Sibelli Silva Cosme Pedro

**Avaliação do potencial carcinogênico de partículas
atmosféricas concentradas: estudo experimental em dois
modelos diferentes**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury

São Paulo

2013

Sibelli Silva Cosme Pedro

**Avaliação do potencial carcinogênico de partículas
atmosféricas concentradas: estudo experimental em dois
modelos diferentes**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 03 de outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pedro, Sibelli Silva Cosme

Avaliação do potencial carcinogênico de partículas atmosféricas concentradas :
estudo experimental em dois modelos diferentes / Sibelli Silva Cosme Pedro. --
São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Patrícia Maluf Cury.

Descritores: 1.Material particulado 2.Neoplasias pulmonares 3.Poluição do ar
4.Camundongos 5.Uretana 6.Nitrosaminas/toxicidade

USP/FM/DBD-427/13

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço ao Senhor, meu amado Jesus, sem o qual eu nada seria.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Patrícia M.Cury, por todo o apoio, orientação além da amizade sempre à minha disposição.

Aos meus queridos: pai, mãe e irmão pelo simples fato de existirem e a quem devo parte do que sou.

Ao Michel pela compreensão e apoio nos momentos alegres, tristes e de muita ansiedade.

Agradeço à Dra. Miriam Lemos por me conduzir nos meus primeiros passos desta jornada e sua dedicação ao longo do desenvolvimento deste trabalho. E ao professor Paulo S. Panse Silveira pelo ajuda.

Agradeço ao professor Paulo Hilário N. Saldiva por sua sabedoria que inúmeras vezes nos direcionou mediante as questões fundamentais.

Às minhas inseparáveis amigas: Luciana M. Pastro, Maiara Campos e Adriana Pires pelo companheirismo, amizade, dedicação, sem as quais partes deste trabalho, talvez não fossem realizadas.

Ao professor Alfredo Jácomo pelo espaço cedido durante todo o processamento e análise do material, a todos os colaboradores do Laboratório de Anatomia Médico Cirúrgica, especialmente à Alessandra T. Marinho por sua imensa ajuda para cortar nossas lâminas histológicas.

Ao estatístico Euro de B. Couto Júnior pela colaboração.

Ao Laboratório de Imunoistoquímica, principalmente à Esmeralda M. Esther e a Sandra de Moraes F. pelos ensinamentos.

À todos que ajudaram direta e indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, sem o qual não seria possível o início e a conclusão deste trabalho.

Porque todos o viam e perturbavam-se, mas logo falou com eles e disse-lhes: Tende bom ânimo. Sou eu, não temais.

Marcos – Cap.6, Vs.50

Normatização adotada

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

- Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).
- Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Sumário	
RESUMO	
ABSTRACT	
INDICE DE FIGURAS.....	
INDICE DE TABELA	
SIGLAS.....	
INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Poluição Atmosférica e Poluentes	1
1.2 Material Particulado	2
1.3 Poluição Atmosférica no Brasil e no Estado de São Paulo	3
1.4 Poluição e Doenças Relacionadas	3
1.5 Formação do Câncer e Alterações Moleculares	4
1.6 P53 e PCNA	5
1.7 Câncer de Pulmão e Poluição	8
1.8 Animais Experimentais	10
1.9 Carcinógenos.....	11
2. OBJETIVO.....	13
2.1 Objetivo geral:.....	13
2.2 Objetivos específicos:	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Animais de Experimentação	15
3.2 Tratamento Com Carcinógenos.....	15
3.3 Tempo de Exposição	16
3.4 Exposição ao Material Particulado Concentrado	16
3.5 Análise de Poluentes	18
3.6 Análise de HPA.....	19
3.7 Eutanásia.....	20
3.8 Análise Macroscópica (Tumorigenicidade)	20
3.9 Histologia	20
3.10 Imunoistoquímica.....	20
3.11 Análise Estatística	21
4. RESULTADOS	24

4.1	Análise dos Grupos Experimentais	24
4.2	Análise dos Poluentes	33
5.	Discussão	42
6.	Conclusão	49
6.1	Considerações finais.....	49
7.	Referências Bibliográficas	50
	Apêndice	58

RESUMO

INTRODUÇÃO. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a exposição à poluição atmosférica está associada ao aumento de doenças cardiorrespiratórias. Trabalhos experimentais anteriores, utilizaram uretana para induzir a formação de nódulos pulmonares em camundongos e expor estes animais à poluição de “mundo real”. Ou seja, os animais foram expostos a gases e partículas da mesma forma com que a população está exposta na cidade de São Paulo. Evidenciou-se então, o papel promotor e dose dependente da atmosfera poluída na progressão dos tumores de pulmão. Sabe-se que substâncias carcinogênicas como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), metais, ácidos graxos e aldeídos, estão presentes na fração particulada respirável da poluição (material particulado fino - MP_{2,5}), e a exposição prolongada a este último vem sendo considerada um risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão. O objetivo deste estudo é verificar se a exposição crônica ao MP_{2,5} concentrado, a partir do ar ambiente da cidade de São Paulo, tem potencial carcinogênico. **MÉTODOS.** Foram utilizados 60 camundongos machos suíços (30g); e 60 AJ (20g), com quatro a seis semanas de vida. Os camundongos suíços foram pré-tratados com um carcinógeno completo, o ácido carbâmico (uretana-U), enquanto que os AJ receberam um carcinógeno iniciador 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridil)-1-butanona (NNK), por serem pré-dispostos ao desenvolvimento de tumores de pulmão. Em seguida todos os animais foram expostos no Concentrador de Partículas Atmosféricas Harvard ao MP_{2,5} diariamente, por 2 horas, durante quatro meses. Cada linhagem foi dividida em quatro grupos (n=15 cada): 2 controles com salina e carcinógeno (CsS e CsU ou CajS e CajNNK) e 2 expostos com salina e carcinógeno (EsS e EsU ou EajS e EajNNK). Foi realizada a análise histopatológica dos pulmões, a contagem e classificação das lesões pulmonares encontradas. Foi feito estudo imunoistoquímico para p53 e PCNA. **RESULTADOS.** Os animais dos grupos expostos, em ambas as linhagens, apresentaram maior número de lesões neoplásicas. As médias de lesões (nódulos e hiperplasia) obtidas foram: CsU: 1,07 (DP $\pm$ 1,54), CsS: 0 (DP $\pm$ 0), EsU: 2,57 (DP $\pm$ 2,77) e EsS: 0,40 (DP $\pm$ 1,12), com p<0,001; CajNNK: 4,94 (DP $\pm$ 3,54), CajS: 0,15 (DP $\pm$ 0,37), EajNNK: 9,14 (DP $\pm$ 7,70) e EajS: 0,80 (DP $\pm$ 1,93), com p<0,001. Não houve alterações para o p53 em ambas as linhagens e, apenas os grupos AJ controle e exposto NNK apresentaram diferença para o PCNA. **CONCLUSÃO.** A exposição crônica ao MP_{2,5} proveniente da poluição atmosférica da cidade de São Paulo tem potencial para promover tumores em camundongos de duas linhagens diferentes, com ou sem o pré-tratamento por carcinógenos.

Descritores: poluição atmosférica, MP_{2,5}, câncer de pulmão, uretana, NNK.

ABSTRACT

INTRODUCTION. Epidemiological studies have shown that exposure to air pollution is associated with increased cardiorespiratory diseases. Previous experimental studies, we used urethane to induce lung nodule formation in mice and these animals exposed to pollution from "real world." In these studies, animals were exposed to gases and particles in the same way that the population is exposed in the city of São Paulo. It was evident then, the role of promoter and dose dependent polluted atmosphere in the progression of lung tumors. It is known that carcinogens such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), metals, aldehydes and fatty acids, are present in the respirable fraction particulate pollution (fine particulate matter - PM_{2.5}), and prolonged exposure to the latter has been considered a risk factor for the development of lung cancer. The objective of this study is to verify whether chronic exposure to PM_{2.5} concentration from the air of the city of São Paulo, has carcinogenic potential. **METHODS.** A total of 60 male Swiss mice (30 g) and 60 AJ (20g), with four to six weeks of life. The Swiss mice were pretreated with a carcinogen completed, the carbamic acid (urethane-U), while AJ received a carcinogen primer 4 - (methylnitrosamino) -1 - (3-pyridil)-1-butanone (NNK) as being predisposed to developing lung tumors. Then all the animals were exposed to atmospheric Harvard Particle Concentrator to PM_{2.5} daily for two hours for four months. Each strain was divided into four groups (n = 15 each): 2 with saline controls and carcinogen (CsS and CsU or CajS and CajNNK) and 2 exposed to saline and carcinogen (EsS and EsS or EajS and EajNNK). After the exposure time, the animals were anesthetized and euthanized. The lungs were fixed, processed histologically and imunohistochemistry was performed on slides with tumor presence of antibodies to p53 and PCNA. Later, in histopathology of pulmonary nodules made counting and classification of lesions found. **RESULTS.** The animals exposed groups in both strains showed a high percentage of neoplastic lesions. Mean lesions (nodules and hyperplasia) were obtained: CsU: 1.07 (SD + 1.54), CsS: 0 (DP + 0), EsU: 2.57 (SD + 2.77) and EsS: 0.40 (+ SD 1.12), p <0.001; CajNNK: 4.94 (SD + 3.54), CajS: 0.15 (SD + 0.37), EajNNK: 9.14 (SD + 7.70) and EajS: 0 , 80 (SD + 1.93), with p <0.001. There were no changes to the p53 in both strains, and only groups A / J control and exposed to NNK differ PCNA. **CONCLUSION.** The chronic exposure to PM_{2.5} air pollution from the city of São Paulo has the potential to promote tumors in mice of two different strains with or without pretreatment by carcinogens.

Keywords: air pollution, PM_{2.5}, lung cancer, urethane, NNK.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sinalização utilizada pela proteína p53.....	7
Figura 2. Estante ventilada para hospedagem de animais de laboratório. Microambiente com ventilação independente para cada caixa.	15
Figura 3. Câmaras para exposição de animais de laboratório: (1) câmara de ar filtrado e (2) câmara de material particulado concentrado.....	16
Figura 4. Container que abriga o CPA.	17
Figura 5. Entrada de ar proveniente da Cabeça Andersen para o interior do concentrador.....	18
Figura 6. Impactadores virtuais em três estágios que concentram as partículas atmosféricas.	18
Figura 7. Peso médio mensal dos camundongos suíços.	24
Figura 8. Peso médio mensal dos camundongos AJ.	25
Figura 9. Nódulos em macroscopia (setas).....	26
Figura 10. Hiperplasia em camundongo suíço (HE, 400x).	26
Figura 11. Adenoma sólido em camundongo suíço (HE, 200x).....	26
Figura 12. Hiperplasia em camundongo AJ (HE, 400x).....	27
Figura 13. Adenoma difuso em camundongo AJ (HE, 200x).....	27
Figura 14. Análise imunoistoquímica em material histológico com presença de marcação nuclear para p53 no tecido tumoral - setas (400x).....	31
Figura 15. Análise imunoistoquímica em material histológico com presença de marcação nuclear para PCNA no tecido tumoral – setas (400x)	32

INDICE DE TABELAS

Tabela 1. Lesões em camundongos suíços quantificadas em microscopia.....	27
Tabela 2. Lesões em camundongos AJ quantificadas em microscopia.....	28
Tabela 3. Dados histológicos (número total de lesões - nódulos e hiperplasias) observados nos grupos suíços.	28
Tabela 4. Dados histológicos (número total de lesões - nódulos e hiperplasias) observados nos grupos AJ.	29
Tabela 5. Comparação das lesões entre os grupos suíços.....	30
Tabela 6. Comparação das lesões entre os grupos AJ.....	30
Tabela 7. Imunoistoquímica do PCNA realizada entre os grupos suíços.	32
Tabela 8. Imunoistoquímica do PCNA realizada entre os grupos AJ.	33
Tabela 9. Imunoistoquímica do p53 realizada entre os grupos suíços	33
Tabela 10. Imunoistoquímica do p53 entre os grupos AJ.....	33
Tabela 11. Médias mensais das concentrações de MP _{2,5} do Concentrados de Partículas e da estação da CETESB durante as exposições dos grupos ao MP _{2,5} até o final da eutanásia.....	34
Tabela 12. Concentrações médias e composição elementar (e desvios padrões correspondentes) de MP _{2,5} em filtros de polycarbonato µg/m ³ ,).....	35
Tabela 13. Resultado da aplicação técnica da análise de componentes principais com rotação VARIMAX para o conjunto de dados das medidas elementares dos filtros de MP fino concentrado.....	36
Tabela 14. Análise da quantidade de HPA em filtros de quartzo, 47mm, expostos ao MP _{2,5} concentrado por duas horas.....	37

SIGLAS

AJ	Linhagem de camundongo isogênico
Al	Alumínio
Br	Bromo
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Ca	Cálcio
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Cl	Cloro
CO	Monóxido de carbono
CPA	Concentrador de Partículas Finas Ambientais
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DAB	Cromogênico Diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
Fe	Ferro
HC	Hidrocarbonetos
HE	Hematoxilina-eosina
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
IgG	Imunoglobulina G
IL-8	Interleucina 8
INCA	Instituto Nacional do Câncer
K	Potássio
K-Ras	Oncogene
LN5	Laminina-5

Mg	Magnésio
Mn	Manganês
MP	Material Particulado
Ni	Níquel
NNK	Carcinógeno 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridil)-1-Butanona
NOX	Óxidos de Nitrogênio
O3	Ozônio
P	Fósforo
p21	Proteína reguladora do ciclo celular
p53	Proteína antitumoral
Pb	Chumbo
PCNA	Antígeno Nuclear de Células em Proliferação
RMSP	Região Metropolitana de São Paulo
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)
S	Enxofre
Se	Selênio
Si	Silício
SO2	Dióxido de Enxofre
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
Sw	Swiss
Ti	titânio
TRF1	<i>Telomeric Repeat Binding Factor (NIMA-interacting) 1</i>
TRF2	<i>Telomeric Repeat Binding Factor (NIMA-interacting) 2</i>
V	Vanádio
Zn	Zinco

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1.1 Poluição Atmosférica e Poluentes

A poluição atmosférica urbana é uma mistura complexa de gases e partículas, cuja composição varia de acordo com as fontes: tipo de combustível, condições meteorológicas, reações fotoquímicas e processos de dispersão. É considerada um problema de saúde pública desde meados do século XVIII, após a Revolução Industrial quando se observou o aumento da mortalidade associado ao excesso de poluentes liberados na atmosfera. A emissão desses poluentes aumentou nas últimas décadas, principalmente nos centros urbanos, caracterizando a poluição do ar como um dos maiores riscos à saúde (Alameddine, 2009).

Para definir os níveis de qualidade do ar, deve-se considerar a interação entre as fontes (naturais, industriais, queima de combustíveis ou de resíduos sólidos, evaporação de produtos de petróleo, atividades produtoras de odores, entre outras) de poluição e a atmosfera, determinando, deste modo, o surgimento de efeitos adversos da poluição do ar sobre os receptores: animais, plantas e os materiais. Segundo a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (Relatório CETESB, 2012), o dióxido de enxofre (SO_2), o monóxido de carbono (CO), oxidantes fotoquímicos, como o ozônio (O_3), hidrocarbonetos (HC), óxidos de nitrogênio (NO_x) e o material particulado (MP) representam um grupo de poluentes comumente encontrados na atmosfera e são utilizados universalmente como indicadores da qualidade do ar por seus efeitos adversos à saúde.

Outro aspecto importante é a compreensão de que o tempo de permanência das partículas na atmosfera pode alterar sua composição química. Assim, podemos dividir as partículas do aerossol atmosférico em partículas primárias - recentemente emitidas - e partículas secundárias - derivam dos processos de dispersão e reações na atmosfera, ao longo do tempo e há uma interação entre a composição química do poluente com a luz solar (Hinneburg et al, 2009).

Óxidos de nitrogênio, monóxido de carbono entre outros compostos orgânicos voláteis surgem da combustão incompleta de combustíveis fósseis e são emitidos a partir de fontes que incluem os catalisadores de automóveis, o aquecimento doméstico e usinas industriais.

1.2 Material Particulado

O MP tem se destacado dos demais poluentes por causa de sua alta toxicidade e da sua associação ao aumento da mortalidade por doenças respiratórias e câncer de pulmão. (Turner et al, 2011). Pode ser classificado como partículas totais em suspensão, partículas inaláveis e fumaça, nos quais tanto pode ter origem primária quanto secundária (Relatório CETESB, 2012).

Em geral as partículas são classificadas por suas propriedades aerodinâmicas por estabelecerem os processos de transporte e remoção no ar além da penetração e deposição nas vias respiratórias. O diâmetro dessas partículas varia de $0,002\mu\text{m}$ a $100\mu\text{m}$ e podem ser chamadas de partículas finas ou grossas quando tamanho é inferior ou superior à $2,5\mu\text{m}$, respectivamente (Maioli, 2011).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda os seguintes valores para concentrações ambientais de MP:

- MP_{2,5}: $10\mu\text{m}/\text{m}^3$, média anual e $25\mu\text{m}/\text{m}^3$, média de 24 horas;
- MP₁₀: $20\mu\text{m}/\text{m}^3$ média anual e $50\mu\text{m}/\text{m}^3$, média de 24 horas.

A maioria dos componentes do MP são metais de transição, íons (sulfato e nitrato), compostos orgânicos, radicais estáveis quínoídes de material carbonáceo, minerais e materiais de origem biológica (Valavanidis et al, 2008). O interesse em estudar partículas finas se dá por sua capacidade de atingir o sistema respiratório, alcançar a circulação e gerar processos inflamatórios. Um estudo realizado *in vitro*, demonstrou que a exposição ao MP_{2,5} induz disfunção endotelial em artérias pulmonares isoladas (Lodovici; Bigali, 2011; Davel et al, 2012).

1.3 Poluição Atmosférica no Brasil e no Estado de São Paulo

As capitais dos estados brasileiros são muito afetadas pela poluição do ar e cinco cidades (São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Curitiba e Porto Alegre) apresentaram a média anual de $MP_{2,5}$ com concentrações que ultrapassaram os padrões de qualidade do ar estabelecidos pela legislação americana e europeia (Miranda et al, 2012).

As fontes emissoras de $MP_{2,5}$ observadas nas principais capitais brasileiras foram elementos derivados do pó mineral, partículas antropogênicas, dentre eles destacam-se os produtos de combustão, das atividades industriais e da combustão do óleo residual. Essas fontes são variáveis determinadas conforme a economia do Estado, por exemplo, um estudo realizado na Amazônia demonstrou que crianças e idosos foram internados com maior frequência por causa das emissões de partículas finas, provenientes da queima da biomassa (Miranda et al, 2012; Ignotti et al, 2010).

A concentração de indústrias em São Paulo foi a principal responsável pela poluição até, aproximadamente, o ano de 1980, mas com a priorização do controle de emissões industriais e alterações na ocupação do solo muitas empresas se descentralizaram. Hoje, as emissões veiculares são as principais responsáveis pela poluição do ar na Região Metropolitana de São Paulo – RMSP (Toledo; Nardoci, 2011; Saldiva et al, 2010).

Entretanto, os veículos pesados movidos a diesel nas áreas urbanas, ainda são as fontes responsáveis pelas elevadas concentrações de MP, além disso, o clima também exerce influência sobre a concentração dos poluentes (Miranda et al, 2012; Martins, 2010).

1.4 Poluição e Doenças Relacionadas

A exposição em curto prazo à poluição leva a um aumento progressivo de internações hospitalares. Asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e doenças cardiovasculares estão entre as causas dessas internações associadas ao aumento da exposição ao MP em áreas urbanas

(Valavanidis et al, 2010). Saieg et. al, (2011) ao estudar campos por microdissecção a laser de captura observou que a árvore brônquica proximal é um sítio para identificar a exposição à poluição atmosférica. A retenção, em longo prazo, dessas substâncias pode estar associada às diversas respostas inflamatórias e alterações estruturais encontradas nos pulmões de pessoas expostas a partículas ambientais.

Nel et al (2006) considerou que o MP induz a lesão inflamatória e a produção de mediadores proinflamatórios como citocinas e quimiocinas. Adicionalmente, alterações na expressão de alguns genes estão associadas a processos inflamatórios envolvendo resposta imunológica por neutrófilos e, alguns desses genes podem aumentar a susceptibilidade ao câncer de pulmão (Güngör et al, 2010).

1.5 Formação do Câncer e Alterações Moleculares

Modificações celulares e bioquímicas progressivas na função celular, apesar de não estarem comprovados de uma forma conclusiva, geram um fenótipo maligno denominado neoplasia. As alterações genéticas são responsáveis por importantes características desta doença, sendo elas: proliferação, invasão e metástase (McPhee, et al, 2007).

O organismo eucarioto apresenta estruturas teciduais altamente organizadas, reguladas por fatores hormonais e de crescimento, mecanismos de sinalização e proteínas adesivas. Normalmente, as células são munidas de um complexo sistema de reconhecimento e reparo de lesões ou erros durante a replicação da molécula do DNA. No decorrer deste processo, genes ativam vias de verificação para deter a proliferação de células defeituosas, aplicam medidas corretivas ou sinalizam para a indução da morte celular. Defeitos nestes genes envolvidos na “guarda do genoma” são observados no desenvolvimento inicial de tumores. Neste aspecto, são identificados os genes supressores tumorais e os proto-oncogenes (Junqueira; Carneiro, 2012).

Não se conhece o mecanismo de ação de todos os genes supressores de tumor, mas estes são recessivos, pois o efeito carcinogênico apenas é

visualizado quando estão ausentes ou são defeituosos em ambos os cromossomos do genoma. Esses genes podem ser inativados por uma mutação que mudará sua estrutura, por uma deleção parcial ou total e pode ser silenciado por meio de uma metilação. A principal função de um supressor tumoral é regular o crescimento celular. Um exemplo clássico desse tipo de gene é o p53, conhecido como o guardião do genoma (Hasty; Christy, 2013).

Os proto-oncogenes atuam com exatidão, em condições normais, no controle da proliferação celular para a obtenção de tecidos normais do organismo. E, ao contrário dos genes supressores de tumor, eles são conferidas qualidades dominantes não hereditárias, tendo apenas um alelo mutado. Uma vez alterados, as proteínas dos proto-oncogenes podem ser codificadas de maneira desordenada, formar proteínas modificadas e, quando originam tumores são denominados oncogenes. Os oncogenes promovem o crescimento celular autônomo (Kumar, et al, 2008).

Após as fases proliferativas e invasivas, as células tumorais apresentam propriedades específicas, as quais configuram seu potencial para se estabelecerem nos organismos. Para tais propriedades, verifica-se a autossuficiência e insensibilidade aos sinais de crescimento; resistência a apoptose; ausência no reparo das lesões; capacidade proliferativa infinita; indução da formação de um aporte vascular; capacidade de invasão e metástase. Uma importante característica tumorigênica é subjugar as barreiras imunológicas para se estabelecer. A etapa de progressão é considerada um processo irreversível após o processo inicial da lesão (Weinberg, 2008).

1.6 P53 e PCNA

O gene p53 recebeu esta denominação por codificar a proteína cujo peso é de 53 kDa e está localizado no braço curto do cromossomo 17, posicionado em 17p13.1. Cerca de 50% dos carcinomas com características invasivas e metastáticas, apresentam mutações ou deleções deste gene. Nos

casos de câncer de pulmão, em 70% dos casos se observou a inatividade desta proteína (Junqueira; Carneiro, 2012).

A principal característica do p53 é a prevenção do desenvolvimento tumoral e a ele são atribuídas muitas características. Robert Weinberg (2008) afirmou que tais características podem representar uma fragilidade no genoma heterozigoto, pois a necessidade do organismo em eliminar células defeituosas atribui a este gene uma ampla função de controle aos danos genéticos, bem como uma desordem metabólica dentro de uma célula.

No ciclo celular, o p53 acompanha e verifica processos durante a transcrição e, conseqüentemente, reduz ou suspende a continuação do ciclo de células danificadas ou induz a apoptose. Os pontos de verificação para a fase G1-S1 são mediados por esta proteína, a qual ativa a proteína p21, como um inibidor do ciclo celular, quando necessário. Sua perda de função pode ocorrer por alteração genética, interação com proteínas virais ou com outras proteínas regulatórias do ciclo celular, portanto, uma lesão neste gene implica na incapacidade para realizar a parada no ciclo celular ou ativar a apoptose. Anormalidades na ciclina D1 são comuns em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células bem como associações às mutações na proteína p53(Lantuejoul et al, 2010) (Figura 1).

Figura 1. Heterogeneidade das vias de sinalização utilizadas pela proteína p53 em seu papel de “guardião do genoma”

Figura 1. Sinalização utilizada pela proteína p53

(Fonte: Klumb; Cavalcanti, 2002)

O PCNA (antígeno nuclear de células em proliferação) é um componente essencial no complexo de replicação celular. É uma proteína nuclear não histona e está ligada a replicação da molécula de DNA, seu peso molecular é de 36 kDa. A principal função do PCNA é iniciar a proliferação celular aumentando a produção da enzima DNA. O fator de proliferação celular correlaciona-se com o prognóstico de tumores, pois altas taxas de proliferação conferem características mais agressivas. Geralmente, células

positivas para PCNA ocorrem em 50% ou mais de neoplasias e indicam prognóstico adverso (Wang et al, 2003).

1.7 Câncer de Pulmão e Poluição

A neoplasia pulmonar é originária de células epiteliais do Aparelho Respiratório e é classificada em dois grupos: câncer de pulmão de pequenas células e não pequenas células. O primeiro grupo aparece em uma frequência aproximada de 15% dos casos, além de apresentar alta malignidade. O segundo grupo é mais comum e subdivide-se em três tipos patológicos: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células grandes (Dela Cruz et al, 2011).

O desgaste dos telômeros é um evento precoce visto na carcinogênese brônquica. A presença de telômeros mais curtos induz respostas por danos à molécula de DNA e à inativação das vias relacionadas ao p53. Proteínas como as de repetição telomérica TRF1 e TRF2 atuam na regulação de eventuais instabilidades teloméricas, deste modo, uma superexpressão destas proteínas pode comprometer este sistema de reparo (Lantuejoul et al, 2010).

As mutações em KRAS são raras ou não existem em câncer de pulmão de pequenas células, mas estão presentes nos casos de células não pequenas e, sua presença neste último representa um prognóstico ruim (Hecht, 1998; Forgacs et al, 2001). Metilações aberrantes podem silenciar alguns dos genes reguladores da função da laminina-5 (LN5), proteína específica do epitélio envolta no hemidesmossoma estrutural, favorecendo a invasão e a destruição da membrana basal em todos os tipos de câncer de pulmão. Mas essa perda de expressão genética é mais visualizada em tumores de pequenas células e não pequenas células, além de ser um importante fator para a patogênese do câncer pulmonar invasivo (Sathyanarayana et al 2003).

O câncer de pulmão é uma das neoplasias mais comuns, correspondendo cerca de 15% de todos os novos casos de câncer no mundo. A incidência, no Brasil, segunda a estimativa do INCA (Instituto Nacional do

Câncer) em 2012 foram 17.210 novos casos de câncer de pulmão em homens e 10.110 em mulheres. A sobrevida média em cinco anos é de cerca de 13% nos países desenvolvidos e 9% nos subdesenvolvidos (Horner, et al, 2009).

O adenocarcinoma é o subtipo mais incidente e muito comum em pacientes não fumantes e em neoplasias observadas em estudos com roedores. Esses tumores apresentam grandes vacúolos em suas células e, normalmente, seu crescimento é lento e se localizam na periferia do órgão. Em sua histologia pode assumir a forma acinar ou glandular, papilar e sólido; os precursores dos adenocarcinomas periféricos são descritos como hiperplasia adenomatosa atípica (Kumar et al, 2008; Hecht, 1998). Também são observadas mutações no fator receptor de crescimento epidérmico (EGFR) em adenocarcinomas periféricos, sendo mais comum em mulheres e pessoas não fumantes (Austin et al, 2012).

Pacientes com câncer de pulmão têm sobrevida de cinco anos e qualidade de vida reduzida quando comparados com vítimas de outros tipos de câncer (Carnelley et al, 2001). Embora o tabagismo seja um grande fator carcinogênico, estudos epidemiológicos têm associado à exposição prolongada ao material particulado urbano com o desenvolvimento de câncer de pulmão (Pope III et al, 2002; Cohen et al, 2005; Lopez, 2005; Vineis et al, 2005).

Estimativas anteriores atribuíam o câncer de pulmão à poluição do ar em menos de 1% dos casos. Em estudos recentes esta porcentagem subiu para 3,6% de casos por exposição, principalmente, a sulfatos e partículas finas; mais tarde esta estimativa se elevou para 5,7% em não fumantes ou ex-fumantes da Europa. Mesmo assim, o tabagismo permanece como fator de risco predominante para câncer de pulmão além de outros fatores como ser fumante passivo, predisposição genética, sexo, raça, idade, dieta, obesidade, doenças pulmonares, infecções e a carcinogênese ocupacional. Entretanto, a proporção atribuída à poluição do ar pode ser que seja maior do que se estimava (Le et al, 2010; Dela Cruz et al, 2011).

Níveis de dióxido e enxofre e MP foram observados com valores elevados quando relacionados às variáveis: tráfego de veículos e pessoas que nunca fumaram. Esses resultados indicaram a possibilidade de maior risco para o câncer de pulmão em não fumantes, mas que estavam expostas à emissão dos poluentes (Beelen et al, 2008).

1.8 Animais Experimentais

Camundongos são roedores comumente utilizados em estudos de carcinogênese pulmonar. Em 1992, Malkinson já afirmava que tumores de pulmão em camundongos compartilham muitas das características morfológicas, histogênicas e bioquímicas de adenocarcinoma humano. Assim como nos seres humanos, são observadas mutações no oncogene KRAS, o qual representa um papel fundamental para o sinal de transdução e proliferação celular.

Os camundongos suíços (Sw) representam uma linhagem de não consanguíneos e podem ser bons modelos experimentais para o desenvolvimento de tumores espontâneos, quando expostos às substâncias carcinogênicas. Em um estudo recente, alguns grupos desses animais receberam ou não injeção de uretana (ácido carbâmico) e foram expostos ou não à poluição atmosférica e os resultados demonstraram que os animais com a injeção de uretana e expostos à poluição tiveram maior número de nódulos pulmonares do que aqueles com uretana sem exposição à poluição (Pereira et al, 2011; Reymão et al, 1997; Cury et al, 2000).

Os camundongos AJ são animais isogênicos com o gene KRAS mutado e são predispostos a desenvolverem tumores pulmonares. São muito utilizados em carcinogênese pulmonar, pois seus adenocarcinomas são semelhantes às neoplasias com a mesma classificação em pacientes (Hecht, 1998; Kassie et al, 2010).

1.9 Carcinógenos

A uretana é um éster etílico do ácido carbâmico encontrado na folha do tabaco e em microconcentrações em alguns produtos fermentados como pão e vinho. É amplamente utilizada em carcinogênese química, cuja ação pulmonar se dá pelo desenvolvimento de adenocarcinomas, além de adenomas sólidos e papilíferos. Neoplasias pulmonares induzidas em camundongos apresentam mutações no códon 61 do gene KRAS, oriundos dos pneumócitos tipo II, por causa da sua natureza proliferativa (Avanzo, 2005).

Experimentos envolvendo o emprego da exposição à poluição atmosférica, bem como outros estudos apresentaram resultados satisfatórios com o uso da uretana (Reymão et al, 1997; Cury et al, 2000; Avanzo, 2005).

Mutações em KRAS são comumente encontradas em tumores induzidos pelo carcinógeno 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridil) -1-butanona (NNK) em roedores, sendo muito utilizado camundongos AJs como modelos experimentais. Esta substância é um nitrosamino também encontrado no tabaco e, trabalhos experimentais evidenciaram a enzima P450 como mediadora no metabolismo oxidativo do NNK. Além disso, podem se ligar à molécula de DNA aductos como o R-metil-hidroxilação e metilações que implicam em erros durante a replicação da mesma (Hecht, 1998; Kassie et al, 2010).

OBJETIVO

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral:

Verificar se a exposição crônica ao MP_{2,5} concentrado a partir do ar ambiente da cidade de São Paulo tem potencial carcinogênico, empregando-se duas linhagens de camundongos.

2.2 Objetivos específicos:

- a) Avaliar os efeitos do material particulado concentrado em linhagem de camundongo não predisposta ao câncer de pulmão;
- b) Avaliar os efeitos do material particulado concentrado em linhagem de camundongo predisposta ao câncer de pulmão;
- c) Avaliar a atividade proliferativa e a expressão de p53 nas neoplasias desenvolvidas;
- d) Avaliar possíveis diferenças histológicas nos tumores desenvolvidos nesses dois modelos;
- e) Verificar outros possíveis efeitos da exposição nos pulmões desses animais.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais de Experimentação

Foram utilizadas duas linhagens de camundongos: 60 Suíços (Sw) albinos e 60 AJ machos, SPF (*specific pathogen free*), com quatro a seis semanas de idade. Os animais foram mantidos em Sistema de Microventilação independente (SMAFLEX^R) (fig.2), recebendo ração e água *ad libitum*. A higienização das caixas dos animais era realizada três vezes por semana. Os grupos experimentais, Suíços e AJ, foram subdivididos em dois grupos controle (salina e carcinógeno) e em dois grupos expostos (salina e carcinógeno), contendo 15 animais por subgrupo.

Figura 2. Estante ventilada para hospedagem de animais de laboratório. Microambiente com ventilação independente para cada caixa.

3.2 Tratamento Com Carcinógenos

Após acomodação e aclimação por três dias dos animais na estante ventilada, parte deles recebeu dois tipos de tratamento com carcinógenos: os camundongos SW receberam 3g/Kg de uretana, sendo aplicada por via intraperitoneal em duas doses de 1,5g/Kg com intervalo de 48hs (Reymão et al, 1997; Cury et al, 2000). Os animais AJ recebem, por gavagem, 200mg/Kg NNK diluídos em 0,1ml de solução fisiológica 0,9%(Fukumasu, 2008; Hecht et al, 1994).

3.3 Tempo de Exposição

A exposição crônica ocorreu por um período de quatro meses, de segunda à sexta-feira, tempo necessário para desenvolvimento de lesões segundo Pereira et al (2011).

3.4 Exposição ao Material Particulado Concentrado

Os animais dos grupos expostos foram, diariamente, levados à câmara poluída ou de ar limpo (Fig.3), pelo período de duas horas, após as 14 horas da tarde, configurando, respectivamente, o grupo de exposição aos poluentes secundários e controle (Sioutas et al, 1995). Dentro da câmara de ar sujo os animais inalam o MP concentrado a partir do ar capturado do meio ambiente e, na câmara de ar limpo eles inalam o ar ambiente de dentro do container.

Figura 3. Câmaras para exposição de animais de laboratório: (1) câmara de ar filtrado e (2) câmara de material particulado concentrado.

O equipamento, mencionado anteriormente, capaz de concentrar e expor animais é conhecido como *Harvard Ambient Fine Particles Concentrator* (em português: Concentrador de Partículas Finas Ambientais - CPA). Este equipamento foi criado e desenvolvido pelos cientistas da *Harvard School of Public Health* (Sioutas et al, 1995), a fim de concentrar em até 30x o MP. Um

exemplar do concentrador foi montado no campus da Universidade de São Paulo e no momento das exposições encontrava-se estacionado ao lado do prédio da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, próximo ao biotério central da FMUSP.

O CPA consiste de uma série de impactadores virtuais que concentram partículas ambientais sem alterar sua distribuição de tamanho e características físico-químicas (Savage et al, 2003). As partículas com são encaminhadas pela Cabeça Andersen, equipamento captador do ar atmosférico e capaz de selecionar partículas com diâmetro aerodinâmico de $2,5\mu\text{m}$ para a entrada do CPA. Após sua entrada, as mesmas são aceleradas em de um cilindro afunilado e concentradas por forças inerciais, enquanto são aspiradas por um fluxo de ar periférico.

As Figuras 4, 5 e 6 ilustram alguns aspectos do CPA.

Figura 4. Container que abriga o CPA.

Figura 5. Entrada de ar proveniente da Cabeça Andersen para o interior do concentrador.

Figura 6. Impactadores virtuais em três estágios que concentram as partículas atmosféricas.

3.5 Análise de Poluentes

Durante as exposições, duas vezes por semana foram realizadas amostragens do material particulado concentrado em filtros de polycarbonato. A partir destes filtros foram realizadas as seguintes análises:

- análise de gravimetria utilizando escala de precisão de 1 micrograma

(Mettler Toledo - modelo MX5).

- quantificação de *black-carbon* por meio de análise da reflectância óptica utilizando um reflectômetro EEL Smokestain, modelo M43D (Diffusion Systems Ltda., London, UK) de acordo com EC Directive 80/799/EEC (ABNT 1989).

- análise de carbono orgânico e perfil elementar através de fluorescência de raio-X com equipamento SHIMADZU Co. Modelo EDX-700HS para determinar Al, Br, Ca, Cl, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, P, Pb, S, Se, Si, Ti, V, e Zn.

- controle com filtros não expostos, considerados como "brancos".

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Análise dos Processos Atmosféricos (LAPAT) do Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo a fim de visualizar a composição do MP deste estudo.

3.6 Análise de HPA

Esse método foi realizado para registrar os HPA presentes em neste estudo. Adicionalmente, filtros de quartzo (47 mm) que se impregnam de MP carreando HPA (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos) foram amostrados duas vezes por semana durante as exposições e enviados para Laboratório de Química Analítica na UNESP (Universidade Estadual Paulista) de Araraquara.

O método de análise destes filtros foi validado pelo Laboratório de Cromatografia do IQ/UNESP em material particulado atmosférico, e consiste na extração com solventes (DCM:metanol, 4:1) em banho de ultrassom (3 x 10 min x 30 ml), seguido de troca do solvente por acetonitrila. Este método quantifica os HPA por HPLC/Flu (Andrade, 2004) e confirmado por GC/MS (Ré-Poppi, 2000).

3.7 Eutanásia

Após o período de exposição, todos os animais foram anestesiados com a associação de ketamina (100mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg). Os animais foram eutanaziados por secção da aorta abdominal e exanguinação.

3.8 Análise Macroscópica (Tumorigenicidade)

Após a eutanásia os animais foram traqueostomizados para fixação dos pulmões com solução de paraformaldeído a 4% sob pressão de 20 cm de H₂O por 30 min. Ocorreu a necropsia dos demais órgãos, também fixados em paraformaldeído e após 48h transferidos para álcool etílico 95% e emblocados para análises posteriores.

Após fixação dos pulmões por 30 min, a traqueia foi ocluída (mantendo-se a pressão interna) e o bloco traqueia-pulmão-corção foi isolado. O número de nódulos pulmonares foi inicialmente determinado por exame macroscópico da superfície pleural (Reymão et al, 1997; Cury et al, 2000).

3.9 Histologia

Após 48h os pulmões foram transferidos para álcool etílico 95% para processamento histológico de rotina. Os lobos direito e esquerdo foram separados, cortados transversalmente e incluídos em blocos de parafina e a análise realizada por cortes de 3µm corados com hematoxilina-eosina (HE).

As lesões foram classificadas em nódulos e hiperplasias, e as primeiras foram sub-classificadas em nódulos sólidos, papilíferos ou difusos.

3.10 Imunoistoquímica

Parte das lâminas histológicas com cortes de 4µm foi preparada com silano e destinadas à imunoistoquímica para estudo do grau de proliferação celular pela marcação do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e expressão de p53. Para tanto, foram incubadas com anticorpos primários de coelho Policlonal IgG, anti-p53 ou anti-PCNA (Santa Cruz *Biotechnology* EUA) cuja padronização foi de 1µl do anticorpo diluído para 500 µl da solução de

BSA (*bovine serum albumin*). Inicialmente realizou-se a desparafinização com xilol seguido de hidratação com álcool etílico e recuperação antigênica com panela de pressão e tampão citrato em pH 6,0. Fez-se inativação da peroxidase endógena com água oxigenada (volume 10) e imersão das lâminas em leite em pó Molico® diluído a 2% por 20 minutos. Os cortes, após esta preparação, foram processados para detecção imunoistoquímica pelo método da avidina-biotina-peroxidase, na qual empregou-se o anticorpo primário (PCNA e p53) e o anticorpo secundário biotinilado produzido em coelhos contra camundongos (Kit ABC Vector) por 20 minutos em estufa à 37°C. A revelação foi realizada com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB), cujos núcleos aparecem corados em marrom. Após a revelação o material foi contra corado com hematoxilina, desidratado, diafanizado e montado.

Para a avaliação, foram contados os números de células com núcleo marcado, por campo, num aumento de 400X no microscópio óptico, para ambos anticorpos.

3.11 Análise Estatística

Os parâmetros analisados foram o número de nódulos tumorais nos pulmões (lesões e hiperplasias, grau de proliferação celular e positividade para proteína p53).

Os quatro grupos descritos anteriormente foram comparados entre si, para a identificação de possíveis diferenças entre eles, em duas variáveis distintas: a) comparação concomitante entre os quatro grupos e comparação de pares de grupos, somente para as variáveis cuja diferença estatística for significativa encontrada na comparação concomitante. Deste modo, para a comparação concomitante foi utilizado o *Teste de Kruskal-Wallis*. Para a comparação de pares de grupos, será aplicado em conjunto o *Teste de Mann-Whitney* e considerada a correção pelo *Método de Bonferroni* para verificar-se quais pares de grupos mostram diferença. Será adotado o nível de significância $p > 0,050$. Usamos a planilha eletrônica MS-Excel, em sua versão

do MS-Office 2010, para a organização dos dados, e o pacote estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), em sua versão 20.0, para o tratamento estatístico.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Análise dos Grupos Experimentais

As linhagens dos camundongos, suíços e AJ, foram escolhidas para tentar delimitar um melhor modelo experimental e estudar a exposição ao $MP_{2,5}$.

Camundongos suíços e AJ cujos pesos eram inferiores a 30g e 18g, respectivamente, eram animais de menor peso. Deste modo, na primeira semana após a aplicação dos carcinógenos, grupos AJ controle NNK e exposto NNK sofreram 3% de mortes; enquanto os grupos suíços controle uretana e exposto uretana sofreram 1% de mortes. Durante o período de exposição, os animais eram pesados semanalmente e o ganho de peso foi observado (Figuras 7 e 8).

Figura 7. Peso médio mensal dos camundongos suíços.

Legenda: CsU (Controle Suíço Uretana); CsS (Controle Suíço Salina); EsU (Exposto Suíço Uretana); EsS (Exposto Suíço Salina)

Figura 8. Peso médio mensal dos camundongos AJ.

Legenda: CajNNK (Controle AJ NNK); CajS (Controle AJ Salina); EajNNK (Exposto AJ NNK); EajS (Exposto AJ Salina).

Após a eutanásia já era possível observar nódulos por macroscopia. As lesões encontradas nos camundongos em microscopia foram todas classificadas como hiperplasias ou adenomas, respeitando a subclassificação de adenomas papilíferos, sólidos e difusos, baseadas em critérios anatomopatológicos, utilizados em estudo prévio dos pesquisadores (Cury, 2000). Com exceção do grupo suíço controle sem uretana, todos os demais grupos, de ambas as linhagens, apresentaram hiperplasias e adenomas. Entretanto, nos camundongos suíços foram observadas lesões com características histológicas sólidas e papilíferas, enquanto os AJ apresentaram lesões difusas. A dificuldade de classificar uma lesão como adenoma e não carcinoma ocorre devido ao fato das lesões não apresentarem muitas atipias celular ou arquitetural e também não termos observado metástases em nenhum caso. As Figuras de 9 a 13 mostram exemplos das lesões encontradas macro e microscopicamente.

Figura 9. Nódulos em macroscopia (setas).

Figura 10. Hiperplasia em camundongo suíço (HE, 400x).

Figura 11. Adenoma sólido em camundongo suíço (HE, 200x).

Figura 12. Hiperplasia em camundongo AJ (HE, 400x).

Figura 13. Adenoma difuso em camundongo AJ (HE, 200x).

As Tabelas 2 e 3 mostram o número total de nódulos e hiperplasias quantificados em microscopia ótica.

Tabela 1. Lesões em camundongos suíços quantificadas em microscopia.

GRUPOS	HIPERPLASIAS	ADENOMAS
Controle Uretana	3	12
Controle Salina	0	0
Exposto Uretana	8	27
Exposto Salina	1	5

Tabela 2. Lesões em camundongos AJ quantificadas em microscopia.

GRUPOS	HIPERPLASIAS	ADENOMAS
Controle NNK	5	79
Controle Salina	0	2
Exposto NNK	13	115
Exposto Salina	2	10

Tabela 3. Dados histológicos (número total de lesões - nódulos e hiperplasias) observados nos grupos suíços.

Variável	Grupo	N	Média	DP	p
Total	EsU	14	2,57	2,77	< 0,001
	EsS	15	0,4	1,12	
	CsU	14	1,07	1,54	
	CsS	14	0	0	
	Total	57	1	1,9	
Hiperplasia	EsU	14	0,57	0,94	0,038
	EsS	15	0,07	0,26	
	CsU	14	0,21	0,58	
	CsS	14	0	0	
	Total	57	0,21	0,59	
Nódulo	EsU	14	1,93	2,09	0,001
	EsS	15	0,33	1,05	
	CsU	14	0,86	1,23	
	CsS	14	0	0	
	Total	57	0,77	1,48	

Legenda: n (número de lesões); CsU (Controle Suíço Uretana); CsS (Controle Suíço Salina); EsU (Exposto Suíço Uretana); EsS (Exposto Suíço Salina). Observa-se que os grupos são diferentes entre si ($p < 0,050$)

As Tabelas 4 e 5 mostram diferenças estatisticamente significantes, entre os grupos da mesma linhagem. Nas duas avaliações feitas, utilizamos o *Teste de Mann-Whitney*, ajustado pela *Correção de Bonferroni*.

Tabela 4. Dados histológicos (número total de lesões - nódulos e hiperplasias) observados nos grupos AJ.

Variável	Grupo	N	Média	DP	p
Nódulo difuso	CajNNK	17	4,41	3,45	< 0,001
	CajS	13	0	0	
	EajNNK	14	6,36	5,69	
	EajS	15	0,4	0,91	
	Total	59	2,88	4,22	
Nódulo solido	CajNNK	17	0,24	0,44	0,098
	CajS	13	0,15	0,38	
	EajNNK	14	1,86	3,57	
	EajS	15	0,27	1,03	
	Total	59	0,61	1,92	
Hiperplasia	CajNNK	17	0,29	0,47	0,002
	CajS	13	0	0	
	EajNNK	14	0,93	1,07	
	EajS	15	0,13	0,52	
	Total	59	0,34	0,71	
Total	CajNNK	17	4,94	3,54	< 0,001
	CajS	13	0,15	0,38	
	EajNNK	14	9,14	7,71	
	EajS	15	0,8	1,94	
	Total	59	3,83	5,5	

Legenda: n (número de lesões); CajNNK (Controle AJ NNK); CajS (Controle AJ Salina); EajNNK (Exposto AJ NNK); EajS (Exposto AJ Salina). Observa-se que os grupos são diferentes entre si ($p < 0,050$)

Ao encontrar diferenças estatisticamente significantes, aplicamos os mesmos testes mencionados, anteriormente, para identificar quais grupos diferenciam-se entre si, quando comparados par a par:

Tabela 5. Comparação das lesões entre os grupos suíços.

Variável	Par de Grupos					
	EsU X EsS	EsU X CsU	EsU X CsS	EsS X CsU	EsS X CsS	CsUX CsS
Total	0,003	0,097	< 0,001	0,102	0,164	0,007
Hiperplasia	0,052	0,203	0,016	0,483	0,334	0,15
Nodulo	0,006	0,165	< 0,001	0,091	0,164	0,007

Legenda: CsU (Controle Suíço Uretana); CsS (Controle Suíço Salina); EsU (Exposto Suíço Uretana); EsS (Exposto Suíço Salina). Observa-se que alguns grupos são diferentes entre si ($p < 0,050$).

Tabela 6. Comparação das lesões entre os grupos AJ.

Variável	Par de Grupos					
	EajNNK X EajS	EajNNK X CajNNK	EajNNKa X CajS	EajS X CajNNK	EajS X CajS	CajNNK X CajS
Nódulo difuso	< 0,001	0,369	< 0,001	< 0,001	0,094	< 0,001
Nódulo solido	0,587	0,162	0,243	0,091	0,52	0,031
Hiperplasia	0,035	0,067	0,14	0,002	0,352	0,006
Total	< 0,001	0,163	< 0,001	< 0,001	0,605	< 0,001

Legenda: CajNNK (Controle AJ NNK); CajS (Controle AJ Salina); EajNNK (Exposto AJ NNK); EajS (Exposto AJ Salina). Observa-se que alguns grupos são diferentes entre si ($p < 0,050$).

As Tabelas 6 e 7 exibem que as informações estatísticas entre os pares de grupos controle e exposto com carcinógenos e solução salina nas duas linhagens empregadas.

A análise imunoistoquímica para verificação do PCNA e p53 foram realizadas nos animais que apresentaram lesões pulmonares e exemplificadas nas figuras 14 e 15. Essas análises não foram realizadas nos grupos salina dos camundongos AJ por causa da perda do material durante o processamento imunoistoquímico.

Figura 14 Análise imunoistoquímica em material histológico com presença de marcação nuclear para p53 no tecido tumoral - setas (400x).

Figura 15. Análise imunoistoquímica em material histológico com presença de marcação nuclear para PCNA no tecido tumoral – setas (400x)

Tabela 7. Imunoistoquímica do PCNA realizada entre os grupos suíços.

Variável	Grupo	Média	Desvio-padrão	p
N de células por n de campos	EsU - PCNA	2,57	3,26	0,878
	CsU - PCNA	2,25	2,63	
	EsS - PCNA	1	0	
	Total	2,33	2,81	

Legenda: CsU (Controle Suíço Uretana); EsU (Exposto Suíço Uretana) e EsS (Exposto Suíço Salina). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,050$)

Tabela 8. Imunoistoquímica do PCNA realizada entre os grupos AJ.

Variável	Grupo	Média	Desvio-padrão	p
N de células por n de campos	EajNNK - PCNA	2,67	1,37	0,008
	CajNNK - PCNA	1,4	1,08	
	Total	2,09	1,38	

Legenda: CajNNK (Controle AJ NNK) e EajNNK (Exposto AJ NNK). Observa-se que houve uma marcação de PCNA maior no grupo exposto à poluição ($p=0,050$).

Tabela 9. Imunoistoquímica do p53 realizada entre os grupos suíços

Variável	Grupo	Média	Desvio-padrão	p
N de células por n de campos	EsU - P53	1,33	0,87	0,150
	CsU - P53	2	4,47	
	EsS - P53	3	0	
	Total	1,67	2,53	

Legenda: CsU (Controle Suíço Uretana); EsU (Exposto Suíço Uretana) e EsS (Exposto Suíço Salina). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,050$).

Tabela 10. Imunoistoquímica do p53 entre os grupos AJ.

Variável	Grupo	Média	Desvio-padrão	p
N de células por n de campos	EajNNK - P53	0,86	0,69	0,892
	CajNNK - P53	0,83	0,84	
	Total	0,84	0,77	

Legenda: CajNNK (Controle AJNNK) e EajNNK (Exposto AJ NNK). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,050$).

Os resultados descritos nas tabelas 7 e 8 mostraram diferenças apenas com PCNA entre os grupos AJ com o emprego do carcinógeno NNK, com um aumento da marcação nos grupos expostos à poluição.

4.2 Análises dos Poluentes

As exposições ao $MP_{2,5}$ ocorreram, semanalmente, durante o inverno, cuja qualidade do ar é considerada ruim por causa das condições meteorológicas que diminui a dispersão dos poluentes como MP, monóxido de carbono e o dióxido de enxofre. O Concentrador de Partículas Atmosféricas

foi utilizado nos dias que a umidade relativa encontrava-se inferior a 80%, uma vez que, acima desta média as gotículas de água dispersas no ar poderiam se associar às partículas e comprometer os valores da concentração das mesmas. As amostras dos filtros foram coletadas para observarmos a composição do material particulado que os grupos experimentais foram expostos.

No ano de 2010 o Estado de São Paulo passou por um período de estiagem gerado pelo fenômeno de escala global denominado *La Niña*, entre julho e setembro. Os índices de umidade relativa estavam baixos, além das altas concentrações de partículas inaláveis (MP_{10}) e de ozônio. Entre 20 à 29 de agosto, a RMSP teve registros de elevadas concentrações de partículas inaláveis. As chuvas se iniciaram no mês de setembro (Relatório CETESB, 2012).

As concentrações do $MP_{2,5}$ caíram ao iniciar o período das chuvas. A estação da CETESB (Cerqueira César) localizada próxima ao local de exposição dos grupos não registrou altos índices de $MP_{2,5}$, de modo que a qualidade do ar para a saúde da população fosse comprometida. Entretanto, na RMSP o valor guia anual de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$, estabelecido pela OMS, foi ultrapassado nas cinco estações que tiveram monitoramento anual representativo na RMSP.

Tabela 11. Médias mensais das concentrações de $MP_{2,5}$ do Concentrados de Partículas e da estação da CETESB durante as exposições dos grupos ao $MP_{2,5}$ até o final da eutanásia.

Meses (2010)	Média de concentração - $MP_{2,5}$ (Concentrador de Partículas) - $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Média de concentração - CETESB - $\mu\text{g}/\text{m}^3$
Julho	812	22
Agosto	1171	25
Setembro	1606	28
Outubro	2398	14
Novembro	195	15
Dezembro	202	11
Janeiro	301	13

Os dados referentes à qualidade do ar desta região não foram registrados pela CETESB. Também devemos mencionar que não há um padrão estabelecido como normal e/ou alterado para os metais encontrados no MP, mas quanto ao chumbo inorgânico, o valor de $1,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ é adotado pela CETESB. Na tabela 12 observam-se os valores encontrados nos filtros.

Tabela 12. Concentrações médias e composição elementar (e desvios padrões correspondentes) de MP_{2,5} em filtros de polycarbonato $\mu\text{g}/\text{m}^3$).

Poluentes	Média	Desvio Padrão
PM2,5	646,37	534,06
Na	0,53	0,71
Mg	0,36	1,08
Al	5,61	11,74
Si	6,49	14,92
P	0,58	1,52
S	9,37	8,18
Cl	0,77	1,05
K	3,46	6,51
Ca	3,27	7,26
Ti	0,64	1,45
V	0,01	0,02
Cr	0,01	0,04
Mn	0,16	0,26
Fe	5,30	11,62
Ni	0,01	0,02
Cu	0,10	0,16
Zn	0,50	0,72
Se	0,00	0,00
Br	0,04	0,05
Rh	0,05	0,09
Pb	0,02	0,04

Por meio da análise de componentes principais, foi possível identificar quatro fatores que explicam 96% da variabilidade de composição do MP_{2,5} concentrado. Tais fatores são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Resultado da aplicação técnica da análise de componentes principais com rotação VARIMAX para o conjunto de dados das medidas elementares dos filtros de MP fino concentrado.

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

O primeiro fator é constituído predominantemente por Mg, Al, Si, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Cu, Ni, Zn e Br. Estes fatores foram associados a tráfego em geral, talvez com um componente de ressuspensão do solo (Ca). Cu e Ni são relacionados com fontes fixas, industriais (Monaci et al, 2000; Figueiredo et al, 2007). O segundo componente foi dominado por S, sendo interpretado como devido aos veículos diesel e à gasolina, dada a associação deste elemento com as emissões deste combustível (Schauer et al, 2006). O

terceiro fator, associado ao Na e Pb (Figueiredo et al, 2007; Carreras et al, 2009). O quarto fator esteve associado ao P e Se.

Por causa do potencial carcinogênico dos HPA, seus componentes tem sido estudados. A Tabela 14 indica alguns dos HPA encontrados em nos filtros expostos durante este experimento.

Tabela 14. Análise da quantidade de HPA em filtros de quartzo, 47mm, expostos ao MP_{2,5} concentrado por duas horas.

Tipos de HPA	Média e Variações das Concentrações de HPA (ng/m3)
Pireno	1,655 (3,6 – 9,0)
Benzo(a)acefenantrileno	6.81 (2,44 -13,97)
Benzo(k)fluoranteno	1.42 (0,44 – 3,17)
Benzo(a)pireno	0.72 (0,27 – 1,083)

DISCUSSÃO

5. Discussão

As informações gerais demonstram que para ambas as linhagens, nos camundongos submetidos à aplicação dos carcinógenos, houve um maior número de nódulos pulmonares nos grupos expostos ao MP_{2,5} que nos demais grupos. Além disso, grupos suíços e AJ sem carcinógenos também apresentaram lesões. Entretanto, o fato dos camundongos suíços, não predispostos a desenvolverem neoplasias de pulmão espontâneas, terem apresentado lesões quando expostos, sugerem que além da ação de promoção do câncer, a poluição aparentemente é uma indutora do mesmo.

Esses resultados se assemelham ao estudo de Pereira et al (2011) que ao expor camundongos suíços à poluição veicular, mesmo em baixas concentrações, evidenciou que o MP_{2,5} pode aumentar o risco para o desenvolvimento de câncer de pulmão, porque os animais expostos também tiveram maior número de lesões. A localização de tal estudo foi em local próximo às exposições deste experimento.

O CPA é uma alternativa para estudar partículas finas de forma isolada, reduzindo os possíveis efeitos de outros poluentes neste estudo.

Um dos primeiros estudos realizados no CPA demonstrou que artérias pulmonares sofreram disfunção endotelial e stress oxidativo vascular quando os animais foram expostos ao material particulado concentrado (Davel et al, 2012). Além disso, esses animais apresentaram maior produtividade de muco ácido nas vias aéreas superiores e maior resposta inflamatória. Davel et al (2012) afirma que esses dados em conjunto podem elucidar o início de patologias cardiopulmonares induzidas por níveis ambientais urbanos de MP_{2,5}.

Uma diferença observada entre as lesões das duas linhagens é que, embora as neoplasias de ambas fossem classificadas como adenomas, os camundongos suíços apresentaram os subtipos papilífero e sólido enquanto que os AJ apresentaram o subtipo difuso. Nada foi encontrado na literatura a respeito dessas diferenças.

Índices elevados de MP foram associados ao crescimento da mortalidade por câncer pulmonar no município de São Paulo. Sobretudo, altas concentrações do MP foram correlacionadas à incidência de câncer de pulmão, pele, tireoide, laringe e bexiga (Yanagiet al, 2012). Os níveis de poluentes associados às emissões veiculares em valores baixos ou dentro da normalidade estabelecida pela OMS tem sido significativos para gerarem danos à saúde (Olmo et al, 2011).

Pessoas tabagistas e, frequentemente, expostas à poluição atmosférica, representam maiores taxas de mortalidade por neoplasia pulmonar em sua vida adulta, do que aquelas não expostas a nenhum desses fatores de risco, bem como uma associação dos mesmos (LiH et al, 2013). O uso de carcinógenos encontrados no cigarro em experimentos é realizado por causa dos seus efeitos no epitélio pulmonar, além de ser uma base para tentar compreender e organizar seus resultados quando comparados aos da poluição em grupos controle e expostos, bem como a tentativa de simular o dia a dia de pessoas tabagistas e não tabagistas e os agravos em sua saúde.

Embora não fora possível identificar as diferenças estatísticas significativas quando os grupos da mesma linhagem foram comparados entre si, não podemos descartar os efeitos da poluição. A exposição dos grupos experimentais ao MP_{2,5} concentrado do ambiente local poderia representar um viés neste estudo, pois o poluente empregado em dosagem maior não simula com exatidão as doses recebidas pela população. Para ser mais fidedigno, teríamos que estudar os efeitos das concentrações diárias deste poluente “in natura” e isto implicaria em um estudo cuja duração seria por um período indeterminado, o que os estudos epidemiológicos já tentam observar.

Os efeitos à saúde causados pela poluição do ar por partículas finas é um caminho de incertezas e os mecanismos pelos quais a poluição gera ou influencia a carcinogênese pulmonar não são, ainda, compreendidos.

Os resultados dos filtros de poluentes demonstraram que em sua composição se fazem presentes elementos, cujos valores explicam uma

porcentagem considerável da composição do MP_{2,5} durante este experimento. Íons e metais de transição estão entre os principais componentes deste poluente e tem importante efeito toxicológico nas células para ativar fatores pró-inflamatórios e mutagênicos. Componentes como S, Cl, Mg, Fe entre outros, foram encontrados em diferentes partes do trato respiratório, sobretudo, o níquel e sais de sulfato de vanádio são altamente tóxicos para os macrófagos alveolares (Saieget al, 2011; Valavanidis et al, 2008; Lewtas, 2007).

HPA também foram identificados neste estudo. A ação carcinogênica dos componentes dos HPA, principalmente, do benzo(a)pireno já era conhecida em 1970. Embora os resultados das amostragens desses filtros serem baixos não podemos descartar o potencial carcinogênico do MP_{2,5}, mesmo quando comparados aos de Abba et al em 2012, cujos valores do benzo(a)pireno identificados em área residencial foram relacionados à tendência de casos de câncer de pulmão.

Esses hidrocarbonetos estão presentes em todas as emissões por combustão e são metabolizados por vias oxidativas produtoras de reações eletrofílicas, cuja interação é dada por ligações covalentes com os centros nucleofílicos e outras proteínas celulares. Tais reações se revertem em ligações geradoras de mutações na fita de DNA com efeitos genéticos variáveis ligados a distúrbios cardiovasculares, crescimento fetal retardado e câncer de pulmão. E os aductos são formados por reações entre as quinonas e a molécula do DNA, podendo surgir sítios apurínicos e mutações (Lewtas, 2007).

Salientar a presença tanto dos metais, quanto dos HPA encontrados neste estudo se fez necessário, porque tais compostos são formadores de espécies reativas de oxigênio (ROS) que desencadeiam a liberação do superóxido (decorrente do peróxido de hidrogênio) e, por fim a constituição dos radicais hidroxilas cuja ação é danificar lipídios, proteínas e o DNA. (Lewtas, 2007).

Em um estudo de medida quantitativa da formação *in vitro* de ROS associado às partículas ultrafinas em macrófagos e células epiteliais, notou-se em microscopia eletrônica que tais partículas são depositadas nas mitocôndrias, induzindo danos estruturais e, desta forma, contribuindo para o stress oxidativo, bem como lesões nessas organelas(Li Net al, 2003).

O stress oxidativo e a ativação de leucócitos na circulação gerados pelo acúmulo de partículas ultrafinas nos pulmões, podem causar a transcrição de genes pro-inflamatórios por intermédio de fatores sensíveis às vias reativas de oxigênio (Terzanoet al, 2010). A supra-regulação de mediadores pro-inflamatórios e o aumento da viscosidade sanguínea, em termos gerais, são alguns dos fatores sugeridos como possíveis mediadores para lesão em tecido pulmonar e fomentam processos inflamatórios e/ou neoplásicos(Olmoet al, 2011).

Sabemos que mutações constantes na fita de DNA podem silenciar uma expressão gênica, causar um imprinting genômico, inativar ou desestabilizar um cromossomo e condensar a cromatina. Hollowayet al, (2012) afirmou que a exposição à poluentes atmosféricos induz mudanças em genes específicos no pulmão ao estudar efeitos epigenéticos, além do desequilíbrio de microRNAs alterador da expressão de certos genes envolvidos em vias inflamatórias como a IL-8 e a formação tumoral.

Em mais de 30% dos adenocarcinomas pulmonares são notáveis mutações no gene KRAS e mutações no gene p53. As mutações no p53 ocorrem em, aproximadamente, 75% dos casos de câncer de pulmão de pequenas células e 50% dos de não pequenas células(Forgacs et al, 2001).

Nosso estudo observou a presença de expressão imunoistoquímica de p53 nas lesões de ambas as linhagens e também uma baixa expressão de PCNA, sugerindo uma baixa atividade proliferativa. Embora não tenhamos observado uma diferença estatisticamente significativa, encontramos um aumento da expressão do PCNA nos animais AJ expostos à poluição

($p=0,008$). Talvez com um número maior de amostras essa diferença pudesse ser melhor demonstrada.

As análises imunoistoquímicas complementam os resultados histológicos, sendo o p53 e o PCNA considerados fatores importantes ao estudar o prognóstico de pacientes com câncer de pulmão. Embora esses dados não forneçam valores significativos se estudados separadamente, seus resultados em conjunto implicam em informações adicionais importantes ao prognóstico desta patologia (Dworakowska et al, 2009).

Uma limitação que tivemos quanto à avaliação de marcadores imunoistoquímicos nos nódulos foi por causa do desgaste dos blocos de parafina e descolamento de material das laminas. Deste modo, não conseguimos avaliar por esse método todos os tumores pulmonares, dificultando uma boa análise estatística devido ao baixo número de lesões analisadas.

Uma maior incidência de nódulos nos grupos expostos não pode ser, precisamente, correlacionada à exposição ao $MP_{2,5}$, porque é a linhagem é predisposta ao desenvolvimento de lesões espontâneas. Mesmo assim, optamos por avaliar esses animais para ver se a influência genética alteraria o número de lesões, em comparação com os camundongos suíços, o que não foi observado. Mas houve um aumento da atividade proliferativa nos animais expostos, melhor vista na marcação para PCNA, o que sugere que a exposição à poluição apresenta efeito sinérgico sobre a predisposição genética.

Para se avaliar melhor essa hipótese, novos estudos moleculares devem ser realizados, além de aumentarmos o tempo de exposição à poluição e de sobrevivência desses animais, para podermos avaliar se o efeito promotor da poluição em longo prazo poderia aumentar mais ainda o número de lesões nos camundongos AJ.

CONCLUSÃO

6. Conclusão

Apesar dos resultados não terem sido estatisticamente significativos, o MP_{2,5} tem um papel tanto promotor, quanto indutor do desenvolvimento de neoplasias nas linhagens predispostas ou não ao desenvolvimento de câncer de pulmão, ao observar os efeitos da poluição neste e em estudos semelhantes.

A linhagem não predisposta apresentou desenvolvimento de lesões quando exposto ao MP_{2,5}, mesmo sem o uso do carcinógeno.

Animais predispostos ao desenvolvimento tumoral e expostos às partículas finas tiveram maior numero de lesões quando comparados ao grupo controle, associado à uma maior atividade proliferativa das lesões.

A atividade proliferativa foi baixa nas neoplasias desenvolvidas, em ambas as linhagens. Entretanto, observou-se uma maior atividade proliferativa nos grupos expostos à poluição em relação ao controle, nos camundongos AJ. Diferenças imunoistoquímicas para o anticorpo p53 não foram observadas neste estudo em nenhuma das linhagens.

As neoplasias de ambas as linhagens são classificadas como adenomas, entretanto, os camundongos suíços apresentaram os subtipos papilífero e sólido e os AJ apresentou o subtipo difuso.

Não houve efeitos significativos macro e microscópicos da poluição em nenhuma das linhagens, em outros órgãos além dos pulmões desses animais.

6.1 Considerações finais

Com os resultados observados neste estudo e a proposta do potencial carcinogênico do MP_{2,5}, sugerimos novos experimentos com o emprego de maior número amostral de animais não predispostos e sem o uso de carcinógenos para então, estudar a ação das partículas finas e correlacionar com análises moleculares da neoplasia a fim de uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no processo e talvez visualizar diferenças estatísticas as quais não foram observadas neste estudo.

Referências Bibliográficas

- Abba EJ, Unnikrishnan S, Kumar R, Yeole B, Chowdhury Z. Fine aerosol and PAH carcinogenicity estimation in outdoor environment of Mumbai City, India. *Int J Environ Health Res.* 2012; 22(2):134-49.
- Alameddine M. Resposta molecular do epitélio pulmonar à exposição aguda de material particulado fino (tese). São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2009.
- Andrade SJV. Investigação sobre a composição química e avaliação da mutagenicidade do material particulado atmosférico sob a influência da fuligem da queima de cana-de-açúcar. 2004. 120p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004
- Austin JH, Garg K, Aberle D, Yankelevitz D, Kuriyama K, Lee HJ, Brambilla E, Travis WD. Radiologic implications of the 2011 classification of adenocarcinoma of the lung. *Radiology.* 2013 Jan; 266 (1):62-71.
- Avanzo JL. Carcinogênese pulmonar em camundongos portadores de deleção em um dos alelos do gene da Cx43 (tese). São Paulo: Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2005.
- Beelen R, Hoek G, van den Brandt PA, Goldbohm RA, Fischer P, Schouten LJ, Armstrong B, Brunekreef B. Long-term exposure to traffic-related air pollution and lung cancer risk. *Epidemiology.* 2008 Sep; 19(5):702-10.
- Carnelley T, Le XC. Correlation Between Chemical Characteristics and Biological Reactivity of Particulate Matter in Ambient Air, Alberta Environment, Edmonton, Alberta, Canada, 2001 p.37.
- Carreras HA, Wannaz ED, Pignata ML. Assessment of human health risk related to metals by the use of biomonitors in the province of Córdoba, Argentina. *Environ Pollut.* 2009 Jan; 157(1):117-22.

- Cohen AJ, Anderson HR, Ostro B, Pandey KD, Krzyzanowski M, Kunzli N, Gutschmidt K, Pope A, Romieu I, Samet JM, Smith K. The global burden of disease due to outdoor air pollution, *J. Toxicol. Environ. Health A*. 2005; 68:1301-1307.
- Cury, PM, Lichtenfels AJFC, Reymão MSF, Conceição GMS, Capellozi VL, Saldiva PHN. Urban levels of air pollution modify the progression of urethane-induced lung tumors in mice. *Pathol. Res. Pract.* 2000; 196: 627-633.
- Davel AP, Lemos M, Pastro LM, Pedro SC, de André PA, Hebeda C, Farsky SH, Saldiva PH, Rossoni LV. Endothelial dysfunction in the pulmonary artery induced by concentrated fine particulate matter exposure is associated with local but not systemic inflammation. *Toxicology*. 2012 May 16;295(1-3):39-46.
- Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med*. 2011 Dec; 32(4):605-44.
- Dworakowska D, Jassem E, Jassem J, Karmoliński A, Lapiński M, Tomaszewski D, Rzyman W, Jaśkiewicz K, Sworczak K, Grossman AB. Prognostic value of the apoptotic index analysed jointly with selected cell cycle regulators and proliferation markers in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2009 Oct; 66(1):127-33.
- Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer (INCA) José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: Inca, 2011.
- Figueiredo AM, Nogueira CAM, Milian FM, Domingos M. Assessment of atmospheric metallic pollution in the metropolitan region of São Paulo, Brazil, employing *Tillandsia usneoides* L. as biomonitor. *Environ Pollut*. 2007 Jan; 145(1):279-92.

- Forgacs E, Zöchbauer-Müller S, Oláh E, Minna JD. Molecular Genetic Abnormalities in the Pathogenesis of Human Lung Cancer. *Pathol OncolRes*. 2001; 1(7): 6–13.
- Fukumasu, H. Efeitos quimiopreventivos e antitumorais do guaraná, *Paulínea Cupana Mart. vai sibilis*, em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* (tese).São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2008.
- Güngör N, Pennings JLA, Knaapen Ad M, Chiu RK, Peluso M, Roger WL, Godschalk RWL, Schooten FJV. Transcriptional profiling of the acute pulmonary inflammatory response induced by LPS: role of neutrophils. *Respiratory Res* 2010, 11: 24.
- Hasty P, Christy BA. p53 as an intervention target for cancer and aging. *Pathobiol Aging Age Relat Dis*. 2013 Oct 8;3.
- Hecht SS, Isaacs S, Trushin N. Lung tumor induction in AJ mice by the tobacco smoke carcinogens 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and benzo[a]pyrene: a potentially useful model for evaluation of chemopreventive agents. *Carcinogenesis*.1994 Dec; 15(12):2721-5
- Hecht SS. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines.*Chem Res Toxicol*. 1998 Jun; 11(6):559-603.
- Hinneburg D, Renner E, Wolke R. Formation of secondary inorganic aerosols by power plant emissions exhausted through cooling towers in Saxony. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2009; 16 (1):25-35.
- Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlander N, Altekruse SF, Feuer EJ, Huang L, Mariotto A, Miller BA, Lewis DR, Eisner MP, Stinchcomb DG, Edwards BK. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006. *Cancer Stat. Rev*. 2009; 1975–2006.

- Ignotti E, Hacon Sde S, Junger WL, Mourão D, Longo K, Freitas S, Artaxo P, Leon AC. Air pollution and hospital admissions for respiratory diseases in the subequatorial Amazon: a time series approach. *Cad Saude Publica*. 2010 Apr;26(4): 747-61.
- Junqueira LC e Carneiro J. *Biologia Celular e Molecular*. 9ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara; 2012.
- Kassie F, Kalscheuer S, Matise I, Ma L, Melkamu T, Upadhyaya P, Hecht SS. Inhibition of vinyl carbamate-induced pulmonary adenocarcinoma by indole-3-carbinol and myo-inositol in AJ mice. *Carcinogenesis*. 2010 Feb; 31(2): 239-45.
- Klumb CE, Cavalcanti Júnior GB. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfoides. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2002; vol.24: 2.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchel RN. *Robins, patologia básica*. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008
- Lantuejoul S, Raynaud C, Salameire D, Gazzeri S, Moro-Sibilot D, Soria JC, Brambilla C, Brambilla E. Telomere maintenance and DNA damage responses during lung carcinogenesis. *Clin Cancer Res*. 2010 Jun 1; 16(11):2979-88.
- Le ND, Sun L, Zidek JV. Air pollution. *Chronic Dis Can*. 2010; 29(Suppl 2):144-63.
- Lewtas J. Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutat Res*. 2007 Nov-Dec; 636(1-3):95-133.
- Li H, Li QD, Wang MS, Li FJ, Li QH, Ma XJ, Wang da N. Smoking and airpollutionexposure and lungcancermortality in Zhaoyuan County. *Int J Hyg Environ Health*. 2013 Jan; 216(1):63-70.

- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect.* 2003 Apr;111(4):455-60.
- Lodovici, M, Bigagli, E. Oxidative Stress and Air Pollution Exposure. *Journal of Toxicology*, 2011:1- 9.
- Lopez AD. Commentary: the evolution of the global burden of disease framework for disease, injury and risk factor quantification: developing the evidence base for national, regional and global public health action, *Global. Health* 2005; 1:5.
- Maioli, Brígida Gusso, Quantificação e caracterização do material particulado fino (MP_{2,5}) na Região Metropolitana da Grande Vitória-ES (dissertação). Espírito Santo: Universidade Federal do Espírito Santo, 2011.
- Malkinson AM. Primary lung tumors in mice: an experimentally manipulable model of human adenocarcinoma. *Cancer Res.* 1992 May 1;52(9 Suppl):2670s-2676s.
- Martins MAG. Variação da composição e toxicidade do material particulado ao longo do dia na cidade de São Paulo (tese). São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2010.
- McPhee SJ, Ganong WF, Cosendey CH, Santos JLDos. *Fisiopatologia da doença*. 5ª edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2007.
- Miranda RM, de Fatima Andrade M, Fornaro A, Astolfo R, de Andre PA, Saldiva P. Urban air pollution: a representative survey of PM (2,5) mass concentrations in six Brazilian cities. *Air Qual Atmos Health.* 2012 Mar; 5 (1): 63-77.

- Monaci F, Moni F, Lanciotti E, Grechi D, Bargagli R. Biomonitoring of airborne metals in urban environments: new tracers of vehicle emission, in place of lead. *Environ Pollut.* 2000 Mar; 107(3):321-7.
- Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006; 311:622-627.
- Olmo NRS, Saldiva PHN, Braga LAF, Lin CH, Santos U de P, Pereira LAA. A review of low-level air pollution and adverse effects on human health: implications for epidemiological studies and public policy. *Clinics.* 2011;66(4):681-690.
- Pereira FAC, Lemos M, Mauad T, Assunção JV de, Saldiva PHN. Urban, traffic- related particles and lung tumors in urethane treated mice. *Clinics*, 2011, vol.66, no.6, p.1051-1054.
- Pope III CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Kazuhiko I, Thurston GD. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA.* 2002; 287:1132-1141.
- Relatório: Qualidade do ar no estado de São Paulo 2011 [recurso eletrônico]. São Paulo: CETESB, 2012. (Série Relatórios / CETESB, ISSN 0103-4103). Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/ar/qualidade-do-ar/31-publicacoes-e-relatorios>
- Ré-Poppi N. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e outras substâncias orgânicas na combustão de madeira para produção de carvão vegetal e em particulado atmosférico da cidade de Campo Grande/MS (tese). Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2000.
- Reymão MS, Cury PM, Lichtenfels AJ, Lemos M, Bathlehner CN, Conceição GM, Capelozzi VL, Montes GS, Junior MF, Martins MA, Böhm GM, Saldiva PH. Urban Air Pollution Enhances the Formation of Urethane-Induced Lung Tumors in Mice. *Environ. Res.* 1997; 74:150-158.

- Saieg MA, Cury PM, Godleski JJ, Stearns R, Duarte LG, D'Agostino L, Kahn H, Pinto EM, Mauad T, Saldiva PH, Bernardi FD. Differentialelementaldistribution of retainedparticlesalong the respiratory tract. *Inhal Toxicol*.2011 Jul;23(8):459-67.
- Saldiva PHN, Vormittag E e demais colaboradores. O desafio das metrópoles. 1ª Edição. São Paulo: Instituto Saúde e Sustentabilidade; 2010.
- Sathyanarayana UG, Toyooka S, Padar A, Takahashi T, Brambilla E, Minna JD, Gazdar AF.Epigenetic Inactivation of Laminin-5-encoding Genes in Lung Cancers. *Clin Cancer Res*2003;9:2665-2672.
- Savage ST, Lawrence J, Katz T, Stearns RC, Coull BA, Godleski JJ.Does the Harvard/U.S. Environmental Protection Agency Ambient Particle Concentrator change the toxic potential of particles? *J Air Waste Manag Assoc*. 2003 Sep; 53(9):1088-97.
- Schauer JJ, Lough GC, Shafer MM, Christensen WF, Arndt MF, DeMinter JT, Park JS. Characterization of metals emitted from motor vehicles.*Res Rep Health Eff Inst*. 2006 Mar;(133):1-76; discussion 77-88.
- Sioutas C, Koutrakis P, Burton RM. A technique to Expose Animals to Concentrated Fine Ambient Aerosols. *Environ. Health Perspect* 1995; 103:172-177.
- Terzano C, Di Stefano F, Conti V, Graziani E, Petroianni A. Air pollution ultrafine particles: toxicity beyond the lung.*Euro Rev for Med and PharmacolSci*. 2010; 14: 809-821
- Toledo GIFM de, Nardocci AC.Poluição veicular e saúde da população: uma revisão sobre o município de São Paulo (SP), Brasil.*Rev. bras. epidemiol*. 2011; 14: 445-454.

- Turner MC, Krewski D, Pope CA 3rd, Chen Y, Gapstur SM, Thun MJ. Long-term ambient fine particulate matter air pollution and lung cancer in a large cohort of never-smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 15;184 (12):1374-81
- Valavanidis A, Fiotakis K, Vlachogianni T. Airborne Particulate Matter and Human Health: Toxicological Assessment and Importance of Size and Composition of Particles for Oxidative Damage and Carcinogenic Mechanisms. *J Environ Sci and Health Part C*, 2008; 26:339–362.
- Vineis P, Husgafvel-Pursiainen K. Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis*. 2005 Nov; 26(11):1846-55.
- Wang J, Chen HL, Zhu RQ, Diao LM, Jang M, Yang F, Liu MQ. Expression of apoptosis and proliferation related genes in carcinogenesis of lung squamous cell carcinoma in rats. *Ai Zheng*. 2003; 22(5):471-6.
- Weinberg, Robert. *A biologia do cancer*. Porto Alegre: Artmed; 2008. 1ª Edição.
- Yanagi Y, Assunção JV, Barrozo LV. The impact of atmospheric particulate matter on cancer incidence and mortality in the city of São Paulo, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2012;28:1737-48.

Apêndice

Tabelas contendo o numero de lesões por cada animal de acordo com seu grupo.

CAMUNDONGOS SUÍÇOS			
GRUPO	SOLIDO E PAPILIFERO	HIPERPLASIA	TOTAL
E Su	4	2	6
E Su	5	0	5
E Su	1	0	1
E Su	4	1	5
E Su	2	1	3
E Su	6	3	9
E Su	3	0	3
E Su	0	0	1
E Su	0	0	0
E Su	1	1	2
E Su	0	0	0
E Su	1	0	1
E Su	0	0	0
E Su	0	0	0
EsS	0	0	0
EsS	0	0	0
EsS	4	0	4
EsS	1	1	2
EsS	0	0	0
EsS	0	0	0
EsS	0	0	0
EsS	0	0	0
EsS	0	0	0
EsS	0	0	0
EsS	0	0	0
EsS	0	0	0
EsS	0	0	0
EsS	0	0	0
EsS	0	0	0
EsS	0	0	0
EsS	0	0	0
CsU	1	0	1
CsU	2	0	2
CsU	2	1	3
CsU	2	2	4
CsU	0	0	0
CsU	0	0	0
CsU	0	0	0
CsU	0	0	0
CsU	0	0	0
CsU	0	0	0
CsU	1	0	1
CsU	4	0	4
CsU	0	0	0

CsU	0	0	0
CsU	0	0	0
CsS	0	0	0
CsS	0	0	0
CsS	0	0	0
CsS	0	0	0
CsS	0	0	0
CsS	0	0	0
CsS	0	0	0
CsS	0	0	0
CsS	0	0	0
CsS	0	0	0
CsS	0	0	0
CsS	0	0	0
CsS	0	0	0
CsS	0	0	0

Legenda: CsU (Controle Suíço Uretana); CsS (Controle Suíço Salina); EsU (Exposto Suíço Uretana); EsS (Exposto Suíço Salina).

CAMUNDONGOS AJ			
GRUPO	DIFUSO E SÓLIDO	HIPERPLASIA	TOTAL
CajNNK	6	1	7
CajNNK	8	0	8
CajNNK	8	0	8
CajNNK	4	0	4
CajNNK	4	0	4
CajNNK	2	0	2
CajNNK	1	0	1
CajNNK	1	0	1
CajNNK	4	0	4
CajNNK	13	0	13
CajNNK	4	1	5
CajNNK	4	0	4
CajNNK	0	0	0
CajNNK	4	1	5
CajNNK	1	0	1
CajNNK	9	1	10
CajNNK	6	1	7
CajS	0	0	0
CajS	0	0	0
CajS	0	0	0
CajS	1	0	1
CajS	0	0	0
CajS	0	0	0
CajS	0	0	0
CajS	1	0	1
CajS	0	0	0
CajS	0	0	0
CajS	0	0	0
CajS	0	0	0
CajS	0	0	0
CajS	0	0	0
EajNNK	6	1	7
EajNNK	3	1	4
EajNNK	0	0	0
EajNNK	20	0	20
EajNNK	9	2	11
EajNNK	2	0	2
EajNNK	2	0	2
EajNNK	4	1	5
EajNNK	8	1	9
EajNNK	11	3	14
EajNNK	18	3	21
EajNNK	10	1	11

EajNNK	0	0	0
EajNNK	22	0	22
EajS	0	0	0
EajS	0	0	0
EajS	0	0	0
EajS	0	0	0
EajS	0	0	0
EajS	0	0	0
EajS	0	0	0
EajS	3	0	3
EajS	0	0	0
EajS	0	0	0
EajS	0	0	0
EajS	0	0	0
EajS	0	0	0
EajS	0	0	0
EajS	5	2	7
EajS	2	0	2

Legenda: CajNNK (Controle AJ NNK); CajS (Controle AJ Salina); EajNNK (Exposto AJ NNK); EajS (Exposto AJ Salina).