Paulo Augusto Amador Pereira

**Estudo das alterações no sistema reprodutor de
camundongos expostos a contaminação ambiental**

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

Área de concentração: Patologia
Orientador: Prof. Dr. Chin An Lin

São Paulo
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pereira, Paulo Augusto Amador

Estudo das alterações no sistema reprodutor de camundongos expostos a
contaminação ambiental / Paulo Augusto Amador Pereira. -- São Paulo, 2008.

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

Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientador: Chin An Lin.

Descritores: 1.Poluição ambiental/efeitos adversos 2.Reprodução 3.Metais pesados
4.Poluentes orgânicos 5.Camundongos 6.Testículo 7.Razão de masculinidade

USP/FM/SBD-163/08

Dedicatória
Ao meu Pai e a minha Mãe

Agradeço à:

Prof. Dr. Paulo Saldiva: Pela oportunidade dada, pelo exemplo e por ter sugerido o tema do trabalho.

Prof. Dr. Chin An Lin: Pela paciência, boa vontade e orientação.

Prof. Olaf Malm: Pela análise de hidrocarbonetos na água.

Prof. Luis Paulo Geraldo: Pela análise de metais na água.

Luiz, meu irmão: Sempre disposto a ajudar e a dar incentivo nas horas de desânimo.

Ao Colega Alfésio Braga pelas sugestões, boa vontade e colaboração na análise dos dados.

À colega Lourdes Martins pela ajuda na análise de dados.

Ana Júlia Lichtenfels: Participou ativamente de toda a fase de trabalho com os animais. Sua colaboração foi vital, seus conselhos imprescindíveis.

A todos os colegas do Laboratório de Poluição da FMUSP.

Ao Instituto Florestal por ter permitido minha entrada no Parque Estadual e colaborado em tudo o que precisei.

Aos motoristas da FMUSP que, semanalmente, me levavam ao Parque Estadual da Serra do Mar

“Uma pessoa inteligente resolve um problema, um sábio o previne”
Albert Einstein

Esta tese obedece:

As recomendações do Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, segundo o Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias, elaborado por Cunha AC, Freddi MJAL, Crestana MF, Aragão MS, Cardoso SC, Vilhena V. São Paulo. Serviço de Biblioteca e Documentação, 2004.

As normas de referências bibliográficas adaptadas do *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Abreviaturas dos títulos dos periódicos da *List of Journals Indexed in the Index Medicus*.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Poluição Ambiental.....	2
1.2 Poluição do solo e da água	2
1.3 Produtos Químicos Orgânicos	3
1.4 Metais pesados	11
1.5 Efeitos dos poluentes no Sistema Reprodutor	17
1.6 Áreas Contaminadas.....	21
1.7 Poluição ambiental em Cubatão	22
1.8 Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental.....	25
2. OBJETIVOS.....	26
3. METODOS.....	28
3.1 Grupos	29
3.2 Coleta da Água	30
3.3 Formação de Casais	31
3.4 Sacrifício dos animais	32
3.5 Parâmetros analisados.....	32
3.6 Análise da Água	33
3.7 Análise Estatística	37
3.8 Ética	38

4. RESULTADOS.....	39
4.1 Análise da Presença de Metais na Água.....	40
4.2 Análise da Presença de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)	42
4.3 Peso das Gônadas.....	43
4.4 Espermograma.....	44
4.5 Taxa de gravidez.....	48
4.6 Proporção de machos na prole (Sex ratio).....	49
4.7 Histologia	50
 5. DISCUSSÃO	 51
6. CONCLUSÃO	64
7. REFERÊNCIAS	66
Apêndice	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
BFA	Bisfenol A
BMF	Fator de Biomagnificação
CAPPesq	Comissão de Análise para Projetos de Pesquisa
CETESB	Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental
CLAE	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
COBEA	Código Brasileiro de Experimentação Animal
CONASQ	Comissão Nacional de Segurança Química
DES	Dietilestilbestrol
DDE	Dicloro-difenil-dicloroetileno
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EPA	Environmental Protection Agency
HCB	Hexaclorobenzeno
HCBD	Hexaclorobutadieno
HCH	Heptaclor
HE	Hematoxilina/Eosina
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
LP AE	Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental
MCL	Maximun Contaminant Level
PAS	Ácido Periódico de Shiff
PCB	Bifenil Policlorado
POP	Poluente Orgânico Persistente
RNA	Ácido Ribonucléico

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	grau Celsius
cm	centímetro
g	grama
Hg	Mercúrio
Kg	Kilograma
L	Litro
MeHg	Metilmercúrio
µg	Micrograma
mg	Miligrama
ml	Mililitro
n	número

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Entrada do Parque Estadual da Serra do Mar.	24
Figura 2. Aterro de Lixo Químico (Pilões).	24
Figura 3. Médias das concentrações de espermatozóides.	46
Figura 4. Médias da concentração de espermatozóides móveis.....	46
Figura 5. Médias da concentração de espermatozóides imóveis.....	47
Figura 6. Médias do percentual de espermatozóides móveis sobre o total.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	42
Tabela 2. Análise descritiva do peso dos testículos	43
Tabela 3. Análise descritiva dos parâmetros do espermograma	45
Tabela 4. Taxa de gravidez	48
Tabela 5. Proporção de machos na prole.....	49
Tabela 6. Análise descritiva do número de células de Sertoli	50

RESUMO

Pereira PAA. *Estudo das alterações no sistema reprodutor de camundongos expostos à contaminação ambiental* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 73p.

O Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo desenvolve várias linhas de pesquisa sobre os efeitos da poluição nos organismos vivos. O objetivo deste trabalho foi estudar as alterações no sistema reprodutor de camundongos balb-c machos expostos a água de manancial localizado próximo a depósito de resíduos químicos. Oitenta camundongos balb-c foram divididos em quatro grupos: Grupo A (controle) recebeu água mineral, grupo B recebeu água de nascente na região do depósito, grupo C recebeu água de cidade abastecida por água originada na região do depósito e grupo D recebeu água de rio que passa ao lado do depósito. A exposição foi do desmame até a idade adulta. Ao atingir a idade reprodutiva eles foram acasalados e posteriormente sacrificados. Os parâmetros avaliados foram: peso das gônadas, espermograma, taxa de gravidez, proporção de machos na prole e contagem de células de Sertoli. A análise da água do grupo A e C não mostrou presença de poluentes, a do grupo B mostrou presença de cádmio nas concentrações de $3,58 \pm 0,50$ microgramas/L e de $2,92 \pm 0,10$ microgramas/L, a do grupo D mostrou a presença de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, de chumbo nas concentrações de 113 ± 11 microgramas/L e de 221 ± 16 microgramas/L, cádmio nas concentrações de $11,33 \pm 0,50$ microgramas/L, $12,6 \pm 1,2$ microgramas/L e $3,78 \pm 0,35$ microgramas/L e de mercúrio nas concentrações de $4,58 \pm 0,92$ microgramas/L e $5,3 \pm 1,1$ microgramas/L. Foram utilizados os testes de Levene e Kolmogorov-Smirnov para se verificar a homogeneidade das variâncias e a aderência a curva normal, respectivamente. Para as variáveis que apresentaram esses dois princípios satisfeitos foram utilizados testes paramétricos (ANOVA- análise de variância), caso contrario foram utilizados testes não paramétricos (Teste de Kruskal-Wallis). Quando diferenças foram observadas foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Tukey (KLEIBAUM). Os resultados mostraram que houve redução significativa da proporção de machos na prole dos animais do grupo B e uma redução marginalmente significativa nos animais do grupo D. Os outros parâmetros avaliados não mostraram diferenças entre os grupos. A alteração verificada na proporção de machos do grupo B não pode ser explicada pela presença de cádmio na água, pois o grupo D foi exposto a doses muito maiores e não apresentou a mesma alteração. No presente trabalho não identificamos diferenças que permitam afirmar que a exposição à água da região do depósito de lixo químico cause alterações no sistema reprodutivo de camundongos.

Descritores: 1.Poluição ambiental/efeitos adversos 2.Reprodução 3.Metais pesados 4.Poluentes orgânicos 5.Camundongos 6.Testículos 7.Razão de Masculinidade

SUMMARY

Pereira PAA. *Study of the Alterations in Reproductive System of Mice Exposed to Environmental Contamination* [thesis]. Sao Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 73p.

The Atmospheric Pollution Laboratory of The Sao Paulo University Medical College develops research on the effects of environmental pollution in health. This study investigated the effects on the reproductive system of balb-c mice exposed to water from a river near a deactivated waste depositary. Eighty male mice were separated in four groups: Group A (mineral water); Group B (water from the water treatment station); Group C (water from Cubatao city); Group D (water from the waste depositary region). They were exposed to water since they were weaned until they reached sexual maturity. They were coupled with females in reproductive age and after this mating time they were sacrificed. The evaluated parameters had been testicle weight, sperm analysis, pregnancy rate, sex ratio of the offspring and Sertoli cell count. The analysis of the water did not show presence of pollutants in the group "a" and group "c" water. Group "b" showed low levels of cadmium, $3,58 \pm 0,50 \mu\text{g/L}$ and $2,92 \pm 0,10 \mu\text{g/L}$. Group "d" showed the presence of PAH's and high levels of lead ($113 \pm 11 \mu\text{g/L}$ and $221 \pm 16 \mu\text{g/L}$), cadmium ($11,33 \pm 0,50 \mu\text{g/L}$ and $12,6 \pm 1,2 \mu\text{g/L}$) and mercury ($4,58 \pm 0,92 \mu\text{g/L}$ and $5,3 \pm 1,1 \mu\text{g/L}$). The tests of Levene and Kolmogorov-Smirnov had been used to verify the homogeneity of the variances and the tack to the normal curve, respectively. The parametric tests used ANOVA and the non parametric tests used Kruskal-Wallis test and the test of multiple comparisons of Tukey (Kleibaun). Results: There were no differences between groups in testicle weight, sperm analysis, pregnancy rate and Sertoli cell count. There was a significant reduction in sex-ratio of the offspring in group b. This alteration cannot be explained by the cadmium levels in group b water. In the present work we cannot associate the exposition to water from the waste depositary and reproductive alterations

Descriptors: 1.Pollution 2.Reproduction 3.Metals 4.Organic pollutants
5.Mice 6. Testicle 7.Sex-ratio

1. INTRODUÇÃO

1.1 Poluição Ambiental

Poluição pode ser considerada a liberação de elementos, radiações, vibrações, ruídos e substâncias ou elementos contaminantes em um ambiente prejudicando os ecossistemas ou os seres humanos. Ao longo da história, a poluição do meio ambiente tem sido um fator que acompanhou o progresso da civilização. A contaminação do meio ambiente é associada à capacidade do ser humano em alterar o ambiente que o cerca para a extração de recursos para o seu proveito. A extração e o processamento de recursos naturais provocam invariavelmente modificações no meio ambiente e as conseqüências mais deletérias são as contaminações do solo, água e ar. A poluição está associada com o aumento da incidência de doenças crônicas e congênitas (Genuis, 2006)

1.2 Poluição do solo e da água

A conseqüência mais negativa do desenvolvimento industrial e da agricultura em larga escala no mundo é a produção de resíduos cujo manuseio e destino se tornou um grande problema uma vez que são

potencialmente deletérios à saúde humana e aos organismos vivos (Asmus, 2008). Os Estados Unidos produzem 40 milhões de toneladas de lixo tóxico por ano (Asmus, 2008) devido a sua intensa atividade industrial e agrícola e pelo fato do registro da produção desses resíduos ser confiável. No Brasil, o Ministério da Saúde identificou, entre os anos de 2001 e 2004, 15 237 áreas com solo contaminado sendo 11 458 áreas de depósito de lixo urbano e 3769 de lixo industrial e pesticida (Asmus, 2008) e essas áreas expõem a população local a riscos (Asmus, 2008), pois podem estar próximas de comunidades, áreas de mananciais, lençóis freáticos e etc. Os principais resíduos são os metais pesados (peso atômico acima de 22) e os produtos químicos orgânicos.

1.3 Produtos Químicos Orgânicos

Este grupo engloba um grande número de substâncias, geralmente hidrocarbonetos, derivados do petróleo ou do gás natural, associados a uma ou mais moléculas de cloro (fertilizantes, conservantes, defensivos agrícolas, produtos de degradação de plásticos e etc.). A produção destas substâncias atinge valores muito altos, sendo que só a de pesticidas atingiu em 1995 o total de 2,7 milhões de kg. Geralmente, estas substâncias apresentam degradação muito lenta no ambiente.

As 12 substâncias mais nocivas ao ser humano foram agregadas em uma categoria denominada “Poluentes Orgânicos Persistentes” (POPs).

Uma destas substâncias é o bifenil policlorado (PCBs), que era utilizado desde 1930 na fabricação de tintas e de fluídos para transformadores e que devido a sua inércia química se espalhou na biosfera e nos tecidos de muitas formas de vida. Mesmo após sua utilização ter sido banida permanecerá por muito tempo no meio ambiente. (Bush, 1974; Carlson, 1973; Powell, 1996).

O termo “POP” quando foi estabelecido se referia a um grupo de 12 substâncias sendo 9 defensivos agrícolas (Aldrin, Clordano DDT, Dieldrin, Endrin, Mirex, heptaclor-HCH, hexaclorobenzeno-HCB e toxafeno) e três produtos de uso industrial (dioxina, furano e bifenil policlorado-PCB). As nove substâncias do grupo dos defensivos agrícolas foram introduzidas entre 1920 e 1950, tiveram seu pico de produção entre 1960 e 1970 e em 1990 foram banidas para uso em plantações e combate a cupins na América do Norte e Europa. Entretanto a produção e comércio no mundo continuaram. Novas substâncias e produtos foram sendo adicionadas a lista “POP” com o tempo (Jorgenson, 2001).

As quatro características principais de um POP são:

Estabilidade: Por ter degradação lenta permanece longo período no ambiente. A meia-vida do Dieldrin pode chegar a 12,5 anos.

Bioacumulação: Por ter grande solubilidade em gordura irá se acumular nos animais. Pode ser absorvida da água ou dos alimentos. O Dieldrin, por exemplo, pode se acumular na gordura corpórea, leite materno, sêmen, fígado e pode passar a barreira placentária.

Biomagnificação: A substância é absorvida por pequenos organismos e vai se concentrando progressivamente em direção ao topo da cadeia alimentar. Pode ser expressa por um fator, o BMF (Fator de Biomagnificação).

Capacidade de se dispersar por longas distâncias (Jorgenson, 2001).

Em 2001, na cidade de Estocolmo foi assinada Convenção Internacional onde os países signatários, dentre eles o Brasil, se comprometeram a interromper o uso destas doze substâncias (POPs) e tratar adequadamente os seus resíduos até a sua eliminação. Em 2005, o decreto presidencial 5472, promulga o texto da Convenção de Estocolmo (Brasil, 2005).

As principais substâncias químicas orgânicas citadas pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos em relação à contaminação da água para consumo humano, seu nível máximo de contaminação (MCL) permitido e seu principal potencial de risco são (EPA, 2008):

- Acrylamida: MCL=0mg/L. Atua no sistema nervoso, hematológico e eleva risco para câncer.
- Alachlor: MCL=0mg/L. Causa problemas nos olhos, fígado rins e baço. Eleva risco para câncer.
- Atrazina: MCL=0,003mg/L. Danos ao sistema cardiovascular e problemas reprodutivos.
- Benzeno: MCL=0mg/L. Anemia, plaquetopenia e eleva risco para câncer.

- Benzopireno (PAHs): MCL=0mg/L. Infertilidade e aumento do risco para câncer.
- Carbofuran: MCL=0,04mg/L. Problemas no sistema nervoso, hematológico e reprodutivo.
- Tetracloroeto de carbono: MCL=0mg/L. Problemas hepáticos e aumento do risco para câncer.
- Clordano: MCL=0mg/L. Problemas hepáticos e no sistema nervoso. Aumento do risco para câncer.
- Clorobenzeno: MCL=0,1mg/L. Problemas hepáticos e renais.
- 2,4-D: MCL=0,07mg/L. Problemas hepáticos, renais e na supra-renal.
- Dalapon: MCL=0,2mg/L. Alterações renais.
- 1,2-Dibromo-3-cloropropano(DBCP): MCL=0mg/L. Distúrbios reprodutivos e aumento do risco para câncer.
- o-Diclorobenzeno: MCL=0,6mg/L. Alterações renais, hepáticas e circulatórias.
- p-Diclorobenzeno: MCL=0,075mg/L. Alterações hematológicas, hepáticas e esplênicas.
- 1,2-Dicloroetano: MCL=0mg/L. Eleva risco para câncer.
- 1,1-Dicloroetileno: MCL=0,007mg/L. Problemas hepáticos.
- cis-1,2-Dicloroetileno: MCL=0,07mg/L. Problemas hepáticos.
- trans-1,2-Dicloroetileno: MCL=0,1mg/L. Problemas hepáticos.
- Diclorometano: MCL=0mg/L. Problemas hepáticos e aumento do risco para câncer.

- 1,2-Dicloropropano: MCL=0mg/L. Aumento do risco para câncer.
- Di(2-ethylexyl)adipato: MCL=0,4mg/L. Perda de peso, problemas hepáticos e no sistema reprodutivo.
- Di(2-ethylexyl)phtalato: MCL=0mg/L. Perda de peso, problemas hepáticos e aumento do risco para câncer.
- Dinoseb: MCL=0,007mg/L. Problemas no sistema reprodutor.
- Dioxina(2,3,,7,8-TCDD): MCL=0mg/L. Problemas no sistema reprodutor e aumento do risco para câncer.
- Diquat: MCL=0,02mg/L. Causa catarata.
- Endothall: MCL=0,1mg/L. Problemas nos sistema digestório.
- Endrin: MCL=0,002mg/L. Problemas hepáticos.
- Epichlorohydrin: MCL=0mg/L. Aumento do risco para câncer.
- Ethylbenzeno: MCL=0,7mg/L. Problemas hepáticos ou renais.
- Dibromato de etileno: MCL=0mg/L. Problemas hepáticos, renais e no sistema reprodutor. Elevação do risco para câncer.
- Glifosato: MCL=0,7mg/L. Problemas renais e no sistema reprodutor.
- Heptaclor: MCL=0mg/L. Problemas hepáticos e elevação do risco para câncer.
- Hexaclorobenzeno: MCL=0mg/L. Problemas hepáticos, renais, no sistema reprodutor e elevação do risco para câncer.
- Hexaclorociclopentadieno: MCL=0,05mg/L. Problemas renais.
- Lindano: MCL=0,0002mg/L. Problemas renais ou hepáticos.
- Metoxyclor: MCL=0,04mg/L. Problemas reprodutivos.

- Oxamyl(Vydate): MCL=0,2mg/L. Problemas no sistema nervoso.
- Bifenil policlorado (PCBs): MCL=0mg/L. Deficiência imunológica, alterações no sistema nervoso e reprodutivo. Aumento do risco para câncer.
- Pentaclorofenol: MCL=0mg/L. Problemas hepáticos ou renais. Aumento do risco para câncer.
- Picloram: MCL=0,5mg/L. Problemas hepáticos.
- Simazine: MCL=0,004mg/L. Problemas hematológicos.
- Estireno: MCL=0,1mg/L. Problemas renais, hepáticos e circulatórios.
- Tetracloroetileno: MCL=0mg/L. Problemas hepáticos e aumento do risco para câncer.
- Tolueno: MCL=1mg/L. Problemas no sistema nervoso, fígado e rins.
- 1,2,4-Triclorobenzeno: MCL=0,07mg/L. Problemas na supra-renal.
- 1,1,1-Tricloroetano: MCL=0,2mg/L. Problemas hepáticos, no sistema circulatório e nervoso.
- 1,1,2-Tricloroetano: MCL=0,003mg/L. Problemas hepáticos, renais e imunológicos.
- Tricloroetileno: MCL=0mg/L. Problemas hepáticos e aumento do risco para câncer.
- Cloreto de vinil. MCL=0mg/L. Aumento do risco para câncer.
- Xileno: MCL=10mg/L. Problemas no sistema nervoso.

Um dos mecanismos de ação é a capacidade de atuar como xenoestrogênios ou disruptores endócrinos. Xenoestrogênios são substâncias que, uma vez no organismo, tem a capacidade de se ligar aos receptores estrogênicos e causar efeito por terem estrutura similar ao estrogênio (Nesaretman e Darbre, 1997).

Os estrogênios são esteróides sexuais que tem diversos efeitos em vários órgãos e tecidos alvo por todo o organismo. Esta classe de hormônios geralmente regula crescimento e diferenciação (McLachlan, 1995). Um órgão alvo é caracterizado pela presença de receptores para esteróides. Estes receptores são intracelulares, mais precisamente, intranucleares. Os disruptores ou xenoestrogênios se ligam aos receptores através de alguns mecanismos (Mueller, 2003).

- a) Difusão através da membrana celular
- b) Transferência através de membrana nuclear ao núcleo e ligação a uma proteína receptora
- c) Interação do complexo hormônio-receptor ao DNA nuclear
- d) Síntese de RNA-mensageiro (m-RNA)
- e) Síntese de proteína específica que leva a atividade celular específica

Como todos os esteróides, a estrutura básica dos estrogênios é o peridro ciclopentanofenantreno diferindo apenas no número e posição dos átomos de carbono no restante da cadeia (18 carbonos para os estrogênios).

Várias substâncias tanto naturais quanto artificiais podem ter afinidade por estes receptores agindo como agonistas ou antagonistas,

parciais ou não (Crews e MacLachlan, 2006; Sohoni e Sumter, 1998). Todas estas substâncias podem ser chamadas de xenoestrogênios. Como substâncias naturais podemos citar os fitoestrogênios, encontrados em diversos vegetais e que tem sido utilizados pela indústria farmacêutica como tratamento para a Síndrome do Climatério. Já como substâncias artificiais temos dois grupos: O primeiro é o dos hormônios sintéticos, criados pela indústria farmacêutica e, o outro grupo é o dos agentes químicos utilizados nos mais diversos campos da atividade humana e que por características de sua forma molecular tem a capacidade de se ligar aos receptores para esteróides (Hall, 2002; MacLachlan, 1995; Battershill, 1994).

A Síndrome do dietilestilbestrol (DES) representa o modelo clássico da ação de estrogênios ambientais: O DES é um estrogênio sintético que foi muito utilizado pelos médicos para prevenir abortamento espontâneo em gestantes entre 1948 e 1971 quando seu uso foi proibido para este fim. Durante o período embrionário, as filhas de mulheres que usaram o DES (mais de um milhão de mulheres entre 1960 e 1970) eram submetidas a um estímulo estrogênico que normalmente não ocorreria nesta fase e, durante sua vida adulta apresentaram taxas elevadas de adenocarcinoma de células claras na vagina, o que normalmente seria muito raro. Ou seja, a exposição a uma substância com ação hormonal durante a fase embrionária apresentou consequências na vida adulta (Colborn *et al*, 1993).

1.4 Metais pesados

Os metais pesados ocorrem naturalmente nos solos e alguns deles, tais como cobre (Cu), zinco (Zn) e cobalto (Co), desempenham importante papel na nutrição de plantas e animais, enquanto outros, como cádmio (Cd), chumbo (Pb), arsênio (As) e selênio (Se), exercem efeitos deletérios sobre vários componentes da biosfera. Na maioria das vezes, esses elementos estão presentes nos solos, em concentrações ou formas que não oferecem risco para o ambiente. Todavia, nas últimas décadas, atividades antropogênicas têm elevado, substancialmente, a concentração de alguns metais em diversos ecossistemas. O acúmulo de metais em solos agrícolas é um aspecto de grande preocupação quanto à segurança ambiental. Esses elementos podem expressar seu potencial poluente diretamente nos organismos do solo, pela disponibilidade às plantas em níveis fitotóxicos, além da possibilidade de transferência para a cadeia alimentar, por meio das próprias plantas, ou pela contaminação das águas de superfície e profundas (Silva, 2007; Fernandes, 2007). O cádmio e o chumbo, nos animais, podem interferir no metabolismo normal do zinco (Telisman *et al*, 2000).

Resíduos contendo Cádmio: O cádmio tem mais motilidade em ambientes aquáticos do que a maioria dos outros metais. É também bioacumulativo e persistente no meio ambiente (meia-vida $t_{1/2}$ de 10-30 anos) (Labuska *et al*, 2000; Queiroz, 2006). É encontrado em água de superfície ou subterrânea como o íon $+2$ hidratado, ou como um complexo iônico com outras substâncias inorgânicas ou orgânicas. Enquanto as

formas solúveis podem migrar na água, o cádmio, em complexos insolúveis ou adsorvido a sedimentos, é relativamente imóvel. De forma semelhante, o cádmio no solo pode existir em forma solúvel em água de solo, ou em complexos insolúveis com componentes inorgânicos e orgânicos do solo (Labuska *et al*, 2000). Além disso, o cádmio é facilmente disponível para a ingestão em grãos, especialmente o arroz, e vegetais, havendo ainda uma associação clara entre a concentração de cádmio no solo e as plantas que crescem naquele solo (Labuska *et al*, 2000). Quando presente em uma forma biodisponível, sabe-se que tanto organismos aquáticos quanto terrestres acumulam o cádmio. Estudos mostram acúmulo em animais aquáticos em concentrações centenas ou, até mesmo, milhares de vezes mais altas do que na água. Os fatores de bioconcentração relatados variam de 113 a 18.000 para invertebrados e de 3 a 2.213 para peixes. Há, também, relatos de acúmulo de cádmio em gramíneas, culturas alimentares, minhocas, aves, gado, cavalos, e vida selvagem. As evidências de biomagnificação são inconclusivas. No entanto, a absorção do cádmio do solo por culturas alimentares pode resultar em altos níveis de cádmio na carne de gado e em aves (especialmente no fígado e nos rins). Esse acúmulo de cádmio na cadeia alimentar tem implicações importantes para a exposição humana, não importando se ocorre uma biomagnificação significativa (Labuska *et al*, 2000). O cádmio não tem função bioquímica ou nutricional, e é altamente tóxico para plantas e animais (Labuska *et al*, 2000). Em humanos e animais, há fortes evidências de que o rim é o principal alvo da toxicidade do cádmio, após exposição por tempo prolongado. Os danos

renais incluem proteinúria e decréscimo na taxa de filtração glomerular. Outros efeitos tóxicos do cádmio, baseados em achados de estudos toxicológicos ocupacionais, em animais e epidemiológicos, são sumarizados a seguir: A inalação de altos níveis de fumaça ou poeira de óxido de cádmio é extremamente irritante para o tecido respiratório, e exposições agudas a altos níveis podem ser fatais. Em níveis mais baixos, a inflamação dos pulmões pode causar enfisema e dispnéia. Estudos em animais confirmaram que a exposição por inalação ao cádmio leva a problemas respiratórios. Vários estudos epidemiológicos tentaram determinar uma relação entre exposição ocupacional respiratória ao cádmio e câncer de pulmão e próstata. Estes estudos, juntamente com estudos epidemiológicos em animais, fundamentam o papel do cádmio na carcinogênese (Labuska *et al*, 2000; IARC, 1998). O cádmio, e certos compostos de cádmio, são, portanto, listados pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer como carcinogênicos (Labuska *et al*, 2000). O Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos no seu 8º Relatório Sobre Carcinógenos sugere o cádmio e certos compostos de cádmio como prováveis candidatos a carcinógenos humanos. A exposição acentuada via oral pode resultar em sérias irritações no epitélio gastrointestinal, náusea, vômitos, salivação, dor abdominal, cólica e diarreia (Labuska *et al*, 2000).

Resíduos contendo Mercúrio: Podem causar envenenamento agudo ou crônico, sua dose letal varia entre 20 e 30 mg. Após sua absorção pelo organismo se deposita no fígado, baço, rins e ossos. O íon mercúrio

corresponde a apenas 2% do mercúrio absorvido pelo Homem, sendo mais de 90% absorvido através do composto orgânico metil mercúrio. O “Water Quality Criteria” recomenda, para águas de abastecimento público, um total de mercúrio que não exceda a dois microgramas por litro (CETESB, 1982). Devido ao fato de o mercúrio ser o único metal que pode existir como líquido e vapor em temperatura ambiente, o seu comportamento ambiental difere do da maioria dos outros elementos tóxicos (Labuska *et al*, 2000). O mercúrio pode existir em três estados de valência, Hg (0), Hg (I) e Hg (II). Na atmosfera, o mercúrio elementar é sem dúvida a forma mais comum e, como vapor, é responsável pela propagação global do mercúrio. Além disso, em um grau muito menor, o mercúrio pode estar associado à material particulado, que é removido por deposição seca ou úmida. As fontes de entrada na atmosfera podem ser mais significativas em áreas onde outras fontes, como os rios contaminados, são menos importantes ou não-existent (Labuska *et al*, 2000). No ambiente aquático, o mercúrio é mais comumente encontrado no estado mercúrico Hg (II), e o seu destino, uma vez que o composto é lançado, é dominado pela adsorção rápida a material orgânico solúvel e particulado; seguido pela floculação, precipitação e o acúmulo final no sedimento de fundo. Devido à força com a qual o mercúrio se liga ao sedimento, a troca com a coluna de água é geralmente pequena, embora possa ser acelerada em águas salinas, e na presença de altas concentrações de sulfetos (condições anóxicas). O acúmulo de mercúrio proveniente de sedimentos pode, portanto, ser uma rota dominante para a ingestão por organismos aquáticos e é responsável por concentrações

relativamente altas em organismos detritívoros, tanto em sistemas de água doce quanto marinhos (Labuska *et al*, 2000). O mercúrio inorgânico pode ser metilado por microorganismos, inerentes aos solos, sedimentos de água doce e salgada. A forma mais comum de mercúrio orgânico é o metilmercúrio (MeHg), que é solúvel, móvel, e rápido para penetrar na cadeia alimentar aquática. A retenção seletiva de MeHg em cada passo da cadeia alimentar, em relação ao mercúrio inorgânico, é relacionada à sua alta solubilidade em lipídios, à sua meia-vida biológica longa, e ao aumento na longevidade dos predadores de topo de cadeia. Como resultado, o MeHg fornece um dos raros exemplos de biomagnificação metálica em cadeias alimentares. Por exemplo, concentrações em peixes carnívoros no topo das cadeias alimentares em água doce e água salgada são biomagnificadas 10.000-100.000 vezes comparando-se às concentrações encontradas em águas ambientes. A importância dessa bioacumulação é que ela geralmente é a fonte mais importante de exposição humana não ocupacional ao mercúrio. O mercúrio é um metal traço extremamente tóxico e não-essencial que não tem função bioquímica ou nutricional. Os mecanismos biológicos para a sua remoção são pobres e, conforme mencionado anteriormente, o mercúrio é o único metal que sabe-se que se biomagnifica, isto é, acumula-se progressivamente através da cadeia alimentar. A exposição aguda a níveis elevados de sais de mercúrio, ou a exposição crônica a doses baixas, é diretamente tóxica ao rim. A exposição ao MeHg também resultou em danos permanentes ao sistema nervoso central, aos rins e ao feto em desenvolvimento. Os estudos sobre a toxicidade aquática do mercúrio são

numerosos, e novamente mostram que o MeHg é muito mais tóxico do que qualquer uma das formas inorgânicas (Labuska *et al*, 2000)

Resíduos contendo Chumbo: Quando o chumbo é lançado no meio ambiente, ele tem um longo tempo de residência comparado à maioria dos outros poluentes. Como resultado, ele tende a se acumular em solos e sedimentos, onde, devido à baixa solubilidade, pode permanecer acessível à cadeia alimentar e ao metabolismo humano por muito tempo. Formas orgânicas tóxicas estão também presentes no meio ambiente, a partir de fontes diretas (fabricação, transporte e armazenamento de gasolina com chumbo e as conseqüentes emissões de exaustão de carro) além da possível metilação química/biológica de chumbo inorgânico em sedimentos anaeróbicos (Labuska *et al*, 2000). A quantidade de chumbo que permanece em solução em águas de é freqüentemente baixa. Além disso, uma fração significativa de chumbo insolúvel pode ser incorporada em material particulado de superfície de escoamentos, ou como íons sorvidos (absorvidos e adsorvidos) ou cobertura de superfície em sedimento, ou pode ser transportada como parte de matéria orgânica viva ou não-viva. Plantas e animais podem acumular chumbo a partir da água, de solos e sedimentos, sendo as formas orgânicas mais facilmente absorvidas do que as inorgânicas. O chumbo é um dos metais tóxicos mais presentes entre os existentes. Ele não tem função nutricional, bioquímica ou fisiológica conhecida, e visto que não há necessidade biológica demonstrada, e que ele é tóxico para a maioria dos organismos vivos, a principal preocupação no momento é em que dose o chumbo pode se tornar tóxico. Os efeitos tóxicos

do chumbo são os mesmos, independentemente de se ele é ingerido ou inalado. Esses efeitos incluem distúrbios no sistema nervoso, anemia, doença cardiovascular, distúrbios no metabolismo ósseo, na função renal e na reprodução (Labuska *et al*, 2000).

Resíduos contendo Cromo: Altamente tóxicos na forma hexavalente. A recomendação do “Water Quality Criteria” para águas de abastecimento público é de no máximo 0,05mg/litro. Dose letal em animais varia entre 50 e 500 mg/kg (CETESB, 1982).

Resíduos contendo molibdênio, vanádio, potássio, níquel, cobre e manganês: O molibdênio é pouco tóxico ao ser humano. O Vanádio é irritante do trato respiratório e seu pior efeito ecológico é quando está presente no ar. O “Water Quality Criteria” recomenda, para águas de abastecimento público, concentração de no máximo 0,1mg/L (CETESB, 1982).

Nas últimas décadas têm sido discutidos os efeitos destes agentes químicos nos seres humanos e seu impacto ambiental.

1.5 Efeitos dos poluentes no Sistema Reprodutor

A literatura mostra uma grande quantidade de estudos que investigam a possibilidade de que a exposição a poluentes possa estar relacionada com o aumento da ocorrência de distúrbios reprodutivos como redução da espermatogênese (Dallinga, 2002; Mehta *et al*, 2003) e da incidência de tumores em órgãos hormônio sensíveis como mamas, ovário, útero e

próstata (Davis *et al*, 1993; Brody *et al*, 2003; Charlier *et al*, 2003) tanto em animais quanto em seres humanos (Skarda, 2002). Outros indicam que a exposição a estes agentes durante o período embrionário pode causar alterações da organogênese (Jones, 1995; Fry, 1995; Varnagy, 1996) e na qualidade do sêmen (Delbés, 2006).

Vários estudos tem sido apresentados indicando que a qualidade e a quantidade de espermatozóides do sêmen humano está apresentando um declínio (Adamapoulos *et al*, 1996; Comhaire *et al*, 2007) outros não verificam nenhuma anormalidade (Carlsen, 2005). Muitos ambientalistas e cientistas consideram a possibilidade da humanidade estar se aproximando de uma “Crise de Fertilidade”. Vários fatores podem ser indicados como possíveis causas para a redução da fertilidade masculina, entre eles estão inclusos os metais e vários agentes químicos utilizados largamente na indústria e na agricultura, maior exposição a radiações, contaminação do ambiente por xenoestrogênios e até o aumento da temperatura global (Sinawat, 2000; Delbés, 2006; Wade *et al* 2002; Multigner e Oliva, 2002).

Carlson *et al* (1973) injetaram soluções contendo PCBs em ovos de galinha durante a embriogênese e observou aumento do numero de mortes dos embriões e, diminuição da taxa de eclosão dos ovos.

Bush *et al* (1974) expuseram galinhas a PCBs através da ração e observou diminuição na porcentagem de ovos eclodidos e aumento no número de malformações dos filhotes.

Powell *et al* (1996) injetaram isômeros de PCB's em ovos de galinhas e verificou aumento do número de embriões malformados, redução do peso de nascimento e grande atividade teratogênica.

Cummings *et al* (1996) mostraram efeito do 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzeno-p-dioxina como promotor de endometriose em ratos e camundongos.

Hsieh *et al* (1998) mostraram que a genisteína, um fitoestrogênio, pode estimular o crescimento de células de câncer de mama in vivo e in vitro.

Telisman *et al* (2000) analisando o sêmen de trabalhadores com níveis séricos de chumbo e cádmio encontraram redução do número e aumento de alterações morfológicas nos espermatozóides.

Selevan *et al* (2000) mostraram que homens tem piora da qualidade do sêmen com redução da motilidade e alteração da forma dos espermatozóides durante períodos de grande elevação da poluição atmosférica.

Birnbaum e Cummings (2002) afirmam que evidências epidemiológicas apontam que a prevalência crescente de endometriose está associada à exposição a organoclorados como a dioxina.

Rajpurkar *et al* (2002) verificou aumento de apoptose em túbulos seminíferos de ratos expostos a fumaça de cigarro.

De Rosa *et al* (2003) mostraram redução da motilidade dos espermatozóides de homens expostos a poluição do ar.

Ramos *et al* (2003), expuseram ratas grávidas ao Bisphenol A (BFA), xenoestrogênio encontrado em plásticos, resina epoxi, selantes de latas de comida, tubos de pasta de dente e embalagens de leite, e

encontrou nos filhotes machos, alterações histofuncionais no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.

Benoff *et al* (2003) correlacionaram níveis de chumbo no plasma seminal com piora na qualidade dos espermatozóides.

Long *et al* (2004) expuseram ratas ao Bisphenol A e encontraram proliferação do epitélio vaginal.

Rubes *et al* (2005) observaram aumento da fragmentação do DNA em homens expostos a poluição do ar em períodos nos quais a poluição atmosférica estava elevada.

Spano *et al* (2005) encontraram alteração na cromatina dos espermatozóides de homens com expostos ao PCB e ao p,p'-DDE, um metabólito do DDT.

Mohallen *et al* (2005) encontraram aumento de óbitos fetais e de falhas da implantação embrionária em ratas expostas à poluição do ar em São Paulo.

Tiido *et al* (2006) encontraram redução na proporção entre espermatozóide Y e X em homens com presença de PCB e DDE no sêmen.

Ahmadnia *et al* (2007) expuseram ratos a fumaça de cigarro e encontraram piora da qualidade da espermatogênese.

Benoff *et al* (2008) mostraram astenospermia em ratos expostos à altas doses de cádmio.

Genuis (2006) afirma que as principais publicações na área de Ginecologia e Obstetrícia não dão a importância necessária ao tema que relaciona exposição a poluentes e a saúde reprodutiva e que deve haver um esforço para esta situação mudar.

1.6 Áreas Contaminadas

Segundo a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB, uma área contaminada pode ser definida como área, local ou terreno onde há comprovadamente poluição ou contaminação causada pela introdução de quaisquer substâncias ou resíduos que nela tenham sido depositados, acumulados, armazenados, enterrados ou infiltrados de forma planejada, acidental ou até mesmo natural. Muitas das áreas contaminadas são decorrentes de atividades industriais já encerradas, tornando difícil a identificação de responsabilidades e, mesmo quando o responsável é identificado técnica e judicialmente, a execução da exigência de recuperação da área degradada e de ressarcimento por danos ambientais e à saúde de populações. Enquanto as pendências judiciais permanecem, o risco de contaminação humana e ambiental cresce. O levantamento de áreas contaminadas no País com sua localização e substâncias presentes ainda é muito insipiente com exceção dos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (CONASQ, 2003).

As áreas contaminadas em Países em desenvolvimento geralmente apresentam diversos poluentes diferentes reunidos (Yanez *et al*, 2002).

1.7 Poluição ambiental em Cubatão

No Parque Estadual da Serra do Mar, núcleo de Itutinga-Pilões, localizada no município de Cubatão, área de reserva ambiental e de manancial onde funciona uma unidade de captação da SABESP que abastece a cidade de Cubatão existiu até 1985 um depósito de lixo municipal que recebia material proveniente do pólo industrial (Lixão de Pilões). Após a comprovação da contaminação do ambiente este depósito foi desativado e aterrado. A CETESB comprovou na época a presença de metais (alumínio, bário, arsênio, cádmio, cobre, chumbo, cromo, ferro, prata, zinco, mercúrio e manganês) e de organoclorados que são substâncias com ação xenoestrogênica ou atividade de disruptores endócrinos (CETESB, 1982). O episódio ficou conhecido como “Caso Rhodia”.

Na década de 60 (1960-1970), a indústria química Clorogil, adquirida pela Rhodia S.A. em 1976 se instalou na cidade de Cubatão com a finalidade de produzir agrotóxicos e solventes clorados. A empresa produziu mensalmente, entre 1966 e 1978, cerca de 82 toneladas de pentaclorofenol e 215 toneladas de pentaclorofenato de sódio (“Pó da China”), tendo como subproduto cerca de 600 toneladas de ácido clorídrico. A partir de 1974, passou a fabricar, também, cerca de 18 mil toneladas por ano de tetracloreto de carbono e percloroetileno. Em 1978, devido a inúmeras complicações de ordem trabalhista na área de higiene e segurança do trabalho, a fábrica de pentaclorofenol foi fechada. Em 1993, a fábrica de tetracloreto de carbono e de percloroetileno também foi fechada. Durante a atividade, a empresa

contaminou a sua própria área e depositou os resíduos em locais inadequados para esse fim, por serem próximos a áreas povoadas e com possibilidade de contaminação de rios e mangues da região (CONASQ, 2003).

A Rhodia, mantinha depósitos no “lixão” municipal, no Vale dos Pilões (Lixão de Pilões), na beira do rio Cubatão, na região de Samaritá, em São Vicente, e no Sítio do Coca em Itanhaém. Estima-se que a empresa tenha gerado em torno de 20 mil toneladas de resíduos tóxicos, cuja composição aproximada é de 70% a 80% de hexaclorobenzeno – HCB e 10% a 15% de hexaclorobutadieno – HCBD. Outras substâncias aparecem em menor quantidade. Estudos mostraram a presença de níveis elevados de HCB no solo, nos pescados, no sangue e no leite materno dos moradores, nos trabalhadores da fábrica e no rio Cubatão (CONASQ, 2003).

Outro fato interessante é que a Prefeitura de Cubatão recebeu como doação da Carbocloro duzentos mil litros de terra contaminada com níveis até 100 vezes superiores ao limite de intervenção estabelecido pela CETESB de várias substâncias (HCB, pentaclorofenol, tetracloroetileno e 1,2 dicloroetano) e essa terra foi utilizada no aterro do lixo domiciliar. A Carbocloro soube da contaminação após a doação e a terra contaminada era originária de um terreno que a empresa havia comprado da Rhodia (CONASQ, 2003).

Em relação aos metais, Cubatão ocupa o quarto lugar no ranking nacional de lançamento de resíduos industriais contendo metais na água, cerca 24,1 toneladas, perdendo apenas para São Paulo, Volta Redonda e Rio de Janeiro (CONASQ, 2003).

A área contaminada de pilões ainda é monitorizada pela CETESB e continua evidenciando a presença de contaminantes (CETESB, 2006).

Figura 1. Entrada do Parque Estadual da Serra do Mar.

Figura 2. Aterro de Lixo Químico (Pilões).

Quem visita o local sem conhecimento da existência do aterro de lixo químico não teria como saber dos perigos de contaminação local se não fosse pela existência destas placas. A região é área de mata atlântica muito bonita.

1.8 Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental

O Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo faz estudos sobre a poluição desde a década de 1980. Inicialmente, os trabalhos eram sobre os efeitos da poluição do ar sobre os animais de experimentação e posteriormente, os trabalhos foram desenvolvidos também na área de epidemiologia. Recentemente, o LPAE também vem desenvolvendo trabalhos na observação de efeitos de contaminação de outros ambientes como solo e água.

Este estudo foi desenvolvido como um projeto que pretende observar os efeitos deletérios da contaminação de água por metais pesados e poluentes orgânicos no estuário do Parque Estadual da Serra do Mar, em Cubatão, e seus possíveis efeitos em animais de experimentação. O trabalho foi conduzido no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o efeito da exposição à água proveniente de meio ambiente contaminado na fertilidade e no sistema reprodutor masculino de camundongos.

Objetivos Específicos

- a) Avaliar se há influência sobre o peso das gônadas dos machos
- b) Avaliar se há alteração no espermograma dos machos
- c) Avaliar se ocorre variação da taxa de gravidez do casal
- d) Avaliar se ocorrem diferenças na proporção de machos da prole
- e) Avaliar alterações histológicas nas gônadas dos machos

3. MÉTODOS

3.1 Grupos

Oitenta camundongos machos Balb-c divididos, aleatoriamente, em 4 grupos foram criados desde o desmame até a idade reprodutiva. Cada grupo recebeu água proveniente de um local específico e ficou separado em gaiolas identificadas com as letras: A, B, C e D.

Grupo A: Água mineral (Crystal®); n=20

Grupo B: Água proveniente do ponto de captação da Sabesp no rio Cubatão que fica no Núcleo Itutinga-Pilões do Parque Estadual da Serra do Mar e que abastece a cidade de Cubatão; n=18

Grupo C: Água proveniente da rede de abastecimento da Sabesp em Cubatão (Rua Manoel Jorge 83); n=22

Grupo D: Água proveniente do rio Pilões que passa pelo local do antigo depósito de resíduos industriais do Núcleo Itutinga-Pilões do Parque Estadual da Serra do Mar (Lixão de Pilões); n=20

Os animais foram fornecidos pelo Biotério de Criação da Faculdade de Medicina da USP e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP que segue as normas do Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory and Animal

Resources, National Academy of Sciences, Washington D.C.; 1996 e aos princípios éticos da legislação brasileira e Código Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Foram alimentados com ração própria para a espécie. A ração e a água eram administradas *ad libitum*.

3.2 Coleta da Água

A água foi coletada semanalmente e mantida em recipiente de vidro. O volume de cada coleta foi de 2 litros. Cada grupo tinha seus recipientes de vidro próprios e identificados.

A água do Grupo A (Mineral) foi transferida diretamente da garrafa na qual foi adquirida para os recipientes de vidro.

A água do Grupo B (Sabesp) foi coletada na estação de captação de água da Sabesp no Núcleo Itutinga-Pilões do Parque Estadual da Serra do Mar antes do ponto de captação da Sabesp através da imersão do recipiente de vidro em uma profundidade de 50 cm da superfície da água e abertura da tampa para permitir a entrada da água. Após o recipiente estar repleto ele era fechado e retirado de dentro do rio.

A água do Grupo C (Rede da Sabesp em Cubatão) foi coletada de torneira situada na Rua Manoel Jorge 83 em Cubatão. A água era transferida diretamente da torneira para o recipiente de vidro após desprezarmos os primeiros 500 ml da vazão da torneira.

A água do Grupo D (Lixão de Pilões) foi coletada no rio Pilões próximo ao local do antigo depósito de resíduos industriais do Núcleo Itutinga-Pilões do Parque Estadual da Serra do Mar através da imersão do recipiente de vidro em uma profundidade de 50 cm da superfície da água e abertura da tampa para permitir a entrada da água. Após o recipiente estar repleto ele era fechado e retirado de dentro do rio.

Os recipientes foram transportados para São Paulo em caixa de isopor com gelo e transferidos posteriormente para geladeira onde foram mantidos sob temperatura constante.

Os recipientes de vidro abasteciam os bebedouros das gaiolas onde os camundongos foram criados. A ingestão de água pelos animais era livre.

3.3 Formação de Casais

Após atingirem a idade reprodutiva, que neste trabalho foi fixada em três meses de idade, cada camundongo macho foi colocado em uma gaiola separada e recebeu a companhia de uma fêmea também em idade reprodutiva proveniente do Biotério de Criação da Faculdade de Medicina da USP. Os 80 casais formados ficaram separados em gaiolas identificadas de A1 até A20, B1 até B18, C1 até C22 e D1 até D20.

Cada casal ficou unido por 10 dias para permitir o acasalamento, que era constatado pela presença do “plug” vaginal, que é o tampão mucoso que fica visível na vulva do camundongo fêmea após o coito.

3.4 Sacrifício dos animais

Os machos foram sacrificados após o período de acasalamento e as fêmeas mantidas em gaiolas individuais para aguardar confirmação da gestação e nascimento dos filhotes sendo sacrificadas posteriormente. Os animais foram colocados em uma caixa hermeticamente fechada e pré-anestesiados com isoflurano (Cristália Produtos Farmacêuticos Ltda.). Após a constatação de falta de sensibilidade os animais foram sacrificados por exsanguinação através de laparotomia e secção da aorta abdominal.

3.5 Parâmetros analisados

Peso dos testículos;

Espermograma;

Taxa de gravidez das fêmeas

Proporção entre macho e fêmea da Prole (Sex-ratio)

Histologia das gônadas

3.5.1. Peso dos testículos: Posteriormente ao sacrifício, os testículos foram retirados e pesados individualmente em balança de precisão. A presença de alguma discrepância na obtenção desta medida poderia representar um indicador quantitativo de normalidade desses órgãos ou da presença de processos patológicos como tumor, edema, inflamação, etc. (Mantovani & Maranghi, 2005).

3.5.2. Espermograma: Para a avaliação da concentração dos espermatozóides utilizamos os espermatozóides presentes na porção caudal do epidídimo. Os espermatozóides foram então extraídos com o auxílio de duas agulhas hipodérmicas em 0,5 ml de meio Ham's F10 (Irvine scientific, Santa Ana, CA, USA) e mantidos por 10 minutos em banho-maria á 32°C. O esperma coletado foi quantificado em uma câmara de contagem do tipo Makler (Seifa Medical, Israel) e a concentração expressa em 10⁶/ml.

3.5.3. Histologia das gônadas: Após a retirada dos testículos, os órgãos foram pesados, perfurados com agulha de insulina e fixados em líquido de Bouin por 2 horas. Posteriormente fixados em álcool 70 e enviados para corte histológico e fixação em parafina. As lâminas foram avaliadas através da microscopia óptica, aumento de 400x, coloração HE (Hematoxilina/eosina) e PAS (Ácido Periódico de Shiff). Os parâmetros avaliados foram: Contagem de células de Sertoli em 10 cortes transversais de túbulos seminíferos no mesmo estágio para cada animal sendo que o estágio escolhido foi o VIII.

3.6 Análise da Água

Uma vez por mês, durante a visita semanal para a coleta da água que era administrada aos camundongos, foi também coletado 500 ml de água de cada um dos quatro pontos de coleta para posterior análise. As amostras provenientes do mesmo local foram reunidas em um mesmo recipiente de vidro.

3.6.1. Metais:

Um volume em torno de 150 mL de cada amostra foi evaporado até aproximadamente 100 mL. Adicionou-se 10 mL de HNO_3 concentrado e procedeu-se a digestão ácida até quase a secagem total da amostra. Em seguida o resíduo foi filtrado e diluído até o volume de 25 mL. Houve, portanto, uma concentração de seis vezes nas amostras analisadas.

Para a determinação dos teores de Chumbo e Cádmio utilizou-se o Espectrômetro de Absorção Atômica com chama, da Perkin Elmer, modelo AAnalyst 100. No caso do Mercúrio, empregou-se o sistema hidreto metálico MHS10 acoplado ao espectrômetro.

Limites de Detecção:

Considerando que as amostras foram concentradas seis vezes, os limites de detecção foram:

- Para Pb – $40 \times 10^{-6} \text{g/L}$ ou $40 \mu\text{g/L}$.
- Para Cd – $2,5 \times 10^{-6} \text{g/L}$ ou $2,5 \mu\text{g/L}$.
- Para Hg – $0,1 \times 10^{-6} \text{g/L}$ ou $0,1 \mu\text{g/L}$.

3.6.2. Poluentes Químicos

Limpeza do Material

Toda vidraria utilizada no experimento foi lavada com detergente comum em água corrente e posteriormente lavada em banho de imersão de *Detertec* - Vetec® (neutro a 5%) por aproximadamente 12 horas. Após o banho a vidraria foi enxaguada em água deionizada e seca em estufa por aproximadamente 150°C ao longo de 12 horas. Antes da análise, foi previamente limpa com Acetona P.A. e n-Hexano.

Solventes e reagentes

Os solventes e reagentes utilizados para o experimento foram: Acetona P.A. Tedia[®], n-Hexano (Ommisolv.) Tedia[®], Isooctano (Omnisolv.) Tedia[®], Éter dietílico, Acetonitrila (HPLC) Tedia[®], Água MilliQ, Sílica gel Merck[®], Óxido de Alumínio, Sulfito de Sódio, Hidróxido de Sódio, Ácido orto-Fosfórico Tedia[®] e Cloreto de Sódio Tedia[®].

Experimental

A extração de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em água foi realizada através do processo de extração Líquido-Líquido contendo a amostra e um solvente orgânico com polaridade intermediária. Para cada 1 (um) Litro de água foram adicionados 200 mL ou 20% do solvente n-Hexano (ABSOLV.). Depois de adicionado o solvente, cada amostra foi extraída por processo de agitação, em um funil de separação, ao longo de dois intervalos de 10 minutos cada.

A fim de evitar uma possível emulsão entre as fases aquosas e orgânicas, foi adicionado para cada amostra 100 mL de uma mistura com ação anti-espumante (2,5 gramas de Cloreto de Sódio e 2,0 gramas de ácido orto-fosfórico (concentrado) dissolvidos em 100 mL de água MilliQ. Após a extração, a fase orgânica das amostras foi separada e concentrada a 1 mL utilizando um evaporador rotatório. Os extratos concentrados foram posteriormente purificados e fracionados por processos cromatográficos. Cada amostra foi transferida e eluída em uma coluna cromatográfica aberta. Cada coluna foi preenchida com três gramas de sílica gel, 2 gramas de

Óxido de Alumínio e 1 grama de Sulfato de Sódio. Os reagentes neste experimento foram limpos em n-Hexano e acondicionados em temperaturas específicas, a fim de retirar ou restringir a possível presença de água adsorvida. Para a primeira eluição, 25 mL de n-Hexano foram eluidos e posteriormente descartados. A segunda eluição utilizou uma mistura de 30 mL de n-Hexano/Éter Dietílico 9:1 v/v. Ao fim desta etapa, as amostras foram concentradas em evaporador rotatório até a secura e solubilizados em 0,5 mL de Acetonitrila.

Condições Cromatográficas

As amostras foram analisadas num cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) acoplado a um detector de fluorescência, modelo Shimadzu (RF-10 AxL) com duas bombas LC-10AT e LC-10AS. Coluna CLC-ODS: 25 cm; 4,6 mm d.i.; partícula com 5 µm e poro de 120 Å. A fase móvel é composta por uma mistura de Acetonitrila/Água (80:20 v/v) com fluxo isocrático de 1.5 mL.min⁻¹. O detector foi programado em nove etapas de comprimento de onda para Excitação/Emissão: 255/325; 253/350; 333/390; 237/462; 280/430; 294/404 300/500 e 300/421. Para análise de cada amostra, foi injetada uma alíquota de 20 µL. Foram analisados 11 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos neste estudo: Naftaleno (NAF), Fluoreno (FLUO), Acenaftileno (ACEN), Antraceno (ANTR), Pireno (PIR), Benzo[a]Antraceno (B[a]A), Benzo[b]Fluoranteno (B[b]F), Benzo[k]Fluoranteno (B[k]F), Benzo[a]Pireno (B[a]P), Dibenzo[ah]Antraceno (DB[ah]A) e Indeno[123cd]Pireno (IND[123]P).

Quantificação

Utilizou-se o *software* Borwin 1.2 para a integração dos cromatogramas e cálculo de concentração dos compostos. Para a identificação dos compostos comparou-se o tempo de retenção de cada um com o cromatograma de uma solução padrão. A quantificação dos HPAs foi baseada na curva de calibração de uma solução padrão

3.7 Análise Estatística

Foi feita a análise descritiva de todas as variáveis do estudo. As variáveis quantitativas foram apresentadas em termos de seus valores de tendência central e de dispersão. Foi apresentada também a % de gravidez e a % do sexo masculino (BERQUO).

Foram utilizados os testes de Levene e Kolmogorov-smirnov para se verificar a homogeneidade das variâncias e a aderência a curva normal, respectivamente. Para as variáveis que apresentaram esses dois princípios satisfeitos foram utilizados testes paramétricos (ANOVA- análise de variância), caso contrário foram utilizados testes não paramétricos (Teste de Kruskal-Wallis). Quando diferenças foram observadas foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Tukey (KLEIBAUM).

Para se verificar a associação entre duas variáveis qualitativas foi utilizado o teste de Qui-quadrado (SIEGEL).

Para se comparar duas proporções foi utilizado o teste de comparação entre duas proporções (SIEGEL).

O nível de significância foi de 5%.

Pacote estatístico utilizado SPSS 14.0 for Windows.

3.8 Ética

Projeto 0907/07 aprovado pela CAPPesq.

Projeto aprovado pela Comissão Técnico Científica – COTEC, da Secretaria do Meio Ambiente. Processo SMA nº 43279/2007.

4. RESULTADOS

4.1 Análise da Presença de Metais na Água

A análise da água para verificar a presença de metais mostrou os seguintes resultados:

Para o Chumbo (Pb):

- Rede de abastecimento de Cubatão (grupo **c**): Todas as amostras com teores abaixo do limite de detecção, ou seja, $40\mu\text{g/L}$.
- Água Mineral (grupo **a**): Todas as amostras com teores abaixo do limite de detecção, ou seja, $40\mu\text{g/L}$.
- Estação de captação da Sabesp (grupo **b**): Todas as amostras com teores abaixo do limite de detecção, ou seja, $40\mu\text{g/L}$.
- Pilões (grupo **d**): Para duas amostras foram obtidos os seguintes valores médios: $113 \pm 11\mu\text{g/L}$ e $221 \pm 16\mu\text{g/L}$.

Para o Cádmio (Cd):

- Rede de abastecimento de Cubatão (grupo **c**): Todas as amostras com teores abaixo do limite de detecção, ou seja, $2,5\mu\text{g/L}$.

- Água Mineral (grupo **a**): Todas as amostras com teores abaixo do limite de detecção, ou seja, 2,5 µg/L.
- Estação de captação da Sabesp (grupo **b**): Foram obtidos os seguintes valores médios: $3,58 \pm 0,50 \mu\text{g/L}$ e $2,92 \pm 0,10 \mu\text{g/L}$.
- Pilões (grupo **d**): Foram obtidos para 3 amostras os seguintes valores médios: $11,33 \pm 0,50 \mu\text{g/L}$, $12,6 \pm 1,2 \mu\text{g/L}$ e $3,78 \pm 0,35 \mu\text{g/L}$.

Para o Mercúrio (Hg):

- Rede de abastecimento de Cubatão (grupo **c**): Foram obtidos os seguintes valores médios: $0,50 \pm 0,10 \mu\text{g/L}$ e $0,61 \pm 0,12 \mu\text{g/L}$.
- Água Mineral (grupo **a**): $0,75 \pm 0,15 \mu\text{g/L}$ e $0,67 \pm 0,13 \mu\text{g/L}$.
- Estação de captação da Sabesp (grupo **b**): Foram obtidos os seguintes valores médios: $0,52 \pm 0,11 \mu\text{g/L}$ e $0,62 \pm 0,12 \mu\text{g/L}$.
- Pilões (grupo **d**): Foram obtidos para três amostras os seguintes valores médios: $0,89 \pm 0,18 \mu\text{g/L}$, $5,3 \pm 1,1 \mu\text{g/L}$ e $4,58 \pm 0,92 \mu\text{g/L}$.

4.2 Análise da Presença de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)

A tabela 1 mostra as concentrações dos HPAs em cada área estudada. O grupo d, (Pilões) apresenta o triplo das concentrações detectadas nos outros grupos.

Tabela 1. Concentrações dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) nas amostras de água segundo grupo de exposição(ng/L)

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Naftaleno	0,01	0,01	0,01	0,04
Acenaftileno	2,57	2,75	2,62	8,06
Fluoreno	42,17	34,79	24,30	131,08
Pireno	1,97	1,50	1,73	20,41
B[a]antraceno	*	*	*	*
B[b]fluoranteno	*	*	*	*
B[k]fluoranteno	*	*	*	*
B[a]pireno	*	*	0,37	0,35
DB[ah]antraceno	*	*	*	*
Total HPAs	46,71	39,05	29,02	159,94

*Valores abaixo do limite de detecção do método

4.3 Peso das Gônadas

Na tabela 2 são apresentados os valores do peso dos testículos em gramas em termos de medidas de tendência central e dispersão para cada grupo de exposição. Não houve diferença estatística entre os grupos estudados através da análise de variância.

Tabela 2. Análise descritiva do peso dos testículos segundo grupo de exposição

	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Testículo Direito					
Grupo A	20	0,088	0,010	0,073	0,110
Grupo B	18	0,900	0,090	0,078	0,110
Grupo C	22	0,091	0,010	0,074	0,108
Grupo D	20	0,910	0,021	0,018	0,117
Testículo Esquerdo					
Grupo A	20	0,089	0,009	0,076	0,106
Grupo B	18	0,088	0,009	0,078	0,108
Grupo C	22	0,091	0,011	0,072	0,110
Grupo D	20	0,910	0,021	0,018	0,111

4.4 Espermograma

A tabela 3 mostra as medidas de tendência central e dispersão dos parâmetros medidos no espermograma.

Para a concentração de espermatozóides o grupo **d** (Pilões) apresentou a menor média em relação aos outros grupos, embora não tenha sido encontrada diferença significativa através da análise de variância.

Em relação ao parâmetro mobilidade, houve uma maior média desse parâmetro nos grupos **c** e **b**, respectivamente. Houve uma diferença significativa entre os grupos **a** e **c** através do teste de Tukey.

Em relação ao parâmetro células imóveis o grupo **b** apresentou uma menor mediana, tendo sido o único entre os parâmetros apresentados na tabela 2 a ter um comportamento não paramétrico (teste de levene). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos através do teste de Kruskal-Wallis

Em relação ao parâmetro percentual de mobilidade, o grupo **a** apresentou a menor média, sendo estatisticamente diferente das médias dos grupos **b** e **c** através do teste de Tukey.

Tabela 3. Análise descritiva dos parâmetros do espermograma segundo grupo de exposição

	N	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Concentração						
Grupo A	18	15,06	14,45	7,01	3,30	33
Grupo B	18	14,35	16,50	6,10	0	23
Grupo C	22	16,91	15,50	5,39	9	29
Grupo D	20	14,16	13,45	7,98	0	30
Móveis						
Grupo A	18	6,55	6	4,70	1	20
Grupo B	20	8,40	10	4,22	0	11
Grupo C	22	9,50	9	4,27	4	18
Grupo D	20	6,89	6	4,24	0	13,30
Imóveis						
Grupo A	18	8,51	8,15	3,57	2,30	17
Grupo B	20	5,95	6,50	2,82	0	11
Grupo C	22	7,41	7	2,02	5	12
Grupo D	20	7,29	5,65	4,68	0	17
Percentual de Mobilidade						
Grupo A	18	40	43,90	15,22	9,40	60,60
Grupo B	20	51,66	57,15	21,64	0	78,50
Grupo C	22	54,21	56,65	11,31	35,70	72,20
Grupo D	20	46,27	48,45	17,22	0	68,60

As Figuras 2 a 5 mostram os parâmetros investigados no espermograma em termos de média e intervalos de confiança (95%), evidenciando uma diferença entre os grupos **a** e **b** para mobilidade e entre o grupo **a** e **b** e **a** e **c** para o percentual de mobilidade.

Figura 3. Médias e intervalos de confiança das concentrações de espermatozoides segundo grupo de exposição.

Figura 4. Médias e intervalos de confiança do número de espermatozoides móveis segundo grupo de exposição.

Figura 5. Médias e intervalos de confiança do número de espermatozoides imóveis segundo grupo de exposição.

Figura 6. Médias e intervalos de confiança do percentual de espermatozoides móveis sobre o total segundo grupo de exposição.

4.5 Taxa de gravidez

Em relação ao percentual de gestação não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (tabela 4).

Tabela 4. Taxa de gravidez segundo grupo de exposição

	N	% Gestação
Grupo a	18	40
Grupo b	20	38,9
Grupo c	22	54,5
Grupo d	20	55

4.6 Proporção de machos na prole (Sex ratio)

A tabela 5 mostra a proporção de machos na prole. Houve um menor percentual no grupo **b**, seguido do grupo **d**. Esses percentuais são diferentes entre os grupos. O grupo **b** apresentou uma diferença estatisticamente significativa e o grupo **d** apresentou diferença marginalmente significativa.

Tabela 5. Número de recém-nascidos por sexo e proporção de machos na prole segundo grupo de exposição

	Masculino (N)	Feminino (N)	Total	Masculino %
Grupo 1	21	16	37	57
Grupo 2	5	23	28	19
Grupo 3	34	22	56	61
Grupo 4	18	26	44	41

P=0,09 Teste de comparação de proporções.

4.7 Histologia

A tabela 6 mostra a quantidade de células de Sertoli em termos de médias e desvios-padrão segundo grupo de exposição. Não houve diferença significativa entre as médias segundo o grupo de exposição através da análise de variância.

Tabela 6. Análise descritiva do número de células de Sertoli segundo grupo de exposição

	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Grupo A	200	13,02	2,099	8	18
Grupo B	180	12,86	1,819	8	18
Grupo C	220	13,24	1,916	9	18
Grupo D	190	12,96	1,787	10	17

5. DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos elaborados para investigar a causa de doenças têm apresentado evidências crescentes de que a exposição a agentes tóxicos tem contribuído com o aumento da incidência de doenças crônicas, neoplasias e doenças congênitas (Heindel, 2006). Também existem evidências de que o período intra-útero e pós-natal precoce seria o mais sensível aos efeitos dos poluentes que poderiam reprogramar genes causando o aumento da incidência de doenças na vida adulta (Heindel, 2006). O período intra-útero seria o mais sensível para exposições a agentes químicos que piorariam a fertilidade na vida adulta (Delbes, 2006).

A exposição a esses agentes tóxicos, incluindo os disruptores endócrinos e os metais, frequentemente ocorre através de fontes que não são previstas pelo indivíduo ou pela comunidade. Tanto a água quanto os alimentos podem conter uma grande variedade de substâncias tóxicas (resíduos de pesticidas, agrotóxicos, metais, hormônios, antibióticos e resíduos industriais). No passado a sociedade não tinha noção dos danos que certas substâncias poderiam causar ao meio ambiente e a saúde humana e nem da capacidade de muitos produtos permanecerem no ambiente por muitas décadas e se concentrarem na cadeia alimentar. Por isso, muitas substâncias que até já foram proibidas e tiveram seu uso banido ainda permanecem em determinados ambientes podendo causar

sérios problemas. Além disso, temos também o uso irresponsável de produtos químicos por pessoas ou empresas que não cumprem as normas adequadas de utilização, armazenamento e descarte destas substâncias e de seus resíduos. Uma mesma empresa que se comporta corretamente em relação ao meio ambiente em um País onde as regras de manuseio de substâncias químicas são rígidas e, acima de tudo, cumpridas pode ser negligente em outro onde esse controle não é tão rigoroso.

As possíveis consequências da exposição aguda ou crônica a estas substâncias em relação ao sistema reprodutivo ainda não estão bem definidas (Jouannet et al, 2001), embora existam fortes evidências que os poluentes prejudicam a função reprodutiva. Resultados conflitantes na literatura podem ser consequência da grande variedade de desenhos de estudos sobre o tema.

A área do aterro do antigo lixão de Pilões é comprovadamente contaminada com metais pesados, solventes halogenados, solventes aromáticos e biocidas orgânicos fazendo parte das áreas monitorizadas constantemente pela CETESB. Essa contaminação atinge solo superficial e águas subterrâneas (CETESB, 2006).

O fato do aterro situado em Pilões ser uma área contaminada não significa, obrigatoriamente, que a água dos rios e riachos da região também seja. Porém, a análise da água mostrou os seguintes resultados:

A análise da água investigou a presença das seguintes substâncias: Cádmio, Chumbo, Mercúrio e 9 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos – HPAs (Naftaleno, Acenaftileno, Fluoreno, Pireno, B[a]antraceno, B[b]Fluoranteno, B[k]fluoranteno, B[a]pireno, DB[ah]antraceno).

A água mineral (grupo **a**) não mostrou presença de cádmio nem de chumbo. Mostrou presença de mercúrio, mas em concentrações inferiores ao valor máximo recomendado para água de consumo pela Environmental Protection Agency (EPA, 2008).

A água da rede de abastecimento na cidade de Cubatão (grupo **c**) não mostrou presença de cádmio nem de chumbo. Mostrou presença de mercúrio, mas em concentrações inferiores ao valor máximo recomendado para água de consumo pela Environmental Protection Agency.

A água da estação de captação e tratamento da SABESP no rio Cubatão (grupo **b**), dentro do Núcleo Itutinga-Pilões, apresentou duas amostras com presença de cádmio e com a presença de mercúrio, porém em níveis abaixo do valor máximo recomendado para água de consumo pela Environmental Protection Agency.

As amostras do rio Pilões (grupo **d**) mostraram a presença de chumbo, mercúrio e cádmio em níveis acima do recomendado para água de consumo pela Environmental Protection Agency. O valor máximo recomendado para o mercúrio em água para consumo humano é de $2\mu\text{g/L}$ e os valores encontrados foram $5,3\pm 1,1$ e $4,5\pm 0,92\mu\text{g/L}$. Para o cádmio o valor máximo recomendado é de $5\mu\text{g/L}$ e os valores encontrados foram $11,33\pm 0,5$; $12,6\pm 1,2$ e $3,78\pm 0,35\mu\text{g/L}$. Para o chumbo, o valor máximo recomendado é de $0\mu\text{g/L}$ e os valores encontrados foram 113 ± 11 e $221\pm 16\mu\text{g/L}$.

Em relação aos hidrocarbonetos aromáticos, o grupo **d** apresentou valores bem superiores aos outros grupos, principalmente em relação ao Fluoreno e ao Pireno. O principal efeito deletério dos hidrocarbonetos

aromáticos é elevar o risco para câncer, mas podem, também, ter efeitos no sistema reprodutor. A amostra de água mineral (grupo **a**) que foi enviada para o laboratório fazer a análise de hidrocarbonetos foi perdida acidentalmente e, substituída por uma amostra de água MilliQ (água pura, para uso em laboratórios) sendo que os valores observados de hidrocarbonetos nesta amostra correspondem a contaminação que ocorre com muita frequência neste tipo de laboratório.

Estes resultados indicam que o ponto de coleta do grupo **d**, no rio Pilões, por ser próximo ao aterro do antigo lixão, está tendo a qualidade de suas águas comprometida com a presença de metais e hidrocarbonetos aromáticos, expondo o meio ambiente e a população local a possíveis riscos.

As amostras de água dos grupos **a**, **b** e **c** estão dentro dos valores recomendados para os metais pesquisados e a população de Cubatão, que consome a mesma água do grupo **c** está recebendo água de boa qualidade. As amostras do grupo **b** e **c** também podem ser consideradas próprias padrão em relação aos hidrocarbonetos.

Em relação às medidas de peso dos testículos não foram observadas diferenças entre os grupos expostos e não expostos aos poluentes. Na literatura existem trabalhos com resultados semelhantes ao deste estudo. *Wade et al* (2002) submeteram ratos macho à exposição crônica a doses baixas de uma mistura de vários poluentes (cádmio, chumbo, DDT, DDE, Dieldrin e outros poluentes) e não observaram diferenças entre o peso das gônadas dos grupos expostos e não expostos. *Martinez et al* (1997) expondo camundongos ao Dietilestilbestrol intra-útero não verificou redução do volume testicular após o nascimento.

Li *et al* (2006) expôs codornas a doses altas de 3-metil-4-nitrofenol e encontrou redução do volume dos testículos. Poon *et al* (2004) também observou redução do tamanho das gônadas ao expor ratos macho a um combinado de poluentes orgânicos. Queiroz e Waissman(2006) afirmaram que exposição a altas doses de cádmio causa atrofia testicular.

Uma possível explicação para o fato de os animais do grupo **d**, exposto a poluentes, não terem apresentado alterações no volume testicular neste trabalho é que o efeito de redução de volume das gônadas estaria associado com a exposição a altas doses de poluentes e talvez as doses de poluentes que os animais deste trabalho receberam não tenham sido suficientes para causar este efeito. Outra possibilidade é que os poluentes presentes na água não tenham a capacidade de causar o efeito de redução de volume testicular.

A análise dos dados do espermograma não mostra diferenças estatisticamente significantes entre os grupos no que se refere ao número de espermatozóides total, ao número de espermatozóides móveis e ao número de espermatozóides imóveis. Quando se comparou o percentual de motilidade do grupo **a** (água mineral) com o do grupo **c** (rede de abastecimento em Cubatão) observou-se redução significativa do percentual de motilidade dos espermatozóides do grupo **a** (água mineral).

O grupo **d** (pilões) que recebeu água cuja análise mostrou a presença de poluentes não apresentou alterações nos valores do espermograma. Outros trabalhos também mostraram resultados similares. Wade *et al* (2002) avaliaram o sêmen de ratos expostos a doses baixas de uma mistura de

metais e poluentes orgânicos e não encontraram alteração no número, concentração ou motilidade dos espermatozóides. Mas, estudando a cromatina, verificaram estar ocorrendo aumento da fragmentação, mostrando a possibilidade de estar havendo dano ao DNA.

Toft et al (2006) comparou o sêmen de homens com altos níveis séricos de poluentes orgânicos (hexaclorobifenil, clorofenil e DDE) com o de homens do grupo controle e não observou diferenças na quantidade, concentração e forma dos espermatozóides. Porém, encontrou redução importante na motilidade dos espermatozóides do grupo exposto aos poluentes. Rubes e Jiri (2005) avaliaram homens expostos a poluição do ar e não encontraram alterações do espermograma. Porém, ao avaliarem a cromatina também encontraram aumento da fragmentação do DNA. Weiss et al (2006) não observaram alterações no espermograma de homens com altos níveis séricos de DDT, DDE, Dieldrin e PCBs. E também não encontraram níveis elevados destas substâncias no sêmen.

Xia et al (2005) encontraram alterações na forma dos espermatozóides e aumento da fragmentação do DNA em trabalhadores expostos ao Carbaril (potente inseticida). Não houve alteração no número, concentração e motilidade dos espermatozóides.

Os resultados dos estudos associando poluição e espermograma são controversos, muitos mostram associação e outros não (Joauannet, 2001).

Talvez a forma de exposição, as características e concentração do poluente justifiquem as variações de resultados na literatura. Pela literatura, parece que o parâmetro do espermograma mais sensível a ação dos

poluentes é a motilidade. Outra observação é de que talvez ocorram primeiro danos intracelulares como o aumento de fragmentação do DNA visto na avaliação da cromatina.

Neste trabalho, o fato de não ter sido observada nenhuma alteração nos parâmetros avaliados no sêmen do grupo exposto aos poluentes (Grupo **d**) poderia ser explicado pelo fato das concentrações dos poluentes a que os animais foram expostos não serem suficientes para causar alterações. Outra possibilidade é que os poluentes encontrados não sejam causadores de alterações no espermograma. O cádmio, mesmo em concentrações séricas moderadas em camundongos, é considerado capaz de causar problemas de fertilidade reduzindo a espermatogênese (Dalton *et al*, 1996). Provavelmente, os níveis de cádmio encontrados na água do grupo **d** ($11,33 \pm 0,5$ e $12,6 \pm 1,2$ $\mu\text{g/L}$) ,assim como os níveis de hidrocarbonetos, não são suficientes para que eles alcancem concentração sérica que cause prejuízos ao espermograma.

Em relação à taxa de gravidez, não foi observada diferença entre os grupos.

Weiss et al (2006) comparou mulheres com níveis séricos elevados de DDT, DDE e Dieldrin com mulheres do grupo controle sem substâncias detectáveis no sangue e observou redução na taxa de gravidez nas mulheres com altos níveis séricos de DDT e DDE. As que tinham níveis elevados de Dieldrin não mostraram diferenças em comparação ao grupo controle. Isso reforça a idéia de que o tipo de contaminante é importante para avaliar a possibilidade de ocorrer determinado efeito.

Neste estudo não se observaram diferenças entre as taxas de gravidez. Como as fêmeas só foram expostas às amostras de água coletadas durante a fase de acasalamento, se ocorresse alteração da taxa de gravidez provavelmente seria por problemas da fertilidade do macho. Provavelmente, os elementos presentes nas amostras de água ou suas concentrações também não foram capazes de alterar este parâmetro.

A análise da proporção de machos na prole mostrou redução estatisticamente significativa no número de machos na prole do grupo **b** uma redução com significância marginal no grupo **d**. A análise da literatura indica que pode ocorrer alteração na proporção de machos na prole em decorrência da exposição aos poluentes. Em mamíferos se observa a redução no número de machos podendo indicar uma maior fragilidade do espermatozóide portador do cromossomo Y aos efeitos dos poluentes.

Parazzini et al (2005) mostrou que há pouca relação entre poluição e proporção de machos na prole, comparando casais tabagistas e não tabagistas.

Lichtenfels et al (2007) encontrou redução na proporção de machos na prole de camundongos expostos à poluição do ar (material particulado) quando comparado ao grupo não exposto.

Neste trabalho, o grupo que apresentou alteração em relação à proporção de machos na prole foi o grupo **b**, que recebeu água com níveis detectáveis de cádmio, porém em valores inferiores ao máximo recomendado pela EPA. O grupo **d** recebeu água com níveis de cádmio muito acima dos do grupo **b**, acima inclusive do valor máximo recomendado

pela EPA e não apresentou a mesma alteração em relação à proporção de machos na prole. Se o cádmio fosse o responsável seria esperado uma alteração mais exuberante no grupo **d**. Provavelmente, outro fator ou poluente não pesquisado neste estudo deve ser a causa desta alteração na prole do grupo **b**. Talvez o rio Cubatão local onde se localiza a estação de coleta da Sabesp, origem da água do grupo **b**, esteja recebendo algum outro poluente que não tenha sido identificado na análise da água e que não esteja presente na água do rio Pilões, origem da água do grupo **d**. Se esta hipótese corresponder a verdade, indica que o tratamento dado a água pela Sabesp é eficaz pois a água pós tratamento, enviada para a cidade de Cubatão e que foi dada ao grupo **c** não causou alterações na proporção de machos na prole.

Em relação ao número de células de Sertoli, não foi observada diferença entre os grupos. As células de Sertoli parecem ser mais resistentes a injúria do que as outras células dos túbulos, podendo explicar a não ocorrência de alteração neste trabalho. Talvez os agentes presentes não sejam capazes de causar alterações ou é uma questão de concentração das substâncias. Estudos têm associado o cádmio em altas doses a alterações estruturais, vistas por microscopia eletrônica, nas células de Sertoli (Queiroz, 2006). Talvez não tenha dado tempo suficiente para ocorrerem lesões visíveis à microscopia óptica.

Almeida et al (2000) expôs ratos a injeção intravenosa e intra escrotal de dimetil sulfoxido e não encontrou diferenças em relação ao diâmetro dos

túbulos, ao número de células do epitélio seminífero e a espermatogênese quando comparado com o grupo controle.

Ahmadnia et al (2007) verificou redução do número de células de Sertoli em ratos expostos a fumaça do cigarro em comparação a não expostos. Avaliações de ultra-estrutura nas células de Sertoli, realizadas por microscopia eletrônica, mostraram alterações intracelulares e na junção entre células.

Após a avaliação dos parâmetros escolhidos relacionados ao sistema reprodutor dos camundongos vemos que só houve uma diferença marginalmente significativa na proporção de machos da prole do grupo **d**, que recebeu a água proveniente da região do aterro de Pilões onde existe a presença de grande quantidade de resíduos químicos. Foi à presença deste depósito de lixo químico em área de mananciais, onde existe uma pequena comunidade moradora e que se alimenta de produtos cultivados e de animais criados naquela região que motivou este estudo. Uma vez que a exposição a poluentes do ar, do solo e da água tem mostrado, em vários estudos, efeitos lesivos em diversos órgãos e sistemas do organismo humano e animal é improvável que os poluentes presentes neste local não tenham repercussão no sistema reprodutivo. Algumas possibilidades podem explicar a não ocorrência de alterações significativas:

Os parâmetros escolhidos para o estudo podem, realmente, não se afetar com a exposição das substâncias presentes na região e por consequência na água coletada. Talvez outros parâmetros não avaliados tenham se alterado. Muitos estudos têm direcionado sua atenção para

alterações no DNA das células ou para a ultra-estrutura celular eventualmente sejam esses os parâmetros a serem considerados.

Outra possibilidade é que a dose da exposição tenha sido insuficiente para alterar os parâmetros escolhidos. Principalmente no caso dos poluentes orgânicos ocorre pequena dissolução em água, pois eles são preferencialmente lipossolúveis o que faz com que tenham a capacidade de se concentrar em direção ao topo da cadeia alimentar por se acumular na gordura dos animais. Como os camundongos foram expostos diretamente à água pode ser que a exposição tenha sido insuficiente. Talvez se a exposição fosse através de alimentos cultivados na região o resultado fosse diferente.

O desenho do estudo também pode ser a causa, uma vez que preferencialmente os estudos para avaliar efeitos de “disruptores” endócrinos devem ser por duas gerações (Mantovani e Maranghi, 2005), e neste caso, os filhotes da prole deveriam ter sido expostos às amostras de água até que atingissem a idade adulta e serem submetidos à avaliação dos parâmetros escolhidos. Não houve neste estudo exposição intra-útero para os machos avaliados, pois a exposição começou no desmame. Se a fase intra-útero é a mais sensível para a exposição aos poluentes e seus efeitos no sistema reprodutor, os próximos trabalhos deverão focalizar sua atenção neste período.

Outra questão importante levantada neste trabalho é se investigar em futuros estudos a interação entre diversas substâncias atuando conjuntamente nos organismos vivos. Exceto em trabalhos de laboratório onde se seleciona e administra uma única substância ou em casos de

contaminações ambientais por um único agente, geralmente os ambientes poluídos e contaminados apresentam dezenas de substâncias, às vezes centenas. Neste trabalho, identificamos 8 substâncias nocivas na água do rio Pilões próximo ao aterro químico sendo que a análise da água tinha a capacidade de identificar só 12 substâncias. Provavelmente, a variedade de contaminantes no local do aterro é bem maior. Alguns trabalhos destacam a importância da interação de poluentes com ação de “disruptores” endócrinos (Kortenkamp e Altenburger, 1998).

Também é crucial que se encontre uma forma eficaz de evitar que a população seja exposta, inadvertidamente, à poluentes de áreas contaminadas através de produtos como água e alimentos(carne, peixe, leite, vegetais e etc.). A fonte da contaminação pode estar muito distante do indivíduo mas os contaminantes podem chegar até ele por produtos oriundos da região contaminada.

Outros estudos, tanto experimentais com exposição e agente controlados, como observacionais em população exposta à contaminação devem ser realizados para averiguar melhor os efeitos da contaminação do meio ambiente sobre a função reprodutiva.

6. CONCLUSÃO

- a) Não houve efeito da exposição à água proveniente de meio ambiente contaminado sobre o peso das gônadas nos animais de nenhum dos quatro grupos.
- b) Não houve efeito da exposição à água proveniente de meio ambiente contaminado sobre o espermograma nos animais de nenhum dos quatro grupos.
- c) Não houve efeito da exposição à água proveniente de meio ambiente contaminado sobre a taxa de gravidez nos animais de nenhum dos quatro grupos.
- d) Houve alteração na proporção de machos na prole do grupo **b** em relação aos outros grupos, mas que não está associada aos contaminantes identificados neste estudo.
- e) Não houve efeito da exposição à água proveniente de meio ambiente contaminado sobre a histologia das gônadas nos animais de nenhum dos quatro grupos.

7. REFERÊNCIAS

Adamopoulos, DA; Pappa, A; Nicopoulou, S; Andreou, E; Karamertzanis, M; Michopoulos, J; Deligianni, V; Simou, M. Seminal volume and total sperm number trends in men attending subfertility clinics in the greater Athens area during the period 1977-1993. *Hum Reprod.* 1996; 11(9):1936-41.

Ahmadnia H; Ghanbari M; Moradi MR; Khaje-Dalouee M. Effect off cigarette smoke on spermatogenesis in rats. *Urol J.* 2007,4(3):159-63.

Almeida LM; Weiss RR; Castro CS; Buchele J. Quantificação Histológica da Espermatogênese de Ratos Wistar Tratados com Dimetil Sulfoxido. *Archives of Veterinary Science.* 2000, 5: 129-135.

Asmus, Carmen Ildes R. Fróes et al . Avaliação de risco à saúde humana por resíduos de pesticidas organoclorados em Cidade dos Meninos, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública** , Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, 2008.

Battershill, J.M. Review of the safety assessment of polychlorinated biphenyls (PCBs) with particular reference to reproductive toxicity. *Human & Experimental Toxicology.* 1994. 13: 581-597.

Benoff, S; Centola, GM; Milan, C; Napolitano, B; Marmar, JL; Hurley, IR. Increased seminal plasma lead levels adversely affect the fertility potential of sperm in IVF. *Hum. Reprod.* 2003. 18(2):374-83.

Benoff, S; Auburn, K; Marmar, JL; Hurley, IR. Link Between low dose environmentally relevant cadmium exposures and asthenzoospermia in a rat model. *Fertil. Steril.* 2008, 89(2):e73-9

Birnbaum, LS; Cummings, AM. Dioxin and Endometriosis: A Plausible Hypothesis. *Environmental Health Perspective*, 2002. 110(1).

BRASIL. Presidência da República. Decreto no 5472, de 20 de Junho de 2005. Promulga o texto da Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes. Brasília, 20 de Junho de 2005.

Brody, J.G.; Rudel, R.A. Environmental pollutants and breast cancer. *Environmental Health Perspective.* 2003. 111(8).

Bush, B; Tumasonis, C.A.; Baker, F.D. Toxicity and Persistence of PCB Homologs and Isomers in The Avian System. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 1974. 2(3): 195-212.

Carlsen, E; Swan, S; Petersen, J; Skakkebaek, N. Longitudinal changes in semen parameters in young Danish men from the Copenhagen area. Human Reproduction. 2005. 20 (4): 942-949.

Carlson, R. W.; DUBY, R. T. Embryotoxic effects of three PCB's in the chicken. Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology. 1973. 9 (5): 261-266.

CETESB. Áreas Contaminadas do Estado de São Paulo. 2006, 268. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br>

CETESB. Diagnóstico da Situação Ambiental em Cubatão com referência a poluição. 1-105, 1982.

Charlier, C; Albert, A; Herman, P; Hamoir, E; Gasparro, U; Meurisse, M; Plomteux, G. Breast Cancer and Serum Organochlorine Residues. Occup Environ Med. 2003. 60:348-351.

Colborn, T et al. Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. Environmental Health Perspectives. 1993. 101(5): 378-84.

Comhaire, F; Mahmoud A; Schoonjans F. Sperm quality, birth rates and the environment in Flanders (Belgium). Reproductive Toxicology 2007. 23(2):133-7.

CONASQ, Comissão Nacional de Segurança Química. Perfil Nacional da Gestão de Substâncias Químicas. 1-280, 2003.

Crews, D.; Maclachlan, J. Epigenetics, evolution, endocrine disruption, health and disease. Endocrinology. 2006. 47 (6):s4-s10.

Cummings, AM; Metcalf, JL; Birnbaum, L. Promotion of Endometriosis by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Rats and Mice: Time-Dose Dependence and Species Comparison. Toxicology and Applied Pharmacology. 1996. 138: 131-9.

Dallinga, J. W.; Moonen, E. J. C.; Dumoulin, J. C. M.; Evers, J. L. H.; Geraedts, J. P. M.; Kleijnans, J. C. S. Decrease human semen quality and organochlorine compounds in blood. Human Reproduction. 2002. 17 (8): 1973-1979.

Dalton, T et al. Analysis of the Effects of Overexpression of Metallothionein-I in Transgenic Mice on the Reproductive Toxicology of Cadmium. *Environmental Health Perspectives*. 1996. 104(1):68-76.

Davis, D. L.;Bradlow, H.L.; Wolff, M.; Woodruff, T.; Hoel, D.; Anton-Culver, H. Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environmental Health Perspectives*. 1993. 101(5).

Delbès, G; Levacher C; Habert R. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction*. 2006. 132(4): 527-538.

De Rosa, M; Carbone, U; Lombardi, G. Traffic pollutants affecting male fertility. *Human Reproduction*. 2003. 18(9): 1981-1982.

EPA. Drinking Water Contaminants. U.S. Environmental Protection Agency, 2008. Disponível em <http://www.epa.gov/safewater/contaminants/index.html#1>

Fernandes, RBA et al . Avaliação da concentração de metais pesados em áreas olerícolas no Estado de Minas Gerais. *Rev. bras. eng. agríc. ambient*. 2007.11(1).

Fry, D.M. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environmental Health Perspective*. , 1995. 103(7).

Genuis, SJ. Health issues and the environment-an emerging paradigm for providers of obstetrical and gynaecological health care. *Human Reproduction*. 2006. 21(9): 2201-2208.

Genuis, SJ. The chemical erosion of human health: adverse environmental exposure and in-utero pollution determinants of congenital disorders and chronic disease. *Journal of Perinatal Medicine*. 2006, 34(3): 185-195.

Hall, J.M.; Korach, K.S. Analysis of the molecular mechanisms of human estrogen receptors α and β reveals differential specificity in target promoter regulation by xenoestrogens. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277 (46): 4455-4461.

Heindel,J. Role of exposure to environmental chemicals in the developmental basis of reproductive disease and dysfunction. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2006, 24(3):168-177.

Hsieh, CY; Santell, RC; Haslam, SZ; Helferich, WG. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer Research*, 1998. 58(17):3833.

IARC. Cadmium and certain cadmium compounds. In: IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Chemicals, industrial processes and industries associated with cancer in humans. IARC monographs, 1998, Vol. 1 to 29

Jones, L.A.; Hajek, R.A. Effects of estrogenic chemicals on development. *Environmental Health Perspectives*. 1995. 103(s7).

Jorgenson, JL. Aldrin and Dieldrin: A Review of Research on Their Production, Environmental Deposition and Fate, Bioaccumulation, Toxicology and Epidemiology in The United States. *Environmental Health Perspectives Supplements*. 2001, 109(1):113-39.

Jouannet, P; Wang, C; Eustache, F; Kold-Jensen, T; Auger, J. Semen quality and male reproductive health: the controversy about human sperm concentration decline. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 2001, 109(5): 333-334.

Kortenkamp, A; Altenburger, R. Synergisms with mixtures of xenoestrogens: A reevaluation using the method of isoboles. *The Science of Total environment*. 1998. 221:59-73.

Labuska, I; Stringer, R; Brigden, K. Poluição por metais e compostos orgânicos associada à unidade da Bayer em Belford Roxo, Rio de Janeiro, Brasil 2000. Universidade de Exeter, Exeter, Reino Unido. Nota técnica. Disponível em: <http://www.greenpeace.org.br/toxicos/pdf/bayer-relatorio.pdf>

Li, C; Takahashi, S; Taneda, S; Furuta, C; Watanabe, G; Suzuki, A; Taya, K. Impairment of testicular function in adult male Japanese quail (*Coturnix japonica*) after a single administration of 3-methyl-4-nitrophenol in diesel exhaust particles. *J Endocrinol*. 2006. 189(3):555-64.

Lichtenfels, A; Gomes, J; Pieri, P; Miraglia, S; Hallak, J; Saldiva, P. Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in São Paulo, Brazil. *Fertility and Sterility*. 2007. 87(1): 230-232.

Long, X; Steinmetz, R; Jonathan, NB; Grant, AC; Young, PC; Nephew, KP; Bigsby, RM. Strain Differences in Vaginal Responses to the Xenoestrogen phenol A. *Environ Health perspec*. 2000, 108:243-7.

Mantovani, A; Maranghi, F. Risk assessment of chemicals potentially affecting male fertility. *Contraception*. 2005, 72(4):268-272.

Martinez, CP et al. Effects of in utero Exposure to Nonsteroidal Estrogens on Mouse Testis. *Can J Vet Res.* 1997; 61:94-8.

Mehta, R; Kumar, T. Traffic pollutants affecting male fertility. *Human Reproduction* 2003, 18 (9): 1981.

McLachlan, J. A.; Korach, K. S. Symposium on estrogens in the environment. *Environmental Health Perspectives.* 1995, 103(s7).

Mohallem, S; de Araújo Lobo, D; Pesquero, C, Assunção, J; de Andre, P; Saldiva, P.; Dolhnikoff, M. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of São Paulo. *Environmental Research* 2005;98:196 –202.

Mueller, OS; Xenoestrogens: mechanisms of action and detection methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* Disponível em: <http://www.springerlink.com/app/home/issue.asp.2003>

Multigner, L; Oliva A. Secular variations in sperm quality: fact or science fiction? *Cad Saude Publica.* 2002, 18(2): 403-412.

Nesaretnam, K; Darbre, P. 3,5,3',5'-Tetrachlorobiphenyl is a weak oestrogen agonist in Vitro and in Vivo. *J. Steroid Biochem. Molec. Bio.* 1997. 62(5/6):409-418.

Parazzini, F; Chatenoud, L; Maffioletti, C; Chiaffarino, F; Caserta, D. Periconceptional smoking and male:female ratio of newborns. *European Journal of Public Health.* 2005, 15(6): 613-614.

Poon, R; Rigden, M; Chu, I; Valli, V. Short-term oral toxicity of pentyl ether, 1,4-diethoxybutane, and 1,6-dimethoxyhexane in male rats. *Toxicol Sci.* 2004, 77(1): 142-50.

Powell, D.C.; Aulerich, R.J.; Stromborg.; Bursian, S.J. Effects of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, 2,3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl, and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl on the developing chicken embryo when injected prior to incubation. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1996. 49:319-338.

Queiroz EKR, Waissman W. Occupational exposure and effects on the male reproductive system. *Cad, saúde Pública.* 2006, 22(3).

Rajpurkar, A; Jiang, Y; Dhabuwala, CB; Dunbar, JC; Li, H. Cigarette smoking induces apoptosis in rat testis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2002, 21(3):243-8.

Ramos, J. G.; Varayoud, J.; Kass, L.; Rodríguez, H.; Costabel, L.; Munoz-de-Toro, M.; Luque, E. H. Bisphenol A induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology.* 2003, 144(7):3206-3215.

Rubes, j; Selevan, S; Evenson, D; Zudova, D; Vozdova, M; Zudova, Z; Robbins, W; Perreault, S. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Human Reproduction.* 2005, 20 (10): 2776-2783.

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

Skarda, J. Sensivity and Specificity of Bioassay of Estrogenicity on Mammary Gland and Uterus of Female Mice. *Physiol. Res.* 2002, 51:407-12.

Silva, MLS; Vitti, GC; Trevizan, AR. Concentração de metais pesados em grãos de plantas cultivadas em solo com diferentes níveis de contaminação. *Pesq. agropec. brás.* Brasília, 2007. 42(4).

Sinawat, S. The environmental impact on male fertility. *Journal of the medical association of Thailand.* 2000; 83(8):880-5.

Sohoni, P.; Sumpter, J.P. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *Journal of Endocrinology.* 1998, 158: 327-339.

Spano, M; Toft, G; Hagmar, L; Eleuteri, P; Rescia, M; Rignell-Hydbom, A; Tyrkiel, E; Zvyezday, V; Bonde, J. Exposure to PCB and p,p'-DDE in European and inuit populations: impact on human sperm chromatin integrity. *Human Reproduction* 2005, 20(12):3488-3499.

Telisman, S et al. Semen Quality and Reproductive Function in Relation to Biomarkers of Lead, Cadmiun, Zinc and Copper in Men. *Environmental Health Perspectives Supplements.* 2000, 108(1):45-53.

Tiido, T et al. Impact of PCB and p,p'-DDE Contaminants on Human Sperm Y:X Cromossome Ratio: Studies on Three European Populations and the Inuit Population in Greenland. *Environmental Health Perspectives.* 2006, 114(5):718-24.

Toft, G; Rignell-Hydbom, A; Tyrkiel, E; Shvets, M; Giwercman, A; Lindh, C; Pedersen, H; Ludwicki, J; Lesovoy, V; Hagmar, L; Spano, M; Manicardi, G; Bonfèl-Jorgensen, E; Thulstrup, A; Bonde, J. Semen quality and exposure to persistent organochlorine pollutants. *Epidemiology*, 2006, 17(4), 450-458.

Várnagy, L.; Varga, T.; Hlubik, I.; Budai, P.; Molnár, E. Toxicity of the herbicides Flubalex, Fulaside S and Maloran 50 WP to chicken embryos after administration as single compounds or in combination. *Acta Veterinaria Hungarica*. 1996, 44(3): 363-376.

Wade, M; Foster, W; Younglai, E; Macmahon, A; Leingartner, K; Yagminas, A; Blakey, D; Fournier, M; Desaulniers, D; Hughes, C. Effects of sub chronic exposure to a complex mixture of persistent contaminants in male rats: systemic, immune, and reproductive effects. *Toxicological sciences*. 2002, 67(1):131-143.

Weiss, J; Bauer, O; Bluthgen, A; Ludwig, A; Vollersen, E; Kaisi, M; Al-Hasani, S; Diedrich, K; Ludwig, M. Distribution of persistent organochlorine contaminants in infertile patients from Tanzania and Germany. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2006, 23(9-10), 393-399.

Xia, Y; Cheng, S; Bian, Q; Xu, L; Collins, m; Chang, H; Song, L; Liu, J; Wang, S; Wang, X. Genotoxic effects on spermatozoa of carbaryl-exposed workers. *Toxicological sciences*. 2005, 85(1):615-623.

Xinghua, L; Steinmetz, R; Ben-Jonathan, N; Caperell-Grant, A; Young, PCM; Nephew, KP; Bigsby, RM. Strain differences in Vaginal responses to the xenoestrogen Bisphenol A. *Environmental Health perspectives*. 2000, 108(3).

Yanez, L; Ortiz, D; calderon, J; Batres, L; Carrizales, L; Mejia, J; Martinez, L; Garcia-Nieto, E; Diaz-Barriga, F. Overview of Human Health and Chemical Mixtures: Problems Facing Developing Countries. *Environmental Health Perspectives*. 2002, 110(6):901-09.

Apêndice

Projeto 0907/07 aprovado pela CAPPesq.

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 23/04/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0907/07**, intitulado: **"ESTUDO DAS ALTERAÇÕES NO SISTEMA REPRODUTOR DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS A CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL."** 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: **Dr. Chin An Lin**

Pesquisador (a) Executante: **Paulo Augusto Amador Pereira**

CAPPesq, 25 de Abril de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Projeto aprovado pela Comissão Técnico Científica – COTEC, da Secretaria do Meio Ambiente. Processo SMA nº 43279/2007.

Áreas Contaminadas no Estado de São Paulo

CIESP - DIRETORIA REGIONAL DE CUBATÃO

CAMINHO DOS PILÕES S/Nº - BAIRRO PILÕES - CUBATÃO

Atividade ☐ indústria ☐ comércio ☐ posto de combustível ☒ resíduo ☐ acidentes ☐ agricultura ☐ desconhecida

Classificação contaminada com proposta de remediação

Etapas do gerenciamento

- ☒ investigação confirmatória
☒ investigação detalhada
☒ avaliação de risco
☐ concepção/projeto da remediação
☐ remediação em andamento com monitoramento operacional

Fonte de contaminação

- ☐ armazenagem ☐ produção ☐ manutenção ☐ emissões atmosféricas ☐ tratamento de efluentes
☒ descarte disposição ☐ infiltração ☐ acidentes ☐ desconhecida

Meios impactados

Meio impactado	Propriedade	
	Dentro	Fora
solo superficial	☒	☐
subsolo	☐	☐
águas superficiais	☐	☐
águas subterrâneas	☒	☐
sedimentos	☐	☐
ar	☐	☐
biota	☐	☐

Contaminantes

- ☐ combustíveis líquidos ☐ fenóis
☒ metais ☒ biocidas
☐ outros inorgânicos ☐ ftalatos
☒ solventes halogenados ☐ dioxinas e furanos
☒ solventes aromáticos ☐ anilinas
☐ solventes aromáticos halogenados ☐ radionuclídeos
☐ PAHs ☐ microbiológicos
☐ PCBs ☐ outros
☐ metano/outras vapores/gases

- ☐ existência de fase livre
☒ existência de POPs

Ações emergenciais e de controle institucional

Risco Iminente

- ☒ isolamento da área (proibição de acesso à área)
☐ ventilação/exaustão de espaços confinados
☐ monitoramento do índice de explosividade
☒ monitoramento ambiental
☐ remoção de materiais (produtos, resíduos, etc.)
☐ fechamento/interdição de poços de abastecimento
☐ interdição edificações
☐ proibição de escavações
☐ proibição de consumo de alimentos

Risco Crônico

restrição	proposta na avaliação de risco	comunicada ao órgão responsável	implantada
uso de solo	☒	☐	☐
uso água subterrânea	☒	☐	☐
uso água superficial	☒	☐	☐
consumo alimentos	☒	☐	☐
uso de edificações	☐	☐	☐

Processo de remediação

- ☐ bombeamento e tratamento ☐ oxidação/redução química ☐ barreira física
☐ extração de vapores do solo (SVE) ☐ barreiras reativas ☐ barreira hidráulica
☐ air sparging ☐ lavagem de solo ☐ biorremediação
☐ biosparging ☐ remoção de solo/resíduo ☐ fitorremediação
☐ bioventing ☐ recuperação fase livre ☐ biopilha
☐ extração multifásica ☐ encapsulamento geotécnico ☐ atenuação natural monitorada
☐ decoloração reductiva ☐ cobertura de resíduo/solo contaminado ☐ outros