Ariadini Negri

**Estudo dos efeitos mutagênicos da poluição ambiental em
trabalhadores de rua em São Paulo**

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. Paulo Hilário Nascimento Saldiva

São Paulo

2009

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, pela oportunidade de entrar no mundo da pesquisa. Por ter confiado em mim, e principalmente pela idéia desse projeto, que se tornou minha Tese de doutorado.

À Profa. Dra Elnara Márcia Negri, por me incentivar sempre, por me ajudar em todas as etapas do projeto e por estimular o meu crescimento pessoal e intelectual.

À Profa. Dra. Elia Garcia Caldini, por emprestar seu Laboratório para o desenvolvimento do projeto e pelo apoio e sugestões para a complementação do nosso estudo.

Ao Dr. Marcelo Alves Ferreira, pela ajuda com a estatística e pela amizade.

A todos os funcionários do laboratório: Cristina, Valéria, Marcelo, Gil, Felipe, Nilsa e Iris por estarem sempre dispostos a ajudar.

Às tecnicas da Histologia, principalmente à Rose por corar as lâminas.

Às Dras. Machione, Regiani e Ana Júlia, por me iniciarem no Laboratório de Poluição Experimental.

A Liduvina por todo apoio e boa vontade.

A todos os voluntários que participaram do estudo.

E à minha família, Carolina minha filha, Adriano meu marido, pelo amor e apoio. Elmo e Najara meus pais, pelos ensinamentos e incentivos de nunca parar de estudar.

Os materiais necessários para a realização deste estudo foram adquiridos por intermédio de auxílio à pesquisa concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, bolsa de Doutorado Direto, processo: 05/55367-0.

Sumário

Resumo	6
Abstract	8
Introdução	10
Objetivos	19
Casuística e métodos	20
Resultados	33
Discussão	48
Conclusões	55
Referências	56

Resumo

A poluição atmosférica vem recebendo crescente atenção como problema de saúde pública, pois representa uma fonte de agentes que podem promover o stress oxidativo e danos ao DNA, levando a efeitos cancerígenos e mutagênicos. As vias aéreas superiores, incluindo a cavidade oral são as áreas mais expostas do sistema respiratório, a material particulado e gases, e podem ser facilmente acessadas para monitorar a exposição humana a estes agentes. Nosso objetivo foi analisar o impacto da poluição do ar sobre a incidência de mutagênese em habitantes de nossa cidade. Para o estudo da mutagênese, utilizamos o teste de micronucleous (Mn), em células do epitélio da mucosa oral. Uma média de 4 a 6 amostras foram coletadas de cada voluntário, que concordou em participar do estudo, em São Paulo (SP) (n = 39) e, em Peruibe (PER), uma pequena cidade à beira-mar (n = 24), utilizados como um grupo controle. Os níveis de material particulado (PM10) foram medidos pelo método gravimétrico, e o ozônio e NO₂ foram medidos pelos amostradores passivos, bem como pelas medições realizadas pela CETESB no mesmo local da coleta. Os resultados expostos em relação à concentração de MN / células, mostraram uma diferença estatisticamente significativa comparando SP (0042 ± 0032) e Per (0023 ± 0019), $p = 0,009$. Um aumento de MN / células foi observado em fumantes comparados aos não fumantes em SP (0055 ± 0012 e 0.040 ± 0005), $p < 0,001$ e em Per ($0,0268 \pm 0,00167$ and $0,0181 \pm 0,00128$), $p < 0,001$. Nosso estudo confirma os efeitos da poluição do ar na promoção de mutagênese e sugere possível sinergismo entre poluição e tabagismo.

Palavras-chave: poluição do ar, mutagênese, micronúcleo, mucosa oral, biomonitoramento.

Abstract

Air pollution is receiving crescent attention as a public health problem, as it represents a source of agents that may promote oxidative stress and DNA damage, leading to mutagenic and carcinogenic effects. The upper airways, including the oral cavity are the most exposed areas of the respiratory system to airborne particles and gases, and can be easily accessed to monitor human exposure to these agents. Our aim was to analyze the impact of air pollution on the incidence of mutagenesis in habitants of our city. To address mutagenicity, we used the micronucleous (mn) assay in desquamated cells of the oral mucosa. An average of 4 to 6 samples were collected from each subject that agreed to participate in the study in Sao Paulo (SP) (n=39) and in Peruibe (Per), a small city by the sea, (n=24) used as a control group. The levels of particulate (PM10) were measured by gravimetric methodology, ozone and NO₂ were measured by passive monitors as well as by governmental monitoring stations in each location. The results exposed as mn/cells showed a statistically significant difference comparing SP ($0,042 \pm 0,032$) and Per ($0,023 \pm 0,019$), $p= 0,009$. An increase in mn/cells was observed in smokers compared to non smokers in SP ($0,055 \pm 0,012$ and $0,040 \pm 0,005$), $p<0,001$ and in Peruibe ($0,0268 \pm 0,00167$ and $0,0181 \pm 0,00128$), $p<0,001$. Our study confirms the hazardous effects of air pollution promoting mutagenesis and suggests that its effects may be synergic to smoking habit. We hope that our work may influence habits and public politics in order to improve public health in this issue.

Key words: air pollution, mutagenesis, micronucleus, oral mucosa and biomonitoring.

INTRODUÇÃO

Poluição e saúde:

Na atmosfera são identificados mais de 3000 componentes químicos diferentes, incluindo uma grande variedade de agentes mutagênicos e carcinogênicos, nocivos às plantas, animais e seres humanos. Vários estudos têm sido feitos apontando a poluição como um dos fatores que ocasionam doenças cardiovasculares (Akinaga, 2009; Terra-Filho, 2008; Martins, 2006), outros associam incidência aumentada de mutagênese em plantas e aumento da frequência de mortalidade por doenças cardiovasculares e câncer a altos níveis de poluição atmosférica (Mariani R L, 2009).

Entre outros poluentes o SO₂, NO, NO₂, são parâmetros rotineiramente mensurados para descrever a qualidade do ar. Extratos orgânicos extraídos dos materiais particulados contêm componentes químicos mutagênicos de origens diferentes de acordo com o local estudado. Erdinger (2005), usando a planta *S.typhimurium*, mostrou que a atividade mutagênica pode ser comparada às variações locais e sazonais dos indicadores gasosos de poluição e que a concentração de NO é um forte indicador da poluição emitida pelos veículos, e da atividade mutagênica induzida pela poluição do ar.

O dióxido de nitrogênio (NO₂) é emitido diretamente para a atmosfera por fontes antrópicas, tais como escapamentos de veículos, plantas geradoras de energia térmica, indústrias de fertilizantes e agricultura. Embora a oxidação do

óxido nítrico (NO) constitua a principal fonte geradora desse gás na atmosfera, pode também ser gerado naturalmente, por relâmpagos. O NO₂ é um gás agressivo ao trato respiratório e sua presença no ambiente está relacionada a casos de infecções respiratórias; além disso, pode ser transformado nos pulmões em nitrosaminas, sendo algumas destas conhecidas como potencialmente carcinogênicas. Este gás pode participar na atmosfera de uma série de reações fotoquímicas, por ex., na formação do "smog" fotoquímico, que reduz a visibilidade. Pode também reagir com a umidade do ar formando o ácido nítrico, contribuindo assim para a formação de chuva ácida. Indiretamente, o NO₂ contribui para o aquecimento global por participar de complexas reações com compostos orgânicos voláteis, levando à formação de ozônio troposférico. Padrões brasileiros para NO₂ atmosférico estão incluídos também na Resolução CONAMA n° 003 de 28 de Junho de 1990, a qual estabelece como padrão primário a concentração média aritmética anual de 100 µg/ m³ e a concentração média horária de 320 µg/ m³ (Mohallem, 2004).

Ozônio (O₃) é um gás incolor que se encontra em duas camadas distintas da atmosfera: na estratosfera, de forma natural, formado pela fotólise do O₂, protege a vida sobre a terra através da absorção da radiação ultravioleta do sol que alcança esta camada; na troposfera, antropicamente, o ozônio é formado através de uma série complexa de reações envolvendo compostos orgânicos voláteis e óxidos de nitrogênio, em presença de luz solar. Nesta camada atua sobre a saúde das populações irritando o sistema respiratório, e podendo causar perda da função dos pulmões, além de agravamento de asma em indivíduos suscetíveis a este tipo de enfermidade. Com relação aos impactos ambientais, o

O₃ troposférico causa danos à vegetação e à agricultura, pois age como inibidor da fotossíntese, provocando também lesões em folhas de plantas, além de contribuir para o aquecimento global, pois é um gás estufa. Devido ao seu elevado poder oxidante é capaz de danificar materiais, como a borracha e o couro, tornando-os quebradiços. Como padrão primário e secundário a legislação brasileira limita a concentração média horária de O₃ em 160 µg m⁻³ (Abrantes, 2005). Estudos epidemiológicos mostram que as variações diárias de partículas finas e ultrafinas são associadas às taxas de morbidade e mortalidade na população em geral, principalmente causando efeitos tóxicos nos aparelhos respiratórios e cardiovasculares (Maroni, 2004).

Muitos estudos relacionam a poluição com o aumento dos índices de mortalidade em idosos, recém nascidos e pessoas com a saúde debilitada (Farhat, 2005; Lin, 2004; Braga, 2001; Lin, 1999). Muitas vezes, famílias pobres residem em áreas com má higiene e próximas a centros com altos níveis de poluição trazendo malefícios à saúde de suas crianças, nestes ambientes os níveis dióxido de nitrogênio, material particulado e outros compostos químicos, na atmosfera estão intimamente relacionados ao aumento de hospitalizações de crianças asmáticas (Rauh, 2008)

Outro estudo que confirma tais achados constatou uma queda no número de crianças internadas na Califórnia entre 1992 e 1998, em períodos de queda dos níveis de poluição atmosférica, ocasionando uma economia de 5.2 milhões de dólares aos hospitais (Neidell, 2004). Neste contexto, vê-se a necessidade de mais estudos correlacionando os efeitos da poluição na população para incentivar medidas sócio-políticas que possam melhorar as condições do ar e,

conseqüentemente diminuir os efeitos maléficos às populações diretamente expostas aos agentes agressores diariamente.

Poluição e Mutagênese:

Um dos métodos utilizados para se estudar a ocorrência de mutações é o teste de micronúcleos, que consiste em se verificar a freqüência de danos cromossômicos “in vivo” em células nucleadas (Soares SRC 2001). Os micronúcleos são corpos nucleares citoplasmáticos, fragmentos cromossômicos condensados que não estão incluídos no núcleo. No Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da USP, a planta *Tradescantia pallida* que já estava sendo usada com muito sucesso para o monitoramento da genotoxicidade de vários agentes através do estudo de Mn, foi utilizada para demonstrar a mutagenicidade secundária à exposição crônica à poluição atmosférica in vivo. Quando exposta à poluição, altos níveis de Mn. são encontrados e também altas concentrações de agentes poluentes e metais pesados puderam ser detectadas através de análise química de suas estruturas (Sumita NM et.al., 2003). Por ocasião de uma greve de ônibus em São Paulo foi possível avaliar o efeito dessa parada de emissão de poluentes agudamente na atmosfera da cidade. A planta *Tradescântia* foi utilizada como indicador biológico. Usando-se o teste de Mn, observou-se uma significativa redução na freqüência de

aparecimento de Mn nas células vegetais, diretamente relacionada à diminuição da concentração de material particulado e gases poluentes no período de greve.

A planta *Tradescântia* foi utilizada também na Índia em Varanasi, em outubro de 2006 a abril de 2007. Através do teste de micronúcleos observou-se a genotoxicidade dos poluentes na cidade de Varanasi. Quatro locais da cidade foram selecionados, três no centro da cidade com características de tráfego diferentes, e um quarto local, que não sofria influência da poluição atmosférica derivada do tráfego. Amostras da planta foram coletadas, durante o período de estudo e a frequência de micronúcleos foi determinada em cada amostra. Durante o mesmo período a concentração de diferentes poluentes foi também medida. O teste de micronúcleos demonstrou que as plantas retiradas de áreas de maior concentração de tráfego, evidenciaram maior incidência de micronúcleos, quando comparadas a aquelas amostras retiradas do local controle. Houve um aumento na incidência de micronúcleos nos locais de maiores concentrações de poluentes. O estudo confirmou que o uso da *Tradescântia* como biomonitor é um método simples e eficaz para a determinação de agentes genotóxicos presentes na poluição atmosférica (Prajapati SK, 2008).

Bolognesi e colaboradores, em 1997 correlacionaram os efeitos da poluição em policiais de trânsito tendo como grupo controle indivíduos fumantes que não estavam em contato direto com a poluição urbana. Nesse estudo, utilizou-se o teste de micronúcleos em linfócitos como ferramenta de detecção dos efeitos mutagênicos da poluição, observando-se um maior nível de ocorrência de micronúcleos nos fumantes e não havendo relação com a exposição direta à

poluição.

Il'Inskikh e colaboradores, na Sibéria em 1998, após o acidente da estação atômica, mostraram a relação entre os altos níveis de Mn em eritrócitos e a radiação atmosférica na população local. Nas crianças nascidas próximas à data do acidente, também foram detectadas células (eritrócitos) com maior incidência de Mn, permanecendo no sangue por um longo período.

Lahirit e colaboradores, em Calcutá em 2000 investigaram a resposta inflamatória pulmonar (sintomas respiratórios, citologia de escarro) em 153 crianças expostas cronicamente a ambientes com poluição e em 116 moradores de uma cidade rural com idade entre 6 e 17 anos. Foram feitos também os testes de Mn. em células epiteliais bucais. Todas as avaliações demonstraram que as crianças de Calcutá sofreram várias reações e anomalias genéticas nos tecidos estudados expostos à poluição.

Amostragem passiva dos poluentes:

Recentemente têm-se verificado diferenças na análise de concentrações de poluentes em certos microambientes de exposição. Certos grupos ocupacionais se encontram constantemente imersos em ambientes de altas concentrações de poluentes diversos, que muitas vezes não correspondem às concentrações medidas por estações localizadas em outros pontos da cidade. Para se conferir maior realidade às condições ambientais das populações estudadas, foram

desenvolvidos instrumentos portáteis de medição de poluentes, que podem ser facilmente colocados nos ambientes de trabalho e, portanto refletir diretamente a condição do ar inspirado no local. Um estudo em Paris, acompanhou 29 taxistas expostos a poluição durante seus dias de trabalho no período de 27 de janeiro à 27 de março de 1997. A concentração de monóxido de carbono (CO) foi medida num período de 8 horas por um monitor portátil, colocado no interior do veículo. As partículas finas em suspensão foram medidas através de um aparelho provido de uma bomba controladora de sucção portátil associada a um filtro de celulose (Zagury, 2000). Os óxidos de nitrogênio (NO e NO₂) foram medidos por amostragem passiva. Como resultado, observou-se que os taxistas foram expostos a altas concentrações desses poluentes. Em relação ao CO, encontraram concentrações abaixo das recomendadas pela Organização Mundial de Saúde. A situação foi menos satisfatória para os outros poluentes que apresentaram índices mais elevados do que as recomendadas principalmente no que se referiu ao material particulado fino. Estes fatos podem justificar os freqüentes problemas de saúde deste grupo ocupacional (Zagury, 2000).

Em estudo no centro da cidade de Belgrado (Rajic SF, 2004) verificando o material particulado (PM_{2.5} e PM₁₀) em três pontos da cidade, entre junho e dezembro de 2002, as partículas foram coletadas com filtros de teflon. O impacto dos fatores meteorológicos não foram imediatamente aparentes, mas houve uma significativa correlação negativa com a velocidade do vento. A cidade de Belgrado apresentou valores de PM₁₀ e PM_{2.5} maiores que as outras cidades européias. O estudo ressalta a interação da poluição com as condições climáticas locais.

Uma questão importante foi ressaltada em artigo publicado em 2005

(Nerriere E., 2005): “Podemos utilizar monitores atmosféricos fixos para estimar a exposição crônica da população em geral aos poluentes do ar?” Neste estudo, a exposição a PM10, PM2.5, e NO2 foi verificada concomitantemente, em quatro áreas metropolitanas francesas (Grenoble, Paris, Rouen, e Strasbourg), com a participação de adultos e crianças, voluntários não fumantes, os quais usavam amostradores individuais (Harvard Chempass multipollutant) durante 48h por duas vezes em diferentes estações (frio e calor). Em todas as cidades os voluntários foram separados de acordo com sua exposição diária (casa e trabalho/ escola), em três diferentes setores urbanos com respeito à poluição do ar (tráfego intenso, regiões industriais, e região urbana convencional sem particularidades). Foram observadas discrepâncias entre as medidas individuais quando comparadas às regionais nas populações estudadas. Este estudo realça a necessidade de maior atenção na escolha do mais apropriado monitor de acordo com os objetivos do trabalho.

Maroni em 2004 na Universidade de Milão publicou um artigo sobre poluição “in door” e “out door” enfatizando a importância de estudarmos mais, sobre o efeito tóxico em fumantes passivos e outros agentes químicos e biológicos presentes em residências e escritórios e dar atenção à subjetiva qualidade de ar “in door” em escritórios, prédios comerciais, escolas, hospitais. Observando a exposição de engraxates de rua, ao O3 no centro da cidade do México, comparando um amostrador individual ativo integrado, e as medidas ambientais de uma estação de monitoramento fixa, foi possível constatar que as concentrações ambientais foram aproximadamente 50 partes por bilhão mais altas em relação às exposições individuais. Associação entre a concentração ambiental

e pessoal de O₃ foi significativa, a razão entre pessoal e ambiental não foi constante, chegou-se à conclusão de que o uso do monitor “outdoor” pode não ser apropriado para medir a exposição ao O₃ e avaliar os efeitos nocivos a saúde desses trabalhadores (O’Neil, 2003).

Nosso estudo pretendeu avaliar os efeitos mutagênicos da poluição atmosférica sobre indivíduos expostos em São Paulo. Para tanto, estudamos a incidência de Mn em esfregaço de células epiteliais bucais. Tal metodologia tem mínima invasibilidade e nenhuma morbidade e reflete o que acontece no interior de células que se localizam em área diretamente exposta ao ar ambiente sendo uma das portas de entrada do sistema respiratório, portanto altamente expostas aos gases e poluentes.

OBJETIVOS

Estudar os efeitos mutagênicos da poluição atmosférica em habitantes da cidade de São Paulo.

Verificar a existência de uma possível interação entre o tabagismo e a poluição atmosférica na promoção de mutagênese.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Caracterização das cidades

São Paulo

São Paulo (figura 1) é um município brasileiro, capital do estado homônimo e principal centro financeiro, corporativo e mercantil da América Latina. Maior cidade do Brasil, das Américas e de todo o hemisfério Sul. Décima nona cidade mais rica do mundo, o município representa, isoladamente, 12,26% de todo o PIB brasileiro e 36% de toda a produção de bens e serviços do estado de São Paulo, sendo sede de 63% das multinacionais estabelecidas no Brasil, além de ser responsável por 28% de toda a produção científica nacional – IBGE 2005. Sua região metropolitana possui aproximadamente 19.200.000 habitantes, o que a torna a sexta maior aglomeração urbana do mundo. A cidade de São Paulo possui uma frota de aproximadamente 6 milhões de veículos. O congestionamento de veículos na cidade é recorrente, principalmente, mas não restrito, aos horários de pico. Desde 1996, a Prefeitura adota medidas paliativas para amenizar os problemas causados pelo trânsito, como a adoção do Rodízio Municipal, a restrição de estacionamentos (Zona Azul) e de circulação de caminhões e veículos de carga. O recorde de congestionamento da cidade foi o de 266 km, em março de 2008.

Hoje, como medidas para solucionar o problema do trânsito, estuda-se a ampliação do metrô, a construção de mais corredores de ônibus, o alargamento da Marginal Tietê e da Marginal Pinheiros, a construção do Rodoanel Metropolitano e a implementação de pedágio urbano.

Figura 1: Camada de poluição atmosférica visível na linha do horizonte da cidade de São Paulo. Fonte: Jornal O Estado de São Paulo.

Peruíbe

Peruíbe (figura 2) é um município do estado de São Paulo, situado na Região Metropolitana da Baixada Santista, na microrregião de Itanhaém (figura 3). A população estimada em 2008 era de 339.622 habitantes e a área de 326 km². Perúibe é um dos 15 municípios paulistas considerados estâncias balneárias pelo Estado de São Paulo, por cumprirem determinados pré-requisitos definidos por lei estadual. Tal *status* garante a esses municípios uma verba maior por parte do Estado para a promoção do turismo regional. Também, o município adquire o direito de agregar junto a seu nome o título de *Estância Balneária*, termo pelo qual passa a ser designado tanto pelo expediente municipal oficial quanto pelas referências estaduais. Não há problemas na incidência de poluentes atmosféricos em altas concentrações na cidade de Perúibe.

Figura 2: Vista aérea da cidade de Peruíbe, litoral sul de São Paulo. Fonte: CETESB.

Cidade de São Paulo

Cidade de Peruíbe

Figura 3: Localização geográfica de São Paulo e Peruíbe. Fonte: CETESB.

População de estudo:

A população de estudo foi composta por 22 trabalhadores das floriculturas da Av. Dr. Arnaldo e 17 funcionários da FMUSP. Foram incluídos no estudo indivíduos fumantes e não fumantes, para posterior comparação. Uma população controle foi estudada na cidade de Peruíbe, composta por 24 indivíduos. Todos os indivíduos que concordaram voluntariamente em participar do estudo responderam a um questionário sobre hábitos (tabagismo, etilismo, etc) bem como sobre o uso de medicamentos e doenças pré-existentes (ANEXO I). Além disso, todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Amostragem passiva de poluentes:

Foram colocadas estações portáteis medidoras de níveis de poluentes (figura 4) nos locais a serem estudados, posteriormente correlacionados com as medidas realizadas pela CETESB. As medidas de NO₂ e O₃ foram feitas por amostradores passivos, que foram desenvolvidos pelo Laboratório de Poluição Atmosférica da Faculdade de Medicina da USP, no sentido de reduzir os custos, que consistem na colocação de filtros de celulose em tubos plásticos de filmes fotográficos fixados em um tábuas de $\pm 15\text{cm}$ por 30cm contendo 6 orifícios. Esses

tubos plásticos contêm uma abertura para o meio ambiente. Estes filtros são embebidos em soluções capazes de reagir com os poluentes de interesse.

Figura 4: amostrador passivo

Após a exposição dos filtros de NO₂ (figura 5), foi feita a extração dos reagentes em solução adequada e a leitura por colorimetria. O monitoramento passivo de NO₂ baseia-se no método descrito por Lodge, utilizando o princípio da difusão de NO₂ atmosférico. Os filtros de celulose foram impregnados com uma solução absorvente específica que contém três reagentes: a trietilonamina, o-metoxifenol (guaicol) e o metabissulfito de sódio. Íons nitrito são formados como produto final desta reação. Estes íons são extraídos em solução de água oxigenada, sulfalinamida e 8-anilino-1-nafitalenosulfônico, sendo posteriormente titulada por método de colorimetria, permitindo que através de uma curva de calibração, calcule-se a concentração média do NO₂ durante o período de

exposição.

Figura 5: Filtro de NO₂.

Para a análise da concentração de O₃ acumulado nos filtros foi utilizado um refletômetro da marca EEL Smokestain Reflectometer, mod. M43D, UK. Esse instrumento é formado por um caneco sensor que possui uma lâmpada que emite luz com intensidade invariável e um “medidor”. A luz emitida atinge a superfície cuja refletância queremos medir, sendo recebida por uma célula fotovoltaica especial que gera uma tensão, a qual é enviada ao sistema medidor que processa este sinal, linearizando, amplificando e mostrando o resultado já convertido em porcentagem de refletância. O filtro de celulose é embebido em solução de Indigo Carmim e colocado em posição horizontal embaixo do caneco sensor. Quanto maior a luz refletida, maior a refletância da superfície e maior a energia gerada

pela célula fotovoltaica. A refletância de cada filtro foi determinada em dois momentos: imediatamente após a impregnação do filtro com a solução reagente pré-exposição e após a exposição (figura 6). Desse modo foi considerada a refletância de cada filtro e a diferença da refletância entre esses dois momentos. (Annes da Silva, 2007).

Figura 6: filtros com a solução reagente para O₃ pré-exposição e após a exposição.

Para a medida de material particulado foi utilizado o método gravimétrico. Num sistema de exposição constituído por duas estruturas cilíndricas de alumínio medindo 2.0 m de diâmetro e 2.15 m de altura cobertas por um plástico filme UV, o ar entra pela base de uma das estruturas cilíndricas e é distribuído uniformemente pelo seu interior. O ar é forçado para dentro da estrutura e sai no

topo onde há uma abertura, é um sistema normobárico, onde a pressão interna não ultrapassa 30 mm H₂O. O sistema de filtragem é composto por três estágios, o primeiro elimina as partículas maiores (plain e bag filtros), o segundo (modelo JFL-90), e o terceiro (High Efficiency Particulate air, HEPA) adere as partículas finas (figura 7). A outra estrutura cilíndrica recebe ar ambiente sem pressão. Após 24h de exposição, as concentrações de PM são determinadas gravimetricamente usando impactores Harvard (Air Diagnostics, Harrison, ME), (Lopes 2009). Tal metodologia foi desenvolvida no LPAE da FMUSP, sendo que os resultados apresentaram boa correlação com as medidas efetuadas pelas estações da CETESB.

Figura 7: filtros para material particulado, antes da exposição e após exposição de 24h ao ar de São Paulo.

Teste de micronúcleos:

A metodologia utilizada para se avaliar os efeitos mutagênicos foi o Teste de Micronúcleos em esfregaço de mucosa oral. No período de março a julho de 2006, foram colhidas amostras de esfregaço da mucosa jugal, com o auxílio de uma espátula de madeira. As lâminas foram secas à temperatura ambiente, fixadas em álcool 70. Após esse procedimento, as mesmas foram coradas pela técnica de Papanicolaou (Soares SRC, 2001). A seguir, as amostras foram submetidas à contagem de micronúcleos em microscopia óptica, sob o aumento de 400X. Foram analisadas 500 células por lâmina. (Figura 8).

Figura 8: Detalhe de esfregaço da mucosa jugal, mostrando célula epitelial com micronúcleo evidente (seta). Aumento de 400X.

Os micronúcleos são corpos nucleares citoplasmáticos, fragmentos cromossômicos condensados que não estão incluídos no núcleo, por não estarem aderidos ao fuso durante a anáfase das células filhas. Representam fragmentos cromossômicos deixados no citoplasma na citocinese, refletindo prováveis áreas de mutação cromossômica (Figuras 9).

Figura 9: fases da divisão celular – mitose. (Fonte: modificado de “o ciclo celular e suas fases”; e-portfolio)

Segundo a IAEA (International Atomic Energy Agency - 2001), os critérios para a análise e quantificação de micronúcleos incluem as seguintes

especificações:

a) O diâmetro do micronúcleo em células de humanos, usualmente varia entre $1/16$ e $1/3$ do diâmetro do núcleo principal.

b) Os micronúcleos não são refringentes e podem ser distinguidos dos artefatos como partículas do corante.

c) Os micronúcleos não estão conectados ao núcleo principal.

d) Os micronúcleos possuem membrana separada da membrana nuclear, visível ao microscópio.

e) Os micronúcleos têm a mesma intensidade de coloração dos núcleos principais, mas ocasionalmente, podem ter coloração mais intensa.

Obedecemos estes critérios para a quantificação dos micronúcleos nas amostras estudadas.

Análise estatística

Para a análise da incidência de micronúcleos por célula e a avaliação da concentração dos poluentes, todos os dados foram testados para caracterizar sua distribuição normal ou não normal. Utilizamos Teste-T para análise de dados de distribuição normal ou Mann-Whitney para não normal. O programa Statistical Package for Social Sciences SPSS 15 foi empregado, e a significância foi fixada em 5%.

Resultados

Caracterização da população estudada

Durante o estudo foram coletadas amostras (esfregaços de mucosa oral) de 63 voluntários, sendo 39 em São Paulo, e 24 voluntários controle representados pelos habitantes de Peruíbe, litoral sul de São Paulo. Efetuamos uma média de 4 a 6 coletas por indivíduo num total de aproximadamente 350 lâminas para leitura. Foram analisadas 500 células por amostra, sendo computados os índices de ocorrência de micronúcleos em cada amostra.

Nenhum dos grupos estudados mostrou diferenças significantes no que diz respeito a estilo de vida ou fatores pessoais, tais como: hábitos alimentares, comorbidades.

	<i>São Paulo N 39</i>	<i>Peruíbe N 24</i>
Idade (média± DP)	37± 6	32± 8
Sexo	20 fem 19 masc.	11fem 13 masc.
Tabagista	13	11
Co-morbidades	1 diabetes	0
	1 hipertensão	

Tabela 1: descrição da população estudada em São Paulo e Peruíbe.

Monitoramento da poluição do ar:

Amostras de NO₂ e O₃ Foram coletadas através da exposição de filtros de celulose, embebidos com suas respectivas soluções e colocados em amostradores passivos nos locais de coleta, durante 12 semanas 3 filtros de cada poluente por semana num total de 72 filtros expostos e posteriormente interpretados. Os filtros eram colocados nos locais de exposição, sempre uma semana antes das coletas de esfregaço de mucosa oral. Os dados eram obtidos através das leituras dos filtros, colorimetria para o NO₂ e refletância no caso do O₃ (refletância inicial, antes da exposição e final, após a exposição. Sendo que a diferença entre os dois resultados representava o valor de interesse), esses resultados eram sempre comparados aos dados da CETESB, nas mesmas datas.

Como, nas duas cidades, a concentração de poluição atmosférica é representada predominantemente pelo tráfego automotivo e por ter havido alguns problemas técnicos com as medições de O₃ e PM em Peruíbe, o NO₂ foi escolhido para se comparar os níveis de poluição nas duas cidades. Apresentaremos a seguir a análise destes elementos durante o período de coleta das amostras de esfregaço de mucosa oral.

Concentração de Ozônio em São Paulo

<i>Date</i>	O3 Amostr. Passivo($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
29/03/06	24,37
10/05/06	24,15
24/05/06	24,12
31/05/06	24,55
12/06/06	24,60
19/06/06	32,62
12/07/06	24,53
19/07/06	-

Tabela 2: Dados da concentração de O3 em São Paulo de março a julho de 2006. (exposição 24h).

Concentração de Material Particulado em São Paulo (PM).

<i>Date</i>	PM10-CETESB $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Pm2,5-método gravimétrico($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
29/03/06	37	12,59
10/05/06	28	26,9
24/05/06	29	24,32
31/05/06	29	17,5
12/06/06	46	24,96
19/06/06	36	27
12/07/06	44	41,85
19/07/06	75	39,64

Tabela 3: Medição de material particulado em São Paulo de março a julho de 2006. (exposição 24h).

Concentração de NO₂

A tabela 4 mostra a concentração de NO₂ em São Paulo e Peruíbe medida pela CETESB e amostradores passivos, durante o período de coleta dos esfregaços de mucosa oral.

<i>Data</i>	<i>NO₂(SP) CETESB µg/m³</i>	<i>NO₂(SP) passivo (µg/m³)</i>	<i>NO₂ (Peruíbe) Passivo (µg/m³)</i>
29/03/06	88	109,36	Indetectável
10/05/06	95	123,65	30,33
24/05/06	90,33	128,87	29,37
31/05/06	120,57	123,08	Indetectável
12/06/06	100,14	100,24	8,30
19/06/06	109,57	140,84	Indetectável
12/07/06	121,42	126,63	Indetectável
19/07/06	112,85	—	—

Tabela 4: concentração de NO₂ em São Paulo e Peruíbe de março a julho de 2006 (µg/m³). (exposição 24h).

Podemos observar que a concentração de todos os poluentes é inferior à concentração recomendada pela OMS (Organização Mundial de Saúde), e mesmo nesses níveis baixos constatamos os efeitos nocivos da poluição atmosférica

sobre a população, levando aos altos índices de micronúcleos nos voluntários respondedores. A tabela 5 compara as concentrações dos poluentes medidos e os níveis aceitos pela OMS.

Concentrações	MAX.	MIN.	Padrão	de Organização
Poluentes	24horas(mg/m³)	24horas(mg/m³)	qualidade do ar primário(mg/m³) (CONAMA)	Mundial de saúde(OMS)
NO₂out(CETESB)	121,42	88	320(1hora) 100(MAA)	200(1hora) 40 anual
NO₂out(passivo)	82,43	64,60		
O₃out(passivo)	32,62	24,12		
PM₁₀outCETESB)	75	29	150(24horas) 50(MAA)	50(24horas) 20(média anual)
PM_{2,5}out(passivo)	41,85	12,59		

Tabela 5: Comparação das concentrações dos poluentes medidos, com padrão de qualidade do ar primário e níveis aceitos pela OMS. MAA- média aritmética anual.

A figura 10 mostra os níveis de NO₂ em São Paulo comparados aos de Perúibe. Observamos diferença marcante nos níveis de NO₂ comparando-se as duas cidades, refletindo os níveis de poluição observados.

Figura 10: concentração de NO₂ medida por amostradores passivos em São Paulo e Perúibe. Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,000$).

Análise de micronúcleos:

Os resultados referentes à concentração de MN/cells mostraram uma diferença estatística significativa comparando SP ($0,042 \pm 0,032$) and Per ($0,023 \pm 0,019$), $p= 0,009$. Observamos também um aumento da incidência de MN/cells nos fumantes quando comparados aos não fumantes em SP ($0,055 \pm 0,012$ e $0,040 \pm 0,005$), $p<0,001$ e em Peruíbe ($0,0268 \pm 0,00167$ e $0,0181 \pm 0,00128$), $p<0,001$ (fig 11).

Figure 11: Incidência de micronúcleos (mn/cel) em São Paulo e Peruíbe entre fumantes e não fumantes, observamos diferença estatisticamente significativa tanto em São Paulo como em Peruíbe (* $p < 0,001$).

Figura 12: aspecto citológico do esfregaço da mucosa oral de um habitante de Peruíbe (A) e outro de São Paulo (B), ambos não fumantes. Observe a evidente diferença quanto à incidência de micronúcleos (setas). Aumento de 400x, corado pela técnica de papanicolaou.

(A)

(B)

A figura 13 mostra as diferenças na incidência de micronúcleos (setas) entre os fumantes de São Paulo e Peruíbe, sugerindo que a poluição atmosférica pode ter um efeito sinérgico ao tabagismo.

Figura 13: Incidência de micronúcleos por célula (Mn/cel.) em fumantes e não fumantes em São Paulo e Peruíbe. Observe a variação dependente tanto da cidade de residência como do tabagismo.

A incidência de micronúcleos em fumantes de São Paulo, é estatisticamente maior quando comparada aos fumantes de Peruíbe ($p < 0,001$), como mostra a figura 14.

Figura 14: Incidência de micronúcleos (Mn/cel) em fumantes de São Paulo e Peruíbe ($p < 0,001$).

A idade foi o fator de maior impacto na contagem de micronúcleos. Observamos um efeito positivo da idade, que pode ser notado após décadas de exposição à poluição atmosférica, como se pode notar na figura 15.

Figura 15: Média de micronúcleos por células (Mn/cel) nos indivíduos estudados divididos por grupos de idade (azul de 20 a 33 anos e verde de 34 a 45 anos) e por percentis de concentração de NO₂ (1=88µg/m³, 2=100,14µg/m³, 3=120µg/m³).

Análise da Incidência de micronúcleos em São Paulo: resposta individual.

Através do programa Graphpad Prism, foram calculadas as integrais de cada paciente com base na incidência de micronúcleos por célula e a concentração de cada poluente em todas as semanas de exposição. Com estes resultados construímos gráficos individuais, para que futuramente possamos estudá-los mais detalhadamente verificando os fatores que realmente influenciam a resposta individual.

Uma marcante resposta individual foi notada. Alguns indivíduos responderam aos elevados níveis de poluição do ar, com alta incidência de micronúcleos, porém, outros não responderam da mesma forma aos mesmos níveis de poluição. Apresentaremos a seguir alguns gráficos de voluntários respondedores (Figuras 16, 17, 18) e não respondedores (Figuras 19, 20, 21) às concentrações de NO₂, por ter sido este o poluente escolhido como marcador de poluição.

Voluntários Respondedores:

Voluntários não respondedores:

Discussão

O Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da FMUSP (LPAE) apresenta uma longa trajetória estudando as repercussões da poluição atmosférica na saúde dos habitantes da cidade de São Paulo. Durante esta trajetória, inicialmente modelos de exposição foram criados dentro do laboratório, como câmaras de intoxicação, tentando mimetizar o ambiente externo expondo os animais de laboratório a condições atmosféricas artificiais. A seguir, animais e plantas foram levados a habitar regiões dentro e fora da cidade de São Paulo por períodos prefixados, sendo analisados após estas exposições. No presente estudo, o laboratório utilizado foi a própria cidade, e os indicadores dos efeitos nocivos da poluição ambiental foram observados diretamente em seus habitantes. Para tanto, uma ferramenta simples, de baixo custo e principalmente não invasiva e sem nenhum risco, se fazia necessária. O teste de micronúcleos em esfregaço da mucosa oral é de fácil execução e leitura, e de boa confiabilidade se forem seguidos os critérios de análise especificados pela IAEA.

Os resultados de nosso estudo confirmam evidências anteriores sugestivas de uma associação entre a poluição atmosférica e danos citogenéticos em células do epitélio oral (Chen, 2006). As vias aéreas superiores atuam de forma bastante eficiente no sentido de impedir o acesso aos alvéolos de uma fração significativa dos poluentes contidos no ar que respiramos, pelas condições de turbulência do fluxo do ar inspirado, que favorece a impactação e a filtração do ar inspirado. Por outro lado, a retenção dos poluentes nas vias aéreas superiores favorece o

desenvolvimento de patologias desse segmento do trato respiratório. (Lemos M., 1994). A poluição provoca uma disfunção do aparelho mucociliar, com redução da frequência de batimento ciliar. Em consequência, pode haver um aumento da vulnerabilidade para a instalação de doenças respiratórias na população exposta. Há um aumento em 25% das consultas por doenças respiratórias nos prontos-socorros, quando a poluição é maior. (Santos UP, 2008).

A decisão de se utilizar apenas o NO₂ como poluente marcador de poluição atmosférica pode ser questionada. Tivemos algumas dificuldades para refletir as condições de exposição individual da maneira mais fiel possível. Os monitores passivos só estão disponíveis para marcação de NO₂ e Ozônio, sendo que em Peruíbe, o corante dos filtros para medição de ozônio (índigo carmim) reagiu com o cloro do oceano e os filtros pós-exposição apresentaram uma refletância final muito alta, por esse motivo foram descartados. Não foi possível a medição do material particulado através do método gravimétrico em Peruíbe, devido à impossibilidade de transporte da aparelhagem necessária. Além disso, não existem estações medidoras da CETESB em Peruíbe ou na região. Embora a diferença de concentração de NO₂ seja nítida entre SP e Peruíbe e a detecção de concentração de NO₂ seja um método confiável para representar os níveis globais de poluição atmosférica, se tivéssemos mais dados com relação aos outros poluentes (O₃ e PM), nosso estudo seria mais completo. Atualmente, um poluente dos mais importantes é o monóxido de carbono, do qual são emitidas 1,9 milhão de toneladas por ano. Suas principais fontes são os carros a gasolina (49%), os veículos a diesel (28%) e os carros a álcool (17%). Grandes concentrações desse poluente prejudicam a oxigenação do organismo, causando

diminuição dos reflexos e da percepção visual. Os outros poluentes mais importantes são os hidrocarbonetos (430 mil toneladas por ano), óxido de nitrogênio (escolhido por nós como parâmetro - 450 mil toneladas), óxido de enxofre (130 mil toneladas) e material particulado (núcleo de carbono no qual se aderem várias substâncias tóxicas, como compostos de enxofre e nitrogênio e metais - 95 toneladas). No caso da cidade de São Paulo, as indústrias são responsáveis pela emissão apenas das partículas inaláveis (10%) e de dióxido de enxofre (15%). O restante é emitido por veículos. No inverno, estação caracterizada no Centro-Sul e Sul do País pela pouca ocorrência de chuvas e ventos - que são os fatores responsáveis pela dispersão de poluentes - e época em que acontecem com frequência as inversões térmicas, os índices de poluição aumentam na cidade. As pessoas mais afetadas com a poluição nos centros urbanos são aquelas pertencentes aos chamados grupos de risco, que são as crianças desnutridas, os idosos e pessoas que já sofrem de alguma enfermidade, como asma e bronquite crônica. (Miraglia SG, 2005).

Os padrões de qualidade do ar são eficientes para preservar a saúde da média da população, mas não impedem efeitos adversos, especialmente sobre os grupos mais suscetíveis da sociedade. Na verdade, entre um dia sem poluição para outro de inversão térmica há uma variação do excesso de mortes, em aproximadamente, de 12 a 14% entre idosos e em crianças de 10% por doenças respiratórias. (Arbex MA, 2009).

Residir em uma localização geográfica caracterizada pela elevada exposição à poluição atmosférica também se confirma como um fator importante, influenciando o potencial mutagênico do organismo. Os resultados corroboram a hipótese de que a poluição do ar, principalmente a proveniente do tráfego de veículos, pode provocar danos citogenéticos em células do epitélio oral em adultos saudáveis. Além disso, o presente trabalho foi bem-sucedido em demonstrar uma associação positiva entre tabagismo e poluição do ar, a qual é percebida após décadas de exposição. Karahalil num estudo em trabalhadores de trânsito (taxistas, monitores de trânsito e policiais) verificou aumento da frequência de micronúcleos em células epiteliais da mucosa bucal destes trabalhadores quando comparados a trabalhadores não expostos diretamente à poluição ambiental, não encontrando diferenças entre fumantes e não fumantes. Diferente deste estudo, nossos resultados mostram ação sinérgica entre a exposição crônica à poluição e o hábito de fumar. Tal fato pode se dever ao elevado nível de aldeídos em nossos combustíveis em comparação aos de outros países. Os aldeídos são formados na atmosfera, por reações fotoquímicas envolvendo hidrocarbonetos e também liberados na combustão dos motores. Além de sua toxicidade estar relacionada com suas propriedades irritantes, com efeito sobre olhos, nariz e garganta, é evidente seu envolvimento na gênese de neoplasias. A cada dia, com o aumento da frota urbana, a população fica mais exposta e por mais tempo ao formaldeído gerado. A International Agency for Research on Cancer (IARC), recentemente classificou o formaldeído como agente carcinogênico causando câncer nasofaríngeo, havendo também evidências fortes mas não suficientes de que ocorra uma associação entre leucemia e exposição ocupacional ao formaldeído.

Há uma hipótese que o formaldeído ataque o sistema hematopoiético, ou as células progenitoras que estão na circulação sanguínea ou na passagem nasal, que depois se dirigem à medula e se tornem células leucêmicas. (Zhang L, 2009).

Interessante ressaltar que embora um aumento na incidência global de micronúcleos tenha sido observado em São Paulo em relação à Peruíbe, uma marcante resposta individual foi notada. Alguns indivíduos responderam aos elevados níveis de poluição do ar, com alta incidência de micronúcleos, porém, outros não responderam da mesma forma aos mesmos níveis de poluição. Esta observação sugere que outros fatores tais como: hábitos alimentares, predisposição genética, e idade também devam estar envolvidos.

O LPAE já estudou o papel da exposição crônica à poluição atmosférica urbana em causar danos ao DNA (frequência de micronúcleos em eritrócitos) em roedores. Como no presente estudo, o envelhecimento, fator relacionado diretamente ao tempo de exposição, foi uma questão importante. A frequência de micronúcleos aumentou com o envelhecimento, com os maiores valores obtidos para o 90º dia do experimento, sugerindo os efeitos cumulativos da exposição à poluição do ar (Soares SR, 2003). Os chamados efeitos crônicos da poluição sobre a saúde se caracterizam por alterações orgânicas, muitas vezes irreversíveis, que se processam ao longo de meses ou anos de exposição contínua a um ar inadequado. Os problemas de saúde nos animais expostos à poluição do ar decorreram de alterações inflamatórias difusas do tecido respiratório, que se estendem das vias aéreas superiores até os alvéolos pulmonares. No processo de troca do ar entre o meio externo e os pulmões, ficam aderidas sobre o muco respiratório substâncias e partículas inaladas que são

removidas através da ação do batimento ciliar (cílios localizados no canal respiratório). (Fló-Neyret C, 2001).

Ou seja, uma exposição prolongada à poluição por meses ou anos pode levar uma pessoa sadia a ficar doente. Por estar exposto a agentes cancerígenos do cigarro e da poluição, o fumante, em São Paulo, corre mais risco de contrair câncer de pulmão do que aquele de uma cidade não poluída.

Apesar de trazer à tona observações e dados de interesse prático, nosso estudo apresenta várias limitações. A principal delas é devida ao reduzido número de indivíduos estudados, principalmente pela dificuldade em se conseguir voluntários. Outros fatores que limitam nossos achados são a falta de dados sobre o local de moradia que diferia bastante entre os indivíduos analisados, e não foi passível de uniformização. O efeito da poluição é maior quanto maior for o índice de pobreza da região. Ele é indiretamente proporcional à porcentagem de pessoas com renda ou nível de educação superior. (Martins MC, 2004). Hábitos alimentares também são fatores a serem levados em conta como, por exemplo, uma dieta deficiente em ácido fólico. A falta de ácido fólico pode aumentar a suscetibilidade à quebra cromossômica. Existem sítios específicos nos cromossomos que apresentam uma falha de coloração, tendo um aspecto de constrição; esses sítios foram denominados sítios frágeis. Eles parecem ser locais nos cromossomos suscetíveis a quebras. Existem 17 sítios frágeis mapeados no genoma humano que ocorrem em metáfases exatamente nos mesmos pontos em qualquer indivíduo. O grupo mais comum de sítios frágeis é induzido por um meio de cultura pobre em ácido fólico e, portanto são chamados sítios sensíveis ao

folato, são herdados como caracteres mendelianos codominantes, indicando uma sequência de DNA única no sítio frágil. (Endoh K, 2007).

O presente estudo confirma os perigosos efeitos da poluição do ar promovendo mutagênese e sugere que estes efeitos possam ser semelhantes e sinérgicos aos observados em indivíduos fumantes. Esperamos que nosso trabalho, por refletir diretamente a situação de exposição dos habitantes da cidade, possa influenciar hábitos e políticas públicas, a fim de melhorar a saúde pública neste tema.

Conclusões

A poluição atmosférica em São Paulo apresenta potencial mutagênico, verificado através da alta incidência de micronúcleos por célula na mucosa oral dos indivíduos respondedores. O efeito da poluição atmosférica sobre esses indivíduos parece ser mediado pela dose dos poluentes e tempo de exposição.

Verificamos também que parece haver um efeito sinérgico na promoção de mutagênese, entre poluição e tabagismo.

REFERÊNCIAS

Abrantes R, Assunção JV, Hirai EY. 2005. Caracterização das emissões de aldeídos de veículos do ciclo diesel. Rev. Saúde Pública vol.39 no.3 São Paulo June.

Akinaga LM, Lichtenfels AJ, Carvalho-Oliveira R, Caldini EG, Dolhnikoff M, Silva LF, Bueno HM, Pereira LA, Saldiva PH, Garcia ML. 2009. Effects of chronic exposure to air pollution from Sao Paulo city on coronary of Swiss mice, from birth to adulthood. Toxicol Pathol. 37 (3) : 306-14. Epub Feb 27.

Arantes-Costa FM, Lopes FD, Toledo AC, Magliarelli-Filho PA, Moriya HT, Carvalho-Oliveira R, Mauad T, Saldiva PH, Martins MA. 2008. Effects of residual oil fly ash (ROFA) in mice with chronic allergic pulmonary inflammation. Toxicol Pathol; 36(5):680-6.

Arbex MA, Conceição GMS, Cendon SP, Arbex FF, Lopes AC, Moyses EP, Santiago SL, Saldiva PH, Pereira LA, Braga AL. Urban Air Pollution and COPD-related Emergency Room Visits 2009. J Epidemiol Community Health May 24.

Bascom R, Bromberg PA, Costa DL, et al. 1996. Health effects of outdoor air pollution. Am J Respir Crit Care Med 153:477-498.

Braga AL, Saldiva PH, Pereira LA, Menezes JJ, Conceição GM, Lin CA, Zanobetti A, Schwartz J, Dockery DW. 2001. Health effects of air

pollution exposure on children and adolescents in São Paulo, Brazil. *Pediatr Pulmonol.* Feb;31(2):106-13.

Campos VP, Costa AC, Tavares TM. 2006. Partial neutralization of rain by seaspray: the case of Recôncavo, Bahia-Brazil. *J Environ Manage.* 2007 Jul;84(2):204-12. Epub Sep 18.

Celik A, Cava T, Ergene-Gözükara S. 2003. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Oxford Journals Mutagenesis* vol. 18 no. 5 pp. 417-421, September.

Chen C, Arjomandi M, Qin H, Balmes J, Tager I, Holland N. 2006. Cytogenetic damage in buccal epithelia and peripheral lymphocytes of young healthy individuals exposed to ozone *Mutagenesis.* Oxford Journals 21(2):131-137; doi:10.1093/mutage/gel007.

Dockery DW, Pope CA. 1994. Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu Rev Public Health*;15:107-132.

Endoh K, Murakami M, Sugiyama T, Taki Y, Umegaki K. 2007. Low folate status enhanced benzene-induced cytogenetic damage in bone marrow of mice: a relationship between dietary intake and tissue levels of folate. *Nutr Cancer.*;59(1):99-105.

Farhat SC, Paulo RL, Shimoda TM, Conceição GM, Lin CA, Braga AL, Warth MP, Saldiva PH. 2005. Effect of air pollution on pediatric respiratory emergency room visits and hospital admissions. *Braz J Med Biol Res.* Feb;38(2):227-35.

Fernando Luis Annes da Silva, 2007. Mestrado em ciências, Universidade de São Paulo USP. Uso de bioindicadores vegetais para avaliação de poluentes em microescala vertical .

Fló-Neyret C, Lorenzi-Filho G, Macchione M, Garcia ML, Saldiva PH. 2001. Effects of formaldehyde on the frog's mucociliary epithelium as a surrogate to evaluate air pollution effects on the respiratory epithelium. *Braz J Med Biol Res* May;34(5):639-43.

International Atomic Energy Agency (IAEA). Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. 2001. Technical report series. Vienna, n. 405.

Kan H, London S J, Chen G, Zhang Y, Song G, Zhao N, Jiang L, Chen B, 2007. Differentiating the effects of fine and coarse particles on daily mortality in Shanghai, China. *Environ Int.* 2007 Apr. 33(3):376-84. Epub Jan. 16.

Karahalil B, Karakaya AE, Burgaz S. 1999. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res.* Jun 7;442(1):29-35.

Lahiri T, Roy S, Basu C, Ganguly S, Ray MR, Lahiri P. 2000. Air pollution in Calcutta elicits adverse pulmonary reaction in children. *Indian J Med Res.* Jul; 112:21-6.

Laks D, de Oliveira RC, de André PA, Macchione M, Lemos M, Faffe D, Saldiva PH, Zin WA. 2008. Composition of diesel particles influences acute pulmonary toxicity: an experimental study in mice. *Inhal Toxicol.* Sep;20(11):1037-42.

Lemos M, Lichtenfels AJ, Amaro Júnior E, Macchione M, Martins MA, King M, Böhm GM, Saldiva PH. 1994. Quantitative pathology of nasal passages in rats exposed to urban levels of air pollution. *Environ Res.* 1994 Jul;66(1):87-95.

Lin CA, Martins MA, Farhat SC, Pope CA, Conceição GM, Anastácio VM, Hatanaka M, Andrade WC, Hamaue WR, Böhm GM, Saldiva PH. Air pollution and respiratory illness of children in São Paulo, Brazil. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 1999 Oct; 13(4):475-88

Lin CA, Pereira LA, Nishioka DC, Conceição GM, Braga AL, Saldiva PH. 2004. Air pollution and neonatal deaths in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2004 May; 37(5):765-70. Epub Apr 22.

Lopes FD, Pinto TS, Arantes-Costa FM, Moriya HT, Biselli PJ, Ferraz LF, Lichtenfels AJ, Saldiva PH, Mauad T, Martins MA. . 2009. Exposure to ambient levels of particles emitted by traffic worsens emphysema in mice. *Environ Res.* Apr 9.

Maheswaran R, Haining RP, Brindley P, Law J, Pearson T, Fryers PR, Wise S, Campbell MJ. 2005. Outdoor Air Pollution and Stroke in Sheffield, United Kingdom: A Small-Area Level Geographical Study. *Stroke.*; 36:239–243.

Mariani RL, Jorge MP, Pereira SS, Melione LP, Carvalho-Oliveira R, Ma TH, Saldiva PH. 2009. Association between micronuclei frequency in pollen mother cells of *Tradescantia* and mortality due to cancer and cardiovascular diseases: a preliminary study in São José dos Campos, Brazil. *Environ Pollut.* 2009 Jun; 157 (6) : 1767-70.

Martins MC, Fatigati FL, Véspoli TC, Martins LC, Pereira LA, Martins MA, Saldiva PH, Braga AL. 2004. Influence of socioeconomic conditions on air pollution adverse health effects in elderly people: an analysis of six regions in São Paulo, Brazil. *J Epidemiol Community Health*. Jan;58(1):41-6.

Mauad T, Rivero DHRF, Oliveira RC, Lichtenfels AJFC, Guimarães ETE, Andre PA, Kasahara DI, Bueno HMS, Paulo Hilário Nascimento Saldiva PHN. 2008. Chronic exposure to ambient levels of urban particles affects mouse lung development. *AJRCCM Articles in Press*. Published on July 2, as doi:10.1164/rccm.200803-436OC.

Miraglia SG, Saldiva PH, Böhm GM. An evaluation of air pollution health impacts and costs in São Paulo, Brazil. 2005. *Environ Manage*. May;35(5):667-76.

Mohallem SV, Lobo DJA, Pesquero CR, Assunção JV, Andre PF, Saldiva PHN, Dolhnikoff M. 2005. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of Sao Paulo. *Environ Res*. Jun; 98 (2) 0: 196-202.

Neidell MJ. 2004. Air pollution, health, and socio-economic status: the effect of outdoor air quality on childhood asthma. *JHealth Econ*. Nov;23(6):1209-36.

Nerriere E, Zmirou-Navier D, Blanchard O, Momas I, Ladner J, Le Moullec Y, Personnaz MB, Lameloise P, Delmas V, Target A, Desqueyroux H. 2005. Can we use fixed ambient air monitors to estimate population long-

term exposure to air pollutants? The case of spatial variability in the Genotox ER study. *Environ Res.* Jan;97(1):32-42.

O'Neill MS, Ramirez-Aguilar M, Meneses-Gonzalez F, Hernández-Avila M, Geyh AS, Sienra-Monge JJ, Romieu I. 2003. Ozone exposure among Mexico City outdoor workers. *J Air Waste Manag Assoc.* Mar;53(3):339-46.

Oudin A., Björk J., Strömberg U. 2007. Efficiency of two-phase methods with focus on a planned population-based case-control study on air pollution and stroke. *Environ Health*; 6: 34.

Pereira CE, Heck TG, Saldiva PH, Rhoden CR. 2007. Ambient particulate air pollution from vehicles promotes lipid peroxidation and inflammatory responses in rat lung. *Braz J Med Biol Res.* 2007 Oct;40(10):1353-9. Epub Aug 14.

Prajapati SK, Tripathi BD. 2008. Assessing the genotoxicity of urban air pollutants in Varanasi City using *Tradescantia* micronucleus (Trad-MCN) bioassay. *Environ Int.* Nov; 34 (8) : 1092-6. Epub 2008 May 2.

Rajsić SF, Tasić MD, Novaković VT, Tomasević MN. 2004. First assessment of the PM10 and PM2.5 particulate level in the ambient air of Belgrade city. *Environ Sci Pollut Res Int.*;11(3):158-64.

Rauh VA, Landrigan PJ, Claudio L. Housing and health: intersection of poverty and environmental exposures. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1136:276-88.

Samet JM, Dominici F, Curriero FC, Ph.D., Coursac I, Zeger SL,. Fine Particulate Air Pollution and Mortality in 20 U.S. Cities. The New England Journal of Medicine 1987–1994.343:1742-1749.

Santos UP, Terra-Filho M, Lin CA, Pereira LA, Vieira TC, Saldiva PH, Braga AL. 2008. Cardiac arrhythmia emergency room visits and environmental air pollution in Sao Paulo, Brazil. J Epidemiol Community Health. Mar;62(3):267-72.

Schwartz J. 2000. Harvesting and long term exposure effects in the relation between air pollution and mortality. Am J Epidemiol;151:440-448.

Soares SR, Bueno-Guimarães HM, Ferreira CM, Rivero DH, De Castro I, Garcia ML, Saldiva PH. 2003. Urban air pollution induces micronuclei in peripheral erythrocytes of mice in vivo. Environ Res. Jul;92(3):191-6.

Teixeira MA, Chaguri LC, Carissimi AS, Souza NL, Mori CM, Saldiva PH, Lemos M, Macchione M, Guimarães ET, King M, Merusse JL. 2006. Effects of an individually ventilated cage system on the airway integrity of rats (*Rattus norvegicus*) in a laboratory in Brazil. Lab Anim. Oct;40(4):419-31)

Tolbert,P.E., Shy,C.M. and Allen,J.W. 1992. Micronuclei and other nuclear abnormalities in buccal smears: methods and development. *Mutat. Res*, 271, 69–77.

Zagury E, Le Moullec Y, Momas I. 2000. Exposure of Paris taxi drivers to automobile air pollutants within their vehicles. Occup Environ Med. Jun; 57(6):406-10.

Zhang L, Steinmaus C, Eastmond DA, Xin XK, Smith MT, 2009.
Formaldehyde exposure and leukemia: a new meta-analysis and potential
mechanisms. *Mutat Res.* Mar-Jun;681(2-3):150-68.

ANEXO I

NOME:

PROFISSÃO:

ENDEREÇO:

SEXO:

IDADE:

FUMANTE: SIM() NÃO()

MAÇOS/ANOS

DOENÇAS PRÉ-EXISTENTES::

AFECÇÕES RESPIRATÓRIAS:

REMÉDIOS USO CRÔNICO:

ALCOLISMO: SIM() NÃO()

GRUPO IN DOOR () GRUPO OUT DOOR()

GRUPO CONTROLE: ()

OBS. OUTROS FATORES DE RISCO: