em São Paulo [99].

Estas duas cidades possuem um Sistema de Verificação de Óbitos, onde habitantes que morreram de causa natural, mas sem uma causa clara de morte, são submetidos à autópsia para determinação da *causa mortis*.

4.3 Coleta e processamento do material

Para a coleta do material, os utensílios usados foram lavados entre os casos e foram utilizadas luvas sem talco a fim de evitar ao máximo a contaminação. Após a retirada do pulmão direito, foi colhido material de três localizações distintas do lobo médio: região central (C) (próxima ao hilo pulmonar), região periférica (P) (subpleural e peribronquiolar) e linfonodo hilar (L). O material coletado foi então armazenado em formaldeído 10 % em diferentes recipientes. Para todos os casos, o material coletado em formol foi fixado por uma média de 5 dias, sendo posteriormente separado para inclusão em bloco de parafina. Foram feitos cortes do material emblocado novamente, evitando-se a contaminação através de uso de luvas sem talco e lavagem do material utilizado entre os cortes.

Para cada caso, foram realizados cortes de $5 \mu\text{m}$ e corados pela técnica de hematoxilina eosina (HE). Os casos foram estudados histologicamente para confirmar a preservação do tecido e para escolha das áreas de antracose nas

regiões peribrônquicas, peribroquiolares, subpleurais e no linfonodo hilar, para posterior microdissecção a laser e análise por microscopia eletrônica.

A análise no MEV foi realizada a partir de material obtido pelas duas metodologias propostas: captura por microdissecção a laser (CML) e cortes de parafina.

Para microdissecção a laser foram realizados cortes em lâminas de membrana de teraptalato de polietileno (PET) (Carl Zeiss, Munique, Alemanha), especiais para CML. Estas lâminas receberam tratamento prévio com exposição à luz ultravioleta por trinta minutos para melhorar a fixação do corte a área membranosa. Cortes de 10 µm de espessura [73] foram feitos com coloração com HE para facilitar a visualização das áreas a serem microdissecadas.

Os casos foram microdissecados usando-se o sistema P.A.L.M Microbeam IP Z (Carls Zeiss, Munique, Alemanha), aliado ao microscópio Zeiss Axiovert 200 (Carl Zeiss, Munique, Alemanha), no laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Esta aparelhagem é integrada a um computador com o P.A.L.M Robot Software (Carls Weiss, Munique, Alemanha) (Figura 1). A microdissecção foi realizada em 4 locais distintos: região subpleural (P), região peribrônquica (C), peribronquiolar (B) e linfonodo hilar (L), locais suspeitos para maior deposição de partículas, em relação a deposição de pigmento de carvão [31]. Nas amostras oriundas de material de pulmão periférico, foram dissecadas áreas de antracose subpleural (P) e focos de antracose ao redor de bronquíolos respiratórios de primeira ordem (B). Em amostras onde não foram visualizadas áreas de antracose, foram dissecados focos de maior espessamento septal,

correlacionado por Siegesmund et al [77] como áreas de maior deposição de material particulado. Nas amostras centrais foram dissecadas áreas de deposição de pigmento de carvão peribrônquico e nas amostras de linfonodos focos de grande quantidade de antracose foram valorizados (Figuras 2 e 3).

Figura 1. Microscópio Zeiss Axiovert 200, utilizado para a CML, que se encontra no laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Figura 2. Exemplo da escolha de áreas para CML na região subpleural. A visualização era feita inicialmente em HE, onde as áreas de antracose eram escolhidas. A partir daí, eram desenhados, com auxílio do programa de computação, as áreas a serem dissecadas (círculos em vermelho) (10x)

Figura 3. Exemplo da escolha de áreas para CML nos linfonodos. Assim como nas demais áreas, eram desenhadas 100 regiões de corte para cada caso

Neste método, a área a ser microdissecada é escolhida, sendo cortada com um laser de nitrogênio com pulso de 337 nm e diâmetro de 1 micron. As áreas selecionadas são ejetadas para a capa do tubo coletor. O mecanismo que possibilita esta catapultagem é um fóton de alta densidade, que se forma abaixo da amostra, impulsionando-a contra a lei da gravidade até o tubo [95]. Toda a visualização e escolha da área de interesse a ser microdissecada podem ser acompanhadas pela tela do computador, onde visualizamos as áreas dos campos escolhidos. O sucesso da ação é comprovado pela evidencia da área negativa no tecido referente à área de corte [91] (Figuras 4 e 5).

Para cada amostra a ser microdissecada foi preparado um tubo coletor de 5 ml, sendo colocado fita carbono dupla face em sua tampa, a fim que os cortes se aderissem e pudessem ser posteriormente analisados no MEV. Para a microdissecção, o laser agia com uma energia de 70MW/cm² para o corte e com energia de 72 MW/cm² para a catapultagem final, onde o material selecionado era impulsionado à capa do tubo coletor (Figura 6), sendo este procedimento repetido para cada região selecionada. Estes parâmetros podem ser regulados dependendo da espessura e da qualidade do material a ser dissecado [97]. Áreas de espessamento fibroso exigiam maior energia de corte e capultamento. Em casos onde o pulso de laser não era suficiente para a extração do material, o procedimento foi repetido mudando-se os parâmetros estabelecidos.

Foram feitos 100 cortes em cada região de cada caso, com área aproximada de 3000 μm^2 somando-se os 100 fragmentos. Grande atenção foi dada a esta etapa da microdissecção, pois uma perda de foco pelo microscópio prejudicaria a ação do laser. Após a coleta, os tubos foram fechados e o material armazenado em dissecador até o preparo para análise no MEV. A sequência de eventos até a obtenção da amostra para análise no MEV pode ser observada na figura 7.

Figura 4. Após o corte e catapultagem, o sucesso da operação podia ser comprovado a partir da visualização das áreas negativas referentes aos fragmentos catapultados (10x)

Figura 5. Assim, como na figura anterior, no caso do linfonodo, após o corte e catapultagem, o sucesso da operação podia ser comprovado a partir da visualização das áreas negativas referentes aos fragmentos catapultados (10x)

Figura 6. As lâminas de PET eram colocadas na bandeja de microdissecção e após o corte pelo laser, o material catapultado era coletado na tampa do tubo coletor (seta), para posterior preparo para a análise no MEV

Figura 7. Seqüência de eventos desde a visualização da área de antracose, até a escolha das áreas a serem microdissecadas e o corte pelo pulso de laser (em ordem horária). O sucesso da operação pode ser comprovado pela visualização das áreas negativas referentes às áreas de antracose dissecadas

4.3 Cortes de parafina para posterior análise pelo MEV

O material foi cortado em 10 μm de espessura e posicionado diretamente em uma placa de grafite previamente polida [73, 79, 80]. As placas de grafite foram encaminhadas para o preparo para o MEV (Figura 8). Do mesmo bloco, foi obtida uma lâmina de HE conseqüente, para nortear o estudo em busca das áreas de antracose [74, 79].

Figura 8. Placas de grafite com os cortes de tecido de 10 μm de espessura, apoiadas em placas de alumínio, para posterior análise no MEV. As placas eram posicionadas com a referente identificação, para reconhecimento na análise pelo MEV

4.4 Análise pelo MEV

A análise pelo MEV foi realizada usando-se um microscópio Quanta 600 FEG (FEI, Praga, República Tcheca), aliado ao detector de sílica de RX-DE, modelo XFlash 4030 (Bruker, Berlim, Alemanha), sendo realizada no Laboratório de Caracterização Tecnológica da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (LCT-POLI). Todos os casos analisados foram previamente preparados, utilizando-se o MED-020 “coater” (Bal-Tec, Liechtenstein). Este preparo consistia-se em depositar, em vácuo, um filme fino de platina sobre as amostras (cerca de 15 nm) para que a condução elétrica do feixe de elétrons gerado no MEV ao interagir com a amostra fosse adequada. Se esta condução não fosse adequada, a aquisição de imagens e a microanálise por dispersão de energia ficariam bastante comprometidas. Após o preparo (*coating*), as amostras foram fixadas em suporte de alumínio, utilizando-se fita de carbono dupla face, para então serem levadas ao MEV (Figura 9).

A análise por fluorescência de raios-X é um método quali-quantitativo baseado na medida das intensidades (número de raios-X detectados por unidade de tempo) dos raios-X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra. Os tubos emitem raios-X ou gama por uma fonte radioativa e excitam os elementos constituintes, os quais, por sua vez, emitem linhas espectrais com energias características do elemento e cujas intensidades estão relacionadas com a concentração do elemento na amostra [101].

O programa de computação Esprit (Bruker, Berlim, Alemanha), aliado ao MEV, interpreta os resultados e identifica os elementos presentes na amostra [73]. Desta forma, pode-se obter análise de mais de 80 elementos em uma área em questões de minutos ou segundos.

Figura 9. Amostras do material dissecado nas tampas dos tubos coletores após o preparo para o MEV (coating), apoiadas em placa de alumínio para a análise no microscópio de varredura

Para as análises microdissecadas, após a acomodação das amostras no aparelho, os campos de interesse, ou seja, campos onde foram visualizados os fragmentos microdissecados, foram escolhidos em um aumento de 200x. Começava-se a visualização da amostra a partir do campo direito alto em sentido horário, sendo escolhidas amostras íntegras

de preferências em cima das membranas. O aumento mais adequado para a devida análise das partículas pelo RX foi de 2000x. Neste aumento pôde-se notar os detalhes do material e escolher pontos de interesse para análise de composição metálica com maior especificidade (pontos na imagem de elétrons retroespalhados que mostrassem brilho mais intenso, indicando presença de elementos químicos de peso atômicos mais altos, normalmente metais), sem causar grande dano a estrutura tecidual. Como as amostras eram irregulares em formato e tamanho, optou-se por escolher os dois maiores eixos do material e traçar linhas, com escolha arbitrária de pontos em cima das linhas, com um espaço de 7 μm entre eles. Além destes, eram escolhidos um ponto por quadrante do material que fosse coincidente com um ponto de interesse [77]. Esta metodologia era repetida até se obter 64 pontos de análise por amostra, ou seja, por região de cada caso (Figuras 10 e 11)

Para as amostras parafinadas, os campos foram escolhidos conforme a lâmina de HE obtida juntamente com o corte de parafina, guiando-se pelo MEV até o ponto de interesse homólogo a área da lâmina. Estas áreas eram facilmente visualizadas pois tinham grande quantidade de elementos depositados, como pontos de brilho mais intenso (nível de cinza mais elevado que do tecido) na imagem de elétrons retroespalhados do MEV, um dos modos de visualização no MEV que facilitava a localização de regiões de diferentes composições químicas (níveis de cinza mais escuro indicavam presença de elementos químicos mais leves e níveis de cinza mais claro, ou seja, brilho intenso, indicavam elementos químicos mais pesados)(Figura

12) [79]. As áreas escolhidas foram então visualizadas em aumento de 2000x, e os campos para amostragem determinados a partir do campo superior alto direito sendo escolhido um a cada dois campos. Eram então desenhadas grades com linhas horizontais e verticais, programadas pelo programa de computação, determinando 12 pontos por campo entre os pontos de intersecção das linhas, com distância de 7 μm entre eles. Quatro pontos adicionais de interesse, um por quadrante, foram posteriormente selecionados, com um total de 16 pontos por campo [77] (Figura 13). Após análise de quatro campos, obtinha-se o total de 64 pontos e passava-se então à amostra seguinte.

Tanto na análise do material microdissecado quanto na análise do material parafinado, as áreas de buraco ou de relevo acentuado foram evitadas.

Figura 10. Exemplo de como o material microdissecado era visto no MEV. Eram traçadas duas linhas nos dois maiores eixos (linhas tracejadas). Os pontos analisados para obtenção do espectro eram coletados a cada 7μm nas linhas (pontos azuis) , além de um ponto de interesse por quadrante (pontos amarelos). Este procedimento era repetido até obter-se 64 pontos por amostra. Neste caso, por exemplo, foram obtidos 14 pontos

Figura 11. Outro exemplo de material microdissecado, visto no MEV. Os pontos analisados, para obtenção do espectro, eram coletados a cada 7μm nas linhas (pontos azuis) , além de um ponto de interesse por quadrante (pontos amarelos). Neste caso, por exemplo, foram obtidos 21 pontos.

Figura 12. Material obtido através do corte de parafina visualizado no MEV. Observa-se aqui a região subpleural, com a área de interesse a ser visualizada em maiores aumentos marcada com a seta. Esta área correspondia à área de antracose no HE

Figura 13. Visualização da mesma área marcada com a seta com o aumento de 2000x para aplicação da grade. Cada região média da linha, entre a intersecção das linhas, representa um ponto de análise espectral (pontos azuis), além de quatro pontos de interesse (um por quadrante, pontos amarelos)

A análise da composição metálica do material se deu através de detector especial (cristal de Si) dos raios-x característicos emitidos pela amostra quando da interação do feixe de elétrons com a amostra em análise. Estes raios-x foram detectados e usados para determinar um sinal proporcional à energia emitida de acordo com a composição do material excitado. Essa variação de energia foi lida por um software de microanálise Esprit (Bruker, Berlim, Alemanha) que gerou uma curva de distribuição com picos de energia (espectro de RX-DE), referentes aos diferentes elementos químicos que compõem a amostra. O tempo escolhido de exposição ao feixe (gerado por corrente de emissão de 20kV) foi de 60 segundos. Dados quantitativos da análise foram obtidos em porcentagem de massa de elemento para cada espectro, através de cálculos obtidos a partir do valor em cps/eV (contagens por segundo /eletron Volt). Porém, por tratar-se de material não polido (apenas materiais totalmente planos e polidos geram dados confiáveis para uma análise quantitativa), os resultados numéricos considerados foram uma simples contagem dos pontos com presença de metais, considerando a presença ou ausência de um determinado elemento, sem valorizar sua intensidade de sinal, caracterizando uma avaliação semiquantitativa dos resultados [79] (Tabela 1).

Tabela 1. Exemplo de como os espectros eram analisados em uma amostra¹

Espectro	Al	Si	S	Cl	K	Ca	Ti	Fe	Br
1		0.74 ²				0.16			
2	0.23	0.73	1.47	0.11		0.09		0.16	
3		1.00				0.20			
4	1.23	1.65	1.25	0.12	0,09	0.14	0.17	1.11	
5	0.32	0.90	1.50	0.10		0.17		1.04	
6	0.39	1.14	1.36	0.11		0.29			
7	0.25	0.79	1.31	0.12		0.23			
8	0.13	0.47	0.59						
9		0.99	1.12	0.12		0.21			1.05
10	0.28	1.38	1.52	0.11		0.15		0.51	
Valor usado	7	10	8	7	1	9	1	4	1

¹ Devido à irregularidade da superfície do material estudado, os valores obtidos pela análise por RX-DE (mostrados na tabela) não foram utilizados. Os valores usados foram o da presença ou ausência de um elemento em um determinado espectro, de 64 estudados por região por caso. Aqui, um exemplo contendo 10 espectros é mostrado. Por exemplo, para o elemento alumínio (Al) o resultado seria 7, para o Si 10, etc.

² Valores expressos em porcentagem de massa para cada elemento.

4.5 Análise Estatística

Comparações entre SP e SJRP foram feitas para cada região analisada (pleura, peribronquico, peribronquiolar e linfonodos) através do teste de Mann-Whitney U. As comparações entre o material parafinado e o microdissecado foram feitas através do teste de ANOVA.

Para testar a possibilidade de se distinguir amostras teciduais de indivíduos vivendo nas duas áreas de estudo de acordo com a composição

elementar das partículas (validação cruzada) empregou-se uma análise discriminante “stepwise”, seguida da abordagem “one-out”. A técnica “one-out” é usada para avaliar a sensibilidade da classificação realizada pelo modelo discriminante. Este procedimento exclui um caso do cálculo estatístico e verifica a classificação do caso excluído, utilizando coeficientes obtidos na sua ausência [102]. Em todos os casos, o nível de significância foi ajustado em 5%. A análise estatística foi realizada com a ajuda do programa SPSS v15.0 (SPSS Inc, Chicago, EUA).

5 Resultados

5.1 Características das amostras

Vinte e quatro casos foram selecionados, todos não fumantes, com causas de morte não pulmonares, sendo quinze casos de SP e nove de SJRP. Doze casos eram do sexo masculino e doze do sexo feminino, com uma idade média de 65,3 anos e mediana de 67,5 (variação de 38-77). As causas de morte incluíam: insuficiência cardíaca, cirrose e sepse. Em nenhum caso houve história de exposição a metais ou atividade profissional que estivesse relacionada a alguma exposição a metais pesados (Tabela 2).

5.2 Comparação entre resultados das amostras dos cortes de parafina e microdissecadas

Oito casos tiveram amostragem pelos dois métodos, sendo 4 de SP e 4 de SJRP. Estes casos foram comparados quanto à composição elementar de partículas retidas em regiões subpleurais, peribrônquicas e linfonodos, determinadas pela análise pela RX-DE aliado ao MEV, pelo teste de ANOVA. Valores referentes à média e desvio padrão estão apresentados na tabela 3. Somente elementos até o Cu foram mostrados. Elementos de Sb a

W foram encontrados em alguns casos, com sinais traço sendo interpretados como variação de exposição individual. Quando comparadas as regiões subpleurais independentemente da origem (SP ou SJRP), houve uma diferença significativa para a análise do Al ($p=0,001$) , Si ($p=0,018$) e Br ($p<0.001$) , mais presente no material dissecado e para o Ca ($p<0.001$) mais presente nos cortes de parafina. Para as regiões centrais, houve diferença significativa para o Al ($p=0,005$) , Si ($p=0,007$), Cl ($p<0.001$) e Br ($p=0,001$), mais freqüentemente encontrados no material microdissecado e para o Mg ($p= 0,29$) e Ca ($p<0.001$) mais encontrado nos cortes de parafina. Na análise dos linfonodos, novamente Cl ($p<0.001$) e Br ($p<0.001$) mostraram diferença significativa com maior presença em material microdissecado, e Mg ($p=0,38$), K ($p=0,39$) e Ca ($p<0.001$) mostraram diferença significativa com maior presença nos cortes de parafina.

Tabela 2. Lista dos casos de acordo com gênero, causas de óbito, ocupação e tempo vivendo na cidade

	SP (n=15)	SJRP (n=9)	TOTAL (n=24)
Gênero (H/M)	9/6	4/5	13/11
Idade (anos) ¹	67 (38-90)	70 (41-77)	67.5 (38-90)
Tempo vivendo na cidade (anos) ¹	45 (30-75)	43 (30-65)	44 (30-75)
Ocupação	Faxineiro: 1 Pedreiro: 1 Advogado: 1 Aposentado: 3 Cozinheiro: 1 Professor: 1 Secretária: 1 Encanador: 1 Do lar :5	Pedreiro: 1 Aposentado: 5 Do lar: 3	
Causa de óbito	Edema cerebral: 2 IAM: 3 Sepse: 2 Insuficiência renal: 2 Miocardia Hipertrófica: 1 Tamponamento Cardíaco: 2 Insuficiência Hepática:1 Hemorragia Cerebral: 2	Edema cerebral :2 IAM: 4 Sepse: 1 Insuficiência renal: 1 Cirrose: 1	Edema cerebral: 4 IAM: 7 Sepse: 3 Insuficiência renal: 3 Miocardia Hipertrófica: 1 Tamponamento Cardíaco: 2 Insuficiência Hepática :1 Hemorragia Cerebral: 2 Cirrose: 1

Abreviaturas: H (homem), M (mulher), SP (São Paulo), SJRP (São José do Rio Preto), IAM (Infarto Agudo do Miocárdio)

¹ Dados expressos em mediana e variação.

Tabela 3. Dados dos números de pontos contendo elementos, expresso em média e desvio padrão de pontos contendo cada elemento, por região do pulmão e método empregado. n=8

Região	Método		Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	K	Ca	Ti	Fe	Br	Zn	Cr	Mn	Cu
Subpleural	CML	Média	6,5 ¹	1,5	50,25	50,88 ²	0,25	39,75	42,38	4,63	6,5	1,75	12,38	20,63 ³	0,13	0,00	0,00	0,00
		DP	7,38	2,44	13,35	13,58	0,46	15,11	10,25	7,78	5,55	2,55	16,63	14,06	0,35	0,00	0,00	0,00
	Parafina	Média	1,38	11,38	22,88	24,0	0,00	46,63	2,38	6,75	48,5 ⁴	8,88	16,63	0,00	0,13	0,00	0,13	0,00
		DP	2,66	11,21	19,16	19,90	0,00	16,06	2,61	8,92	18,80	12,63	17,68	0,00	0,35	0,00	0,35	0,00
Linfonodo	CML	Média	1,63	6,00	59,13	58,00	0,00	34,63	37,25 ¹¹	11,38	9,00	17,63	27,38	14,88 ¹²	0,00	0,13	0,25	0,13
		DP	1,68	7,17	3,98	6,59	0,00	15,52	8,59	10,37	2,77	13,43	11,25	8,80	0,00	0,35	0,46	0,35
	Parafina	Media	7,63	15,38 ¹³	55,50	55,88	0,50	49,38	2,13	23,00 ¹⁴	44,25 ¹⁵	24,25	33,50	0,00	0,00	0,38	1,88	0,25
		DP	11,52	9,05	6,48	5,27	1,06	15,26	2,64	9,98	15,29	14,26	8,55	0,00	0,00	0,74	3,18	0,46
peribrônquico	CML	Media	1,38	1,50	50,25 ⁵	54,00 ⁶	0,25	39,75	42,38 ⁷	4,63	6,50	1,75	12,38	20,63 ⁸	0,13	0,00	0,00	0,00
		DP	2,66	2,44	13,35	19,90	0,46	15,11	10,25	7,78	5,55	2,55	16,63	14,06	0,35	0,00	0,00	0,00
	Parafina	Media	6,50	11,38 ⁹	22,88	24,00	0,00	46,63	2,38	6,75	48,50 ¹⁰	8,88	16,63	0,00	0,13	0,00	0,13	0,00
		DP	7,38	11,21	19,16	19,90	0,00	16,06	2,61	8,92	18,80	12,63	17,68	0,00	0,35	0,00	0,35	0,00

Abreviaturas : CML- Captura por microdissecção a laser; DP- Desvio Padrão

¹ (p=0,001), ² (p=0,018), ³ (p<0.001), ⁴ (p<0.001) ⁵ (p=0,005), ⁶ (p=0,007), ⁷ (p<0.001), ⁸ (p=0,001), ⁹ (p=0,29), ¹⁰ (p<0.001), ¹¹ (p<0.001), ¹² (p<0.001) ¹³ (p=0,38), ¹⁴ (p=0,39) e ¹⁵ (p<0.001).

5.3 Local de deposição na árvore traqueobrônquica

A análise da distribuição dos elementos ao longo da árvore traqueobrônquica sem considerar o tipo de exposição à poluição, ou seja, a origem da amostra, mostrou dois padrões distintos de distribuição, com dois grupos de elementos. (figuras 14 e 15). Um grupo mostrou uma tendência de distribuição com deposição bronquiolar (S, Cl, Ca e Br), e outro (formado por Na, Mg, Si, K, Ti e Fe) foi mais encontrado em linfonodos. Quando esses dois grupos foram comparados usando-se o teste de t independente, o grupo com distribuição peribronquiolar mostrou uma diferença significativa para os elementos S, Ca e Br com $p=0,001$, $p=0,021$ e $p=0,035$, respectivamente. No grupo com distribuição linfonodal, houve uma diferença significativa para os elementos Mg, Si, K e Ti, com $p=0,013$, $p=0,021$, $p=0,001$ e $p=0,001$, respectivamente.

Figura 14. Distribuição dos elementos mais comumente encontrados na região peribronquiolar. P(subpleural); B (peribronquiolar); L (linfonodo); C (peribrônquico)

Figura 15. Distribuição dos elementos mais comumente encontrados em linfonodos. P (subpleural); B (peribronquiolar); L (linfonodo); C (peribrônquico)

5.4 Análise Discriminante

A figura 16 mostra os resultados quando a análise discriminante “stepwise” foi realizada (seguida da abordagem “one-out”). As regiões subpleurais, peribronquiolares e linfonodos mostraram níveis de discriminação de 70%, 70 % e 87%, respectivamente. A região peribrônquica mostrou uma tendência de acumulação de partículas em pulmões paulistanos, com 95,8 % de discriminação sem utilização da abordagem “one-out” e 91,7% na utilização desta, indicando que o modelo em questão era confiável (Tabela 3). Os elementos responsáveis por essa discriminação foram o Al, Fe e Cu (mais comumente encontrados em SP) e Cl e Na (mais encontrados em amostras de SJRP).

Figura 16. Porcentagem de discriminação da origem das amostras (SP ou SJRP) através do perfil elementar das partículas depositadas ao longo do sistema respiratório. P (região subpleural); B(região peribronquiolar); L(linfonodo); C (região peribrônquica)

5.5 Comparação entre SP e SJRP

A tabela 4 mostra as medianas e intervalos interquartis referentes ao número de pontos encontrados, para cada elemento, em cada região, por caso. Somente elementos até o Cu são mostrados. Elementos de Sb a W foram encontrados em alguns casos, com sinais traço sendo interpretados como variação de exposição individual. Não houve diferença em relação ao sexo. Casos de SJRP mostraram uma maior deposição de Cl ($p=0,002$), Br ($p=0,001$) e Al ($p=0,006$) em áreas peribronquiolares, assim como o Br em região subpleural ($p=0,008$), Ti em linfonodos ($p=0,006$) e Cl em áreas centrais ($p=0,034$). Em SP, Fe foi mais significativamente encontrado nas regiões centrais ($p=0,041$).

Tabela 4. Dados dos números de pontos contendo elementos, expresso em mediana e intervalo interquartil (IQR), por região do pulmão e cidade de origem.

Região	Origem		Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	K	Ca	Ti	Fe	Br	Zn	Cr	Mn	Cu
Subpleural	SJRP ¹	Mediana	0	91	62	39	0	61	59	0	18	0	4	25 ³	0	0	0	0
		IQR	3	6	14	25	1	27	23	7	35	11	37	19	0	0	0	0
	SP ²	Mediana	0	2	60	56	0	61	49	0	22	0	4	7	0	0	0	0
		IQR	4	7	8	30	0	9	26	6	27	2	23	17	0	0	0	0
	Total	Mediana	0	2	61	48	0	61	52	0	20	0	4	16	0	0	0	0
		IQR	3	7	10	29	0	19	23	6	28	4	23	18	0	0	0	0
peribronquiolar	SJRP	Mediana	1	3	64 ⁴	53	0	63	61 ⁵	0	38	0	2	44 ⁶	0	0	0	0
		IQR	3	6	0	16	0	1	4	2	32	2	28	23	0	0	0	0
	SP	Mediana	1	3	64	53	0	63	61	0	18	0	4	22	0	0	0	0
		IQR	3	5	4	18	0	5	36	3	38	1	9	26	0	0	0	0
	Total	Mediana	1	2.5	64	53.5	0	63	58.5	0	36	20	2.5	26	0	0	0	0
		IQR	3	5	2	17	0	2	18	2	37	1	9	30	0	0	0	0
Linfonodo	SJRP	Mediana	4	11	64	62	0	61	48	24	18	26 ⁷	32	13	0	0	1	0
		IQR	19	29	4	9	0	28	25	29	39	25	29	18	0	0	1	0
	SP	Mediana	1	14	63	61	0	51	38	13	12	9	32	10	0	0	0	0
		IQR	4	9	5	9	0	24	40	25	14	16	33	28	0	0	0	0
	Total	Mediana	1.5	4	63	61.5	0	53.5	45.5	13	14.5	13	32	12.5	0	0	0	0
		IQR	6	22	5	9	0	23	26	26	26	25	31	23	0	0	1	0
peribrônquico	SJRP	Mediana	0	0	62	54	0	62	58 ⁸	0	9	0	0	17	0	0	0	0
		IQR	5	4	20	15	0	21	20	1	14	1	2	29	0	0	0	0
	SP	Mediana	0	1	62	59	0	60	43	1	17	0	3	8	0	0	0	0
		IQR	4	7	9	15	0	18	33	3	30	4	24 ⁹	13	0	0	0	0
	Total	Mediana	0	0.5	62	58.5	0	60.5	50.5	0	14	0	1.5	14.5	0	0	0	0
		IQR	4	5	10	14	0	18	26	2	17	2	10	18	0	0	0	0

Abreviaturas: SJRP – São José do Rio Preto; SP- São Paulo; n- número de casos; IQR- Intervalo interquartil.

¹ (n=9); ² (n=15), ³ p=(0.008), ⁴ (p=0.006), ⁵ (p=0.002), ⁶ (p=0.001), ⁷ (p=0.006), ⁸ (p= 0.034), ⁹ (p=0.041).

6 Discussão

Neste estudo mostramos que a composição elementar das partículas retidas varia em diferentes regiões do pulmão. Áreas antracóticas dos bronquíolos respiratórios e dos linfonodos hilares apresentaram a maior frequência de partículas retidas, mas com padrões de composição elementar distintos. Nossos dados também indicam que as áreas peribrônquicas são melhor discriminadoras da exposição à poluição do ar pelo indivíduo quando comparadas com outras regiões do pulmão.

Quando se comparou os resultados obtidos através da análise por RX-DE aliado ao MEV dos mesmos casos amostrados por dois métodos diferentes (parafina e CML), observou-se que a maioria dos elementos não apresentava diferença significativa na comparação dos dois métodos e nas áreas periféricas, áreas com maior retenção de partículas, houve uma maior detecção de elementos mais relacionados à exposição ambiental quando se utilizava a técnica de microdissecção, o que fundamenta a utilização desta metodologia. Este é o primeiro estudo que utiliza CML aliada ao RX-DE e ao MEV. A CML é uma alternativa a digestão pulmonar ou análise de cortes de parafina e provou ser útil na determinação e comparação do perfil elementar de partículas retidas ao longo da árvore traqueobrônquica.

A deposição de MP já foi classicamente demonstrada em áreas de antracose [30-32], e embora vários trabalhos tenham detalhado a concentração de metais no tecido pulmonar, inclusive com detalhamento

de variação interlobar e interpessoal, nenhum trabalho até hoje detalhou a composição elementar das áreas de antracose em relação a sua deposição ao longo da árvore traqueobrônquica, podendo utilizá-la como um marcador de poluição para discriminar locais com diferentes níveis e tipo de poluição. Neste aspecto, a CML aliada ao MEV e RX-DE foi um instrumento útil para discriminar estas áreas, apontando para um diferente padrão de deposição para diferentes elementos segundo o tipo de poluição que o indivíduo estava exposto.

Os resultados obtidos quando da comparação entre os oito casos cuja análise elementar foi realizada pelas duas metodologias (cortes de parafina e micro-dissecado) fundamentaram a CML como método de amostragem para análise elementar de partículas retidas nos pulmões e linfonodos. Quando se comparam os resultados obtidos pelos mesmos casos na região periférica, região correspondente às áreas subpleural e peribronquiolar, através das duas metodologias, independentemente da origem do tecido (SP ou SJRP), observou-se uma diferença significativa para os elementos Al, Si, Cl e Br com maior presença no material microdissecado. Somente o Ca mostrou-se mais presente na metodologia de cortes de parafina. Quando se comparam as outras regiões como os linfonodos e região central, o Al e Si passam a não mostrar diferença significativa, e o Mg aparece como elemento mais presente na análise por parafina nas duas regiões. O fato dos outros elementos não mostrarem diferença significativa, aliado ao fato da maioria dos elementos onde há diferença serem mais encontrados no material microdissecado, pode fundamentar a escolha desta metodologia.

Para a análise dos cortes de parafina utilizamos cortes de 10 μ m de espessura, diretamente colocados na placa de grafite. Funahashi et al mostraram em seu trabalho de 1977 que cortes de 10 μ m de espessura eram mais fidedignos na interpretação da análise dos elementos, a partir da relação de enxofre com a quantidade de tecido analisado [73], já que tinham previamente constatado uma importante relação entre o enxofre e a quantidade de material pulmonar avaliado, usando a relação Si/S e não a Si sozinha, como resultado de concentração deste elemento [74]. Embora trabalhos mais antigos que relatam a metodologia para a realização desta análise preconizem a desparafinização do corte [73, 77, 79, 103], encontramos resultados satisfatórios sem a desparafinização, com cortes de 10 μ m. Além disso, a manutenção da parafina possibilitou uma correlação direta com os casos obtidos por CML, que também tinham sido obtidos a partir de material parafinado.

A CML apresenta várias vantagens em relação a métodos clássicos discutidos na literatura. A digestão enzimática do tecido pulmonar representa todo o pulmão, e embora uma análise confiável do que está ocorrendo em todo o fragmento seja possível, há perda da correlação morfológica. Ao usar-se o corte de parafina, embora a correlação morfológica seja mantida, uma análise cara e demorada é necessária para se ter uma representatividade maior. Desta forma, quando este último método é usado, os estudos são conduzidos usando-se menores aumentos e há necessidade da utilização da razão elemento/S. Nossos estudos confirmam a grande presença de S no parênquima pulmonar, mas a razão elemento/S não foi utilizada, pois a CML

discrimina as áreas de interesse a serem estudadas antes da análise pelo MEV, com uma melhor representatividade pulmonar, mesmo trabalhando em aumentos maiores, com maior detalhamento do estudo elementar das partículas e segurança que somente as áreas de interesse estão sendo estudadas.

Uma outra vantagem do método de CML aliado ao MEV é a avaliação de múltiplas áreas de interesse em menor tempo. Quando utilizamos cortes de parafina, a avaliação é feita somente na área escolhida segundo a lâmina de HE, se prestando principalmente ao estudo de pneumoconioses [73, 74]. Já a CML pode ser indicada quando se quer obter a concentração de certo elemento em relação a sua distribuição no pulmão, já que estuda vários focos de regiões peribronquicas, subpleurais ou peribronquiolares de forma mais rápida.

Durante a realização da CML, porém, houve várias dificuldades. Para se obter um número suficiente de amostras para avaliação no MEV, é necessário o corte de pelo menos 100 áreas de aproximadamente $30\mu\text{m}^2$ cada. Este corte não pode ser feito em maiores proporções, já que o material não seria catapultado. Esta dificuldade é notada porque embora haja o corte eficiente na maioria dos casos, nem todas as áreas são catapultadas com sucesso devido ao tamanho do fragmento. Além disso, na posterior análise pelo MEV, várias amostras estavam viradas ao contrário ou grudadas de pé na fita adesiva de carbono, o que impossibilitava a análise. Outro grande consumo de tempo e trabalho foi refazer os cortes por CML, já que muitas vezes mesmo com as 100 áreas dissecadas não havia material suficiente

para se obter 64 pontos de análise pelo MEV devido às alterações de fixação dos fragmentos à fita dupla face de carbono.

Em um trabalho recente de meta-análise por Catalani et al [90] salientou-se a importância de se considerar a contaminação, quando do estudo da concentração de metais no pulmão. Os autores salientam a importância de se utilizar luvas sem talco no manuseio das amostras, assim como materiais de corte, todos de um mesmo elemento (quando possível) e a lavagem dos instrumentos entre análise de um caso e outro. Além disso, a eventual contaminação pelo corante, ou pelo formol, também foi discutida, sendo necessário desconsiderar estes contaminantes quando da análise da concentração [90]. Entretanto, em nosso estudo, todas as amostras comparadas foram expostas à mesma fonte de contaminação, já que o mesmo formol e mesma coloração foram utilizados para todas as lâminas, eliminando assim a influência da contaminação, além dos cuidados das luvas e lavagem do material de manipulação das amostras durante o trabalho. Além disso, nossa avaliação foi semi-quantitativa, não se levando em conta a concentração dos elementos encontrados pelo MEV e RX-DE, o que diminui de forma significativa a importância de eventual contaminação, já que dados absolutos dos elementos não foram utilizados. O RX-DE é um método bastante utilizado para análise elementar, mas não é o mais adequado para medição de metais pesados (de maior número atômico) razão pela qual somente os elementos mais leves foram incluídos em nossos resultados.

Quanto ao estudo da antracose como “carimbo” da exposição ambiental, Souza et al.[30] concluíram em seu estudo que havia uma maior concentração de antracose na parede bronquiolar de não fumantes vivendo em um ambiente poluído (SP), apontando para um possível papel da antracose como biomarcador da exposição a poluentes. Achados semelhantes foram relatados por Pinkerton et al [31], onde em uma série de casos de autópsias por morte violenta foi vista uma correlação positiva entre o grau de antracose e alterações histológicas (fibrose, hipertrofia muscular e número de macrófagos intraluminais) nos bronquíolos de primeira, segunda e terceira ordem, com achados mais proeminentes nos de primeira ordem. Contudo, assim como no estudo anterior, não foi realizada análise elementar, e a deposição particular foi relatada somente quantitativamente. Estes achados são consistentes com um estudo prévio [2], onde o bronquíolo de primeira ordem é apontado como o local de maior deposição particular.

Churg et al. [32] também relataram uma maior deposição de partículas nos bronquíolos respiratórios de habitantes da Cidade do México (cidade com altos níveis de MP) quando comparado ao grupo controle (Vancouver). Neste relato, quatro pulmões da Cidade do México foram escolhidos ao acaso e a mucosa das vias aéreas destes casos foi dissecada nos bronquíolos segmentais e sub-segmentais além da carina. Esses tecidos foram dissolvidos e as partículas coletadas e analisadas através do MEV e FRX-DE. Através desta análise, os autores mostraram que as mesmas partículas encontradas no meio ambiente foram encontradas nas vias aéreas destes indivíduos, com uma predileção para deposição na carina e

bronquíolos sub-segmentais. Nenhum pulmão do grupo controle de Vancouver foi processado quanto a este tipo de análise. Estes mesmos achados haviam sido parcialmente relatados em um trabalho prévio pelo mesmo grupo [33], onde os materiais digeridos das regiões centrais de pulmões de habitantes da Cidade do México mostraram partículas com as mesmas características das previamente coletadas no meio ambiente, provando pela primeira vez a relação entre o MP inalado e as partículas depositadas nas vias aéreas, mostrando ainda, que o pigmento enegrecido de antracose tem como seu constituinte MP, que entrou e ficou retido na parede das vias aéreas. Neste primeiro estudo deste grupo, contudo, não há distinção entre áreas centrais e periféricas e também os linfonodos não foram estudados. Em 2003, quando as vias aéreas foram dissecadas e o perfil elementar das partículas depositadas em diferentes áreas da árvore traqueobrônquica foi estudado, a concentração de partículas foi maior nas carinas e em bronquíolos de primeira ordem, mas somente quatro casos foram estudados, todos da mesma cidade (Cidade do México), excluindo-se desta forma a possibilidade de se estudar o padrão de distribuição elementar ao longo da árvore traqueobrônquica, de acordo com o tipo de exposição à poluição [32].

Nosso estudo tentou elucidar o padrão de distribuição elementar ao longo da árvore traqueobrônquica, estudando também os linfonodos. Não há relato na literatura de estudo semelhante, sendo o primeiro estudo a comparar áreas distintas da árvore traqueobrônquica quanto à composição elementar de partículas retidas, através do estudo das áreas de antracose.

Embora não quantitativo, nossos resultados apontam para uma tendência de um aumento de presença de elementos em regiões peribronquiolares de acordo com a literatura prévia [31-33]. Alguns elementos como S, Cl, Ca e Br mostraram uma clara predileção para deposição bronquiolar, enquanto elementos como Na, Mg, Si, K, Ti e Fe foram mais comumente encontrados em linfonodos. Isto pode estar relacionado à cinética das partículas e sua remoção, com partículas mais solúveis sendo mais encontradas nos linfonodos. Os elementos com retenção predominante em região peribronquiolar podem ser constituintes de partículas de remoção lenta, tendo com isso piores efeitos locais e sendo uma ameaça maior a saúde do pulmão. Tal relação causal entre a composição elementar e ação local no pulmão, contudo, é difícil de ser assumida, já que as partículas são multielementares e diferentes elementos em diferentes concentrações podem estar relacionados às lesões do órgão, não sendo possível, neste contexto, o estabelecimento de uma simples relação causa-efeito.

Quando se aplicou a análise discriminante “stepwise”, a única área com alto índice de discriminação quanto ao tipo de poluição ao qual aquele grupo de indivíduos estava exposto (ou seja, sua origem), através da composição elementar das partículas estudadas foi a região central ou peribrônquica, com 95,8% de discriminação. Isso significa que através do estudo da composição elementar de partículas depositadas nesta região consegue-se estabelecer a qual grupo aquele indivíduo pertence (SP ou SJRP) em 95,8% dos casos. Este achado sugere que as regiões proximais são melhores discriminadores de exposição à poluição, com um “carimbo”

elementar pela antracose. Nosso estudo achou uma predileção pela deposição de partículas nas regiões peribronquiolares, mas quando esta área foi estudada através da análise discriminante somente 70% dos casos foram corretamente discriminados.

Isto pode ser explicado pelo fato de regiões centrais não serem os locais mais comuns para deposição particular, e por esta razão serem melhores discriminadores da exposição à poluição do que as vias aéreas distais, que são a via final de deposição da maioria das partículas inaladas independente de seu histórico de exposição. As vias aéreas centrais figurariam então neste cenário como os marcadores de exposição do indivíduo e as vias aéreas distais e linfonodos como a grande “lixeira” de partículas inaladas.

Outro mecanismo que explica a remoção mais lenta de partículas nesta região foi relatado em estudos de deposição particular, onde, usando-se uma técnica que limita a deposição de partículas nas vias aéreas proximais, mostrou-se que uma fração substancial das partículas são depositadas e removidas de forma lenta das vias aéreas maiores [104]. Outro mecanismo de retenção das partículas nas vias aéreas, foi proposto por Gehr et al [105, 106], que mostraram em um estudo “in vitro” que partículas se depositam no topo da camada gel e acabam sendo puxadas para dentro da fase gel, ou até mesmo para camada sol, devido aos gradientes de força de tensão superficial na interface gel-sol. As partículas que se localizam então sob os cílios são imobilizadas e tem maior predileção a ficarem retidas por maior tempo, mostrando que este pode ser o destino final para uma quantidade considerável de partículas.

Na aplicação da CML para se comparar áreas centrais de SP e SJRP, o Cl foi mais claramente encontrado em SJRP e o Fe em SP. Quando os pulmões foram comparados nas outras regiões (subpleural, peribronquiolar e linfonodos), nossos achados sugerem uma tendência a aumento da presença de metais em pulmões do interior. Estes achados são um pouco inesperados, mas podem refletir um diferente tipo de exposição desta população do interior, já que elementos como Cl e Br podem estar mais relacionados a queima de biocombustível, atividade que cresceu recentemente com a utilização do álcool como alternativa de combustível, tendo importante papel na composição da poluição atmosférica desta região. O achado de Cl nestes pulmões poderia também ser justificado pelo uso de pesticidas, compostos de clorinas e bromo, usados em áreas rurais [107, 108]. S, Fe e Al foram mais comumente encontrados nas áreas peribrônquicas em pulmões paulistanos, o que pode refletir a maior exposição à emissão veicular com re-suspensão de partículas do asfalto, já que estes elementos estão presentes em queima de combustível e no produto de fricção dos pneus no solo.

Nossos achados quanto ao estudo dos linfonodos, mostraram uma predileção clara para deposição de um grupo de elementos composto de Na, Mg, Si, K, Ti e Fe. Entretanto, a análise discriminante não mostrou diferenças entre linfonodos de SP e SJRP, devido à grande variedade de elementos encontrada nesta região, que acaba sendo o porto final de deposição dos elementos após a depuração pulmonar. Assim, os linfonodos não se mostraram adequados para discriminar o tipo de exposição à poluição, de acordo com relato anterior por Rogero et al. [41], onde não

houve diferença significativa da concentração da maioria dos elementos quando linfonodos e amostras pulmonares foram comparadas.

Desta forma, o conhecimento do padrão de distribuição das partículas na árvore traqueobrônquica quanto a sua composição elementar é importante, pois pode ser aplicado para o estudo de doenças respiratórias causadas por exposição a poluição do ar e doenças ocupacionais, onde haverá maior presença de determinado elemento que pode estar relacionado a patogenia da lesão estabelecida.

Assim sendo, devem ser realizados estudos futuros para o melhor entendimento do papel das partículas e sua distribuição na árvore brônquica quanto ao perfil elementar, sendo possível estabelecer políticas de saúde pública a fim de controlar os níveis atmosféricos destes elementos e desta forma atuar na prevenção de doenças respiratórias e cardiovasculares causadas pela poluição do ar.

7 Conclusão

A composição elementar das partículas retidas varia em diferentes regiões do pulmão com tendência a retenção preferencial em região peribronquiolar ou linfonodos

A região peribrônquica foi o principal local para se discriminar o tipo de exposição à poluição do indivíduo, caracterizando a antracose como o “carimbo” da história passada de exposição elementar do indivíduo.

A CML provou ser uma ferramenta útil em discriminar áreas de interesse para estudo, com resultados semelhantes ao estudo em cortes de parafina, apresentando maior representatividade do tecido pulmonar.

8 Anexos

Anexo 1**Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa** **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23.02.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **051/06**, intitulado: "Estudo comparativo da composição das partículas ambientais depositadas e retidas nos pulmões e linfonodos hilares pulmonares." apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Dra. Fabiola Del Carlo Bernardi**

Pesquisador(a) Executante: **Dr. Mauro Tadeu Ajaj Saieg**

CAPPesq, 23 de Fevereiro de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Anexo 2**Entrevista com o parente mais próximo e explicação do estudo para a entrada do caso no protocolo de estudo do projeto** **FACULDADE DE MEDICINA****Da Universidade de São Paulo****CONSETIMENTO INFORMADO**

Para entrevista estruturada

A poluição é presença marcante hoje em dia na nossa vida. De alguma forma, conhecemos o mal que a inalação diária de gases poluentes presentes em nossa atmosfera nos causa, principalmente no sistema respiratório, onde sintomas como irritação do nariz e garganta, tosse e falta de ar estão sempre relacionados com o mal-estar do dia-a-dia no trânsito, no trabalho e até em casa.

Pouco, porém, se sabe sobre quais componentes dessa poluição geram as principais lesões pulmonares, e quais os níveis mais seguros desses poluentes.

Nosso estudo tem como objetivo, determinar quais agentes do ar levam às principais lesões pulmonares e assim determinar novos níveis de segurança para melhora do bem-estar geral.

Para isto, pedimos sua colaboração para realização do estudo através de uma entrevista que dura cerca de vinte minutos. Na entrevista, serão feitas perguntas sobre a história do seu familiar, o uso dos remédios e algumas questões sobre sua vida pessoal e seus hábitos relacionados à exposição a estes poluentes. Também pedimos sua colaboração para que

seja autorizada a análise de dois fragmentos de pulmão e outro de linfonodo hilar pulmonar de seu familiar.

É importante que você saiba que as informações obtidas nesta entrevista do seu familiar aparecerão na pesquisa apenas como um número, e o seu nome e o de seu familiar não aparecerão de nenhum modo, em qualquer apresentação pública e nem nenhum tipo de publicação.

Questionário

Dados Pessoais

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: _____ Data de nascimento: _____ Raça : _____

Cidade de nascimento: _____ Estado: _____

Quanto tempo morou no local de nascimento? _____

Mora em São Paulo há quantos anos? _____

Endereço: _____

Telefone Residencial: _____

Qual (is) bairro (s)? _____

Dados Ocupacionais

Ocupação:

Endereço da firma onde trabalhava; _____

Lista de empregos anteriores e tempo de permanência:

Antecedentes Pessoais:

Fumava? _____ por quanto tempo, quantos cigarros por dia?

Ex Fumante? _____ Havia parado há quantos anos? _____

Já teve exposição a metais pesados? _____

Quais? _____

Possuía alguma doença cardiorrespiratória? _____

Neoplasia? _____

Se sim, qual (is)? _____

Já foi internado? _____

Se sim, quantas vezes e por quais razões?

Fazia uso regular de alguma medicação? _____

Se sim, qual (is)? _____

“Eu concordo que fragmentos de tecidos pulmonar e linfonodos possam ser utilizados para pesquisa “Estudo comparativo da composição das partículas ambientais depositadas e retidas nos pulmões e linfonodos hilares pulmonares”, em que eu poderei contribuir para o desenvolvimento de estratégias de controle de emissão de material particulado, visando a preservação da saúde pública.

Se você tiver dúvidas sobre esta pesquisa ou sobre sua participação, sinta-se à vontade para perguntar agora ou ao coordenador da pesquisa:

Seu nome é: Prof^a. Dra. Fabíola Del Carlo Bernardi ou Dr. Mauro Ajaj Saieg

Seu telefone: (011) 7177-0915.

Caso você queira participar e se está de acordo com estes termos, por favor, pedimos que consentisse assinando este termo.

Data: ____/____/____

Ass : _____

Os responsáveis pela pesquisa assinam o seguinte termo de compromisso com você.

Termo de Compromisso

O coordenador da pesquisa e os pesquisadores do Mistério da Saúde comprometem-se a conduzir todas as atividades desta pesquisa, de acordo com os termos do presente Consentimento Informado.

Data: ____/____/____

Ass : _____

9 Referências

1. Lippmann M, Yeates DB, Albert RE: Deposition, retention, and clearance of inhaled particles. *Br J Ind Med* 1980, 37(4):337-362.
2. Churg A, Brauer M: Ambient atmospheric particles in the airways of human lungs. *Ultrastruct Pathol* 2000, 24(6):353-361.
3. Churg A, Brauer M: Human lung parenchyma retains PM2.5. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, 155(6):2109-2111.
4. Mossman BT, Borm PJ, Castranova V, Costa DL, Donaldson K, Kleeberger SR: Mechanisms of action of inhaled fibers, particles and nanoparticles in lung and cardiovascular diseases. *Part Fibre Toxicol* 2007, 4:4.
5. Pope CA, 3rd, 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):71-77.
6. Glantz SA: Air pollution as a cause of heart disease. Time for action. *J Am Coll Cardiol* 2002, 39(6):943-945.
7. Pope CA, 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD: Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002, 287(9):1132-1141.
8. Abbey DE, Nishino N, McDonnell WF, Burchette RJ, Knutsen SF, Lawrence Beeson W, Yang JX: Long-term inhalable particles and other air pollutants related to mortality in nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999, 159(2):373-382.

9. Goldberg MS, Burnett RT, Bailer JC, 3rd, Brook J, Bonvalot Y, Tamblyn R, Singh R, Valois MF: The association between daily mortality and ambient air particle pollution in Montreal, Quebec. 1. Nonaccidental mortality. *Environ Res* 2001, 86(1):12-25.
10. Gotschi T, Heinrich J, Sunyer J, Kunzli N: Long-term effects of ambient air pollution on lung function: a review. *Epidemiology* 2008, 19(5):690-701.
11. Pope CA, 3rd: Respiratory disease associated with community air pollution and a steel mill, Utah Valley. *Am J Public Health* 1989, 79(5):623-628.
12. Dockery DW, Pope CA, 3rd: Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu Rev Public Health* 1994, 15:107-132.
13. Kampa M, Castanas E: Human health effects of air pollution. *Environ Pollut* 2008, 151(2):362-367.
14. Auchincloss AH, Roux AV, Dvorchak JT, Brown PL, Barr RG, Davignus ML, Goff DC, Kaufman JD, O'Neill MS: Associations between recent exposure to ambient fine particulate matter and blood pressure in the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Environ Health Perspect* 2008, 116(4):486-491.
15. Saldiva PH, Pope CA, 3rd, Schwartz J, Dockery DW, Lichtenfels AJ, Salge JM, Barone I, Bohm GM: Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. *Arch Environ Health* 1995, 50(2):159-163.
16. Saldiva PH, Lichtenfels AJ, Paiva PS, Barone IA, Martins MA, Massad E, Pereira JC, Xavier VP, Singer JM, Bohm GM: Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in Sao Paulo, Brazil: a preliminary report. *Environ Res* 1994, 65(2):218-225.

17. Pereira Filho MA, Pereira LA, Arbex FF, Arbex M, Conceicao GM, Santos UP, Lopes AC, Saldiva PH, Braga AL, Cendon S: Effect of air pollution on diabetes and cardiovascular diseases in Sao Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2008, 41(6):526-532.
18. Nascimento LF, Pereira LA, Braga AL, Modolo MC, Carvalho JA, Jr.: [Effects of air pollution on children's health in a city in Southeastern Brazil]. *Rev Saude Publica* 2006, 40(1):77-82.
19. Farhat SC, Paulo RL, Shimoda TM, Conceicao GM, Lin CA, Braga AL, Warth MP, Saldiva PH: Effect of air pollution on pediatric respiratory emergency room visits and hospital admissions. *Braz J Med Biol Res* 2005, 38(2):227-235.
20. Goncalves FL, Carvalho LM, Conde FC, Latorre MR, Saldiva PH, Braga AL: The effects of air pollution and meteorological parameters on respiratory morbidity during the summer in Sao Paulo City. *Environ Int* 2005, 31(3):343-349.
21. Braga AL, Saldiva PH, Pereira LA, Menezes JJ, Conceicao GM, Lin CA, Zanobetti A, Schwartz J, Dockery DW: Health effects of air pollution exposure on children and adolescents in Sao Paulo, Brazil. *Pediatr Pulmonol* 2001, 31(2):106-113.
22. Rivero DH, Soares SR, Lorenzi-Filho G, Saiki M, Godleski JJ, Antonangelo L, Dolhnikoff M, Saldiva PH: Acute cardiopulmonary alterations induced by fine particulate matter of Sao Paulo, Brazil. *Toxicol Sci* 2005, 85(2):898-905.
23. Cancado JE, Braga A, Pereira LA, Arbex MA, Saldiva PH, Santos Ude P: [Clinical repercussions of exposure to atmospheric pollution]. *J Bras Pneumol* 2006, 32 Suppl 2:S5-11.

24. Cancado JE, Saldiva PH, Pereira LA, Lara LB, Artaxo P, Martinelli LA, Arbex MA, Zanobetti A, Braga AL: The impact of sugar cane-burning emissions on the respiratory system of children and the elderly. *Environ Health Perspect* 2006, 114(5):725-729.
25. Mazzoli-Rocha F, Magalhaes CB, Malm O, Saldiva PH, Zin WA, Faffe DS: Comparative respiratory toxicity of particles produced by traffic and sugar cane burning. *Environ Res* 2008, 108(1):35-41.
26. Ribeiro H: [Sugar cane burning in Brazil: respiratory health effects]. *Rev Saude Publica* 2008, 42(2):370-376.
27. Capasso L, Kissler W, Morgenroth K, Scherbeck W: [Archaeological documentation of the atmospheric pollution in antiquity] Electron microscopic investigations on dust penetration into the pulmonary interstitium in experimental pneumoconioses. *Med Secoli* 1995, 7(3):435-444.
28. Fornaciari G: Renaissance mummies in Italy. *Med Secoli* 1999, 11(1):85-105.
29. Grailles M, Collet A: [Composition and outcome of early dust deposits in the bronchiolo-alveolar area]. *Bronches* 1965, 15(5):441-448.
30. Souza MB, Saldiva PH, Pope CA, 3rd, Capelozzi VL: Respiratory changes due to long-term exposure to urban levels of air pollution: a histopathologic study in humans. *Chest* 1998, 113(5):1312-1318.
31. Pinkerton KE, Green FH, Saiki C, Vallyathan V, Plopper CG, Gopal V, Hung D, Bahne EB, Lin SS, Menache MG *et al*: Distribution of particulate matter and tissue remodeling in the human lung. *Environ Health Perspect* 2000, 108(11):1063-1069.

32. Churg A, Brauer M, del Carmen Avila-Casado M, Fortoul TI, Wright JL: Chronic exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling. *Environ Health Perspect* 2003, 111(5):714-718.
33. Brauer M, Avila-Casado C, Fortoul TI, Vedal S, Stevens B, Churg A: Air pollution and retained particles in the lung. *Environ Health Perspect* 2001, 109(10):1039-1043.
34. Asgharian B, Price OT: Airflow distribution in the human lung and its influence on particle deposition. *Inhal Toxicol* 2006, 18(10):795-801.
35. Gher P JH: Particle-Lung Interactions, vol. 143. New York: Basel; 2000.
36. Weibel E: Morphometry of the Human Lung. New York: Academic Press; 1963.
37. Raabe O: Tracheobronchial Geometry: Human, Dog, Hamster. Albuquerque: Lovelace Foundation; 1976.
38. Horsfield K, Dart G, Olson DE, Filley GF, Cumming G: Models of the human bronchial tree. *J Appl Physiol* 1971, 31(2):207-217.
39. Svartengren M, Falk R, Philipson K: Long-term clearance from small airways decreases with age. *Eur Respir J* 2005, 26(4):609-615.
40. Scheuch G, Kohlhauf M, Moller W, Brand P, Meyer T, Haussinger K, Sommerer K, Heyder J: Particle clearance from the airways of subjects with bronchial hyperresponsiveness and with chronic obstructive pulmonary disease. *Exp Lung Res* 2008, 34(9):531-549.
41. Rogero SO, Saiki M, Saldiva PH, Daliberto ML: Determination of trace elements in human lung samples. *Biol Trace Elem Res* 1994, 43-45:489-496.

42. Bartsch P, Collignon A, Weber G, Robaye G, Delbrouck JM, Roelandts I, Yujie J: Distribution of metals in human lung: analysis by particle induced x-ray emission. *Arch Environ Health* 1982, 37(2):111-117.
43. Moller W, Felten K, Sommerer K, Scheuch G, Meyer G, Meyer P, Haussinger K, Kreyling WG: Deposition, retention, and translocation of ultrafine particles from the central airways and lung periphery. *Am J Respir Crit Care Med* 2008, 177(4):426-432.
44. Ovrevik J, Myran T, Refsnes M, Lag M, Becher R, Hetland RB, Schwarze PE: Mineral particles of varying composition induce differential chemokine release from epithelial lung cells: importance of physico-chemical characteristics. *Ann Occup Hyg* 2005, 49(3):219-231.
45. Ovrevik J, Schwarze PE: Chemical composition and not only total surface area is important for the effects of ultrafine particles. *Mutat Res* 2006, 594(1-2):201-202; author reply 199-200.
46. Seagrave J, McDonald JD, Bedrick E, Edgerton ES, Gigliotti AP, Jansen JJ, Ke L, Naeher LP, Seilkop SK, Zheng M *et al*: Lung toxicity of ambient particulate matter from southeastern U.S. sites with different contributing sources: relationships between composition and effects. *Environ Health Perspect* 2006, 114(9):1387-1393.
47. Osornio-Vargas AR, Bonner JC, Alfaro-Moreno E, Martinez L, Garcia-Cuellar C, Ponce-de-Leon Rosales S, Miranda J, Rosas I: Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter in vitro are dependent on particle size and composition. *Environ Health Perspect* 2003, 111(10):1289-1293.
48. Schwarze PE, Ovrevik J, Lag M, Refsnes M, Nafstad P, Hetland RB, Dybing E: Particulate matter properties and health effects: consistency of epidemiological and toxicological studies. *Hum Exp Toxicol* 2006, 25(10):559-579.

49. Valavanidis A, Fiotakis K, Vlachogianni T: Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2008, 26(4):339-362.
50. Donaldson K, Brown DM, Mitchell C, Dineva M, Beswick PH, Gilmour P, MacNee W: Free radical activity of PM10: iron-mediated generation of hydroxyl radicals. *Environ Health Perspect* 1997, 105 Suppl 5:1285-1289.
51. MacNee W, Donaldson K: Mechanism of lung injury caused by PM10 and ultrafine particles with special reference to COPD. *Eur Respir J Suppl* 2003, 40:47s-51s.
52. Risom L, Moller P, Loft S: Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res* 2005, 592(1-2):119-137.
53. Bonner JC: Lung fibrotic responses to particle exposure. *Toxicol Pathol* 2007, 35(1):148-153.
54. Singh R, Sram RJ, Binkova B, Kalina I, Popov TA, Georgieva T, Garte S, Taioli E, Farmer PB: The relationship between biomarkers of oxidative DNA damage, polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts, antioxidant status and genetic susceptibility following exposure to environmental air pollution in humans. *Mutat Res* 2007, 620(1-2):83-92.
55. Dai J, Gilks B, Price K, Churg A: Mineral dusts directly induce epithelial and interstitial fibrogenic mediators and matrix components in the airway wall. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 158(6):1907-1913.
56. Singh R, Kaur B, Kalina I, Popov TA, Georgieva T, Garte S, Binkova B, Sram RJ, Taioli E, Farmer PB: Effects of environmental air pollution on endogenous oxidative DNA damage in humans. *Mutat Res* 2007, 620(1-2):71-82.

57. Binkova B, Chvatalova I, Lnenickova Z, Milcova A, Tulupova E, Farmer PB, Sram RJ: PAH-DNA adducts in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair gene polymorphisms. *Mutat Res* 2007, 620(1-2):49-61.
58. Santella RM, Gammon M, Terry M, Senie R, Shen J, Kennedy D, Agrawal M, Faraglia B, Zhang F: DNA adducts, DNA repair genotype/phenotype and cancer risk. *Mutat Res* 2005, 592(1-2):29-35.
59. van Gijssel HE, Schild LJ, Watt DL, Roth MJ, Wang GQ, Dawsey SM, Albert PS, Qiao YL, Taylor PR, Dong ZW *et al*: Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts determined by semiquantitative immunohistochemistry in human esophageal biopsies taken in 1985. *Mutat Res* 2004, 547(1-2):55-62.
60. Knaapen AM, Borm PJ, Albrecht C, Schins RP: Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int J Cancer* 2004, 109(6):799-809.
61. Ingram JL, Rice AB, Santos J, Van Houten B, Bonner JC: Vanadium-induced HB-EGF expression in human lung fibroblasts is oxidant dependent and requires MAP kinases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003, 284(5):L774-782.
62. Tal TL, Graves LM, Silbajoris R, Bromberg PA, Wu W, Samet JM: Inhibition of protein tyrosine phosphatase activity mediates epidermal growth factor receptor signaling in human airway epithelial cells exposed to Zn²⁺. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006, 214(1):16-23.
63. Godleski JJ RWC, Brent A.Coull, Paulo H.N.Saldiva, Nan-Fei Jiang, Joy Lawrence, Petros Koutrakis: Composition of Inhaled Urban Air Particles Determines Acute Pulmonary Responses. *Ann Occup Hyg* 2002, 46(supplement 1):419-424.

-
64. Morishita M, Keeler G, Wagner J, Marsik F, Timm E, Dvonch J, Harkema J: Pulmonary retention of particulate matter is associated with airway inflammation in allergic rats exposed to air pollution in urban Detroit. *Inhal Toxicol* 2004, 16(10):663-674.
 65. Aust AE, Ball JC, Hu AA, Lighty JS, Smith KR, Straccia AM, Veranth JM, Young WC: Particle characteristics responsible for effects on human lung epithelial cells. *Res Rep Health Eff Inst* 2002(110):1-65; discussion 67-76.
 66. Donaldson K, Stone V: Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann Ist Super Sanita* 2003, 39(3):405-410.
 67. Molinelli AR, Madden MC, McGee JK, Stonehuerner JG, Ghio AJ: Effect of metal removal on the toxicity of airborne particulate matter from the Utah Valley. *Inhal Toxicol* 2002, 14(10):1069-1086.
 68. Schaumann F, Borm PJ, Herbrich A, Knoch J, Pitz M, Schins RP, Luettig B, Hohlfeld JM, Heinrich J, Krug N: Metal-rich ambient particles (particulate matter 2.5) cause airway inflammation in healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 170(8):898-903.
 69. Gross P, Westrick ML, McNerney JM: Silicosis: the topographic relationship of mineral deposits to histologic structures. *Am J Pathol* 1956, 32(4):739-775.
 70. Gross P, Smith KW: The topographic distribution of mineral dusts in some pneumoconiotic lungs. *Dis Chest* 1959, 35(2):140-154.
 71. Robertson AJ: The electron probe microanalyser and its applications in medicine. *Phys Med Biol* 1968, 13(4):505-522.

72. Berry JP, Henoc P, Galle P, Pariente R: Pulmonary mineral dust. A study of ninety patients by electron microscopy, electron microanalysis, and electron microdiffraction. *Am J Pathol* 1976, 83(3):427-456.
73. Funahashi A, Siegesmund KA, Dragen RF, Pintar K: Energy dispersive x-ray analysis in the study of pneumoconiosis. *Br J Ind Med* 1977, 34(2):95-101.
74. Funahashi A, Pintar K, Siegesmund KA: Identification of foreign material in lung by energy dispersive x-ray analysis. A new approach to silicosis. *Arch Environ Health* 1975, 30(6):285-289.
75. Ohshima S: Studies on pulmonary anthracosis. With special reference to the mineral constitution of intrapulmonary particulate pollutants in the human lung. *Acta Pathol Jpn* 1990, 40(1):41-49.
76. Siegesmund KA, Funahashi A, Pintar K, Dragen R, Schlueter DP: Elemental content in alveolar septa in various pneumoconioses. *Scan Electron Microsc* 1980(Pt 2):485-491.
77. Siegesmund KA, Funahashi A, Yorde DE: Morphometric and elemental microanalytical studies of human lung in health and disease. *Br J Ind Med* 1985, 42(1):36-42.
78. Brody: Distribution and elemental analysis of inorganic particulates in pulmonary tissue. *Scanning Electron Microsc* 1976, 1:477-482.
79. Abraham JL: Documentation of environmental particulate exposures in humans using SEM and EDXA. *Scan Electron Microsc* 1979(2):751-766.
80. Abraham JL: Diagnostic applications of scanning electron microscopy and microanalysis in pathology. *Isr J Med Sci* 1979, 15(8):716-723.

81. Hayashi H: Analytical electron microscopy in the study of pneumoconiosis. *Environ Res* 1980, 23(2):410-421.
82. Tsuchiyama F, Hisanaga N, Shibata E, Aoki T, Takagi H, Ando T, Takeuchi Y: Pulmonary metal distribution in urban dwellers. *Int Arch Occup Environ Health* 1997, 70(2):77-84.
83. Garcia F, Ortega A, Domingo JL, Corbella J: Accumulation of metals in autopsy tissues of subjects living in Tarragona County, Spain. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 2001, 36(9):1767-1786.
84. Takemoto K, Kawai H, Kuwahara T, Nishina M, Adachi S: Metal concentrations in human lung tissue, with special reference to age, sex, cause of death, emphysema and contamination of lung tissue. *Int Arch Occup Environ Health* 1991, 62(8):579-586.
85. Johnson NF, Haslam PL, Dewar A, Newman-Taylor AJ, Turner-Warwick M: Identification of inorganic dust particles in bronchoalveolar lavage macrophages by energy dispersive x-ray microanalysis. *Arch Environ Health* 1986, 41(3):133-144.
86. Ferrer J, Orriols R, Tura JM, Lirola J, Xaus C, Vidal X: Energy-dispersive X-ray analysis and scanning electron microscopy of pleura. Study of reference, exposed non-pneumoconiotic, and silicotic populations. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, 149(4 Pt 1):888-892.
87. Shimizu Y, Dobashi K, Kusakbe T, Nagamine T, Oikawa M, Satoh T, Haga J, Ishii Y, Ohkubo T, Kamiya T *et al*: In-air micro-particle induced X-ray emission analysis of asbestos and metals in lung tissue. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2008, 21(3):567-576.
88. Drake EN, 2nd, Sky-Peck HH: Discriminant analysis of trace element distribution in normal and malignant human tissues. *Cancer Res* 1989, 49(15):4210-4215.

89. De Palma G, Goldoni M, Catalani S, Carbognani P, Poli D, Mozzoni P, Acampa O, Internullo E, Rusca M, Apostoli P: Metallic elements in pulmonary biopsies from lung cancer and control subjects. *Acta Biomed* 2008, 79 Suppl 1:43-51.
90. Catalani S, De Palma G, Mangili A, Apostoli P: Metallic elements in lung tissues: results of a meta-analysis. *Acta Biomed* 2008, 79 Suppl 1:52-63.
91. Simone NL, Bonner RF, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Liotta LA: Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trends Genet* 1998, 14(7):272-276.
92. Murray GI: An overview of laser microdissection technologies. *Acta Histochem* 2007, 109(3):171-176.
93. Chinge NO, Ruddle F, Bayarsaihan D: Laser-assisted microdissection (LAM) in developmental biology. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2007, 308(2):113-118.
94. Bonner RF, Emmert-Buck M, Cole K, Pohida T, Chuaqui R, Goldstein S, Liotta LA: Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science* 1997, 278(5342):1481,1483.
95. Eltoum IA, Siegal GP, Frost AR: Microdissection of histologic sections: past, present, and future. *Adv Anat Pathol* 2002, 9(5):316-322.
96. Cuadrado E, Rosell A, Alvarez-Sabin J, Montaner J: [Laser capture microdissection: a new tool for the study of cerebral ischemia]. *Rev Neurol* 2007, 44(9):551-555.
97. Roberts E, Charboneau L, Espina V, Liotta L, Petricoin E, Dreher K: Application of laser capture microdissection and protein microarray technologies in the molecular analysis of airway injury following pollution particle exposure. *J Toxicol Environ Health A* 2004, 67(11):851-861.

-
98. Liu G, Huang W, Moir RD, Vanderburg CR, Lai B, Peng Z, Tanzi RE, Rogers JT, Huang X: Metal exposure and Alzheimer's pathogenesis. *J Struct Biol* 2006, 155(1):45-51.
 99. CETESB: Relatório da Qualidade do Ar no Estado de São Paulo 2006. In. São Paulo; 2007.
 100. CETESB: Material Particulado inalável fino (MP2,5) e grosso (MP10) na atmosfera da região metropolitana de São Paulo (2000-2006). 2008.
 101. F.N.Filho V: Técnicas Analíticas Nucleares de Fluorescência de Raios X por dispersão de Energia (ED-XFR) e por reflexão total (TXRF). São Paulo: São Paulo; 1999.
 102. Dawson-Saunders B: Basic & Clinical Statistics. New Jersey: Prentice Hall; 1994.
 103. Monso E, Tura JM, Pujadas J, Morell F, Ruiz J, Morera J: Lung dust content in idiopathic pulmonary fibrosis: a study with scanning electron microscopy and energy dispersive x ray analysis. *Br J Ind Med* 1991, 48(5):327-331.
 104. Scheuch G, Stahlhofen W, Heyder J: An approach to deposition and clearance measurements in human airways. *J Aerosol Med* 1996, 9(1):35-41.
 105. Gher P SS, Y.Berthiaume, V.Im Hof, M.Geiser: Particle retention in airways by surfactant. *J Aerosol Med* 1990, 3:27-43.
 106. Gehr P, Green FH, Geiser M, Im Hof V, Lee MM, Schurch S: Airway surfactant, a primary defense barrier: mechanical and immunological aspects. *J Aerosol Med* 1996, 9(2):163-181.

-
107. Socko R, Kupczewska-Dobecka M: [Is dichloromethane an occupational carcinogen?]. *Med Pr* 2007, 58(2):143-153.
 108. Pignatello JJ, Cohen SZ: Environmental chemistry of ethylene dibromide in soil and ground water. *Rev Environ Contam Toxicol* 1990, 112:1-47.
 109. Governo do Estado de São Paulo (2007). Sítio da Secretaria de planejamento. Disponível em: <http://www.planejamento.sp.gov.br> [acessado em 16 de Setembro de 2009].