LICIA MIOKO YOSHIZAKI AKINAGA PATRÍCIO

Efeitos da poluição atmosférica de origem veicular no sistema cardiopulmonar de camundongos *Swiss (Mus musculus L.)* recém-natos expostos até a idade adulta.

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

Área de concentração: Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Bueno
Garcia

São Paulo

2008

DEDICATÓRIA

À minha família

Cláudio, Isadora e Gustavo

"Amor, alegria, força, inspiração e luz"

Papai e mamãe

Exemplo de vida e dedicação

"Amor incondicional"

Minhas irmãs, Marlice e Lucila

Para sempre o Trio: "unidas jamais serão vencidas"

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Lúcia Bueno Garcia.

Professora, mãe dedicada, amiga em todos os momentos, médica excepcional, entusiasta. Serei sempre sua "fã de carteirinha". Obrigada por ter me ensinado a dar os primeiros passos na pesquisa e conseguir chegar até o fim desse projeto.

Ao "Sr." Toninho, pelos almoços tão agradáveis e gostosos em sua casa. Ainda não posso responder se todo esse trabalho vai me render algum "tutu" mas posso dizer que me rendeu muitas alegrias, inclusive uma viagem para Estocolmo com sua esposa Maria Lúcia minha mestra, com tudo pago!

À minha amiga de infância Cláudia Albertini Yagi, por ter me convidado a fazer parte do grupo de defesa pulmonar. Sinto muito a sua falta.

À Dra. Elnara sempre com uma palavra de conforto e amizade. Obrigada por ter me ajudado desde o início do projeto. A minha família está muito mais saudável graças a você, Deus te abençoe com muita Luz.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, pela sua genialidade, sempre indicando um caminho melhor mesmo sendo minha orientadora uma "anti-capivaras"...

À Dra. Regiani Carvalho de Oliveira, sempre atenciosa e delicada. Me acolheu com tanto carinho e por ter me ajudado com as dúvidas e dificuldades sobre os poluentes e tantas outras "coisas da vida"...

À Dra. Mariangela Macchione, você é um exemplo que todos os fisioterapeutas deveriam conhecer pois me ensina e demonstra todos os dias que com a inteligência não existem barreiras intransponíveis. Obrigada pelo carinho e pela força.

À Nilsa, por ter pacientemente me ensinado a confeccionar as lâminas de pulmão e coração e por ter na verdade confeccionado a maior parte.

À Dra. Ana Júlia Lichtenfels por ter me cedido seu material sempre prontamente, pelo apoio e incentivo.

Ao Dr. Luiz Pereira que com toda a sua paciência me ensinou a entender e mexer com os dados da análise estatística.

À Heloisa Bueno: fala sério, Helo a Lunchão vem ou não vem? Sempre solícita (se não apanha e não almoça mais, heim!!) me ajudou em tudo, você está no meu coração.

À Dra. Naomi Kondo, sempre produzindo cientificamente para o crescimento da fisioterapia e ensinando a "arte" de ser fisioterapeuta. Obrigada pelas sugestões e pelos momentos no "cafezinho".

À Profa. Dra Marisa Dolhnikoff e Dr. Luis (Dr. Burns), por terem me ensinado a metodologia da análise das fibras elásticas e colágenas. Em especial agradeço a você "Dr. Burns" pelas macros e pela "macro" paciência com esta aluna.

Ao Prof. Dr. Paulo Abrahamsohn que gentilmente leu e fez sugestões para melhorar esse trabalho, me acalmou e me deu ao mesmo tempo um empurrãozinho nesta reta final.

À Rosana Aparecida dos Reis da Paz pela contribuição inestimável para a finalização desta dissertação.

Ao "casal 20" Ruy e Tatiana, muito obrigada por toda a ajuda nos gráficos e tabelas, pôsteres e muito mais. Obrigada pela amizade e carinho.

A todo o grupo de defesa pulmonar e LPAE, Vivien, Kelly, Alessandra Choqueta, Dolores Rivero, Andréa Pereira, Beatriz, Rodolfo e também aqueles que por ventura eu não tenha citado, meu muito obrigada pela colaboração e amizade.

Ao grupo do Museu de imagem da Patologia, Dna Ana Luíza e Reginaldo, muito obrigado pela ajuda inestimável.

À Dalva, Márcia, Dna Severina e Dna Nilda, Nildo, o que seria do laboratório sem a retaguarda de vocês? Muito obrigado pelo cafezinho semprequentinho, xerox, etc...

Às minhas queridas alunas de Ginástica Holística e meus queridos pacientes de fisioterapia. Muito obrigada pelo apoio e torcida. Em especial agradeço à paciente e amiga Jandira que é um exemplo de força e vontade de viver.

À Amélia que cuidou e cuida da minha casa e de meus filhos com tanto carinho e dedicação nos períodos que estou ausente.

À Cláudia minha secretária e amiga que pilotou a impressora para que eu tivesse os artigos e também a estatística em mãos, reorganizou meus horários de atendimento tantas vezes.

Esta dissertação ou tese 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. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.*

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Histórico	1
1.2	Poluição atmosférica no Brasil e no Estado de São Paulo	2
1.3	Monitoramento da qualidade do ar na RMSP- CETESB	6
1.4	Programas de controle da poluição atmosférica de origem veicular	9
1.5	Poluição atmosférica e o Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE)	11
1.6	Poluição atmosférica e os efeitos sobre o sistema cardiopulmonar	14
1.6.1	Material Particulado (MP)	15
1.6.2	Sistema respiratório	18
1.6.3	Sistema circulatório sanguíneo	21
1.6.4	Fibras do Tecido Conjuntivo	22
1.7	Justificativa	24
2	OBJETIVO	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	Grupos experimentais	26
3.2	Câmaras de exposição	27

3.3 Caracterização do local da exposição	28
3.4 Medidas dos parâmetros da atmosfera do interior das câmaras	29
4 Análise histológica e morfométrica	30
4.1 Pulmões	30
4.2 Densidade numérica de neutrófilos no septo alveolar	30
4.3 Análise das arteríolas perbronquiolares	31
4.4 Razão L/P dos bronquíolos (BL/P)	33
4.5 Resposta inflamatória	33
4.6 Remodelamento vascular	34
4.7 Coração	36
4.8 Análise das artérias coronárias	36
4.9 Espessura do miocárdio	36
4.10 Remodelamento vascular	37
5 RESULTADOS	39
6 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÃO	78
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Índices dos poluentes e sua qualificação CETESB 2008

Tabela 2. Pesos dos animais experimentais

Tabela 3. Temperatura e umidade das câmaras e ambiente externo

Tabela 4. Poluentes

Tabela 5. Razão L/P dos bronquíolos terminais

Tabela 6. Fibras elásticas nas arteríolas pulmonares

Tabela 7. Fibras colágenas nas arteríolas pulmonares

Tabela 8. Razão L/P das coronárias

Tabela 9. Fibras colágenas nas artérias coronárias

Tabela 10. Fibras elásticas nas artérias coronárias

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Figura 1: Evolução dos fatores médios de emissão de HC e NO_x dos veículos movidos a álcool e a gasolina C da RMSP (Relatório CETESB 2003)

Figura 2. Evolução da frota de veículos automotores leves na RMSP (Relatório CETESB 2003)

Figura 3. Figura 3: Evolução das concentrações médias anuais de MP₁₀ até 2003 na RMSP (Relatório CETESB 2003)

Figura 4. Vias aéreas ao longo do sistema respiratório

Figura 5. Foto das câmaras de exposição do tipo topo aberto

Figura 6. A: fotomicrografia coronária; B: fotomicrografia vaso peribronquiolar e bronquíolo; C: desenho esquemático de um retículo de cem pontos com área total de 62.500 μm^2 (aumento 400x), para análise lumen /parede

Figura 7. A: pulmão fibras colágenas (coloração picrosírius) vaso peribronquiolar; B: pulmão fibras elásticas (coloração fucsina-resorcina oxidada) vaso peribronquiolar (400x)

Figura 8. A: coração: fibras colágenas (coloração picrosírius) coronária ; B: coração: fibras elásticas (coloração fucsina-resorcina oxidada) coronária (400x)

Figura 9. Variação das concentrações dos particulados durante o período da exposição

Figura10. Escores histopatológicos inflamatório dos pulmões

Figura 11: Inflamação dos Pulmões

Figura 12. Razão L/P das arteríolas pulmonares

Figura 13. Fibras elásticas na túnica média das arteríolas pulmonares

Figura 14. Fibras colágenas na camada adventícia das arteríolas pulmonares

Figura 15: Fibras colágenas e elásticas de arteríolas pulmonares

Figura 16. Núcleos de cardiomiócitos/área dos ventricular

Figura 17. Fibras colágenas na camada adventícia das coronárias

Figura 18. Fibras elásticas na camada adventícia das coronárias.

Figura 19. Fibras elásticas na túnica média das coronárias.

Figura 20. Fibras elásticas e colágenas das coronárias.

LISTA DE ABREVIATURAS

MP material particulado

O₃ ozônio

NO₂ dióxido de nitrogênio

NO monóxido de nitrogênio

NO_x óxidos de nitrogênio

SO₂ dióxido de enxofre

SO_x óxidos de enxofre

CO monóxido de carbono

Pb chumbo

HC hidrocarbonetos totais

H₂O água

Al₂O₃ óxido de alumínio

KMNO₄ permanganato de potássio

PTS partículas totais em suspensão

MP₁₀ material particulado menor que 10 µm

MP_{2,5} material particulado menor que 2,5 µm

HEPA *High Efficiency Particulate Air*

EPA *Environmental Protection Agency*

CEC *Comission of the European Communities*

OMS Organização Mundial da Saúde

WHO *World Health Organization*

IBAMA Instituto Brasileiro de Meio Ambiente

CONAMA Conselho Nacional de Meio Ambiente

CETESB Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

RMSP Região Metropolitana de São Paulo

CICPAA Controle de Poluição das Águas e do Ar

PROCONVE Programa de Controle de Poluição do Ar por Veículos Automotores

PROMOT Programa de Controle de Poluição de Ar por Motociclos e Veículos
Similares

ABC Municípios de: Santo André, São Bernardo e São Caetano - Mauá.

LP AE Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental

FMUSP Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

UV Ultra Violeta

TEMP. EXT. MÁX. temperatura externa máxima

TEMP.EXT.MÍN temperatura externa mínima

TEM.INT.MÁX temperatura interna máxima

TEMP.INT.MÍN temperatura interna mínima

UMID.INT.MÁX umidade interna máxima

UMID.INT.MÍN umidade interna mínima

HYP hiperplasia do epitélio bronquiolar

VI infiltrado inflamatório vascular

PI infiltrado inflamatório do parênquima (septo) pulmonar

TS score total

M média

EP erro padrão da média

L/P razão lumen/parede

BC Black Carbon

VD Ventrículo Direito

VE Ventrículo Esquerdo

CL câmara limpa

CP câmara poluída

RESUMO

INTRODUÇÃO: A exposição contínua desde o nascimento à poluição atmosférica de grandes centros urbanos de origem predominante veicular, contribui para eventos cardiopulmonares em adultos. A inflamação e remodelamento induzidos pelos poluentes podem modular a resposta vascular a mediadores e alterar a sua patência e reatividade contribuindo para eventos isquêmicos. **MÉTODOS:** Verificar alterações inflamatórias e estruturais nos pulmões e corações de camundongos Swiss machos cronicamente expostos, desde o nascimento até a idade adulta, às câmaras seletivas com filtros (câmara limpa) e sem filtros (câmara poluída) para particulados e gases tóxicos, situadas a 20m de um cruzamento de tráfego intenso da cidade de São Paulo, 24 h/7dias/semana/4 meses. Realizaram-se medidas internas e externas dos poluentes: PM_{2,5}; NO₂ e Black Carbon (BC) e análises morfométricas nos pulmões e corações. **RESULTADOS:** A filtragem da câmara limpa clareou 100% de BC, 52% de PM_{2,5} e 32% de NO₂. Nos pulmões, as alterações predominaram na região peribronquiolar. Os animais submetidos à câmara poluída apresentaram inflamação peribronquiolar caracterizada por aumento do infiltrado perivascular ($p=0,022$), hiperplasia do epitélio bronquiolar ($p=0,037$), escore inflamatório total ($p=0,015$), e diminuição do infiltrado polimorfonuclear na região do septo alveolar distal ($p=0,001$). A parede dos vasos peribronquiolares não demonstrou alteração da razão lúmen/parede (L/P) entre os grupos (0,094), porém, os animais submetidos à câmara poluída, apresentaram remodelamento estrutural com diminuição de fibras elásticas na adventícia ($p= 0,006$) e na túnica média ($p= 0,008$) e das fibras colágenas apenas na adventícia ($p= 0,016$). No miocárdio, verificamos aumento do número de núcleos

por área do VE, sem alteração de peso dos corações entre os grupos ($p=0,005$). As coronárias dos camundongos expostos à câmara poluída também não demonstraram diferenças na razão L/P, porém a poluição induziu remodelamento através de aumento de fibras colágenas e elásticas na camada adventícia e média dos vasos ($p<0.001$; $p=0,03$ respectivamente), mesmo quando categorizados os vasos por seu calibre e por ventrículo separadamente ($p<0,001$). CONCLUSÃO: A poluição atmosférica da cidade de São Paulo, Brasil, induziu alterações inflamatórias e estruturais nos pulmões e corações dos animais normais expostos desde o nascimento até a idade adulta. A resposta pulmonar caracterizou-se por inflamação e diminuição das fibras da matriz extracelular dos vasos, enquanto as coronárias apresentaram fibrose e elastogênese em toda parede vascular. Esses achados reforçam a hipótese de que a poluição atmosférica de grandes centros urbanos induz alterações silenciosas porém significativas, órgão-específicas, modulando a resposta vascular, podendo contribuir para alteração da patência e reatividade dos vasos e eventos isquêmicos na idade adulta.

Descritores: 1-Poluição Atmosférica; 2-Pulmão; 3- Fibras Colágenas 4-Coronárias
5-Remodelação vascular; 6-Fibras elásticas

ABSTRACT

Effects of atmospheric pollution generated by traffic on cardiopulmonary system of Swiss mice (*mus musculus*) from birth to adulthood.

INTRODUCTION: The continuous exposition since birth to atmospheric pollution of great urban centers originated by vehicles predominantly, contributes to cardiopulmonary events in adults. The remodeling and inflammation induced by airborne pollutants may modulate the vascular response to mediators and alter the vascular patency and reactivity which may contribute to ischemic events.

METHODS: To verify the inflammatory and structural alterations of the lungs and heart of Swiss male mice chronically and continuously exposed since birth to adulthood, to selective chambers with (clean) or without (polluted) filter devices for particles and toxic gases, 7days/24h/4 months, located 20m far from a cross-road with heavy traffic in Sao Paulo city downtown. Measurements of PM_{2,5}; NO₂ and Black Carbon (BC) inside the chambers and in the external environment and morphometric analyses of the lung and heart were made. **RESULTS:** Filters cleared 100% of BC, 47% of PM_{2,5} and 68% of NO₂ in the clean chamber. In the lungs, pollutants affected predominantly the peribronchiolar area. Animals submitted to the polluted chamber presented peribronchiolar inflammation characterized by increased perivascular influx ($p=0.022$), bronchiolar epithelial hyperplasia ($p=0.037$), total inflammatory scores ($p=0.015$), and decrement of polymorphonuclear cells infiltration in the distal septa ($p=0.001$). There was no difference of the lumen/wall

ratio (L/W) of peribronchiolar vessels ($p=0.094$) between groups. However, mice from polluted chamber presented structural remodeling characterized by decrement of elastic fibers in both adventitia ($p=0.006$) and media layers ($p=0.008$) and collagen content in the adventitia ($p=0.016$). In the heart, there was an increase of nucleus of myocytes/left ventricle area, but no alteration of the myocardial weight between groups ($p=0.005$). Although the coronary arterioles from mice exposed to polluted ambient did not show differences of L/W ratio when compared to those from clean ambient, pollutants induced increment of collagen and elastic fibers in the adventitia and media vascular layer ($p<0.001$; $p=0.03$ respectively), even when vessels were categorized by caliber and per ventricle chamber separately ($p<0.001$).

CONCLUSION: The continuous exposure to atmospheric pollution of São Paulo city, Brazil, since birth to adulthood, induced inflammatory and structural alterations in the lungs and heart. The lung response was characterized by inflammation and decrement of extracellular matrix fibers while in the heart, there was fibrosis and elastin increment in the coronary arteriolar wall. These results reinforce the hypothesis that urban airborne pollution predominantly generated by traffic, induces silent but significant organ-specific alterations, which may impair vascular patency and reactivity and may contribute to ischemic cardiac events in the adulthood.

Key words: 1- Atmospheric pollution; 2- Lung; 3- Collagen fibers 4- Coronary arterioles 5- Vascular remodeling; 6-Elastic fibers

INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

Os efeitos nocivos da poluição atmosférica na saúde são historicamente bem documentados desde meados do século XX, após episódios agudos de poluição como o do vale de Meuse, Bélgica em 1930. Uma região com grande concentração de indústrias e condições meteorológicas desfavoráveis, como ausência de ventos, impediram a dispersão dos poluentes. Foi registrado aumento da incidência de doenças respiratórias e óbito de 60 pessoas até dois dias após o início da ocorrência (Firket, 1931). Em Londres em 1952, ocorreu o episódio mais grave, onde uma nuvem com taxas elevadas de SO₂ e material particulado (MP) ficou estacionada sobre a cidade por aproximadamente três dias levando à morte cerca de 4000 pessoas em relação à média de óbitos em períodos semelhantes (Logan, 1952).

Em 1956 o Parlamento Inglês atribuiu às autoridades locais o controle das áreas de maior risco de ocorrência e acúmulo de fumaça preta emitida pelas chaminés das residências, obrigando e financiando a troca do sistema a carvão por eletricidade, gás ou óleo diesel.

De 1956 a 1958 os *Clean Air Acts* ampliaram o controle das emissões de poluentes industriais, regulamentando as emissões de enxofre e fumaça preta (Braga et al., 2002).

Na década de 70, foi criada nos Estados Unidos da América a entidade *Environmental Protection Agency* (EPA) à qual foi delegado o controle da qualidade do ar, sendo então estabelecidos padrões com limites máximos para seis poluentes:

material particulado (MP), dióxido de enxofre (SO₂), monóxido de carbono (CO), dióxido de nitrogênio (NO₂), ozônio (O₃) e chumbo (Pb).

Em 1976 a *Comission of the European Communities* – CEC estabeleceu padrões para o SO₂, CO, NO₂, MP e oxidantes foto-químicos e, desde então, vem sendo aprimorado estes padrões, o que tem subsidiado as legislações dos diversos países europeus de maneira uniforme (Braga et al.,2002).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) em conjunto com a *World Health Organization* (WHO, 2005) mantém desde 1975 um programa de apoio técnico aos países em desenvolvimento para a implantação de programas de monitoramento de poluentes atmosféricos.

Poluição atmosférica no Brasil e no Estado de São Paulo

No Brasil, os padrões foram estabelecidos pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA) e aprovado pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), por meio da Resolução CONAMA nº 03/90.

No Estado de São Paulo, a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) é o órgão fiscalizador e responsável pelo monitoramento ambiental e considera como poluente qualquer substância presente no ar e que, pela sua concentração, possa torná-lo impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde, causando inconveniente ao bem estar público, danos aos materiais, à fauna e a flora ou prejudicial à segurança, ou uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade.

O nível de poluição atmosférica é medido pela quantidade de substâncias poluentes presentes no ar. A variedade de substâncias que podem ser encontradas na atmosfera é muito grande, o que torna difícil a tarefa de estabelecer uma classificação. Para facilitar essa classificação, os poluentes são divididos em duas categorias:

- Poluentes primários: aqueles emitidos diretamente pelas fontes de emissão.
- Poluentes secundários: aqueles formados na atmosfera através da reação química entre poluentes primários e componentes naturais da atmosfera.

As substâncias poluentes podem ser classificadas universalmente pelo seu composto e pela fonte emissora da seguinte forma:

Compostos de Enxofre: SO_2 , SO_3 , H_2S , mercaptanas sulfatos

Fonte: combustões, olarias, usinas termoeletricas, refinarias de petróleo, usinas de ferro/aço, indústria de fertilizantes e plantas.

Compostos de Nitrogênio: NO , NO_2 , NH_3 , HNO_3 , nitratos

Fonte: emissões de veículos, indústria de fertilizantes.

Compostos orgânicos: hidrocarbonetos; álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos orgânicos.

Fonte: emissões de veículos, refinarias de petróleo e vegetação, pesticidas, lavanderias e propelentes de aerossóis.

Monóxido de carbono: CO

Fonte: emissões de veículos e oxidação de terpenos (vegetação).

Compostos Halogenados: HCl , HF , cloretos, fluoretos.

Fonte: pesticidas, lavanderias e propelentes de aerossóis.

Material Particulado: mistura de compostos no estado sólido ou líquido

Fonte: emissões de veículos, refinarias de petróleo, usinas a gás, geração de eletricidade, incinerações-fábricas de cimento, cerâmicas, estufas e carvão, fornos e, entre outras, conversão gás-partícula.

Ozônio: O_3

Fonte: Na troposfera, principalmente: hidrocarbonetos + óxidos de nitrogênio + luz

Foram estabelecidos dois tipos de padrões de qualidade do ar: os primários e os secundários.

Padrões primários: níveis máximos toleráveis de concentração de poluentes atmosféricos que, se ultrapassados, poderão afetar a saúde pública. Constituindo-se em metas de curto e médio prazo. Por exemplo, no caso do NO_2 seu padrão primário é de $100 \mu g/m^3$ a $320 \mu g/m^3$ em 24h (CETESB 2008) que se ultrapassado entra-se em estado de atenção.

Padrões secundários: níveis desejados de concentração para poluentes os quais se prevê o mínimo efeito adverso na saúde, mínimos danos à fauna e à flora, aos materiais e ao meio ambiente em geral. Constituem-se em metas de longo prazo que no exemplo citado acima são de 100 a $190 \mu g/m^3$ em 24h. Para cada poluente medido é calculado um índice. Através do índice obtido o ar recebe uma qualificação, que é uma espécie de nota, feita conforme apresentado na tabela abaixo (CETESB 2007):

Tabela 1: Índices dos poluentes e sua qualificação CETESB 2007

Qualidade	PM ₁₀ (µg/m ³)	NO ₂ (µg/m ³)	SO ₂ (µg/m ³)
Boa	0 – 50	0 - 100	0 - 80
Regular	50 - 150	100 - 320	80 - 365
Inadequada	150 - 250	320 - 1130	365 - 800
Má	250 - 420	1130 - 2260	800 - 1600
Péssima	>420	>2260	>1600

Esta qualificação do ar está associada com efeitos sobre a saúde, independente do poluente em questão, segundo esses índices a qualidade boa e regular praticamente não acarretam riscos à saúde. A população em geral não é afetada nem pessoas de grupos sensíveis (crianças, idosos e pessoas com doenças respiratórias e cardíacas), podem apresentar sintomas como tosse seca e cansaço (CETESB). Porém, acredita-se que os efeitos à exposição mantida a baixos níveis de poluição podem culminar em efeitos crônicos na saúde (Donaldson,K., et all, 2001). Desta forma podemos considerar o processo de poluição do ar em duas fases:

- fase de geração, emissão, transporte, difusão e transformação (ex: um incinerador de resíduos produz a poluição e a chaminé a emissão).
- fase de recepção (ex.: pessoas, vegetação, animais, ou os materiais).

O crescimento desordenado da Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) e dos municípios vizinhos a partir da 2ª Guerra Mundial, levou à instalação de indústrias

de grande porte sem a preocupação com o controle das emissões de poluentes atmosféricos, sendo possível a visualização de chaminés emitindo enormes quantidades de fumaça. Há registros do século passado, na década de 60 e especialmente de 70, de episódios agudos de poluição do ar que levaram a população ao pânico devido aos fortes odores, decorrentes do excesso de poluentes lançados pelas indústrias na atmosfera, causando mal-estar e lotando os serviços médicos de emergência. Em decorrência desse crescimento desordenado, no início dos anos 60, foi criada a Comissão Intermunicipal de Controle da Poluição das Águas e do Ar (CICPAA), envolvendo os municípios do ABC (Santo André, São Bernardo do Campo, São Caetano do Sul e Mauá) que desenvolveu um sistema de medição de poluentes na atmosfera e, em 1975 esse sistema foi incorporado pela CETESB.

1.3 MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO AR NA RMSP- CETESB

O monitoramento da qualidade do ar, com a avaliação das concentrações de poluentes no Estado de São Paulo foi iniciado na RMSP em 1972. A partir dessa época a qualidade do ar passou a ser divulgada diariamente à população por meio de boletins encaminhados à imprensa.

Entre 1975 e 1976, embora o Estado de São Paulo não possuísse uma legislação adequada para que a CETESB pudesse atuar de forma efetiva no controle das diversas fontes, desenvolveu-se intensa atividade dirigida ao levantamento das fontes de emissões atmosféricas industriais e outras, em um programa denominado "Operação Branca".

Após a consolidação dos dados de emissão e com a promulgação da Lei 997/76 e seu regulamento aprovado pelo Decreto 8.468/76, a CETESB aplicou na década de 70 um programa para redução das emissões industriais de MP e, no início dos anos 80, um programa para redução das emissões de SO₂ e ainda nessa década foram registradas reduções significativas dos níveis desse poluente na atmosfera da RMSP. Ainda na metade da década de 70, a CETESB detectou altos níveis de monóxido de carbono (CO) na região central da cidade de São Paulo provocada pelas altas emissões dos carros movido a gasolina. A partir de então se verificou que os veículos automotores eram os principais causadores de poluição da RMSP.

No meio de transporte os derivados de petróleo (como a gasolina e o óleo diesel) são os combustíveis predominantes. Apesar de ser o Brasil o único país no mundo que conta com uma frota veicular que utiliza etanol em larga escala como combustível, exclusivo ou misturado a derivados de petróleo como a gasolina (cerca de 34% do combustível consumido na RMSP corresponde ao álcool). Recentemente houve uma expansão no uso do gás natural veicular, principalmente em veículos leves de uso intensivo (táxis e frotas cativas).

As emissões originadas pelo uso de veículos automotores podem ser divididas nas seguintes categorias:

- emissões de gases e partículas pelo escapamento do veículo (subprodutos da combustão lançados à atmosfera pelo tubo de escapamento);
- emissões evaporativas de combustível (evaporação de hidrocarbonetos do combustível);

- emissões de gases do cárter do motor (subprodutos da combustão que passam pelos anéis de segmento do motor e por vapores do óleo lubrificante);
- emissões de partículas provenientes do desgaste de pneus, freios e embreagem;
- ressuspensão de partículas de poeira do solo ;
- emissões evaporativas de combustível nas operações de transferências de combustível (associadas ao armazenamento e abastecimento de combustível);

Vale a pena ressaltar alguns dos principais produtos da combustão em veículos automotores que são o CO₂, água (H₂O), CO, hidrocarbonetos não ou parcialmente oxidados (HC), aldeídos, NO_x, SO₂, MP e O₃.

A regulamentação destinada a controlar a emissão de poluentes pelos veículos automotores enfrentou mundialmente, forte oposição da indústria automobilística que argumentava que as principais fontes de poluição atmosférica eram as indústrias e não os veículos e que não dispunham de tecnologias de controle de emissão pouco custosas, efetivas e confiáveis; que haveria necessidade de longos prazos para o desenvolvimento dessas tecnologias e que o controle de emissões elevaria o preço dos veículos. Entretanto, o reconhecimento pelos governos dos países envolvidos nas discussões dos elevados custos sociais decorrentes da poluição veicular, argumentado por inúmeros trabalhos científicos e apoiado na pressão pública da mídia e de diversos organismos não governamentais, contribuíram para a manutenção da firmeza na ação regulatória e estimulou o desenvolvimento tecnológico no setor automotivo e de combustíveis.

1.4 PROGRAMAS DE CONTROLE DA POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA DE ORIGEM VEICULAR

No Brasil em 1976 foi iniciada pela CETESB a operação caça fumaça que visou fiscalizar a emissão de fumaça preta, emissão característica de motores a óleo diesel quando desregulados, que resultou numa diminuição de 45% dos motores desregulados em 1996, para 9,2% em 2000.

Durante os anos 80, a CETESB desenvolveu as bases técnicas que culminaram com a Resolução nº 18/86 do CONAMA, que estabeleceu o Programa de Controle da Poluição de Ar por Veículos Automotores (PROCONVE), posteriormente complementada por outras Resoluções CONAMA. Essas ações resultaram na redução significativa de emissões dos poluentes emitidos pelos veículos automotores. Este fato é demonstrado no gráfico (Fig. 1) que exemplifica a evolução da emissão de HC e NOx até 2003, ano de nossa exposição.

Figura 1: Evolução dos fatores médios de emissão de HC e NOx dos veículos movidos a álcool e a gasolina C da RMSP (Relatório CESTESB 2003)

Outros programas surgiram como em 1995, que durante uma semana houve mobilização para que os proprietários de veículos na RMSP deixassem, voluntariamente em casa seu veículo, em um dia na semana, conforme o final da placa. Em 1996 e 1997, a Operação Rodízio foi realizada por meio de Lei com intuito de reduzir os níveis da poluição porém hoje em dia tem como principal objetivo a redução dos congestionamentos na região denominada de centro expandido da Cidade. Mais recentemente, a CETESB elaborou uma proposta para o controle das emissões das motocicletas, cuja frota na RMSP vem crescendo de forma notável nos últimos anos com seu perfil de utilização, predominante no segmento econômico de prestação de serviços de entregas em regiões urbanas. Tendo em vista os elevados fatores de emissão dos mesmos em relação aos dos automóveis novos, deu origem à Resolução CONAMA nº 297/02 que estabeleceu o Programa de Controle da Poluição do Ar por Motociclos e Veículos Similares (PROMOT) completada pela Resolução CONAMA nº 342/03.

Em 2003, a RMSP possuía cerca de 2000 indústrias de alto potencial poluidor e uma frota automobilística de aproximadamente 7,5 milhões de veículos, sendo essas fontes de poluição responsáveis pelas emissões para a atmosfera de 1,8 milhão de t/ano de CO, 415 mil t/ano de HC, 409 mil t/ano de NOx, 67 mil t/ano de MP e 37 mil t/ano de SOx. Desses totais os automóveis são responsáveis por 98% das emissões de CO, 97% de HC, 97% de NOx, 52% de MP e 55% de SOx (CETESB,2003). O gráfico da Figura 2 mostra o aumento da frota de veículos automotores até 2003.

Figura 2: Evolução da frota de veículos automotores leves na RMSP (Relatório CETESB 2003)

1.5 POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA E O LABORATÓRIO DE POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA EXPERIMENTAL (LPAE)

O Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) foi criado em 1979, para comparar os efeitos tóxicos da emissão veicular do álcool e da gasolina, quando o Brasil lançou o programa de incentivo a utilização do álcool como combustível para automóveis. Os estudos verificaram que ambos são tóxicos porém o álcool um pouco menos (Massad E. et al , 1985; Saldiva et al., 1985). Desde então a proposta principal do LPAE é a investigação dos efeitos da poluição atmosférica sobre a saúde, através de estudos epidemiológicos e do uso de bioindicadores animais e vegetais. Böhm et

al, 1989 verificaram que os achados patológicos em bioindicadores expostos à poluição da cidade de São Paulo (poluição veicular) e da cidade de Cubatão (poluição industrial), são muito úteis para correlacionar o tipo (qualitativo e quantitativo) de poluição e diferentes locais de lesão das vias aéreas . Dando seqüência aos estudos dos efeitos da exposição crônica à poluição no sistema respiratório desses bioindicadores, observaram significativa alteração nas propriedades de defesa mucociliar e predisposição à infecção respiratória (Saldiva et al., 1992; Lemos et al., 1994). Pereira et al., 1995, mostraram associação entre poluição atmosférica e hiperresponsividade pulmonar em ratos expostos por 3 meses em condições reais de ar urbano quando comparados com um grupo controle mantido em uma área considerada não poluída no mesmo período. Estudos epidemiológicos do grupo verificaram forte correlação entre mortalidade infantil (Saldiva et al., 1994) e de idosos (Saldiva et al., 1995) por doenças respiratórias com a poluição atmosférica. Braga et al., 2000, mostraram que acréscimos nos níveis dos poluentes do ar na cidade de São Paulo estão associados ao aumento do número de admissões hospitalares por doenças respiratórias em crianças com dois anos de idade ou menos. E Martins et al., 2002, mostraram que variações de um interquartil na concentração de SO_2 ($11.82 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e de O_3 ($35.87 \mu\text{g}/\text{m}^3$) aumentaram a incidência de internações em idosos com doenças respiratórias crônicas em 18% e 14% respectivamente. Em paralelo com o crescimento dos estudos internacionais de poluição e seus componentes, pesquisas foram sendo desenvolvidas com concentrados de partículas ambientais e sua associação com lesão pulmonar (Saldiva et al., 2002) e vasoconstricção em artérias pulmonares (Batalha et al., 2002).

Desenvolvimento do Laboratório de Defesa Pulmonar em conjunto com o LPAE onde Macchione et al., 1999, verificaram que a exposição ao PM₁₀ (material particulado com diâmetro $\leq 10 \mu\text{m}$) coletado em São Paulo promoveu lesão no aparelho mucociliar do palato de rã que mimetiza o epitélio respiratório, pelo estresse oxidativo, evidenciado por uma depleção de antioxidantes endógenos como a glutathione. O uso de plantas como bioindicadores onde Guimarães et al., 2000, e Ferreira et al., 2000, demonstraram aumento na incidência de micronúcleos em plantas expostas cronicamente ao ar da cidade de São Paulo. Carvalho-Oliveira et al., 2004, verificaram a associação da mutagenicidade (nº de micronúcleos na planta *Tradescantia pallida*) e toxicidade (inibição das mitoses das células do meristema primário da raiz de *Allium cepa*) do material particulado fino coletado durante uma greve total de ônibus ocorrida na cidade de São Paulo durante 3 dias. Os resultados mostraram diminuição da concentração de todos os elementos obtidos nos filtros. Houve redução significativa dos micronúcleos apesar da toxicidade não ter sido significativa. Além de estudos voltados para o sistema respiratório, outros trabalhos começaram a demonstrar o efeito da poluição em outros sistemas como no reprodutor onde, Lichtenfels et al., 2007, mostraram uma associação entre os níveis de poluição ambiental e mudanças na razão sexual em camundongos; houve uma interferência na distribuição da proporção de cromossomos X:Y no esperma dos camundongos machos, com maior frequência do cromossomo X. E no sistema cardiovascular Rivero et al., 2005, encontraram uma significativa diminuição da razão lumen/parede tanto em artérias coronárias como em artérias pulmonares, verificaram também linfocitose sangüínea após instilação de concentrações de PM_{2,5} em ratos.

Lemos et al., 2006, também avaliaram a repercussão da poluição nos vasos coronarianos mas dessa vez em ambiente real e concluíram que a poluição induziu vasoconstrição.

Atualmente com a mudança do panorama dos índices de poluição que vêm diminuindo e também sofrendo alterações na sua composição, várias são as vertentes de estudos no campo da poluição atmosférica. Sabemos que a poluição causa efeitos deletérios em múltiplos órgãos mas muitos de seus mecanismos fisiopatológicos ainda são controversos, que tipo de poluentes são mais lesivos, que níveis podem ser realmente menos lesivos e quanto tempo de exposição ainda é segura para a saúde.

1.6 POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA E OS EFEITOS SOBRE O SISTEMA CARDIOPULMONAR

O nosso estudo enfocará o sistema cardiopulmonar de camundongos que ficaram expostos à poluição real de São Paulo a qual caracterizamos acima como predominantemente veicular cuja concentração manteve-se dentro dos índices baixos de MP, como mostra a Figura 3 da evolução das concentrações médias anuais de MP₁₀ até 2003. Estudos epidemiológicos confirmam o aumento de mortalidade de todas as causas naturais associados ao aumento das concentrações de poluentes do ar como NO₂, CO e PM₁₀ (Briggeri et al., 2004) e danos na saúde associados a poluição atmosférica aos níveis próximos do valor mínimo do padrão do ar (Viggot et al., 1999).

Fizemos amostragem de alguns poluentes que são próprios da queima de combustível que foram o MP ($MP_{2,5}$), NO e Black Carbon (Fumaça preta). Não existe legislação nacional para $MP_{2,5}$.

Os padrões propostos pela US EPA estabelecem que a média aritmética das médias anuais (calculada a partir das médias de 24 horas) dos últimos três anos consecutivos não pode ultrapassar $15\mu\text{m}/\text{m}^3$ e o percentil 98 das médias de 24 horas em três anos não pode ultrapassar $65\mu\text{m}/\text{m}^3$ para nenhuma estação da região.

Figura 3: Evolução das concentrações médias anuais de MP_{10} até 2003 na RMSP (Relatório CETESB- 2003)

1.6.1 MATERIAL PARTICULADO (MP)

O MP é uma mistura de partículas líquidas e sólidas em suspensão no ar com característica físico-química muito variada. Sua composição e tamanho dependem das fontes de emissão. O tamanho da partícula é utilizado para medidas de emissões

do MP e para o monitoramento de sua concentração na atmosfera. O tamanho da partícula é expresso em relação ao seu diâmetro aerodinâmico. O MP pode ser classificado como Partículas Totais em Suspensão (PTS) que são aquelas com diâmetro aerodinâmico menor que 50 μ m. A EPA, em 1979 determinou que as partículas finas com diâmetro $\leq 10 \mu$ m (MP₁₀) que são chamadas de partículas inaláveis pois podem penetrar pela laringe e atingir as vias aéreas, fossem divididas em duas frações: fração grossa e partículas finas que tem diâmetro $\leq 2,5 \mu$ m (MP_{2,5}), possuem maior acidez e atingem quando inaladas as porções mais inferiores do trato respiratório que não possuem mais o sistema ciliar de proteção, padrão utilizado pela "International Standards Organization thoracic convention" e considerado como padrão nos Estados Unidos (apud Donaldson, 2001).

Fumaça Preta ou "Black Carbon" ou "Black Smoke" é um padrão de MP, cuja estimativa da massa é baseada no método de reflexão da luz que incide na poeira coletada em um filtro, com partículas finas sendo mais escuras. É aceito pela EPA, como uma fração entre MP₁₀ e TSP. Confere a esse parâmetro a característica de estar diretamente relacionado ao teor de fuligem na atmosfera (proveniente da combustão) e ao carbono elementar (Kinney A.et al., 2000; Janssen H.et al,2000 apud WHO 2005).

Óxidos de nitrogênio (NO_x)

O NO e o NO₂ são os derivados do NO_x mais importantes gerados pela combustão principalmente veicular. O NO sob ação da luz solar se transforma em NO₂ e tem papel importante na formação de oxidantes fotoquímicos como o ozônio.

A maioria dos efeitos do MP na saúde é demonstrada em estudos epidemiológicos e experimentais com exacerbação dos sintomas respiratórios e cardíacos em indivíduos suscetíveis (Pope et al., 2002; Lin, et al., 2003) envolvendo mecanismos ligados aos metais de transição e estresse oxidativo (Kelly, et al., 2003) causando aumento da permeabilidade epitelial ativando fatores de transcrição para genes pró-inflamatórios em macrófagos e nas células epiteliais, especialmente da família da IL-8, da IL-6 e TNF (Carter et al., 1997; Eeden et al., 2001). A produção desses mediadores inflamatórios após a exposição a poluentes atmosféricos pelas células constitutivas dos pulmões pode deflagrar respostas locais e sistêmicas potencialmente capazes de promover ou acelerar processos patológicos ligados ao aumento da mortalidade (Dockery, et al., 1993; Pope, et al., 2002).

Estudos recentes demonstraram a influência da exposição ao MP ou ozônio alterando a pressão arterial pulmonar em crianças (Calderón-Guarcidueñas L., 2007) e as placas de ateroma formadas nas artérias e nas coronárias (Sun Q. et al., 2005), alteração da frequência cardíaca que são as bases mais importantes para a angina e o infarto do miocárdio, causas de morbidade e mortes associadas à poluição (Carnelley e Le, 2001; Pope, 2000; Pope et al., 2004).

A exposição ao MP também aumenta a produção de fibrinogênio que é um importante componente da coagulação sanguínea e da trombose plaquetária, além de ser determinante na maior viscosidade sanguínea. Essa viscosidade está associada a severas doenças cardiovasculares (Eeden et al., 2002; Inoue, et al., 2006).

Atualmente estudos demonstraram alterações celulares nos cardiomiócitos induzido pela exposição ao MP (Knuckles and Dreher, 2007).

1.6.2 SISTEMA RESPIRATÓRIO

O sistema respiratório é um dos primeiros alvos dos efeitos adversos da poluição. O sistema de tubulação aérea dos pulmões é baseado em bifurcações ao longo de 23 gerações de brônquios, o que faz com que a soma das áreas de secções transversais aumente progressivamente. Isso faz com que o fluxo seja mais lento à medida que se aproxima dos alvéolos, e passe de turbulento a laminar. O ar inspirado vai até os bronquíolos terminais, ao nível da 16ª geração de brônquios por fluxo de massa. Nas porções mais distais (os bronquíolos respiratórios), a movimentação dos gases depende principalmente da difusão, mas, como as distâncias são extremamente pequenas e a difusão das moléculas de gás dentro das vias aéreas é rápida, isso é o suficiente para as funções de troca gasosa, que ocorrem principalmente, nos ductos alveolares (ramificação dos bronquíolos respiratórios que se abrem frequentemente nos sacos alveolares). Essa lentificação do fluxo, favorece a redução da penetração de particulados inalados nas porções mais distais do parênquima pulmonar. Existem três mecanismos principais envolvidos:

Impactação inercial: a inércia das partículas, que lhes dá a tendência de seguir sempre em linha reta, promove colisões, graças às bifurcações frequentes dos brônquios. Embora seja o principal mecanismo de deposição das partículas grandes, acima de 10µm, tem influência sobre ampla faixa de diâmetro de partículas inaladas.

Sedimentação gravitacional: é favorecida pela queda de fluxo, e ocorre com as partículas de 0,5 a 5,0 µm. Representa o mais importante meio de deposição de partículas nos alvéolos.

Difusão: o movimento browniano faz com que as moléculas de gases, nas regiões onde o fluxo é mínimo, desloquem as partículas ao acaso, até que entrem em contato com as paredes das vias aéreas. Afeta principalmente partículas pequenas, com diâmetro inferior a $0,1\mu\text{m}$ de diâmetro (Saldiva,1990).

As paredes dos brônquios são revestidas por mucosa composta de epitélio pseudo estratificado ciliado, cuja lâmina própria é rica em fibras elásticas. A camada muscular lisa da via aérea é relativamente espessa e contínua (brônquios maiores) e mais rarefeita em brônquios menores. A submucosa é formada de tecido conjuntivo relativamente frouxo. A camada de cartilagem hialina se organiza em placas irregulares que se distribuem pela parede brônquica, conferindo ao brônquio um formato cilíndrico. Na medida em que o brônquio diminui em tamanho, as placas de cartilagem tornam-se menores e em menor número, sendo que no diâmetro de 1mm estas placas desaparecem e a estrutura passa a ser chamada de bronquíolo. A adventícia é formada por tecido conjuntivo denso e une o brônquio às estruturas adjacentes, tais como a artéria pulmonar e o parênquima pulmonar. Os bronquíolos não apresentam cartilagem, glândulas ou nódulos linfáticos. O epitélio é distinto do epitélio chamado respiratório pois varia desde cilíndrico simples ciliado até cúbico simples, na sua porção final (Figura 4). A lâmina própria dos bronquíolos é delgada e rica em fibras elásticas. Abaixo da mucosa encontra-se a camada muscular, que é relativamente mais desenvolvida do que nos brônquios.

Os bronquíolos terminais são revestidos por um epitélio cúbico simples contendo células de Clara (secretam lipoproteínas que têm a função de prevenir adesões no lúmen quando os bronquíolos se contorcem durante o ciclo respiratório normal).

Figura 4: Vias aéreas ao longo do sistema respiratório

Os bronquíolos respiratórios são revestidos por epitélio cúbico simples. Os ductos alveolares também são revestidos por um epitélio cúbico ou pavimentoso simples que terminam nos sacos alveolares mas não se estendem pelas paredes deles (Figura 4). Por outro lado, as fibras colágenas e elásticas se continuam com a parede alveolar sustentando-as.

A circulação sanguínea dos pulmões envolvida na arterialização do sangue é realizada pela artéria pulmonar e seus ramos acompanham a árvore brônquica, os ramos arteriais são envoltos pela adventícia dos brônquios e bronquíolos (Moriscot , 2004).

1.6.3 SISTEMA CIRCULATÓRIO SANGÜÍNEO

O papel fundamental desse sistema é distribuir pelo organismo, através do sangue nele contido, substâncias nutritivas, hormônios, O₂, água, sais minerais e muitas outras substâncias que mantêm o funcionamento integrado dos diversos órgãos.

Os componentes do sistema circulatório sangüíneo são o coração, as artérias, os vasos capilares e as veias.

O coração funciona como uma bomba muscular com quatro câmaras (átrio direito, ventrículo direito, átrio esquerdo e o ventrículo esquerdo) que se comunicam com grandes vasos sanguíneos. A força de contração do coração impulsiona o sangue para todos os órgãos. O sangue percorre dois circuitos anatomicamente separados: o circuito pulmonar (leva sangue do coração para os pulmões e de volta ao coração) e o circuito sistêmico (distribui o sangue para todos os órgãos e traz o sangue de volta para o coração).

O músculo cardíaco é chamado de miocárdio e é constituído por células musculares estriadas cardíacas dispostas em diversas direções, são mono ou binucleadas enquanto que as fibras esqueléticas são multinucleadas. Outra peculiaridade das fibras musculares cardíacas é que se associam umas às outras, por meio de complexos juncionais, denominados de discos intercalares, facilmente observados na microscopia óptica.

Estrutura geral dos vasos sanguíneos; a partir de certo diâmetro os vasos sanguíneos são constituídos de três camadas denominadas túnicas ou camadas:

Túnica íntima: é a mais interna e está em contato com o sangue. Consiste em uma camada de células endoteliais, apoiada em tecido conjuntivo frouxo. Nas artérias, a

íntima possui ainda a membrana limitante elástica interna, constituída de material elástico e que a separa da túnica média.

Túnica média: geralmente constituída de fibras musculares lisas dispostas circularmente, de pequena quantidade de fibras de colágeno tipo III (fibras reticulares) e de proteoglicanas. Nesse local, o colágeno e as proteoglicanas são produzidos pelas células musculares lisas. Nas artérias de maior calibre, a túnica média possui uma membrana limitante elástica externa, separando-a da túnica adventícia.

Túnica adventícia: formada por tecido conjuntivo frouxo contínuo com o conjuntivo adjacente, sem um limite externo nítido entre a adventícia e o tecido conjuntivo dos órgãos onde o vaso sanguíneo está localizado (Moriscot, 2004).

1.6.4 FIBRAS DO TECIDO CONJUNTIVO

Fibras de colágeno: as fibras colágenas são as mais abundantes nos tecidos conjuntivos. Quando observadas no microscópio eletrônico, contêm estruturas cilíndricas e alongadas denominadas fibrilas, que por sua vez são constituídas por moléculas de colágeno arranjadas em paralelo com diâmetro variável. Alguns estudos sugerem que esse arranjo em paralelo das moléculas confere ao colágeno a característica de birrefringência. Dependendo do tipo de coloração, pode-se observar pela microscopia eletrônica, fibrilas de colágeno de até 10nm de espessura. Filamentos de proteoglicanos aparecem conectados nas proximidades das fibrilas de colágeno transversalmente e periodicamente ligados aos sítios específicos das fibrilas. Esta estrutura das fibras colágenas com as fibrilas em paralelo, forma feixes

que junto com proteoglicanos podem ser flexíveis, mas oferecem grande resistência para forças de estiramento de acordo com suas propriedades mecânicas. O arranjo da rede de fibras colágenas mantém função de acordo com cada tecido e órgão, sendo que atualmente são conhecidos aproximadamente 20 tipos diferentes de moléculas de colágeno(Ushiki T., 2002; Moriscot, 2004).

Fibras elásticas: são estruturalmente distintas das colágenas por serem mais delgadas e não apresentarem fibrilas nem estrias transversais. Estas fibras sofrem intensa ramificação e se associam umas às outras, formando trama irregular. As fibras elásticas possuem alta capacidade de sofrer deformação mecânica, graças à forma contorcida das moléculas de elastina. Vários investigadores têm demonstrado que os componentes da elastina formam uma contínua rede ou uma lâmina com a superfície lisa que apresentam características morfológicas específicas para cada tecido e órgãos. Além das fibras elásticas clássicas foram identificadas algumas variantes, as fibras elaunínicas e oxitalânicas(Ushiki T., 2002; Moriscot, 2004).

Atualmente muitos estudos têm demonstrado alterações desse sistema de fibras colágenas e elásticas decorrentes do remodelamento dos tecidos durante e depois de processos inflamatórios agudos e/ou crônicos como os que ocorrem na asma fatal e na síndrome do desconforto respiratório agudo (Negri, et al., 2000; Mauad T. et al., 2004; Araujo B.B. et al., 2008) e também relacionados à poluição atmosférica (Dai J. et al., 2003).

1.7 JUSTIFICATIVA

Este trabalho propõe verificar as possíveis alterações estruturais induzidas pela exposição crônica à poluição atmosférica de origem veicular da cidade de São Paulo nos sistemas cardiopulmonar de camundongos machos Swiss desde o nascimento até idade adulta, semelhante aos humanos que nascem e crescem nos grandes centros urbanos e que apresentam na faixa dos 40-50 anos de idade eventos cardiovasculares de alto índice de morbi-mortalidade.

2 OBJETIVOS

Estudar as alterações induzidas pela exposição crônica contínua aos níveis ambientais reais de poluição atmosférica da cidade de São Paulo, em camundongos machos Swiss saudáveis desde o nascimento até a idade adulta avaliando-se:

- Os efeitos inflamatórios na região peribronquiolar e no parênquima pulmonar.
- Remodelamento estrutural dos vasos peribronquiolares e coronarianos.
- Remodelamento do miocárdio

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este é um trabalho de extensão da tese de doutorado da Dra. Ana Júlia Lichtenfels do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE- FMUSP), que estudou o sistema reprodutor dos camundongos utilizados no presente estudo (Lichtenfels et al., 2007).

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e de Análise de Projetos para Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o nº 803/05.

Os animais foram tratados de acordo com as normas do "*Guide for the care and use of laboratory animals*" do "*Institute of laboratory Animal Resources da National Academy of Sciences*", de Washington DC, USA.

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Cinquenta camundongos machos Swiss com 10 dias de idade não isogênicos, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foram divididos em dois grupos de 25 e expostos concomitantemente às câmaras denominadas câmara limpa (com filtros) e câmara poluída (semelhante ao ar ambiente), de Setembro a Dezembro de 2003. Os animais foram aclimatados por cinco dias antes do início da exposição e mantidos em gaiolas de polipropileno e alimentados com ração comercial balanceada (Nuvital-Nutrients Ltda., Colombo, Brasil) e água *ad libitum* (autoclavada), durante todo o período experimental.

Ao término do período de exposição, os camundongos foram pré-anestesiados com isoflurano inalatório até a constatação de falta de sensibilidade (Cristália Produtos Farmacêuticos, Ltda) e eutanasiados por deslocamento cervical e em seguida exsanguinados. De cada animal, foi obtido peso total e dos órgãos e coletado material biológico, a saber:

- coração
- pulmão

Preparo de amostra dos corações e pulmões para procedimentos histológicos.

3.2 CÂMARAS DE EXPOSIÇÃO

O sistema de exposição empregado nesse estudo já foi previamente descrito (Pires-Neto, et al., 2006; Lemos, et al., 2006; Lichtenfels et al., 2007). Foram utilizadas duas câmaras de exposição que ficam lado a lado. As câmaras consistem em estruturas cilíndricas de alumínio, medindo 2 m de diâmetro e 2,15 m de altura e cobertas por um filme plástico com proteção contra UV (Figura 5). O ar atmosférico entra na base das câmaras por uma bomba de sucção e é uniformemente distribuído saindo por uma abertura na parte superior (câmaras do tipo topo aberto). É um sistema normobárico: a pressão dentro das câmaras não excede 30 mm H₂O. A câmara denominada câmara limpa, possui sistema de filtração com três filtros alinhados em série. Um para substâncias químicas (Al₂O₃ e KMNO₄) e os outros dois removem: grandes partículas (modelo JFL-90) e partículas finas e ultrafinas até 0,3µm (High Efficiency Particulate Air, HEPA). Os filtros foram comprados da Purafil (São Paulo, SP, Brazil).

As câmaras recebem o ar atmosférico com um fluxo de 20 m³/min. Dentro das câmaras, os animais foram mantidos nas mesmas condições de temperatura, umidade (medidas por um termohigrômetro digital - Soil Control, Tecnologia em Instrumentos do Solo, Ltda) e som.

Figura 5. Câmaras de exposição do tipo Topo Aberto instaladas no seu local de uso

3.3 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DA EXPOSIÇÃO

As câmaras de exposição foram colocadas no campus da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a 20 m de uma avenida e a 150 m do cruzamento dessa avenida com outra, ambas com tráfego de automóveis muito intenso da Cidade de São Paulo. A 160 m de distância desse local situa-se uma estação de monitoramento de poluição CETESB. No cruzamento mencionado acima, estima-se que aproximadamente 83.941 carros, 9.936 veículos a diesel e 6.321 motocicletas circulam diariamente. A avenida lateral onde se situam as câmaras, circulam cerca de

25.590 carros, 5.299 veículos a diesel e 808 motocicletas. Não há indústrias ou significativa queima de biomassa nos arredores (relatório CETESB 2003).

A poluição atmosférica desse local foi bem caracterizada como *predominantemente veicular*. A média de PM_{10} ($PM \leq 10 \mu m$) durante o ano de 2003 foi em torno de $50 \mu g/m^3$ (Lichtenfels AJ et al, 2007). Prévia caracterização da massa de $PM_{2.5}$ ($PM \leq 2.5 \mu m$) coletada da estação de monitoramento e do terraço da Faculdade de Medicina mostraram que aproximadamente 67% da massa de $PM_{2.5}$ é derivada de fonte veicular, com *black carbon*/orgânico, média de carbono medida de 40-70% durante o dia. Foram feitas análises de $PM_{2.5}$ elementar nos filtros coletados no local de exposição entre Agosto de 2005 e Maio de 2007 confirmando que essa emissão veicular e ressuspensão da crosta são formadas na maior parte por componentes de $PM_{2.5}$. A média $\pm$ SD da razão *black carbon*/ carbono total foi de $39 \pm 22\%$ durante o curso de nossas análises. Por isso, estudos anteriores e recentes mostram que a maior parte das emissões veiculares é de composta por $PM_{2.5}$ nesse local de exposição.

3.4 MEDIDAS DOS PARÂMETROS DA ATMOSFERA DO INTERIOR DAS CÂMARAS

A concentração de $PM_{2.5}$ coletada durante 24 horas foi determinada gravimetricamente usando um impactador de partículas do tipo *Harvard* (*Air Diagnostics, Harrison, ME*) com um fluxo na razão de $10 L.m^{-1}$. O impactador foi equipado com um filtro de policarbonato e os resultados foram expressos em $\mu g/m^3$. O NO_2 foi coletado e analisado através do método colorimétrico descrito por Lodge (Lodge, 1989). O *Black Carbon* (BC) foi medido por refletância óptica (ABNT, 1989) coletado em filtros de celulose. A temperatura e umidade relativa (dentro e

fora das câmaras) foram medidas diariamente através de termohigrômetro (Hygropalm, Brasil).

Concentrações diárias de CO (*Gas Filter Correlation, 48 series, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts*), PM₁₀ (PM ≤ 10 µm) (FH62 I-n *Beta Attenuation Monitor, Graseby Andersen, Smyrna, GA*), NO₂ (*Chemiluminescence 42 Series, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts*) e SO₂ (*Pulsed Fluorescence 43 Series, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts*) foram medidos diariamente e obtidos da central de monitoramento CETESB - Cerqueira César.

4 ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

4.1 PULMÕES

Os pulmões foram retirados em bloco e fixados em solução de formalina tamponada a 10% sob pressão constante de 20 cm de H₂O.

44 pulmões foram insuflados (23 da câmara limpa e 21 da câmara poluída), os outros 6 pulmões não insuflaram, sendo inapropriados para a análise histológica.

Os pulmões foram tratados por procedimentos histológicos rotineiros para emblocamento em parafina para o preparo de cortes.

4.2 DENSIDADE NUMÉRICA DE NEUTRÓFILOS NO SEPTO ALVEOLAR

Para a quantificação de células neutrofílicas no septo alveolar, cortes histológicos longitudinais de 4 µm foram obtidos dos pulmões e foram corados com Hematoxilina

e Eosina (HE). Utilizando um microscópio de luz modelo Olympus BX40, a densidade numérica de neutrófilos na área do septo alveolar foi determinada contando 10 campos em cada lâmina, com um retículo de 100 pontos e 50 linhas, com área total de 10.000 μm^2 com aumento de 1000x. O número de neutrófilos foi corrigido pelo perímetro do parênquima pulmonar utilizando o mesmo sistema de retículo contando o número de linhas que cruzavam a membrana basal (BM) do alvéolo distal.

A densidade numérica de neutrófilos foi calculada segunda a equação:

Densidade de neutrófilos = nº células (neutrófilos) / Perímetro da BM do septo (linhas do retículo que cruzam a BM do septo)

4.3 ANÁLISE DAS ARTERÍOLAS PERBRONQUIOLARES

Cortes corados por H&E foram submetidos a análise morfométrica através da determinação da razão lúmen/parede (L/P) das arteríolas peribronquiolares que indicaria variações do lumen em relação à parede vascular, secundário a reatividade ou remodelamento dos vasos analisados.

A análise da razão L/P foi realizada pela técnica de contagem de pontos (Batalha, 2002; Lemos, 2006). Ao microscópio comum em pequeno aumento (10x), selecionamos os vasos que obedeciam aos seguintes critérios: a) estar adjacente ao bronquíolo terminal; b) caracterizar corte transversal (variação <10% entre o diâmetro máximo e mínimo).

A L/P era determinada morfometricamente usando um microscópio acoplado a uma câmara de vídeo e um sistema de análise de imagem (microscópio Olympus BX40; câmara de vídeo colorida JVC TK - C 1380 Victor Company of Japan , Yokohama). A imagem foi digitalizada em alta resolução nesse monitor de vídeo com um retículo de $62.500 \mu\text{m}^2$ de área (aumento de 400x) contendo 100 pontos. As arteríolas eram focalizadas no centro desse retículo de forma a cobrir todo o vaso. Então, os pontos que incidiam sobre o lúmen e os pontos que incidem na parede do vaso eram contados. Depois de realizada a contagem, as arteríolas foram categorizadas por calibre em pequenos; médios e grandes, através da área do lúmen (Figura.6 B).

A razão L/P das arteríolas peribronquiolares foi calculada pela equação:

Área do lúmen= número de pontos no lúmen x 100

Área da parede vascular= número de pontos na parede do vaso x 100

Razão L/P = área do lúmen / área da parede vascular

Figura 6 A: fotomicrografia coronária ; B: fotomicrografia vaso peribronquiolar e bronquíolo; C: desenho esquemático de um retículo de cem pontos com área total de $62.500 \mu\text{m}^2$ (aumento 400x), para análise lumen /parede.

4.4 RAZÃO LUMEN /PAREDE DOS BRONQUÍOLOS (BL/P)

A reatividade das vias aéreas foi analisada através da técnica morfométrica de contagem de pontos (igual ao descrito para os vasos pulmonares) em cortes histológicos de 4 μm dos pulmões corados com (H&E). Similarmente ao procedimento morfométrico vascular, os bronquíolos foram selecionados em cada lâmina utilizando-se o retículo de 62.500 μm^2 de área em aumento de 400x em microscópio de luz modelo Olympus BX40 acoplado ao analisador de imagem (JVC TK - C 1380 *Victor Company of Japan , Yokohama*). A razão lumen /parede dos bronquíolos foi calculada através do número de pontos que incidiam no lúmen do bronquíolo pelo número de pontos que incidiam na parede (Figura 6 B). Após a contagem, os bronquíolos foram categorizados por calibre em pequenos; médios e grandes de acordo com a área do lúmen.

A razão L/P do bronquíolo(BL/P) foi calculada pela equação:

Área do lúmen= número de pontos no lúmen x 100

Área da parede do bronquíolo= número de pontos na parede do bronquíolo x 100

$BL/P = \text{Área do lúmen} / \text{Área da parede do bronquíolo}$

4.5 RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Para verificar se houve resposta inflamatória, foi realizado escores histopatológicos semiquantitativos (Nurkiewicz, 2006) feito por 2 pesquisadores em lâminas mascaradas de 4 μm dos pulmões corados com (H&E). As graduações deste escores

foram: 0=ausência de inflamação; 1=inflamação focal; 2=moderada; 3=difusa. Os parâmetros morfométricos foram: hiperplasia do epitélio bronquiolar (HYP), infiltrado inflamatório perivascular (VI), infiltrado inflamatório septal (PI); e score histopatológico total (HYP+VI+PI=TS). Cada lâmina era primeiramente observada em pequeno aumento (10x) para identificação das estruturas (figura 7).

4.6 REMODELAMENTO VASCULAR

Para quantificar o conteúdo de fibras colágenas e elásticas na parede dos vasos peribronquiolares, cortes de 4 µm foram corados utilizando o método de coloração específica para fibras colágenas picrosirius e para as fibras elásticas, o método de *Weigert's* resorcina fucsina modificada pela oxidação. Utilizou-se o programa *Image-Pro Plus 4.1 for Windows* (Median Cybernetics, Silver Spring, MD), instalado num microcomputador, conectado a uma câmera digital (JVC TK-C1380 color video camera; Victor Company of Japan, Yokohama, Japan) acoplado a um microscópio óptico (*Leica MDR; Leica Microsystems, Bensheim, Germany*) para a realização das fotomicrografias dos vasos em cada lâmina e para posterior quantificação. O programa *Image-Pro Plus 4.1 for Windows* permite através do estabelecimento prévio de um padrão de cores "*threshold*" baseado na coloração do picrosirius, que vai de um vermelho-castanho claro ao vermelho-castanho escuro, a partir do qual o software reconhece o substrato em estudo. O "*threshold*" é estabelecido individualmente para cada tipo de coloração, sendo a área ocupada pelas fibras calculada por densitometria digital. Os resultados expressam a área de fibras positivas por unidade de perímetro do vaso, este último parâmetro calculado pelo

comprimento da lâmina elástica externa ao término da camada muscular de cada vaso estudado. As áreas das camadas adventícia e média/íntima da parede vascular a serem analisadas foram delimitadas medindo-se os perímetros externos da adventícia, elástica externa e endotélio (Figura 7).

Para a leitura do conteúdo das fibras elásticas o mesmo programa foi utilizado modificando somente o *threshold* que foi baseado na coloração da resorcina fucsina oxidada, que vai de preto até um cinza claro (Figura 7). Os vasos foram posteriormente categorizados por seus tamanhos em pequeno, médio, e grande, baseado nos tercís da área do lúmen, como foi feito pelo método de pontos da análise L/P.

Figura 7A: pulmão fibras colágenas (coloração picrosírius) vaso peribronquiolar; B: pulmão fibras elásticas (coloração fucsina-resorcina oxidada) vaso peribronquiolar (400x)

4.7 CORAÇÃO

Os corações foram retirados em bloco e fixados em solução de formalina tamponada a 10%.

42 corações (22 da câmara limpa e 20 da câmara poluída), 8 corações foram danificados durante os procedimentos histológicos.

4.8 ANÁLISE DAS ARTÉRIAS CORONÁRIAS

Os corações foram cortados em três secções transversais paralelas, coletando-se os ventrículos. Após serem emblocados em parafina, cortes de 4 µm foram corados com Verhoeff que evidencia a camada muscular das artérias (Figura 6A).

Realizamos medidas quantitativas utilizando-se o mesmo método de contagem de pontos e critérios descritos para os vasos peribronquiolares. Depois de realizada a contagem, as coronárias foram categorizadas por calibre em pequeno, médio e grande, através dos tercís da área do lúmen.

A razão L/P dos vasos coronarianos foi determinada pela equação:

Área do lúmen= número de pontos no lúmen x 100

Área da parede vascular= número de pontos na parede do vaso x 100

Razão L/P dos vasos coronarianos = área do lúmen / área da parede vascular

4.9 ESPESSURA DO MIOCÁRDIO

O espessamento do miocárdio foi determinado morfometricamente em cortes de coração de 4 µm corados em (H&E). Usando um microscópio com uma vídeo-

câmera e um sistema de analisador de imagem, a imagem microscópica é digitalizada em um vídeo de alta resolução que possui um retículo acoplado ao seu monitor, com área conhecida (10.000 μm^2 de área com aumento de 400x). O número de núcleos de cardiomiócitos foi contado em 10 campos no ventrículo direito (VD) e 10 campos no ventrículo esquerdo (VE) em cada lâmina. O espessamento do miocárdio foi calculado segundo a equação:

Espessura do miocárdio= N° de núcleos de cardiomiócitos em todo o retículo/área do retículo

4.10 REMODELAMENTO VASCULAR

Para quantificar o conteúdo de fibras colágenas e elásticas na parede das artérias coronárias cortes de 4 μm foram corados utilizando o método de coloração específica para fibras colágenas picrosirius e para as fibras elásticas o método de resorcina fucsina de *Weigert* modificada pela oxidação (Figura 8). Utilizamos o programa *Image-Pro Plus 4.1 for Windows* (Median Cybernetics, Silver Spring, MD) com a mesma metodologia de quantificação que foi descrita para o remodelamento dos vasos peribronquiolares. Os vasos foram posteriormente categorizados por calibres em pequeno, médio e grande, pelos tercís da área do lúmen.

Figura 8 A: coração: fibras colágenas (coloração picro-sírius) artérias coronárias ; B: coração: fibras elásticas (coloração fucsina-resorcina oxidada) nas artérias coronárias (400x)

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados de peso dos animais, medidas de temperatura e umidade das câmaras que apresentaram distribuição normal, nós utilizamos o teste-T, para dados paramétricos. A análise descritiva realizada pelos testes de *Kolmogorov-Smirnov* e teste de *Levene* mostrou que a maioria dos dados tanto para o pulmão quanto para o coração os resultados não apresentam distribuição normal nem homogeneidade das variâncias. Nós utilizamos testes não paramétricos, método *Wilcoxon/Mann-Whitney U test* para comparar os dois grupos experimentais. O nível de significância foi fixado em 5%. A análise estatística foi realizada com o programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS versão 15).

6 RESULTADOS

6.1 PESO DOS ANIMAIS, DOS CORAÇÕES E DOS PULMÕES

Não houve diferença no peso corpóreo total dos animais da câmara limpa em relação aos da câmara poluída no fim do experimento. Igualmente os pesos dos corações também foram similares entre os grupos. Apenas os pesos dos pulmões foram diferentes entre os animais experimentais, expressando maior peso nos animais submetidos à câmara poluída (semelhante ao ar ambiente externo). A análise descritiva e estatística encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2: Pesos dos animais experimentais

Os valores representam em g o peso corpóreo total e dos pulmões e corações dos camundongos submetidos às câmaras de exposição desde o nascimento até a idade adulta por 4 meses contínuos.

	CÂMARA LIMPA	CÂMARA POLUÍDA
Peso corpóreo total (g)	(n=23) 45,11±1,05	(n=21) 43,38±1,22
Peso pulmões (g)	(n=23) 0,30±0,010*	(n=21) 0,34±0,001*
Peso corações (g)	(n=22) 0,21±0,007	(n=20) 0,22±0,012

Valores expressos em média ± erro padrão da média; * Os sinais em pares de valores controles e experimentais indicam diferença significativa ao nível $p=0,019$, Teste T.

6.2 PARÂMETROS DE UMIDADE E TEMPERATURA EXTERNA E INTERNA DAS CÂMARAS

A umidade relativa máxima e mínima dentro das câmaras não apresentou diferença entre os dois ambientes experimentais de exposição. As temperaturas externas e internas máximas e mínimas das câmaras limpa e poluída apresentaram valores semelhantes, com exceção da temperatura interna máxima. Esses resultados são apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Temperatura e Umidade das Câmaras e Ambiente Externo.

Os valores representam em °C os registros médios das temperaturas externa (meio ambiente) máxima e mínima; temperatura interna (dentro das câmaras) máxima e mínima. Valores em % dos registros médios da umidade relativa interna das câmaras máxima e mínima. Registros realizados no período de Setembro á Dezembro de 2003.

TEMPERATURA UMIDADE	CÂMARA LIMPA	CÂMARA POLUÍDA
TEMP EXT MÁX (°C)	(n=52) 27,55±0,65	(n=54) 27,17±0,66
TEMP EXT MÍN (°C)	(n=52) 17,67±0,45	(n=54) 17,26±0,51
TEMP INT MÁX (°C)	(n=52) 28,32±0,63*	(n=54) 30,81±0,74*
TEMP INT MÍN (°C)	(n=51) 18,65±0,47	(n=54) 18,48±0,38
UMID INT MAX (%)	(n=50) 80,54±0,77	(n=50) 80,78±0,57
UMID INT MIN (%)	(n=52) 48,53±1,64	(n=54) 40,90±1,80

Valores expressos em média ± erro padrão da média; * Os sinais em pares de valores controles e experimentais indicam diferença significativa ao nível $p=0,02$, Teste T.

6.3 POLUENTES

O monitoramento diário dos poluentes dentro das câmaras de exposição é apresentado na figura 10. A média e dispersão destes valores ao final do experimento são expostos na tabela 4. Nota-se redução dos poluentes Black Carbon, $PM_{2,5}$, NO_2 dentro das câmaras. Este fato demonstra a eficiência das câmaras, principalmente referente ao material particulado. Nota-se também que os níveis não ultrapassaram os valores padrões limites de qualidade do ar estabelecidos pela CETESB em 2003 que foram $PM_{2,5}=15 \mu g/m^3$, $PM_{10}=50 \mu g/m^3$, $NO_2=100 \mu g/m^3$ e $BC=60 \mu g/m^3$. Valor do PM_{10} durante o experimento ($28,27 \pm 1,25 \mu g/m^3$). Os valores de NO_2 e de BC apresentados na tabela 4 são do relatório anual da CETESB do ano de 2003 referentes à média aritmética anual, por não estarem disponíveis no site os níveis diários destes poluentes no período exato do experimento.

Tabela 4: Poluentes

Os valores representam em $\mu g/m^3$ as concentrações dos poluentes coletados no período de Setembro á Dezembro de 2003. Os valores de NO_2 e de BC da CETESB são referentes à média aritmética anual de 2003.

POLUENTES	CÂMARA LIMPA		CÂMARA	CETESB
	Filtração (%)		POLUÍDA	
Black carbon $\mu g/m^3$	(n=36) 0*	(100%)	(n=36) $11,11 \pm 0,93^*$	50
$PM_{2,5} \mu g/m^3$	(n=38) $8,61 \pm 0,79^*$	(48%)	(n=38) $18,05 \pm 1,25^*$	$18,53 \pm 2,25$
$NO_2 \mu g/m^3$	(n=34) $38,84 \pm 3,47^*$	(68%)	(n=32) $56,81 \pm 4,45^*$	60

Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média; * Os sinais em pares de valores controles e experimentais indicam diferença significativa ao nível $*p=0,001$ *Mann-Whitney*

U test.

Figura 9: Variação das concentrações dos particulados durante o período da exposição.

Nota-se que os particulados obedecem ao mesmo padrão no tempo. CLMP_{2,5}: MP_{2,5} na câmara limpa; CPMP_{2,5}: MP_{2,5} na câmara poluída; CETESBMP₁₀: MP₁₀ no ar externo, CLBC: "black carbon" na câmara limpa; CPBC: "black carbon" na câmara poluída.

6.4 DENSIDADE DE NEUTRÓFILOS E ESCORE HISTOPATOLÓGICO

O infiltrado inflamatório foi avaliado em 2 regiões do parênquima distal pulmonar: no septo distal e no septo peribronquiolar. No septo distal a avaliação morfológica pela contagem de pontos demonstrou diminuição do infiltrado de polimorfonucleares nos animais do grupo submetido à câmara poluída quando comparados aos da câmara limpa ($0,0235 \pm 0,028$ células/ μm^2 (n=210) e $0,0337 \pm 0,028$ células/ μm^2 (n=230), respectivamente, $p=0,001$, teste de *Mann-Whitney U*).

Na região peribronquiolar, além do infiltrado inflamatório no septo alveolar (PI), também foram quantificados hiperplasia epitelial (Hyp), infiltrado inflamatório perivascular (VI) e pontuação total inflamatória (PI+VI+Hyp=Total) através de escores semiquantitativos. Todos os parâmetros demonstraram aumento nos animais submetidos à câmara poluída com exceção da inflamação septal que atingiu valores limítrofes de significância, Figura 11 (PI: $0,71 \pm 0,19$ vs $1,3 \pm 0,26$, $p=0,094$; VI: $0,71 \pm 0,14$ vs $1,35 \pm 0,21$, $p=0,022$; Hyp: $0,76 \pm 0,17$ vs $1,35 \pm 0,21$, $p=0,037$; Total: $2,19 \pm 0,37$ vs $4,00 \pm 0,55$, $p=0,015$, CS vs CP respectivamente, teste *Mann-Whitney*).

Figura10: Escores histopatológicos inflamatório dos pulmões.

Escores histopatológicos inflamatório dos pulmões de camundongos submetidos às câmaras de exposição desde o nascimento até a idade adulta por 4 meses contínuos. Nota-se aumento do infiltrado inflamatório perivascular e da hiperplasia epitelial assim como do total de escores inflamatório nos animais do grupo submetido à câmara poluída (semelhante ao ar externo). O infiltrado inflamatório septal não apresentou diferença estatística (PI: $p=0,094$). PI: infiltrado inflamatório do septo; VI: infiltrado inflamatório perivascular; Hyp: hiperplasia do epitélio peribronquiolar; TS: escore total de inflamação. (*: $p=0,022$, δ : $p=0,037$; ϕ : $p=0,015$, teste de *Mann Whitney*).

Figura 11: Inflamação dos Pulmões.

Escore histopatológico inflamatório da região peribronquiolar dos pulmões de camundongos submetidos às câmaras de exposição desde o nascimento até a idade adulta por 4 meses contínuos. A, C, E animais submetidos à câmara poluída (semelhante ao ar externo); B,D,F: animais submetidos à câmara limpa (filtrada). Nota-se infiltrado inflamatório perivascular, septal e a hiperplasia epitelial peribronquiolar no grupo submetido à câmara poluída (semelhante ao ar externo).

6.4 RAZÃO L/P DOS BRONQUIÓLOS TERMINAIS

A relação lumen/parede foi avaliada tanto para os bronquíolos terminais quanto para os vasos peribronquiolares.

Os bronquíolos terminais não apresentaram diferença quanto ao parâmetro lumen/parede quando comparados os grupos experimentais, mesmo depois de categorizados por seus calibres (I=0-16 μm^2 , II=17-24 μm^2 ; III=>25 μm^2). Vide tabela 5.

Tabela 5: Razão L/P dos bronquíolos terminais

Razão lumen/parede de bronquíolos terminais de camundongos submetidos às câmaras seletivas de exposição com filtros para particulados e gases tóxicos, desde o nascimento até a idade adulta. Os valores representam a razão da área do lúmen/área da parede do bronquíolo, categorizados pela área do lúmen em μm^2 . Não houve diferença entre os grupos.

L/P Bronquíolo	I (0-16 μm^2)	II (17-24 μm^2)	III (>25 μm^2)
Camara Limpa	(n=29) 2,85±0,25	(n=31) 4,79±0,33	(n=32) 5,76±0,35
Camara Poluída	(n=27) 2,60±0,25	(n=14) 4,36±0,54	(n=17) 7,23±1,77

Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média. I (p=0,57) ;II (p=0,13); III (p=0,99).

6.5 RAZÃO L/P ARTERÍOLAS PERIBRONQUIOLARES

A Figura 12 mostra a razão Lumen/Parede (L/P), medido nas arteríolas que estão localizadas na região adjacente do bronquíolo terminal (denominamos vasos peribronquiolares), agregados por calibre de vasos. Os vasos foram divididos em três categorias pela área do lúmen para cada câmara. Designamos como I para pequeno ($I = 1-4 \mu\text{m}^2$), II para médio ($II = 5-9 \mu\text{m}^2$), e III para grande calibre ($III \geq 10 \mu\text{m}^2$). As 3 categorias de arteríolas peribronquiolares apresentaram valores semelhantes de razão L/P entre os grupos experimentais: I: (n=48) $0,58 \pm 0,07$ vs (n=51) $0,51 \pm 0,06$, $p=0,42$; II (n=27) $1,45 \pm 0,14$ vs (n=24) $1,16 \pm 0,14$, $p=0,14$; III (n=35) $1,82 \pm 0,17$ vs (n=44) $1,58 \pm 0,12$, $p=0,30$, CL vs CP, teste Mann Whitney).

Figura 12. Razão L/P das arteríolas pulmonares.

Razão L/P dos vasos peribronquiolares de camundongos submetidos às câmaras de exposição desde o nascimento até a idade adulta por 4 meses contínuos. Valores expressos em mediana, 25-75% e 5-95% dos valores. Não há diferença entre os grupos.

6.6 ANÁLISE DO CONTEÚDO DAS FIBRAS ELÁSTICAS NOS VASOS PERIBRONQUIOLARES

A remodelação estrutural vascular pulmonar foi avaliada através da quantificação de fibras elásticas e colágenas dos vasos da região peribronquiolar.

O conteúdo das fibras elásticas foi analisado na parede dos vasos da região peribronquiolar em vasos independentes dos seus tamanhos e categorizados por seu calibre, designados por I (pequeno, $I = 0$ a $1336,61\mu\text{m}^2$), II (médio $=1336,61$ a $2981,80\mu\text{m}^2$) e III (grande $>2981,80\mu\text{m}^2$). Analisando-se a parede vascular independente do tamanho dos vasos, houve diminuição do conteúdo elástico entre os grupos experimentais (camada adventícia $p = 0,006$); (Túnica Média $p = 0,008$). Após categorização do tamanho dos vasos, constatou-se não haver alteração do conteúdo das fibras elásticas na camada adventícia dos vasos entre os grupos experimentais (I: $p = 0,33$; II: $p = 0,093$; III: $p = 0,18$). A túnica média dos vasos peribronquiolares da categoria I expressou menor quantidade de elástica na parede vascular (I: $p = 0,051$) e as demais categorias não apresentaram diferença entre os grupos experimentais (II: $p = 0,067$; III: $p = 0,43$). Esses resultados estão demonstrados na Tabela 6. A Figura 13 mostra os gráficos da representação das áreas das fibras elásticas na camada média.

Tabela 6: Fibras elásticas nas arteríolas pulmonares

Fibras elásticas na parede de arteríolas peribronquiolares de camundongos submetidos às câmaras seletivas de exposição com filtros para particulados e gases tóxicos, desde o nascimento até a idade adulta. Os valores representam a área de fibras positivas por unidade de perímetro do vaso em μm . Vasos Totais (sem diferenciar o calibre do vaso) e categorizados pela área do lúmen. Houve diminuição de elástica nos vasos totais em ambas as camadas e na categoria I (pequeno) na camada média nos animais submetidos a câmara poluída.

Fibras Elásticas Arteríolas Pulmonares			Categoria de Vasos		
Camada vascular	Câmara	Vasos Totais	I (0 - 1336,61 μm^2)	II (1336,61a 2981,80 μm^2)	III (>2981,80 μm^2)
Adventícia	Limpa	(n=83) 0,72 $\pm$ 0,04 [#]	(n=28) 0,77 $\pm$ 0,05	(n=30) 0,71 $\pm$ 0,08	(n=15) 0,49 $\pm$ 0,06
	Poluída	(n=68) 0,55 $\pm$ 0,03 [#]	(n=19) 0,66 $\pm$ 0,05	(n=17) 0,54 $\pm$ 0,06	(n=32) 0,40 $\pm$ 0,05
Média	Limpa	(n=83) 1,35 $\pm$ 0,05 [♦]	(n=28) 1,34 $\pm$ 0,07*	(n=30) 1,43 $\pm$ 0,10	(n=15) 1,26 $\pm$ 0,13
	Poluída	(n=68) 1,30 $\pm$ 0,04 [♦]	(n=19) 1,11 $\pm$ 0,06*	(n=17) 1,14 $\pm$ 0,08	(n=32) 1,16 $\pm$ 0,09

Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média; Os sinais em pares de valores controles e experimentais indicam diferença significante, [♦]p= 0,008; *p=0,051, Mann-Whitney U test.

Figura 13: Fibras elásticas na túnica média das arteríolas pulmonares.

Fibras elásticas na camada média de vasos peribronquiolares de camundongos submetidos às câmaras de exposição desde o nascimento até a idade adulta por 4 meses contínuos. Nota-se diminuição do conteúdo elástico nos animais submetidos á câmara poluída (semelhante ao ambiente externo). ♦p= 0,008; *p=0,051

6.7 ANÁLISE DO CONTEÚDO DAS FIBRAS COLÁGENAS NOS VASOS PULMONARES

Igualmente às fibras elásticas, o conteúdo das fibras colágenas foi analisado na parede dos vasos da região peribronquiolar em vasos independente do seu tamanho e categorizados por seu calibre designados I (pequeno, I= 0 a 2218,87 μm^2), II (médio =2218,87 a 3786,28 μm^2) e III (grande >3786,28 μm^2). Analisando-se a parede

vascular independente do tamanho dos vasos, constatamos haver menor quantidade de colágeno nos vasos dos animais submetidos à câmara poluída quando avaliada a camada adventícia. A túnica média não evidenciou alteração do conteúdo colágeno

entre os grupos experimentais. Após categorização do tamanho dos vasos constatou-se diminuição do conteúdo colágeno na categoria III e nas demais categorias manteve-se o padrão de resposta colágena estrutural vascular, não ocorrendo diferença entre os grupos experimentais. Esses resultados são demonstrados na Tabela 7 e figura 14.

Tabela 7: Fibras colágenas nas arteríolas pulmonares

Fibras colágenas na parede de arteríolas peribronquiolares de camundongos submetidos às câmaras seletivas de exposição com filtros para particulados e gases tóxicos, desde o nascimento até a idade adulta. Os valores representam a área de fibras positivas por unidade de perímetro do vaso em μm . Vasos Totais (sem diferenciar o calibre do vaso) e categorizados pela área do lúmen. Houve diminuição de colágeno nos vasos totais e na categoria III (grande) na camada adventícia nos animais submetidos a câmara poluída.

Fibras Colágenas Arteríolas Pulmonares			Categoria de Vasos		
Camada vascular	Câmara	Vasos Totais (μm)	I (0- 2218,87 μm^2)	II (2218,87- 786,28 μm^2)	III (>3786,28 μm^2)
Adventícia	Limpa	(n=69) 3,84 $\pm$ 0,41 ^ϕ	(n=25) 3,16 $\pm$ 0,49	(n=19) 4,08 $\pm$ 1,11	(n=25) 4,34 $\pm$ 0,55*
	Poluída	(n=70) 3,08 $\pm$ 0,47 ^ϕ	(n=21) 3,53 $\pm$ 0,78	(n=28) 2,96 $\pm$ 0,96	(n=21) 2,81 $\pm$ 0,53*
Média	Limpa	(n=69) 0,16 $\pm$ 0,03	(n=25) 0,14 $\pm$ 0,03	(n=19) 0,18 $\pm$ 0,09	(n=25) 0,17 $\pm$ 0,05
	Poluída	(n=70) 0,17 $\pm$ 0,02	(n=21) 0,23 $\pm$ 0,06	(n=28) 0,09 $\pm$ 0,02	(n=21) 0,21 $\pm$ 0,05

Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média; Os sinais em pares de valores controles e experimentais indicam diferença significativa, ^ϕp= 0,016; *p=0,03 *Mann-Whitney U test*.

Figura 14. Fibras colágenas na camada adventícia das arteríolas pulmonares.

Fibras colágenas na camada adventícia dos vasos peribronquiolares de camundongos

submetidos às câmaras de exposição desde o nascimento até a idade adulta por 4

meses contínuos. Nota-se diminuição do colágeno nos animais expostos à câmara

poluída (semelhante ao ambiente externo). $\phi p= 0,016$; $*p=0,03$, Teste de Mann

Whitney

Figura 15: Fibras colágenas e elásticas de arteríolas pulmonares

Fotomicrografias de arteríolas peribronquiolares de camundongos submetidos a câmaras seletivas de exposição com filtros para particulados e gases tóxicos, desde o nascimento até a idade adulta por 4 meses. A, C: animais da câmara limpa; B, D: animais da câmara poluída; E: fibras colágenas (em vermelho) na camada adventícia; F: fibras elásticas (em negro) na camada média. Nota-se diminuição das fibras estruturais colágenas e elásticas das camadas das paredes das arteríolas dessa região nos animais submetidos à câmara poluída (semelhante ao ar externo). Coloração: picrus-sirius (colágeno) e resorcina-fuccina (elástica), 400x.

6.8 REMODELAÇÃO DO MIOCÁRDIO

A Figura 15 compara a remodelação do miocárdio do ventrículo esquerdo e do ventrículo direito entre os grupos submetidos às câmaras seletivas de exposição.

Houve um aumento do número de núcleos de miócitos por área muscular do ventrículo esquerdo nos animais submetidos à câmara poluída: 3.345 ± 0.940 núcleos/ μm^2 (n=220) vs 3.645 ± 1.146 núcleos/ μm^2 de área muscular, (n=200), $p=0.005$, CL vs CP respectivamente, Mann Whitney, figura 10.

E em relação ao VD não houve diferença entre os grupos experimentais, evidenciando resultados de 3.3 ± 1.106 núcleos/ μm^2 vs 3.525 ± 1.322 núcleos/ μm^2 de área muscular, (n=200), $p=0,10$, CL vs CP respectivamente, Mann Whitney, figura 15.

Figura 16. Núcleos de cardiomiócitos/área ventricular.

Núcleos de cardiomiócitos de camundongos submetidos às câmaras de exposição desde o nascimento até a idade adulta por 4 meses contínuos. Nota-se aumento de núcleos por área ventricular nos camundongos expostos á câmara poluída (semelhante ao ar ambiente). * $p=0.005$, Mann Whitney.

6.9 RAZÃO L/P DAS CORONÁRIAS

A Tabela 8 mostra a razão Lumen / Parede (L/P) medida nas coronárias dos ventrículos D e E dos grupos experimentais. Os vasos foram divididos em três categorias de acordo com o seu calibre designados I para pequeno ($1-4 \mu\text{m}^2$), II para médio ($5-9 \mu\text{m}^2$) e III para grande ($\geq 10 \mu\text{m}^2$). As três categorias das coronárias

apresentaram valores semelhantes de razão L/P entre os grupos experimentais (I: $p=0,13$; II: $p=0,45$; III: $p=0,25$).

Tabela 8: Razão L/P das coronárias

Razão lumen/parede de coronárias de camundongos submetidos às câmaras seletivas de exposição com filtros para particulados e gases tóxicos, desde o nascimento até a idade adulta por 4 meses. As arteríolas foram categorizadas pela área do lumen. Não há diferença entre os grupos experimentais.

L/P coronárias	I ($1-4 \mu\text{m}^2$)	II ($5-9 \mu\text{m}^2$)	III ($\geq 10 \mu\text{m}^2$)
Câmara Limpa	(n=36) $0,359 \pm 0,034$	(n=15) $1,237 \pm 0,25$	(n=31) $1,688 \pm 0,22$
Câmara Poluída	(n=32) $0,614 \pm 0,128$	(n=14) $1,281 \pm 0,45$	(n=32) $1,851 \pm 0,18$

Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

6.10 ANÁLISE DO CONTEÚDO DAS FIBRAS COLÁGENAS NAS CORONÁRIAS

O remodelamento estrutural de coronárias dos animais experimentais foi analisado através da avaliação das fibras colágenas e elásticas na parede vascular, avaliando-se separadamente as camadas em adventícia e média. Essa análise foi realizada em ventrículo total e separadamente os ventrículos D e E. Posteriormente os vasos foram categorizados pelo seu calibre por I: vasos pequenos (0 a $786,21 \mu\text{m}^2$) II : II: vasos de médio calibre de ($786,21$ a $2554,00 \mu\text{m}^2$) e III: vasos grandes ($>2554,00 \mu\text{m}^2$).

Ocorreu aumento do conteúdo colágeno na parede das coronárias dos animais do grupo submetido à câmara poluída quando comparados aos camundongos da câmara limpa. Quando analisados os vasos totais dos ventrículos, notamos aumento do conteúdo de fibras colágenas na camada adventícia ($p < 0,001$). A túnica média apresentou diminuição dessas fibras nos mesmos animais ($p = 0,03$), Tabela 9.

A fibrose das coronárias quando avaliada por ventrículo apresentou em VE, aumento significativo do conteúdo de colágeno na área da adventícia do grupo exposto à câmara poluída ($p < 0,001$), porém apresentou valores semelhantes na área da muscular ($p = 0,18$). Os vasos do VD apresentaram aumento de fibras colágenas na adventícia vascular dos animais da câmara poluída ($p = 0,02$); porém na camada média foram semelhantes ($p = 0,090$), Tabela 9.

Quando separados por categoria do tamanho do calibre dos vasos, temos aumento de colágeno na camada adventícia das arteríolas de grande calibre e diminuição do colágeno na camada média nas arteríolas de categoria II do VE no grupo submetido à câmara poluída (I: $p = 0,08$; II: $p = 0,89$; III: $p < 0,001$; camada média: I $p = 0,78$; II: $p = 0,03$; III: $p = 0,69$), Figura 16.

No ventrículo direito, após categorização dos vasos, ocorreu fibrose na camada adventícia das arteríolas de médio calibre, não havendo diferenças em outras categorias de coronárias entre os grupos experimentais (adventícia: I: $p = 0,12$, II: $p = 0,05$; III: $p = 0,38$). Na túnica média, os grupos foram semelhantes (I: $p = 0,46$; II: $p = 0,63$; III: $p = 0,35$), tabela 9.

O conteúdo de fibras colágenas na parede de coronárias é representado no painel da figura 16.

Figura 17: Fibras colágenas na camada adventícia das coronárias

Fibras colágenas na adventícia de coronárias de camundongos submetidos às câmaras de exposição desde o nascimento até a idade adulta por 4 meses contínuos.

A: Fibras colágenas na adventícia das coronárias por câmaras. **B:** Fibras colágenas na adventícia dos VD e VE. **C:** Fibras colágenas na adventícia do VD por categoria de vasos. **D:** Fibras colágenas na adventícia do VE por categoria de vasos. Nota-se

aumento de colágeno em vasos dos animais pertencentes à câmara poluída (semelhante ao ambiente externo). * $p < 0,001$; $\phi p = 0,02$; $\phi p = 0,05$.

Tabela 9: Fibras colágenas nas artérias coronárias

Fibras colágenas na parede de coronárias de camundongos submetidos às câmaras seletivas de exposição com filtros para particulados e gases tóxicos, desde o nascimento até a idade adulta. Os valores representam a área de fibras positivas por unidade de perímetro do vaso em μm de vasos Totais (sem diferenciar o calibre do vaso) e categorizados pela área do lúmen. Nota-se nos animais submetidos a câmara poluída, aumento das fibras colágenas na camada adventícia dos vasos totais de ambos os ventrículos. No VD, esse aumento ocorre nas arteríolas médias e no VE, nas arteríolas de maior calibre.

Fibras Colágenas Coronárias			Categoria de Vasos		
Camada vascular	Câmara	Vasos Totais (μm^2)	I (0-786,21 μm^2)	II (786,21-2554,00 μm^2)	III (>2554,00 μm^2)
VD	Adventícia	Limpa (n=47)	(n=17)	(n=23)	(n=23)
		0,71 $\pm$ 0,18 ^Φ	0,77 $\pm$ 0,45	0,54 $\pm$ 0,14 ^Φ	1,15 $\pm$ 0,45
	Poluída	(n=37)	(n=18)	(n=10)	(n=10)
		1,13$\pm$ 0,25^Φ	1,36 $\pm$ 0,42	1,41 $\pm$0,47^Φ	1,31 $\pm$ 0,38
	Média	(n=47)	(n=17)	(n=23)	(n=23)
		0,89 $\pm$ 0,22	0,69 $\pm$ 0,16	0,71 $\pm$ 0,14	1,94 $\pm$ 1,38
VE	Adventícia	(n= 37)	(n=18)	(n=10)	(n=10)
		0,51 $\pm$ 0,10	0,48 $\pm$ 0,18	0,56 $\pm$ 0,15	0,50 $\pm$ 0,18
	Limpa	(n=85)	(n=23)	(n=29)	(n=33)
		1,01 $\pm$ 0,14*	0,87 $\pm$ 0,32	1,26 $\pm$ 0,21	0,86 $\pm$ 0,22*
	Poluída	(n=55)	(n=17)	(n=14)	(n=24)
		1,96$\pm$ 0,29 *	1,54 $\pm$ 0,48	1,15 $\pm$ 0,19	2,73 $\pm$ 0,54*
	Média	(n=85)	(n=23)	(n=29)	(n=33)
		1,26 $\pm$ 0,16	0,57 $\pm$ 0,15	1,36 $\pm$ 0,21 [#]	1,66 $\pm$ 0,35
	Poluída	(n=55)	(n=17)	(n=14)	(n=24)
		0,82 $\pm$ 0,10	0,39 $\pm$ 0,08	0,62$\pm$0,15[#]	1,22 $\pm$ 0,19

Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média; significância expressa aos pares;

[#]p=0,03; ^Φp=0,02 ;*p<0,001; ^Φp=0,05, Mann Whitney.

6.11 ANÁLISE DO CONTEÚDO DAS FIBRAS ELÁSTICAS ARTÉRIAS CORONÁRIAS

Também em relação ao conteúdo elástico, os camundongos expostos à câmara poluída apresentaram maior quantidade desta fibra quando comparados aos da câmara limpa. A categorização das coronárias para essa análise foi I (vasos pequenos: 0 a $520,81\mu\text{m}^2$), II (médios: $520,82$ a $2225,58\mu\text{m}^2$) e III (grandes $>2225,58\mu\text{m}^2$). Nos vasos totais de ambos os ventrículos a câmara poluída apresentou elastogênese tanto na área da camada adventícia ($p<0,001$) quanto na área da camada muscular ($p<0,001$). No VD ocorreu elastogênese na camada adventícia ($p<0,001$) e na camada muscular ($p<0,001$). VE também apresentou aumento das fibras elásticas na camada adventícia ($p<0,001$) na camada média ($p<0,001$).

Quando separados por categoria do tamanho do calibre dos vasos, temos aumento das fibras elásticas no VD na camada adventícia dos animais da câmara poluída na categoria I e III (I: $p<0,001$; II: $p=0,06$; III: $p=0,005$). Na camada média apresentou aumento das fibras elásticas na categoria II e III (I: $p=0,06$; II: $p=0,01$; III: $p=0,007$). No VE ocorreu aumento das fibras elásticas na camada adventícia das três categorias de vasos nos animais da câmara poluída (I: $p<0,001$; II: $p<0,001$; III: $p=0,003$). Na camada média houve aumento das fibras elásticas na categoria II e III (I: $p=0,07$; II: $p<0,001$; III: $p=0,01$). Vide tabela 10.

O conteúdo das fibras elásticas na parede das coronárias é representado no painel da figura 17.

Figura 18. Fibras elásticas na camada adventícia das coronárias.

Fibras elásticas na camada adventícia de coronárias de camundongos submetidos às câmaras de exposição desde o nascimento até a idade adulta por 4 meses contínuos.

A: Fibras elásticas na adventícia das coronárias por câmaras. B: Fibras elásticas na adventícia nos VD e VE. C: Fibras elásticas na adventícia no VD por categoria dos vasos. D: Fibras elásticas na adventícia no VE por categoria de vasos. Nota-se aumento de elástica nas coronárias de camundongos expostos à câmara poluída (semelhante ao ar ambiente externo). * $p < 0,001$; # $p = 0,01$; $\phi p = 0,005$.

Tabela 10: Fibras elásticas artérias coronárias

Fibras elásticas na parede de coronárias de camundongos submetidos às câmaras seletivas de exposição com filtros para particulados e gases tóxicos, desde o nascimento até a idade adulta. Os valores representam a área de fibras positivas por unidade de perímetro do vaso em μm de vasos Totais (sem diferenciar o calibre do vaso) e categorizados pela área do lúmen. Nota-se, em ambos ventrículos dos animais submetidos à câmara poluída, aumento das fibras elásticas em toda extensão da parede arteriolar dos vasos totais, na adventícia das grandes arteríolas e na túnica média dos vasos de médio calibre.

Fibras Elásticas Coronárias				Categoria de Vasos		
Camada vascular		Câmara	Vasos totais (µm²)	I (0-520,81µm²)	II (520,82-2225,58µm²)	III (>2225,58µm²)
VD	Adventícia	Limpa	(n=52) 0,38±0,05*	(n=15) 0,23±0,05*	(n=26) 0,48±0,08	(n=11) 0,36±0,11 ^θ
		Poluída	(n=51) 0,84±0,09*	(n=25) 0,70±0,12*	(n=15) 0,84±0,19	(n=11) 1,13±0,23^θ
	Média	Limpa	(n=52) 0,46±0,05*	(n=15) 0,24 ±0,06	(n=26) 0,50±0,05 [#]	(n=11) 0,53±0,17 ^φ
		Poluída	(n=51) 0,51±0,07*	(n=25) 0,26 ±0,05	(n=15) 0,87±0,13[#]	(n=11) 1,26±0,18^φ
VE	Adventícia	Limpa	(n=72) 0,76±0,09*	(n=20) 0,25 ±0,05*	(n=20) 0,64±0,16*	(n=32) 1,16 ±0,13 [#]
		Poluída	(n=79) 1,50±0,11*	(n=25) 0,87±0,09*	(n=24) 1,68±0,14*	(n=30) 1,88±0,24[#]
	Média	Limpa	(n=72) 0,93±0,06*	(n=20) 0,56±0,07	(n=20) 0,81±0,08*	(n=32) 1,24±0,08 [#]
		Poluída	(n=79) 1,43±0,11*	(n=25) 0,81±0,10	(n=24) 1,41±0,11*	(n=30) 1,96±0,25[#]

Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média; Significância expressa aos pares, * $p < 0,001$; # $p = 0,01$ $\phi p = 0,003$; $\varphi p = 0,007$; $\theta p = 0,005$; Teste Mann Whitney.

Figura 19. Fibras elásticas na túnica média das coronárias.

Fibras elásticas na túnica média de coronárias de camundongos submetidos às câmaras de exposição desde o nascimento até a idade adulta por 4 meses contínuos.

A: Fibras elásticas na túnica média das coronárias por câmaras. **B:** Fibras elásticas na túnica média nos VD e VE. **C:** Fibras elásticas na túnica média no VD por categoria dos vasos. **D:** Fibras elásticas túnica média. Nota-se aumento da elástica nos vasos de camundongos expostos à câmara poluída (semelhante ao ambiente externo).

* $p < 0,001$; # $p = 0,01$; $\phi p = 0,07$.

Figura 20: Fibras colágenas e elásticas das coronárias.

Fotomicrografia de coronárias de camundongos Swiss submetidos às câmaras seletivas de exposição com filtros para particulados e gases tóxicos, desde o nascimento até a idade adulta por 4 meses. A, C: animais expostos à câmara limpa; B,D: animais expostos à câmara poluída; E: fibras colágenas (em vermelho) na camada adventícia; E. F: fibras elásticas (em negro) na camada média. Nota-se aumento do teor estrutural de fibras colágenas e elásticas nas camadas adventícia e média das coronárias dos animais expostos à câmara poluída (semelhante ao ar externo). Coloração picrussirius (colágeno) e resorcina-fuccina (elástica), 400x.

DISCUSSÃO

A remodelação cárdio-pulmonar estrutural é um marco silencioso da exposição crônica desde o nascimento até a fase adulta à poluição atmosférica da cidade de São Paulo de predomínio veicular. Mesmo abaixo do limite de qualidade do ar pelos órgãos sanitários internacionais e nacionais, estas alterações ocorrem secundárias às impactações dos poluentes na região peribronquiolar, transpõem a barreira alvéolo-capilar e atingem o miocárdio e coronárias. A resposta orgânica caracteriza-se por inflamação leucocitária e quebra das fibras estruturais de vasos pulmonares contrapondo-se à gênese de fibras elásticas e colágenas causando fibrose de coronárias e remodelação miocárdica.

O desenho proposto neste modelo experimental utilizando as duas câmaras de exposição, mostrou que a câmara poluída é semelhante ao meio externo em relação à umidade e temperatura e aos poluentes amostrados ($MP_{2,5}$, BC e NO_2) como apresentamos nas tabelas 3 e 4 e figura 10. As câmaras mostraram-se seletivas com eficiência de filtragem predominante para particulados, atingindo 100% de clareamento de BC e mais de 52% de MP, e 42% de gases tóxicos representado pelo NO_2 , que são componentes de poluição de referência para poluentes do ar de origem veicular, tabela 4 e figura 10. Conseguimos afirmar que a câmara poluída não concentra os poluentes, sendo assim, expusemos os animais a concentrações de poluentes realmente semelhantes ao que respiramos. Com esses dados, podemos sugerir que esses poluentes possam ter algum papel na gênese das alterações ocorridas no sistema cardiopulmonar dos animais expostos ao ambiente sem filtros.

No entanto, ressaltamos que no ar ambiente há transformação constante de componentes de poluição através de reações químico-físicas entre si e neo formação de novos componentes, que não foram pesquisados neste protocolo experimental. Reconhecemos que apesar dos resultados sugerirem a participação dos particulados na gênese do processo de lesão tissular, não podemos afirmar qual poluente teve efeito mais contundente no processo

Vários autores demonstram que os particulados exercem efeito inflamatório em células e tecidos através de estresse oxidativo (Macchione et al 1999; Carvalho-Oliveira et al., 2005). Os particulados contém metais de transição como o Ferro e Cobre que podem deflagrar, através da reação intracelular de Fenton e Haber Weiss, produção de superóxidos que induzem a peroxidação lipídica e citotoxicidade. Os superóxidos também exercem indução do fator nuclear K beta, capaz de desencadear quimiotaxia de células inflamatórias, liberação de fatores de crescimento e interleucinas como a IL-8 (Gilmour, 2002; Donaldson et al., 2001). Em contrapartida, o epitélio pulmonar possui substâncias antioxidantes que modulam o processo de citotoxicidade deflagrada pelos radicais livres superóxidos. Porém, quando a agressão externa ultrapassa a capacidade antioxidante do organismo, predomina a lesão tissular e suas consequências deletérias (Carvalho-Oliveira et al., 2005).

Optamos neste experimento por animais recém natos, não isogênicos, que permanecessem continuamente por 4 meses nas câmaras de exposição, tempo necessário para que fossem sexualmente maduros e antes de se iniciar o processo de envelhecimento. Dessa forma, tentamos refletir o mais próximo possível a vida de

indivíduos assintomáticos que vivem em grandes metrópoles expostos ao ar poluído urbano desde o nascimento, vindo a manifestar eventos isquêmicos cardiovasculares na idade adulta produtiva.

O peso corpóreo dos animais foi semelhante entre os grupos assim como o peso dos corações, porém o peso dos pulmões foi diferente ($0,30 \pm 0,01$ vs $0,34 \pm 0,001$, $p=0,019$), sendo mais pesados os dos animais que permaneceram na câmara poluída (tabela 2). Este fato pode estar relacionado ao edema e a presença de infiltrado inflamatório principalmente nos vasos peribronquiolares e hiperplasia do epitélio bronquiolar como demonstrado nos escores inflamatórios histopatológicos (figura 10 e 11). Alguns autores demonstraram baixo peso de recém natos porém mais marcantes evidenciados com o poluente tabaco (Forestiere et al.,2002; Ward et al., 2007). Porém não existe referência de alteração de peso na idade adulta de indivíduos expostos à poluição.

O escore histopatológico (figura 10) nos mostrou que os animais da câmara poluída apresentavam mais inflamação no escore total ($p=0,015$). Não houve inflamação no septo alveolar distal e sim na região do bronquíolo terminal com hiperplasia do epitélio bronquiolar ($p=0,037$) e na região perivascular desse local ($p=0,022$). Esses resultados reforçam a teoria que descrevemos na introdução de ser a via aérea distal uma região de baixo fluxo, que favorece a sedimentação gravitacional das partículas, compatível com exposição crônica a baixos níveis de poluentes e também ao tamanho das partículas que conseguem atingir esse terminal ($< MP_{2,5}$) (Saldiva, 2002; Gilmour,2002; Carnelly, 2001).

A densidade de neutrófilo no septo alveolar mostrou-se diminuída nos animais expostos a câmara poluída. Saldiva et al., 2002, avaliou a densidade numérica de neutrófilos em ambiente concentrado de partículas e observaram aumento de célula polimorfonucleares somente nos animais controles normais e nos animais com bronquite crônica principalmente na região acinar dos alvéolos e não significativa em região distal do parênquima pulmonar. Associaram a quantidade de neutrófilos como sendo dose dependente do concentrado de partículas e também a certos componentes como o vanádio. Porém, nosso protocolo experimental utiliza exposição aos reais níveis ambientais de poluição atmosférica, os quais não ultrapassaram os níveis de qualidade do ar, o que permite desencadear alterações mais discretas e silenciosas afetando predominantemente o território de impactação dos poluentes, poupando as regiões mais distais dos septos. Similarmente ao nosso protocolo, alguns autores demonstraram diminuição de neutrófilos no septo alveolar, após exposição a particulados, e atribuíram esses efeitos ao recrutamento dessas células para dentro dos vasos ou aderidos ao endotélio vascular (Nurkiewicz, 2005; Rivero, 2005).

A razão L/P dos bronquíolos terminais mostrou que os grupos experimentais são semelhantes, apesar de que numericamente as médias dos bronquíolos de pequenos e médios calibres da câmara poluída serem menores, indicando uma tendência a broncoconstrição quer seja por aumento da espessura da parede, quer seja por contração da via aérea, tabela 5. Ressaltamos que nossos animais são considerados “normais” e assintomáticos e portanto, sem patologia pulmonar prévia. Esses dados podem corroborar com estudos epidemiológicos que demonstram que pacientes predispostos, com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), aumentam a

reatividade e resistência das vias aéreas quando expostos à poluição (Folinsbee, 1992; Moshhammer, 2006) (tabela 5).

A razão L/P das arteríolas peribronquiolares também foram semelhantes entre os grupos, mostrando somente um indício à diminuição da luz do vaso nos de tamanho médio, categoria II ($p=0,14$) (Figura 12). Lemos et al., 2001, encontraram redução do calibre dos vasos pulmonares num estudo semelhante ao nosso porém, realizado dois anos, quando as médias diárias de todos os poluentes ambientais, como por exemplo o NO_2 e o PM_{10} , eram mais elevadas (NO_2 : $104,75 \pm 42,62 \mu\text{g}/\text{m}^3$ vs $56,81 \pm 25,21 \mu\text{g}/\text{m}^3$; 2001 e 2003 respectivamente) e (PM_{10} : $35,52 \pm 12,84 \mu\text{g}/\text{m}^3$ vs $28,27 \pm 4,9 \mu\text{g}/\text{m}^3$; 2001 e 2003 respectivamente). É possível que o controle mais adequado dos limites de qualidade do ar possa ter contribuído para menor alteração na patência vascular em nosso experimento quando comparado ao de Lemos e colaboradores, demonstrando a importância e a necessidade de se controlar e reduzir as emissões dos poluentes atmosféricos (Figura 9).

A análise do remodelamento da parede vascular das arteríolas peribronquiolares mostra quebra de fibras proteicas (fibras elásticas e colágenas). Os vasos dos animais da câmara poluída quando analisados independentes de seu tamanho, apresentaram redução do conteúdo das fibras elásticas na camada adventícia ($p=0,006$) e na túnica média ($p=0,008$) , Tabela 6, Figura 13. Quando categorizado por calibre dos vasos, observamos redução no conteúdo elástico da camada média nos vasos de pequeno calibre ($p=0,051$), Tabela 6 e Figura 13. Mauad et al., 2004, demonstram que na asma fatal ocorre uma diminuição do conteúdo das fibras elásticas na adventícia das vias aéreas causando um desacoplamento com o parênquima pulmonar pelo processo

inflamatório crônico e cita alguns mediadores envolvidos na inflamação pulmonar como a metaloproteinase-9 com propriedades elastinolítica encontradas no plasma de pacientes com asma grave. Cita também que as alterações ocorridas no conteúdo elástico na região peribronquiolar, nesses casos, não podem ser somente atribuídas ao processo de hiperdistensão que ocorre na asma. Nosso estudo é pioneiro na análise da parede dos vasos peribronquiolares que apresentam essa desorganização e fragmentação das fibras elásticas como a que ocorre na asma alérgica (Xisto, 2005). Não podemos saber se essa elastólise foi decorrente da atuação direta dos poluentes. Mas com certeza, existe o componente dos mediadores inflamatórios liberados pela reação à presença dos mesmos, com liberação local de proteases, que supostamente poderiam corroborar para o desbalanço entre a gênese e a quebra de fibras de sustentação vascular, que poderiam modular respostas vasculares anormais nesta região.

O conteúdo das fibras colágenas nos vasos peribronquiolares apresentou-se diminuído nos animais da câmara poluída, quando comparados com os camundongos da câmara limpa filtrada, independente do calibre dos vasos na camada adventícia ($p=0,016$), Tabela 7 Figura 14. Após categorização dos vasos pelo seu calibre, observamos que essa diminuição se deve ao acometimento dos vasos de grande calibre ($p=0,03$), Tabela 7. Nosso estudo mostra um resultado controverso com a literatura de que a poluição causa fibrose nas vias aéreas. A maior parte dos estudos correntes mostra que o MP promove nos pulmões liberação de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β , MIP-1 α , MCP-1 e KC (Inoue, 2006) e ativação de genes que expressam importantes componentes da fibrinogênese (Bonner, 2007). O TGF- β

é um estimulador dos fibroblastos da matriz extra-celular e também pode causar a proliferação da musculatura lisa das vias-aéreas. O MP através da ativação do fator nuclear K beta (NF-kB) que participa da modulação do mecanismo metal/oxidação, relacionado com a geração de espécies de oxigênio, atua na expressão do gene pró-colágeno (Dai, 2003). Assim como no sistema elástico, é possível que a liberação dos mediadores inflamatórios como as metaloproteinases, possam predominar sobre os fatores de colagênese local e serem também responsáveis pela diminuição do conteúdo colágeno encontrado nesse experimento. Além desse fator, o tempo de exposição dos animais de experimentação do nascimento até a fase adulta e não exposição aguda como na maioria dos relatos, poderia promover uma adaptação da resposta colagênica do organismo aos poluentes. Consideramos que mais estudos sobre o remodelamento vascular pulmonar são necessários para elucidar esses achados (Figura 14 e 15).

No coração houve remodelamento no miocárdio com aumento do número de núcleos de cardiomiócitos por área muscular no ventrículo esquerdo dos camundongos submetidos ao ar ambiente, ($p=0.005$), Figura 16. Não houve alteração aparente do peso médio dos corações ($p=0,48$). Devido ao baixo peso dos corações e ser a morfometria mais sensível que abalança para denotar alterações de fibras musculares, não podemos afirmar se o processo que se instalou foi o de atrofia de VE ou de hiperplasia dessa câmara.

A literatura evidencia a hiperplasia do VE secundária a hipertensão arterial sistêmica e de VD secundária a hipertensão pulmonar como reações ao aumento de pós carga. Evidenciamos alterações estruturais neste experimento de vasos pulmonares mas não

demonstramos aumento de sua reatividade nem de hipertensão pulmonar. A remodelação ventricular detectada ocorreu em câmara miocárdica esquerda somente. A possibilidade de hiperplasia de VE não pode ser afastada, porém não foi checada a pressão da pós carga nesse experimento. A alternativa de fatores de crescimento agirem localmente via poluentes e estresse oxidativo produzindo proliferação de cardiomiócitos assim como podem ter agido nas coronárias, também não pode ser constatada.

Se considerarmos a possibilidade de ter ocorrido atrofia da musculatura de VE, esta poderia ser secundária à isquemia crônica e lenta do miocárdio secundária à fibrose de coronárias causada pela agressão dos poluentes em nosso experimento. Trabalhos deste laboratório com camundongos expostos à cocaína inalada, demonstrou que a fibra miocárdica atrofia perante a toxicidade da droga, confirmada pela mesma metodologia morfométrica, porém com diminuição do peso do coração dos animais (Bueno, dados submetidos). Graff et al., 2004, estudou a influência de componentes do MP como os metais zinco (Zn) e o vanádio (V) que são muito solúveis e favorecem a absorção sistêmica e translocação para o coração, sugerindo ocorrer remodelamento das fibras miocárdicas secundário a esse processo. O remodelamento contribuiria para alterações de despolarização de membrana dos miócitos produzindo arritmias cardíacas. Como mecanismo fisiopatológico, os autores verificaram que metais de transição pertencentes aos particulados, promovem significantes alterações na expressão gênica de duas citocinas inflamatórias (IL-6, IL-1 α) que atuam na modulação da resposta da fibra cardíaca. Esses mecanismos ainda não são bem esclarecidos, mas como foi observada inflamação nos pulmões que liberam os

mesmos tipos de marcadores inflamatórios, podemos também associar esse raciocínio fisiopatológico aos achados cardíacos dos animais do nosso experimento. Na avaliação da razão L/P das coronárias, os grupos se mostraram semelhantes (Tabela 8). Esperávamos encontrar diminuição do calibre dos vasos como em estudos prévios, porém isso não ocorreu. A literatura mostra que a liberação das citocinas produzidas pelo contato com o MP promove, como discutimos acima, alteração da modulação dos canais principalmente de potássio, ativação do NF-kB e alteração da resposta arteriolar sistêmica endotélio-dependente (Nurkiewicz, 2004). Desta forma a literatura sugere que a poluição promove distúrbios nos mecanismos regulatórios do calibre dos vasos que poderiam ser secundários ao remodelamento induzido por esse agressor.

Analizamos o conteúdo de fibras colágenas nas túnicas das paredes das coronárias e verificamos a predominância da gênese de colágeno e fibrose em vasos de ambas câmaras cardíacas, em quase todas as categorias de calibre vascular atingindo todas as camadas da parede vascular, Tabela 9 e Figura 17.

Ao analisarmos ambas câmaras ventriculares, constatamos aumento do conteúdo colágeno na camada adventícia dos camundongos submetidos ao ar ambiente ($p < 0,001$) e diminuição na camada média ($p = 0,03$).

Os ventrículos analisados separadamente demonstraram fibrose na camada adventícia do VE ($p < 0,001$) devido aos vasos de grande calibre ($p < 0,001$) e na túnica média nas coronárias de categoria II ($p = 0,03$).

No VD houve igualmente ao VE aumento de colágeno na adventícia ($p=0,02$) às custas dos vasos médios ($p=0,05$). Não houve alteração entre os grupos experimentais em relação colágeno da camada média de VD, Tabela 9 e Figura 17.

A análise do conteúdo das fibras elásticas foi mais surpreendente, pois houve elastogênese na camada adventícia quando analisadas todas as coronárias nos animais da câmara poluída ($p<0,001$) e também na camada média ($p<0,001$), Tabela 10 e Figura 18.

Quando separado por ventrículos obtivemos elastogênese na camada adventícia do VD ($p<0,001$) às custas dos vasos pequenos e grandes ($p<0,001$; $p=0,005$, respectivamente), e na camada muscular ($p<0,001$) devido aos vasos médios e grandes ($p=0,01$; $p=0,007$ respectivamente) Figura 19.

No VE, obtivemos o mesmo padrão com aumento do conteúdo elástico da camada adventícia das coronárias ($p<0,001$) atingindo as 3 categorias de vaso (I: $p<0,001$; II: $p<0,001$; III: $p=0,003$), e na camada média ($p<0,001$), referente às categorias II e III ($p<0,001$; $p=0,01$, respectivamente), Tabela 10 e Figuras 18, 19 e 20.

Os achados de remodelamento vascular caracterizado por fibrose e elastogênese coronariana podem contribuir para respostas inadequadas de patência vascular durante agressões externas como os poluentes. Esse fato poderia justificar a maior resposta a vasoconstricção em coronárias (Mills et al., 2006) e artérias braquiais (Törnqvist et al., 2007) secundárias a exposição aguda de poluentes. A resposta vascular anormal poderia também justificar episódios de hipertensão pulmonar agudizada com repercussões cardíacas como arritmias e cor-pulmonale. Poderia

também justificar remodelamento miocárdico com atrofia de massa ventricular secundário a isquemia crônica agudizadas de coronárias.

É a primeira vez que esse predomínio de gênese de fibras estruturais na parede das coronárias é demonstrado em estudo animal, sem doença prévia, com exposição ao nível ambiental real de poluição atmosférica e dentro dos limites padrões de qualidade do ar preconizados pelos órgãos sanitários públicos.

Como discutimos acima, poluentes como o MP podem ser causa direta de ativação de fibroblastos (Gursinsky et al., 2006) e indireta dessa gênese, através da liberação nos pulmões de marcadores pro-inflamatórios e que causam fibrinogênese (Dai, 2002) e alteração da expressão gênica de citocinas, assim como componentes do MP altamente solúveis como alguns metais que podem ser absorvidos sistemicamente atingindo o coração. Esse remodelamento pode ser uma das respostas para as alterações de fluxo do miocárdio como no estudo realizado por Mills, et al., 2007, com adultos submetidos a inalação de solução diluída de diesel durante esforço físico, onde verificaram uma alteração vasomotora isquêmica nos voluntários sadios e discutiram a possibilidade da disfunção ser causada pelo estresse oxidativo e disfunção na resistência microvascular dos vasos do miocárdio.

Nossos resultados permitem afirmar que a poluição predominantemente veicular da cidade de São Paulo induz remodelação cardiopulmonar com respostas diferentes perante os sistemas. Essa remodelação ocorre assintomática mas pode contribuir para respostas alteradas de coronárias em adultos, constituindo fator de predisposição a eventos cardiovasculares de alta morbimortalidade em adultos entre 40 e 50 anos em fase produtiva.

CONCLUSÃO

A exposição crônica à poluição da cidade de São Paulo desde o nascimento induziu:

- Inflamação pulmonar na região peribronquiolar.
- Remodelamento vascular com quebra de fibras dos sistemas elástico e colágeno na parede dos vasos pulmonares peribronquiolares.
- Remodelamento vascular com predomínio de fibrose e elastose da parede das coronárias.
- Remodelamento do miocárdio caracterizado por uma hiperplasia dos núcleos de cardiomiócitos ou atrofia das fibras do miocárdio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) Material particulado em suspensão na atmosfera - determinação da concentração de fumaça pelo método da refletância da luz. NBR (Norma Brasileira Registrada) 10736; Set, 1989.

Araújo BB, Dolhnikoff M, Silva LFF, Elliot J, LindemanJHN, Ferreira DS, Mulder A, Gomes HAP, Fernezlían SM, James A, Mauad T. Extracellular matrix components and regulators within the airway smooth muscle in asthma. *ERJ Express*.2008.

Batalha JRF, Saldiva PHN, Clark RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GGK, Koutrakis P, Godlesky JJ. Concentrated ambient air particles induce vasoconstriction of small pulmonary arteries in rats. *Environ. Health Perspect.* 2002;110 (12):1191-7.

Böhm GM, Saldiva PHN, Pasqualucci CAG, Massad E, Martins MA, Zin WA, Silva R et al. Biological Effects of Air Pollution in São Paulo and Cubatão. *Environ Res.* 1989;49: 208-16.

Bonner JC. Lung fibrotic responses to particle exposure.*Toxicol Pathol.*2007; 35(1):148-53.

Braga ALF, Pereira LAA, Saldiva PHN. Poluição atmosférica e seus efeitos na saúde humana. *J Pneumol*.20012;10-6.

Briggeri A, Bellini P, Terracini B. Meta-analysis of the Italian studies on short-term effects of air-pollution - MISA 1996-2002. *Epidemiol.Prev*. 2004;28(4-5):4-100.

Bueno HMS. Comunicação oral. Dados ainda não publicados.

Calderon-Guarcidueñas L, Mora-Tiscareno A, Fordham LA, Valencia-Salazar G, Chung CJ, Rodriguez-Alcaraz A, Hazucha MJ et al. Respiratory damage in children exposed to urban pollution. *Pediatr. Pulmonol*. 2003;36:148-161.

Calderon-Guarcidueñas L, Vincent R, Mora-Tiscareno A, Franco-Lira M, Henriquez-Roldam C, Barragan-Mejia G, Reed W et al. Elevated plasma endothelin-1 and pulmonary arterial pressure in children exposed to air pollution. *Environ. Health Perspect*. 2007;115:1248-53.

Carnelley T, Le C. Correlation between chemical characteristics and biological reactivity of particulate matter in ambient air. *Environmental Sciences Division Alberta*.2001

Carter JD, Ghio AJ, Samet JM, Devlin RB. Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air particles in metal-dependent. *Toxicol Appl Pharmacol*.1997;146:180-8.

Carvalho-Oliveira R, Pozo RMK, Lobo DJA, Lichtenfels AJFC, Martins-Jr HA, Bustilho JOWV, Saiki M, Sato IM, Saldiva PHN. Diesel Emissions Significantly Influence Composition and Mutagenicity of Ambient Particles: a Case Study in São Paulo, Brazil. *Environ Res*, 2005;98:1-7.

Carvalho-Oliveira R, Saiki M, Pires-Neto RC, Lorenzi-Filho G, Macchione M, Saldiva PHN. Anti-oxidants reduce the acute adverse effects of residual oil fly ash on the frog palate mucociliary epithelium. *Environ Res*, 2005; 98:349-54.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). Relatório de qualidade do ar do Estado de São Paulo 2003. Série Relatório – Secretaria do Estado do Meio Ambiente. São Paulo: CETESB; 2003. Disponível em: URL:<http://www.ctesb.sp.gov.br/AR>

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). Relatório de qualidade do ar do Estado de São Paulo 2007. Série Relatório – Secretaria do Estado do Meio Ambiente. São Paulo: CETESB; 2007. Disponível em: URL:<http://www.ctesb.sp.gov.br/AR>

Dai J, Xie C, Vincent R, Churg A. Air pollution particles produce airway wall remodeling in rat tracheal explants. *Am.J.Respir.Cell Mol. Biol.* 2003;29:352-8.

Dockery DW, Douglas W, Pope CA III, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG Jr, Speizer FE. The association between air pollution and mortality in six US cities. *N Eng J Med*. 1993;329: 1753-9.

Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W. Ultrafine Particles. *Occup Environ Med*. 2001; 58: 211-15.

Eeden SF, Tan WC, Suwa T, Mukae H, Terashima T, Fujii T, Qui D, Vicent R, Hogg JC. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particle matter air pollutants (PM₁₀). *Am Respir Crit Care Med*. 2001; 164:826-30.

Eeden SF, Hogg JC. Systemic inflammatory response induced by particulate matter air pollution: the importance of bone-marrow stimulation. *J Toxicol and Environ Health*. 2002; 65: 1597-1613.

Ferreira MI, Petrenko H, Lobo DJA, Rodrigues GE, Moreira A, Saldiva PHN. In situ monitoring of the mutagenic effects of the gaseous emission of a soil waste incinerator in metropolitan Sao Paulo, Brazil, using the *Tradescantia* stamen-hair assay. *J. Air Waste Manage. Assoc*. 2000;50:1852-6.

Firket J. The cause of the symptoms found in the Meuse Valley during the fog of December, 1930. *Bull Acad R Med Belg*. 1931; 11:683-741.

Folinsbee LJ. Does nitrogen dioxide exposure increase airways responsiveness. *Toxicol Ind Health*. 1992;8(5):273-83.

Forestiere F, Lo Presti E, Agabiti N, Rapiti E, Perucci CA. Health impact of exposure to environmental tobacco smoke in Italy. *Epidemiol Prev*. 2002;26(1):18-29.

Gilmour PS, Rahman I, Donaldson K, MacNee W. Histone acetylation regulates epithelial IL-8 release mediated by oxidative stress from environmental particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;284(3): L533-40.

Graff DW, Cascio WE, Brackhan JA, Devlin RB. Metal particulate matter components affect gene expression and beat frequency of neonatal rat ventricular myocytes. *Environ. Health Perspect*. 2004;112(7):792-8.

Guimarães ET, Domingos M, Alves ES, Caldini NJr, Lobo DJA, Lichtenfels AJFC, Saldiva PHN. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of Sao Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay. *Environ Exp Bot*. 2000; 44: 1-8.

Gursinsky T, Ruhs S, Friess U, Diabaté S, Krug IIF, Silber RE, Simm A. Air pollution associated fly-ash particles induce fibrotic mechanisms in primary fibroblasts. *Biol. Chem*. 2006;387(10-11):1411-20.

Inoe KI, Takano H, Sakurai M, Oda T, Tamura H, Yanagisawa R, Shimada A, Yoshikawa T. Pulmonary exposure to diesel exhaust particles enhances coagulatory disturbance with endothelial damage and systemic inflammation related to lung inflammation. *Biol. Med.* 2006;231:1626-32.

Johnson RL. Effects of Air Pollution on Lungs and Heart. *Circulation.* 2005; 6: 13.

Kelly FJ. Oxidative Stress: Its Role in Air Pollution and Adverse Health Effects. *Occup Environ Med.* 2003; 60: 612-16.

Knuckles IL, Dreher KL, Kevin L. Fine oil combustion particle bioavailable constituents induce molecular profiles of oxidative stress, altered function, and cellular injury in cardiomyocytes. *J. Toxicol. Environ. Health.* 2007;70(21):1824-37.

Lemos M, Lichtenfels AJFC, Amaro EJr. Quantitative pathology of nasal passages in rats exposure to urban levels of air pollution. *Environ Res.* 1994;66:87-95.

Lemos M, Mohallen SV, Macchione M, Dolhnikoff M, Assunção JV, Godlesky JJ, Saldiva PHN. Chronic exposure to urban air pollution induces structural alterations in murine pulmonary and coronary arteries. *Inh. Toxicol.* 2006;18:247-53.

Lichtenfels AJFC, Gomes JB, Pieri PC, Miraglia SGEK, Hallak J, Saldiva PHN. *Fertil Steril.* 2007; 87(1):230-2.

Lin CA, Association Between Air Pollution and Ischemic Cardiovascular Emergency Room Visits. *Environ Re.* 2003; 92: 57-63.

Lodge JP. Methods of air sampling and analysis. Intersociety committee. *Lewis Publishers, Inc.* 1989; 399-402.

Logan WPD. Mortality in London fog incident. *Lancet.* 1952; 1: 336-8.

Macchione M, Oliveira AP, Gallafrio CT, Munchão FP, Obara MT, Guimarães ET, Artaxo P, Kim M, Lorenzi- Filho G, Junqueira VCB, Saldiva PHN. Acute effects of inhalable particles on the frog palate on the mucociliary epithelium. *Environ. Health Perspect.* 1999;107(10);829-33.

Martins, Air Pollution and Emergency Room Visits Due to Chronic Lower Respiratory Diseases in the Elderly: An Ecological Time-Series Study in São Paulo, Brazil. *J Occup Environ Med.* 2002; 44: 622 – 27.

Massad E, Saldiva CD, Cardoso LMN, Silva R, Saldiva PHN, Böhn GM. Acute toxicity of gasoline and ethanol automobile engine exhaust gases. *Toxicol Lett.* 1985;26(2-3):187-92.

Mauad T, Silva LFF, Santos MA, Grinberg L, Bernardi F, Martins MA, Saldiva PHN, Dolnikoff M. Abnormal alveolar attachments with decreased elastic fiber content in distal lung fatal asthma. *Am. J. Crit. Care Med.* 2004;170:857-62.

Mills NL, Töqvist H, Robinson SD, Gonzalea M, Darnley K, Mac Nee W, Boon NA, Donaldson K, Blomberg A, Sandstrom T, Newby DE. Diesel exhaust inhalation causes vascular dysfunction and impaired endogenous fibrinolysis. *Circulation* 2005; 112(25):3930-36.

Mills NL, Töqvist H, Robinson SD, Gonzalez M, Vink E, Vink E, Robinson SD, Söderberg S, Boon NA, Donaldson K, Sandstrom T, Blomberg A, Newby DE. Ichemic and thrombotic effects of diesel-exhaust inhalation in men with coronary heart disease. *N.Engl J. Med.* 2007;357:1075-82.

Moriscot AS, Carneiro José, Abrahamsohn Paulo Alexandre. Histologia para fisioterapia e outras áreas da reabilitação. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. ; 2004.

Moshhammer H, Hutter H-P, Hauck H, Neuberg m. Low levels of air pollution induce changes of lung function in a panels of schoolchildren. *Eur. Respir. J.* 2006;27:1138-43.

Negri EM et al. Architectural Remodelling in Acute and Chronic Interstitial Lung Disease: Fibrosis or Fibroelastosis ? *Histopathology*, 2000; 37: 393 – 401.

Nurkiewicz TR, Porter DW, Barger M, Millecchia L, Rao KMK, Marvar PJ, Hubbs AF, Castranova V, Boegehold MA. Systemic microvascular dysfunction and inflammatory after pulmonary particulate matter exposure. *Environ. Health Perspect.* 2006;114(3):412-19.

Nurkiewicz TR, Porter DW, Barger M, Castranova V, Boegehold MA. Particulate matter exposure impairs systemic microvascular endothelial-dependent dilation. *Environ. Health Perspect.* 2004;112(13):1299-306.

Pereira PM, Saldiva PHN, Sakae RS, Böhn G, Martins MA. Urban levels of air pollution increase lung responsiveness in rats. *Environ Research.* 1995;69:96-101.

Pires-Neto R, Lichtenfels AJ, Soares SR, Macchione M, Saldiva PHN, Dolnikoff M. Effects of Sao Paulo air pollution on the upper airways of mice. *Environ. Res.* 2006;101:356-61.

Pope CA III, Burnett RT, Thum MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. Lung Cancer, Cardiopulmonary Mortality, and Long-Term Exposure to Fine Particulate Air Pollution. *JAMA* 2002; 287(9) :1132-41.

Pope CAIII, Burnett RT, Thurston GD et al. Cardiovascular mortality and long term exposure to particulate air pollution - Epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of diseases. *Circulation*, 2004; 109:71-7.

Rivero DHRF, Soares SRC, Lorenzi-Filho G, Saiki M, Godlesky JJ, Antonangelo L, Dolhnikoff M, Saldiva PHN. Acute cardiopulmonary alterations induced by fine particulate matter of Sao Paulo, Brazil. *Toxicol. Sciences*. 2005;85:898-905.

Santos FB, Nagato LKS, Boechem NM, Negri EM, Guimarães A, Capelozzi VL, Faffe DS, Zin WA, Rocco PRM. Time course of lung parenchyma remodeling in pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. *J.Appl.Physiol*. 2006;100:98-106.

Saldiva PHN, Massad E, Caldeira MP, Calheiros DF, Saldiva CD, Nicolelis MA, Böhn GM. Pulmonary function of rats exposed to ethanol and gasoline fumes. *Braz J Med Biol Res*. 1985; 18(4):573-7.

Saldiva PHN. Aparelho mucociliar: aspectos funcionais e métodos de estudo. *Jornal de Pneumologia*. 1990;16(3):161-170.

Saldiva PHN, King M, Delmonte VLC, Macchione M, Parada MAC, Daliberto ML, Sakae RS, Criado PMP, Silveira PLP, Zin WA, Böhn GM. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. *Environ Res*. 1992; 57: 19-33.

Saldiva PHN, Lichtenfels AJFC, Paiva PSO, Barone IA, Martins MA, Massad E, Pereira JCR, Xavier VP, Singer JM, Böhn GM. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in Sao Paulo, Brazil: A Preliminary Report. *Environ Res*, 1994; 65: 218-25.

Saldiva PHN, Air pollution and mortality in elderly people: a time series study in São Paulo, Brazil. *Arch Environ Health*, 1995;50:159-63.

Saldiva PHN, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GGK, Diaz E, Koutrakis P, Suh H, Tsuda A, Godlesky JJ. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles in related to particle composition. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002;165:1610-17.

Saldiva PHN et al. Lung Inflammation and air particles. *Am J Resp Crit Care Med*, 2002;165:1610-17.

Sun Q, Wang A, Wang A, Jin X, et al. Long term air pollution exposure and acceleration of atherosclerosis in vascular inflammation in an animal model. *JAMA* 2005; 294:3003-10.

Törnqvist H; Mills NL; Gonzalez M; Miller MR; Robinson SD; Megson IL, Mac Nee W; Donaldson K; Söderberg S; Newby DE; Sandstrom T; Blomberg A. Persistent endothelial dysfunction in humans after diesel exhaust inhalation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007; 176(4):325-326.

Ushiki T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from morphological viewpoint. *Arch. Histol. Cytol.* 2002;65(2):109-26.

Vigott MA. Short term effects of exposure to urban air pollution on human health in Europe. The APHEA Project (Air Pollution and Health: a European Approach). *Epidemiol. Prev.* 1999;23(4):408-15.

Xisto DG, Farias LL, Ferreira HC, Picanço MR, Amitrano D, Lapa e Silva JR, Negri EM, Mauad T, Carnielli D, Silva LFF, Capelozzi VL, Faffer DS, Zin WA, Rocco PRM. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Am. J. Crit, Care Med.* 2005;17:829-37.

WHO (World Health Organization). Air quality guidelines, 2005.