NILSA REGINA DAMACENO-RODRIGUES

**Estudo estereológico do efeito da exposição gestacional à
poluição ambiental de São Paulo sobre o desenvolvimento
renal em camundongos**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Elia Garcia Caldini

São Paulo

2012

NILSA REGINA DAMACENO-RODRIGUES

**Estudo estereológico do efeito da exposição gestacional à
poluição ambiental de São Paulo sobre o desenvolvimento
renal em camundongos**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Elia Garcia Caldini

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Damaceno-Rodrigues, Nilsa Regina
Estudo estereológico do efeito da exposição gestacional à poluição ambiental de
São Paulo sobre o desenvolvimento renal em camundongos / Nilsa Regina
Damaceno-Rodrigues. -- São Paulo, 2012.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Elia Tamasso Espin Garcia Caldini.

Descritores: 1.Poluição do ar 2.Material particulado 3.Rim/crescimento &
desenvolvimento 4.Camundongos 5.Estereologia

USP/FM/DBD-193/12

*Dedico este trabalho ao meu
querido esposo Jorge e a minha
querida filha Talita.*

À querida orientadora Profa. Dra. Elia Garcia Caldini, agradeço pela orientação dedicada a mim como aluna e como profissional, sempre disposta a buscar soluções para a realização de um trabalho com paciência e sabedoria, dispondo de seu tempo e conhecimento científico. Por me incentivar a desenvolver e concluir este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Paulo Hilário Nascimento Saldiva, do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Coordenador do Instituto Nacional de Análise Integrada do Risco Ambiental (INAIRA) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por mais uma vez, me acolher, dar a oportunidade de conviver e por incentivar a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Fernando Barbosa Junior e à Química Vanessa Cristina de Oliveira Souza do Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela realização da análise dos metais por espectrometria de massa.

À Doutora Mariana Matera Veras do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da FMUSP, responsável pelo Projeto: “Avaliação dos efeitos da exposição gestacional e pós-natal à poluição do ar sobre o organismo materno, desenvolvimento fetal e suas consequências sobre a saúde na vida adulta: estudo experimental”, pelo companheirismo e amizade durante toda a manipulação dos animais experimentais, desde sua exposição aos poluentes até a coleta de material para o estudo e pelos ensinamentos da estereologia.

Ao graduando Andrey Augusto Socolovithc, aluno do Curso de Medicina da FMUSP, Bolsista de Iniciação Científica PIBIC neste projeto, pela amizade e pelo auxílio nas análises morfológicas.

Ao Doutor Marcelo Alves Ferreira, do Laboratório de Biologia Celular (LIM 59) da FMUSP, pela dedicação na análise estatística.

Aos Professores membros da Banca Examinadora da Qualificação, Doutora Elnara Márcia Negri, Doutora Regiani Carvalho de Oliveira e Doutor Magno Santos Leite, pelos sábios ensinamentos e sugestões para este trabalho.

À Secretária Valéria Veiga Sales, do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP, pelo carinho e profissionalismo com que conduziu a diagramação digital da dissertação.

À Dra. Claudia Naves Battlehner, Angela Batista Gomes dos Santos, Gildásio Vieira Rocha, Cristina Fonseca (in memoriam), Felipe Garcia Storace, Maria Ires Amorim, Rosemeire Firmino, Mirian Regina Taborda Simone, Maria Cecília Lobo Marcondes, Hélio Corrêa, Maria Margarida Teixeira Monteiro, Adão Caetano Sobrinho, Maria do Rosário Loureiro Aguiar, funcionários do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP e ao Mestrando Fagner Leitão de Menezes, pela amizade, companheirismo e incentivo em diferentes tarefas durante este trabalho.

A todo o pessoal do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da FMUSP, pela amizade e colaboração.

À Tania Regina de Souza, Liduvina da Silva Neta de Barros e Diva Collapaula Carvalho, da Secretaria do Programa Fisiopatologia Experimental da FMUSP, pelo valioso auxílio administrativo durante o curso de pós-graduação.

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Carneiro da Cunha A., Freddi MJAL, Crestana MF, Aragão MS, Cardoso SC, Vilhena V. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	i
LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Material particulado na atmosfera	2
1.2. Efeitos adversos da poluição atmosférica na cidade de São Paulo	5
1.3. Vulnerabilidade fetal à poluição atmosférica	6
1.4. Toxicidade dos metais no desenvolvimento embrionário	10
1.5. Estrutura e desenvolvimento renal	12
1.6. Estereologia	22
1.7. Justificativa e Objetivos	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1. Caracterização da exposição à poluição	30
2.2. Grupos experimentais e obtenção do material	33
2.3. Processamento histológico do material	35
2.4. Análise estereológica de volume do rim e dos compartimentos renais	36
2.5. Quantificação estereológica dos glomérulos renais	38
2.6. Análise dos elementos traço por espectrometria de massa	40
2.7. Análises estatísticas	42
3. RESULTADOS	44
3.1. Peso fetal e peso renal	44
3.2. Análise morfológica qualitativa	45
3.3. Análise estereológica de volume do rim, córtex e medula	47
3.4. Densidade e número total de glomérulos no rim	49
3.5. Análise da concentração de metais nos fetos	51
4. DISCUSSÃO	55
5. CONCLUSÕES	63
6. REFERÊNCIAS	64

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS E SÍMBOLOS

CAPPesq – Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CO – Monóxido de carbono

CV – coeficiente de variação

dpc – dia pós-concepção

F – Grupo de animais gestados na câmara filtrada

HC – Hidrocarbonetos

HPA – hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

LIM – Laboratórios de Investigação Médica

n – número de animais na amostra

NF – Grupo de animais gestados na câmara não filtrada

NO₂ – Molécula do nitrogênio

NO_x – Óxidos de nitrogênio

O₂ – Oxigênio

O₃ – Ozônio

PBS – Tampão fosfato de sódio

PM – Material Particulado

PM₁₀ – Material particulado entre 2,5 e 10µm de diâmetro

PM_{2,5} – Material particulado 2,5µm de diâmetro

SO_x – Óxidos de enxofre

UV – Radiação ultra-violeta

LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA

µg/g – microgramas por grama

µm – micrômetro

cm – centímetro

g – grama

l/m³ – litros por metro cúbico

l/seg – litros por segundo

m – metro

mg – miligrama

mm² – milímetro quadrado

mm³ – milímetro cúbico

t – tonelada

RESUMO

Damaceno-Rodrigues N.R. *Estudo estereológico do efeito da exposição gestacional à poluição ambiental de São Paulo sobre o desenvolvimento renal em camundongos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

A poluição atmosférica é um importante fator de risco à saúde humana, com maior vulnerabilidade em pessoas com doenças pré-existentes, idosos, crianças e fetos. A teoria da origem desenvolvimentista da saúde e doença se baseia em evidências que alterações no desenvolvimento fetal que podem levar a prematuridade, baixo peso ao nascer e predispor ao surgimento de síndrome metabólica, hipertensão e doenças renais na idade adulta. Há evidências também que alterações do ambiente intrauterino na gestação afetam o número de néfrons ao nascimento, o que predispõe à hipertensão na idade adulta. Estudos experimentais prévios comprovam que o ar de São Paulo apresenta uma concentração de poluentes capaz de desencadear, além de lesões cardio-respiratórias, alterações reprodutivas como baixo peso ao nascer e prematuridade. O objetivo deste estudo foi avaliar de maneira objetiva se a exposição aos níveis ambientais de poluição atmosférica no período gestacional tem o potencial de promover alterações de volume renal e número de glomérulos ao nascimento, o que, com base na teoria da origem fetal das doenças, poderia ser um fator predisponente para doenças renais e hipertensão no adulto. Para tanto, neste estudo, foram estudados rins fetos de camundongos Balb/c no 18º dia pós-concepção, expostos aos níveis ambientais de poluição do ar em São Paulo, em duas câmaras de exposição uma recebendo ar filtrado (F) e outra ar não filtrado (P). Os rins dos fetos foram avaliados morfolologicamente por métodos estereológicos para estimativa do volume renal total e de cada compartimento (córtex e medula) e número de néfrons. A concentração do material particulado na câmara filtrada foi significativamente menor (71%, $p < 0.001$) que na câmara não filtrada. O peso fetal e dos rins foi 30% menor no grupo NF em relação ao grupo F ($p = 0.007$ e $p = 0,0112$ respectivamente).

O córtex e a medula renais dos fetos do grupo NF apresentaram redução de volume: córtex: $4,46 \pm 0,55 \times 2,44 \pm 0,79$ ($p=0,0003$); medula: $2,35 \pm 0,43 \times 1,24 \pm 0,61$ ($p=0,0034$). O número absoluto de néfrons no rim dos fetos NF ($3301,0 \pm 1720,8$) foi significativamente menor ($p=0,0082$) que nos fetos F ($7199,5 \pm 2023,5$). Estes dados mostram que a exposição pré-natal aos níveis ambientais de poluição em São Paulo provoca uma alteração no desenvolvimento renal, que pode levar à doenças no adulto.

Descritores: Poluição do ar, Material particulado, Rim/crescimento & desenvolvimento, Camundongos, Estereologia.

ABSTRACT

Damaceno-Rodrigues N.R. *Stereological study of the effect of gestational exposure to environmental pollution in São Paulo on kidney development in mice* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012.

Air pollution is an important risk factor to human health, with greater vulnerability in people with pre-existing diseases, elderly, children and fetuses. The theory of developmental origins of health and illness proposes that changes in fetal development that can lead to prematurity, low birth weight and predisposition to chronic diseases in adulthood. There is also evidence that changes in the intrauterine environment during pregnancy affect the number of nephrons at birth, which predisposes to hypertension in adulthood. Previous experimental studies show that the air of Sao Paulo has a concentration of pollutants that can trigger cardio-respiratory lesions and reproductive hindrances as low birth weight and prematurity. Our proposal was to evaluate objectively whether exposure to ambient levels of air pollution during pregnancy has the potential to promote changes in renal volume and number of glomeruli at birth, which could be a predisposing factor for adult renal illness and hypertension based on the theory of fetal origin of the disease. Therefore, in this study, we used kidneys of fetal Balb/c mice on day 18 post-conception (dpc), exposed to ambient levels of air pollution in Sao Paulo in two exposure chambers: one receiving filtered air (F) and other non-filtered air (P). The kidneys of the fetuses were morphologically evaluated by stereological methods for estimation of total renal volume and the volume of each compartment (cortex and medulla) and the number of nephrons. The concentration of particulate matter in the filtered chamber was significantly lower (71%, $p < 0.001$) than in the unfiltered chamber. Fetal weight and kidney weight were 30% lower in the unfiltered chamber ($p = 0.007$ and $p = 0.0112$ respectively). The renal cortex and medulla of exposed fetuses showed volume reduction; cortex: $4.46 \pm 0.55 \times 2.44 \pm$

0.79 ($p=0.0003$); medulla: $2.35 \pm 0.43 \times 1.24 \pm 0.61$ ($p=0.0034$). The absolute number of nephrons in the kidney of exposed fetuses ($3301,0 \pm 1720,8$) was significantly lower ($p=0.0082$) when compared to the filtered air group ($7199,5 \pm 2023,5$). These data show that pre-natal exposure to ambient levels of air pollution in Sao Paulo entails changes in the development of the kidney, that can lead to illness in adult age.

Descriptors: Air pollution, Particulate matter, Growth & development kidney, Mice, Stereology.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A poluição atmosférica em São Paulo interfere na qualidade de vida da população. A exposição a poluentes ambientais aumenta o risco para doenças respiratórias e cardiovasculares, admissões hospitalares e mortalidade (Bobak, 2000; Olmo et al., 2011; Anderson et al. 2012; Colais et al., 2012; Lepeule et al. 2012).

Alterações reprodutivas, que vão desde disfunções do ciclo sexual e produção de gametas até aumento de risco para perda fetal e prematuridade também associam-se à exposição aos poluentes em São Paulo (Veras et al. 2008, 2009 e 2010).

Estudos em humanos e animais mostram uma associação entre exposição gestacional à poluição do ar e baixo peso ao nascer (Veras et al., 2008; Pearce et al., 2012; Wilhelm et al., 2012).

Por sua vez, o baixo peso tem sido relacionado a um maior risco de doenças na vida adulta, como diabetes, disfunções cardiovasculares e, inclusive, alteração da função renal (Rogers & Velten, 2011; Sandboge et al. 2012).

Ainda que não estejam claros os mecanismos que levam a esta programação fetal determinante de maior risco para doenças no adulto, as evidências mostram alterações de desenvolvimento de alguns órgãos, inclusive do rim, como por exemplo, restrição de crescimento na vida intrauterina induz hipertensão no adulto. É interessante notar que nestes

casos observa-se menor número de néfrons ao nascimento (Brenner e Mackenzie, 1997).

Levando-se em consideração a associação da exposição gestacional à poluição com baixo peso ao nascer e com alterações do desenvolvimento de órgãos (como do pulmão, Mauad et al., 2008), a proposta deste trabalho é avaliar, através de uma investigação experimental controlada, as consequências da exposição gestacional aos níveis ambientais de poluição em São Paulo sobre o desenvolvimento renal de camundongos.

1.1 Material particulado na atmosfera

A variedade de substâncias que podem estar presentes na atmosfera é muito grande, porém nas grandes cidades, como São Paulo, os principais poluentes atmosféricos derivam do tráfego de veículos automotores e compreendem material particulado (PM, do inglês *particulate matter*) respirável, associado a óxidos de nitrogênio (NO_x), ozônio (O_3) e compostos orgânicos voláteis.

O Estado de São Paulo mantém, desde a década de 70, redes de monitoramento da qualidade do ar medindo os poluentes atmosféricos nas escalas locais e regionais. A Região Metropolitana de São Paulo é uma área prioritária, por apresentar uma forte degradação da qualidade do ar, característica da maior parte dos grandes centros urbanos. De acordo com as estimativas de 2010, as diversas fontes de poluição (automóveis,

indústrias, etc.) são responsáveis pelas emissões para a atmosfera da Região Metropolitana de São Paulo de 161 mil toneladas por ano (t/ano) de monóxido de carbono (CO), 35 mil t/ano de hidrocarbonetos (HC), 84 mil t/ano de óxidos de nitrogênio (NO_x), 5 mil t/ano de material particulado total e 9 mil t/ano de óxidos de enxofre (SO_x) (CETESB-São Paulo, 2010).

As partículas totais em suspensão (PTS) são uma mistura de partículas sólidas e gotas de líquidos suspensas no ar, com tamanho variável de poucos nanômetros a dezenas de micrômetros (10nm a 100µm), originárias de fontes naturais (poeira espalhada pelo vento) ou artificiais (fumaça de cigarro, queima incompleta do combustível em veículos, setor industrial, construção civil e processos agrícolas).

O ser humano retém as partículas maiores nas vias superiores de seu aparelho respiratório. Já as partículas menores podem atingir os alvéolos pulmonares, onde ocorrem as trocas gasosas. Em termos práticos, classifica-se o material particulado em:

PM₁₀, partículas até 10µm micrômetros de diâmetro;

PM_{2,5}, partículas respiráveis menores que 2,5µm, e

PM_{0,1}, partículas ultrafinas menores que 100nm, contribuem pouco em termos de massa, porém são as mais numerosas.

Ainda que as partículas finas e ultrafinas possam depositar-se nas vias aéreas superiores, dependendo do fluxo de ar e das taxas de difusão, estas partículas penetram no interior das vias aéreas inferiores e alvéolos (Brauer et al., 2001).

O material particulado contém material biológico, hidrocarbonos, íons, gases reativos e metais adsorvidos a um núcleo de natureza carbônica. O PM_{10} constitui-se basicamente por material biológico (pólen, bactérias), poeira grossa e sal marinho.

As partículas inaláveis finas ($PM_{2,5}$) são produzidas principalmente nos processos de combustão, a partir de emissão direta e também a partir dos gases precursores emitidos como SO_2 , NO_x e compostos orgânicos voláteis que reagem na atmosfera. A fração fina é composta tipicamente de nitrato, sulfato, amônio, material carbonáceo e metais (CETESB-São Paulo, 2012).

É preciso destacar que, para uma mesma quantidade de emissão, a qualidade do ar pode variar em decorrência das condições meteorológicas, pois estas determinam uma maior ou menor diluição dos poluentes. É por isso que a qualidade do ar piora com relação aos parâmetros CO, PM e SO_2 durante os meses de inverno, que são mais desfavoráveis à dispersão dos poluentes (Andrade, 1993; CETESB-São Paulo, 2012).

Ainda que existam descrições da relação entre níveis de PM_{10} e aumento de mortalidade, a maior parte dos estudos indica que $PM_{2,5}$ e $PM_{0,1}$ são as frações bioativas do material particulado e, por isso, são as mais estudadas em relação aos seus efeitos adversos à saúde (Stone, 2000). Em geral, a fração de menor tamanho tem os maiores efeitos toxicológicos, particularmente mutagenicidade, citotoxicidade e reatividade com o DNA, devido a esta fração possuir grande capacidade de geração de radicais e maiores concentrações de HPA (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos),

semiquinonas, metais e metais de transição (Squadrito et al., 2001; Vinitketkumnuen et al., 2002).

1.2 Efeitos adversos da poluição atmosférica na cidade de São Paulo

Até por volta de 1990, os estudos que relacionavam os efeitos adversos da poluição na saúde populacional foram realizados a partir de episódios determinados que levassem a um aumento dos níveis de poluentes. Posteriormente, começaram a surgir estudos realizados em séries temporais, levando em consideração as estações do ano e a variação da concentração diária dos poluentes, durante um determinado período de tempo e correlacionando-a com as taxas de mortalidade, de admissões hospitalares e outros indicativos (Brunekreef & Holgate, 2002).

Localmente, diversos estudos foram realizados para se conhecer e avaliar os efeitos sobre a saúde da poluição do ar na cidade de São Paulo; os dados obtidos revelaram que a poluição do ar aumenta o número de admissões hospitalares, mortalidade e atendimentos de emergência por problemas respiratórios e cardiovasculares (Souza et al., 1998; Sih, 1999; Lin et al., 2003; Freitas et al., 2004; Arbex et al., 2010) e que os idosos e as crianças são mais suscetíveis a estes efeitos (Saldiva et al., 1994; Saldiva et al., 1995; Miraglia, 1997; Saldiva et al., 1998; Lin et al., 1999; Gouveia e Fletcher, 2000a; Gouveia e Fletcher, 2000b; Braga et al., 2001; Conceição et al., 2001; Ribeiro e Cardoso, 2003; Jasinski et al., 2011).

Recentemente, Vidotto et al. (2012) demonstraram uma associação entre a exposição ao SO₂ atmosférico de São Paulo e aumento de admissões hospitalares por doenças reumáticas pediátricas.

Estabeleceu-se ainda que a exposição à poluição atmosférica em São Paulo pode provocar alterações inflamatórias das vias aéreas de animais e humanos (como, disfunção no transporte mucociliar e no perfil secretor de mucinas do epitélio respiratório) e alterações do parênquima e vasos pulmonares (Böhm et al., 1989; Lemos et al., 1994; Macchione et al., 1999; Batalha et al., 2002; Saldiva et al., 2002; Yoshizaki et al., 2010; Olmo et al., 2011), além de alterações no pico do fluxo expiratório (Correia-Deur et al., 2012).

Há evidências de que a poluição do ar de São Paulo provoca aumento de sintomas de desconforto ocular e instabilidade do filme lacrimal (Novaes et al.; 2010; Torricelli et al., 2011).

1.3 Vulnerabilidade fetal à poluição atmosférica

No que diz respeito aos efeitos da exposição à poluição nos processos reprodutivos, nosso grupo tem contribuído grandemente para o tema usando o modelo experimental de camundongos expostos às condições reais de poluição do ar na cidade de São Paulo. A exposição crônica, mesmo em níveis moderados, trouxe prejuízos ao processo reprodutivo com efeitos agravados para a segunda geração.

As fêmeas de camundongos da primeira geração, que cresceram submetidas à poluição ambiental, apresentaram menor número de filhotes nascidos vivos e maior índice de falha no processo de implantação (Mohallem et al., 2005). Porém, para a segunda geração de animais, além dos efeitos já descritos, observou-se redução significativa do peso ao nascer (cerca de 20%) associada a alterações placentárias (principalmente redução do espaço sanguíneo materno) e um aumento na incidência de perdas pós implantacionais, além de alterações relacionadas aos índices de fertilidade e gestacional, à ciclicidade estral e à reserva folicular de fêmeas nulíparas (Veras et al., 2008; 2009 e 2010).

Em humanos, o baixo peso do recém-nascido e a prematuridade são alguns dos efeitos da exposição gestacional à poluição do ar (Pereira et al., 1998; Lin et al., 2004; Pearce et al., 2012). Além do baixo peso, outros fatores foram associados à exposição, como chamaram a atenção Jedrychowski et al. (2004) ao encontrarem redução na altura e diâmetro da cabeça do neonato causadas pela exposição pré-natal à poluição do ar durante a gestação.

Diferentes estudos realizados na China (Wang et al, 1997), República Tcheca (Djemek et al, 1999) e Estados Unidos (Ritz e Yu, 1999; Rogers et al. (2000) apontam a alta concentração de SO₂ e de PM como os principais responsáveis pelo aumento de risco de baixo peso do recém-nascido. Em São Paulo, a exposição materna aos níveis ambientais de PM₁₀ e CO durante o primeiro trimestre da gestação está associada a uma redução do peso ao nascer (Gouveia et al, 2004). Em Sidney, na Austrália, Mannes et al.

(2005) calcularam que para $1\mu\text{g}/\text{m}^3$ de aumento na concentração média de material particulado é esperada uma redução de 4 g (95% CI: 3 a 6) no peso ao nascer.

Recentemente, nosso grupo demonstrou que há um menor número de células NK uterinas, macrófagos e mastócitos nos sítios implantacionais de camundongos expostos à poluição. Estas alterações nas populações celulares podem estar na base do aumento de falhas implantacionais e menor volume do sítio de implantação observados no mesmo estudo. A presença de quantidades adequadas destas células no início da gestação promove o ambiente imunológico necessário para o desenvolvimento da interação materno-fetal, inclusive estimulando a angiogênese dos vasos placentários (Scoriza-Cortes, 2012). Desta forma, as alterações placentárias observadas por Veras et al. (2008) associadas ao baixo peso ao nascer podem derivar de alterações precoces no sítio implantacional em camundongos.

A exposição à poluição ambiental também provoca alterações no desenvolvimento de órgãos e sistemas no feto. Mulheres expostas a altos níveis de CO durante o segundo mês de gestação apresentam um risco três vezes maior de gerar crianças com defeitos na septação ventricular e a exposição gestacional ao O_3 aumenta o risco para defeitos na aorta, nas artérias pulmonares e nas válvulas aórtica e pulmonares no recém-nascido (Ritz et al., 2002).

O peso ao nascer (resultante tanto de uma restrição uterina ao crescimento como do parto prematuro) é um importante indicador da

condição subsequente da saúde: bebês com baixo peso são mais susceptíveis a desenvolver na vida adulta hipertensão, doenças coronarianas, diabetes tipo 2, obesidade e doença renal crônica (Curhan et al., 1996; Barker, 1999; Osmond e Barker, 2000; Calkins & Devaskar, 2011).

Um exemplo desta afirmação é que o fato da mãe fumar durante a gestação e/ou no período perinatal parece ser mais importante para a função respiratória do filho do que o fato da mãe fumar após o primeiro ano de vida da criança. Esta conclusão sugere que o período intrauterino é crítico, afetando, de modo adverso, a função respiratória mais tardiamente na criança e contribuindo para o desenvolvimento da asma (Tager et al., 1993; Cunningham et al., 1994).

No que se refere ao desenvolvimento de órgãos e sistemas, Mauad et al. (2008) mostraram que pulmões de camundongos expostos à poluição da cidade de São Paulo durante o período embrionário apresentaram, aos 15 dias de vida, menor relação superfície/volume que permaneceu até a idade adulta do animal. Além disso, esta alteração associou-se a um pior desempenho funcional inspiratório e expiratório no animal adulto.

Ainda dentro do tema, nosso grupo mostrou que os corações de animais expostos à poluição de São Paulo durante o desenvolvimento embrionário apresentavam, na idade adulta, níveis maiores de peroxidação lipídica nos cardiomiócitos, indicando maior estresse oxidativo tecidual. Esta alteração bioquímica da membrana plasmática expressava-se morfológicamente pelo acúmulo de lisossomos secundários, caracterizados

como “corpos lamelares” e “figuras de mielina”, resultantes do processo de autofagia (Damaceno-Rodrigues et al., 2009).

1.4 Toxicidade dos metais no desenvolvimento embrionário

Entre os metais pesados encontrados no meio ambiente, o cádmio, o chumbo, o mercúrio, o arsênico, o vanádio e o plutônio são conhecidamente embriotóxicos e teratogênicos.

O chumbo, o mercúrio e o cádmio não existem naturalmente no organismo. Não desempenham funções nutricionais ou bioquímicas em microorganismos, plantas ou animais. Ou seja, a presença destes metais em organismos vivos é prejudicial em qualquer concentração.

O cádmio é um elemento de elevado potencial tóxico apresentando efeito cumulativo nos organismos, com meia vida da ordem de 10 anos. A placenta humana, assim como a placenta de roedores, é uma estrutura sensível à atividade tóxica do cádmio; o acúmulo desta substância altera tanto a sua estrutura quanto sua função (Wier et al., 1990). Durante a gestação o cádmio se acumula na placenta, o que significa que esta atua como uma barreira, porém não como uma barreira impermeável, de modo que o feto está exposto ao cádmio como mostrado em roedores, bovinos e em humanos (Korpela et al., 1986; Webster, 1988; Smith et al., 1991). A exposição ao cádmio pode provocar anencefalia, anoftalmia, afetar o desenvolvimento dos pulmões, estimular a produção de oócitos e embriões

com anomalias cromossômicas, diminuir a produção de HCG e inibir a transferência placentária de oxigênio e nutrientes para o feto (Levin et al., 1981; Bahttacharya et al., 1988).

Cerca de 50% do chumbo presente no ar é proveniente do petróleo (Järup, 2003). Em humanos, observou-se que a exposição ao chumbo durante a gestação provoca um aumento no risco de aborto, morte intrauterina e partos prematuros (Saric, 1984; Sallmen et al., 1992). O chumbo passa livremente através da placenta, resultando em níveis sanguíneos similares na mãe e no feto. Pesquisas mostraram que a exposição por longo período a baixos níveis de chumbo pode levar a uma diminuição da capacidade intelectual em crianças (WHO, 1995).

O mercúrio resultante da atividade industrial liberado no ambiente tem sido associado com mortalidade por doenças renais (Hodgson et al., 2007).

A falência renal aguda, proteinúria crônica e a hipertensão podem ser uma manifestação de agentes nefrotóxicos ambientais (Solhaug et al., 2004). Hodgson e colaboradores (2007) demonstraram que, em Runcorn, uma área com altos níveis de emissões industriais no Reino Unido, ocorre maior risco de mortalidade por doenças renais.

Sabe-se há muito tempo que os principais alvos dos metais pesados, notavelmente o cádmio, chumbo e o mercúrio, são o sistema nervoso central e os rins. Especificamente em relação aos rins, há evidências de que a nefrite tubulointersticial, em muitos casos, está associada à exposição ambiental ou ocupacional a altos níveis de metais. Sinais precoces da disfunção renal também são encontrados mesmo na exposição a baixos

níveis, como por exemplo, no caso do chumbo, que diminui a taxa de filtração glomerular e, no caso do cádmio, que aumenta a perda urinária de enzimas tubulares. Estes efeitos são frequentemente descritos em adultos, mas é certo que também ocorrem em crianças (de Burbure et al., 2006).

A nefrotoxicidade aguda ou crônica de muitos metais pode ser detectada através da dosagem de algumas proteínas ou enzimas específicas do sistema urinário refletindo a integridade dos glomérulos ou dos túbulos proximais. Alguns biomarcadores para acessar a nefrotoxicidade por metais são albumina, beta2-microglobulina, alfa1-microglobulina, RBP4 (retinol-binding protein) e glucosaminidase. Estes biomarcadores são utilizados rotineiramente em trabalhadores industriais e em áreas poluídas, como por exemplo, no Japão (de Burbure et al., 2003).

1.5 Estrutura e desenvolvimento renal

Os rins exercem uma série de funções, desde a filtração do sangue para manutenção da homeostase eletrolítica e a liberação de excretas pela urina (o que implica sua capacidade de reabsorver água, glicose, aminoácidos e outras pequenas moléculas), passando pela regulação da pressão arterial até a secreção de vários hormônios, inclusive a eritropoetina, e a ativação da vitamina D. As informações não referenciadas contidas neste item foram retiradas de Brenner (2004).

Os rins são órgãos pares em situação retroperitoneal, na parede posterior do abdome. A borda medial de cada rim contém o hilo, pelo qual passam a artéria e a veia renais, os vasos linfáticos, um plexo nervoso e a pelve renal (a porção dilatada do ureter que penetra no rim).

Em corte observam-se macroscopicamente duas regiões: a cortical, mais externa, e a medular, mais interna. No rim humano, a medula está dividida em 8 a 18 massas cônicas, chamadas pirâmides renais, cujas bases estão voltadas para o córtex e os ápices se estendem em direção à pelve, formando a papila renal.

Em cada papila abrem-se as porções terminais de 10 a 25 ductos coletores. A partir daí, a urina é despejada numa complexa rede de cavidades: os cálices renais menores, os cálices renais maiores e a pelve renal. Em ratos e camundongos o rim possui uma única pirâmide e, portanto, uma única papila, sendo chamado de rim unipapilar (Figura 1).

Figura 1 – À esquerda um esquema do rim humano e à direita uma imagem de tomografia computadorizada do rim de camundongo. Observar que o parênquima renal do camundongo também se divide em córtex e medula, embora não seja observada a segmentação da medula em várias pirâmides; ao contrário, a medula constitui uma única pirâmide cujo ápice desemboca em uma única papila (marcada com a estrela). Imagens adaptadas de <http://www.becomehealthynow.com> e Ontario Consortium for Small Animal Imaging, respectivamente.

O néfron é a unidade funcional do rim. Cada rim humano contém cerca de 1.000.000 de néfrons (variando de 400.000 a 1.200.000); no rim do rato o número varia de 20.000 a 40.000 enquanto que no camundongo a quantidade é muito menor, cerca de 11.000 néfrons no animal adulto.

O néfron é constituído pelo corpúsculo renal (contendo o glomérulo e a cápsula de Bowman), túbulo contorcido proximal, alça de Henle, túbulo contorcido distal; estes elementos se originam do blastema metanéfrico. Os ductos coletores principais e seus derivados não são considerados parte do néfron, por possuírem outra origem embrionária, a partir do broto ureteral. A rede vascular que acompanha o néfron é peculiar, pois o ramo arterial penetra no espaço da cápsula de Bowman, se capilariza (formando o glomérulo), se refaz como arteríola, levando o fluxo sanguíneo para fora da cápsula, para então se capilarizar novamente em direção à rede venosa (Figura 2).

Figura 2 – Diagrama ilustrativo de um néfron com corpúsculo renal, túbulos e vasos associados. Cada néfron é uma unidade tubular contínua, que conduz o filtrado glomerular em direção ao ducto coletor que recebe o filtrado de vários néfrons. Observar a rede capilar que forma o glomérulo e a rede capilar no entorno do sistema tubular do néfron, conhecida como *rete mirabilis*. Adaptado de 3DScience.com.

Os componentes do corpúsculo renal são: um tufo de capilares constituídos por células endoteliais e com lâmina basal; células mesangiais no interior do glomérulo; células da porção visceral da cápsula de Bowman (diferenciadas em podócitos) e lâmina basal associada; espaço de Bowman, e células da porção parietal da cápsula com a lâmina basal associada (Figura 3). Seu diâmetro é de cerca de 200µm no homem e 80µm no camundongo.

Figura 3 – Diagrama ilustrativo de um corpúsculo renal. O corpúsculo renal é o local onde ocorre a ultrafiltração do plasma. A arteriola eferente é mais estreita que a aferente, de modo que o sangue está sob pressão nos capilares glomerulares. O plasma é filtrado através das células endoteliais e da lâmina basal em direção do espaço de Bowman. Além destas estruturas relacionadas diretamente à produção da urina, o corpúsculo contém as células do aparelho justaglomerular que, estimuladas pela mácula densa, ativam o sistema renina-angiotensina-aldosterona, levando ao aumento da pressão arterial, o que, em última análise, controla a função renal. Adaptado de <http://www.vetmed.vt.edu/education>.

Os podócitos são células epiteliais cujos processos citoplasmáticos ricos em filamentos do citoesqueleto colocam-se ao redor dos capilares criando uma fina rede entrelaçada que cobre toda a superfície capilar e funciona como uma “peneira”. A lâmina basal dos podócitos funde-se à lâmina basal dos capilares glomerulares e o ultrafiltrado é o resultado da interação da pressão arterial e das propriedades seletivas da lâmina basal

que funciona como um microfiltro impedindo a filtração de proteínas maiores que 40 kdaltons, prevenindo a passagem de células sanguíneas e proteínas de alto peso molecular para o filtrado glomerular. As células mesangiais têm atividade fagocitária e removem do interstício algum material inadequadamente filtrado (Figura 4).

Figura 4 – Diagrama ilustrativo de parte de um corpúsculo renal a partir de sua aparência ao microscópio eletrônico, mostrando os podócitos com seus prolongamentos ao redor dos capilares fenestrados e as células fagocitárias mesangiais. Adaptado de <http://www.vetmed.vt.edu/education>.

No homem cerca de 120 litros de filtrado são produzidos por dia para pouco mais de um litro de urina. Isto dá uma idéia de quão grande é a taxa de reabsorção, definida como o movimento de substâncias a partir dos túbulos renais em direção aos capilares peritubulares da *rete mirabilis* que os circunda. São reabsorvidos cerca de 118 litros de água por dia. Uma vez que pequenas moléculas como íons e glicose atravessam a barreira de filtração, estas devem ser recuperadas evitando assim uma deficiência metabólica ou desequilíbrio iônico. No camundongo, de 0,5 a 1,0ml de urina

é produzido por dia, com uma concentração ainda maior que no homem e no rato.

Nefrogênese

Durante o desenvolvimento embrionário o blastema nefrogênico aparece a partir do mesoderma intermediário, localizado entre os somitos e mesoderma lateral (Figura 5).

Figura 5 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura obtida de um corte transversal de embrião de rato. O blastema nefrogênico surge a partir da massa mesodérmica intermediária, anteriormente aos somitos e lateralmente à notocorda que marca o eixo central do embrião.

As estruturas renais dos mamíferos aparecem em várias alturas do blastema nefrogênico adquirindo formas diferentes, em três etapas sucessivas (que repetem a filogênese), até se tornarem totalmente diferenciadas:

1) Pronéfron: Esse tipo de rim se origina na porção cefálica do blastema nefrogênico. No interior do mesoderma da região cefálica forma-se uma estrutura tubular que progride em direção caudal, dando origem um ducto contínuo ao longo de todo blastema nefrogênico, desembocando na cloaca. Os pronéfrons formam-se medialmente, ligam-se a este ducto,

porém não são funcionais e degeneram-se. No entanto, o ducto (denominado ducto pronéfrico na porção cranial e mesonéfrico, ou de Wolff, na sua porção média e caudal) permanece e será utilizado como ducto nas etapas sucessivas.

2) Mesonéfron: Origina-se a partir do blastema na região caudal ao pronéfron. Neste local, uma série de cordões celulares diferenciam-se e, ao adquirirem uma luz, passam a constituir túbulos irregulares e sinuosos (túbulos mesonéfricos) que estabelecem comunicação com o ducto mesonéfrico em uma extremidade. Na outra extremidade cada túbulo se invagina adquirindo o aspecto de cálice, em cuja concavidade forma-se um glomérulo a partir do mesênquima local. Este rim é funcional produzindo urina que é liberada no líquido amniótico. Os mesonéfrons degeneram, mas os túbulos e o ducto se diferenciam em estruturas do aparelho reprodutivo de machos (Figura 6).

Figura 6- Ilustração de um embrião de camundongo aos 10 dias de vida intrauterina em corte parasagital. Os pronéfrons aparecem em degeneração na porção cranial e os mesonéfrons aparecem ligados ao ducto mesonéfrico. Observar que na região caudal deste ducto está presente o broto ureteral que dará origem aos cálices e aos ductos coletores do rim definitivo dos mamíferos.

3) Metanéfron: É o rim definitivo nos répteis, aves e mamíferos. Constitui-se a partir de duas porções com origens embriológicas distintas. Da porção caudal do ducto mesonéfrico, mais precisamente do broto ureteral, originam-se ureter, bacinetes, cálices e ductos coletores, enquanto que os néfrons surgem a partir da porção caudal do blastema nefrogênico (conhecido como blastema metanéfrico). O broto ureteral e o mesênquima metanéfrico exercem efeitos indutivos recíprocos. Na extremidade do broto ureteral que fica em contato com o mesênquima ocorre a ramificação de cerca de 13 gerações de ductos: aqueles ductos resultantes das primeiras quatro gerações dilatam-se e dão origem à pélvis renal e aos cálices maiores; as duas gerações seguintes formam os cálices menores, e as outras gerações diferenciam-se em ductos coletores. Por sua vez, o blastema metanéfrico fragmenta-se, formando massas celulares que se localizam junto às extremidades dos ductos coletores e que irão originar os túbulos e os corpúsculos renais (Figura 7).

Figura 7- Ilustração da formação da pelve, cálices e ductos coletores a partir do broto ureteral. Adaptado de Physiology, 19: 339-347.

Inicialmente, cada massa de blastema diferencia-se em túbulos sinuosos que, em uma extremidade, passam a se comunicar com o ducto

coletor enquanto que, na outra extremidade, o túbulo se invagina-se levemente, assumindo a forma de um cálice em cuja concavidade diferenciam-se capilares sanguíneos, originando um glomérulo. A posterior diferenciação do cálice dará origem aos folhetos visceral e parietal da cápsula de Bowman. Por sua vez, por crescimento e diferenciação, o túbulo dará origem ao túbulo contorcido proximal, alça de Henle e túbulo contorcido distal (Figura 8).

Figura 8 – Esquemas ilustrativos da diferenciação dos túbulos e da cápsula de Bowman desde a fragmentação do mesênquima do blastema nefrogênico, a síntese da lâmina basal ao redor da massa celular, seu alongamento, até a formação do néfron. Notar que uma extremidade do néfron funde-se ao ducto coletor (DC), enquanto que a outra extremidade se diferencia em cápsula de Bowman. Adaptado de Development of the Mature Kidney (sprojects.mmi.mcgill.ca).

O desenvolvimento dos néfrons em humanos começa na quinta semana de gestação e se completa no útero em 36 semanas. Assim sendo, ao nascimento o número de néfrons já está completo (Hinchliffe et al., 1991; Bush et al., 2004). Em camundongos, a nefrogênese dos rins definitivos começa entre os 11 e 12 dias de vida intrauterina e se completa entre 7 a 10 dias após o nascimento (Speller & Moffat, 1977; Bush et al., 2004). Desta forma, em cortes histológicos do rim de camundongos a termo podem ser visualizados todos os estágios de desenvolvimento glomerular e tubular (Mugrauer & Ekblom, 1991; Dodge, 1997).

As observações principais sobre o desenvolvimento renal intrauterino foram feitas em cortes seriados de embriões isolados em estágios

sequenciais de desenvolvimento até o nascimento (aos 19 dias pós-concepção). Segundo Kaufman e Bard (1999), o desenvolvimento embrionário renal em camundongos obedece a seguinte cronologia:

- 8 dias pós-concepção: aparecem as primeiras placas do mesoderma intermediário juntamente com os primeiros somitos.
- De 8,5 a 9,5 dias pós-concepção: aparecimento do cordão de blastema nefrogênico, diferenciação dos pronéfrons, do ducto mesonéfrico que se abre na cloaca; início da diferenciação dos túbulos mesonéfricos.
- De 10 a 10,5 dias pós-concepção: os túbulos mesonéfricos são claramente visualizados; aparece o septo uroretal que irá separar, na cloca, os tratos urinário e gástrico.
- De 11 a 11,5 dias pós-concepção: primeiras evidências do desenvolvimento do rim metanéfrico, caudalmente aos túbulos mesonéfricos. O broto ureteral pode ser visto e começa a se ramificar em direção do blastema nefrogênico periférico, para formar a pelve renal, cálices e ductos coletores.
- De 12 a 13 dias pós-concepção: reconhece-se o futuro córtex renal do rim definitivo com a diferenciação dos primeiros néfrons ainda como acúmulos de células em formato sinuoso (formado de S) na extremidade dos ductos coletores em formação. Inicia-se o delineamento da medula renal. A pelve renal, os cálices e alguns ductos coletores já podem ser reconhecidos. Os mesonéfrons estão quase completamente degenerados.

- De 14 a 15 dias pós-concepção: néfrons em fase de maturação adiantada (já contendo os glomérulos) podem ser distinguidos na cortical. A cápsula renal se forma delimitando claramente o parênquima renal.
- De 16 a 17 dias pós-concepção: os túbulos contorcidos distais proximais e proximais são claramente reconhecíveis, assim como as cápsulas de Bowman e os glomérulos maduros.
- Aos 18 dias pós-concepção: ao lado de corpúsculos renais totalmente maduros há néfrons em estágios anteriores de desenvolvimento; as alças de Henle dos túbulos mais desenvolvidos estão no processo final de diferenciação.

1.6 Estereologia

A Estereologia é uma área do conhecimento que utiliza a aplicação da geometria probabilística em amostras sistemáticas e randômicas para fornecer um dado quantitativo, permitindo a análise de imagens e de corpos sólidos não apenas em duas dimensões (2D) - a partir do comprimento e largura -, mas também levando em conta a sua profundidade (3D) (Gundersen, 1988).

Os primeiros métodos utilizados para quantificar estruturas em cortes histológicos baseavam-se em avaliação semi-quantitativa nas quais as estruturas a serem avaliadas eram classificadas em categorias

representativas de sua frequência no tecido: ausente, pouco frequente, frequente e muito frequente. O pesquisador fazia uma “calibração de seus olhos” no início do estudo e as análises eram efetuadas por pelo menos dois observadores (Cowen, 1995). Os resultados eram difíceis de avaliar estatisticamente e de grande subjetividade. A necessidade de se produzir dados quantitativos confiáveis estimulou o desenvolvimento e o uso de métodos estereológicos nas ciências biológicas.

Estereologia é definida como: “Um conjunto de métodos matemáticos que obtém parâmetros tri-dimensionais a partir de medidas realizadas em imagens planas, bidimensionais, como aquelas obtidas em cortes histológicos preparados para a microscopia de luz e eletrônica” (Weibel, 1979).

A estereologia começa em 1847, quando o geólogo francês August Delesse formula o seguinte princípio: a densidade de volume dos componentes de uma rocha é igual à densidade de área destes componentes avaliadas em cortes representativos feitos ao acaso.

$$\frac{\text{Área do componente}}{\text{Área da rocha}} = \frac{\text{Volume do componente}}{\text{Volume da rocha}}$$

Ou seja: $A_A = V_V$

Na primeira metade do século 20 foram descritos vários princípios estereológicos fundamentais, por diferentes autores, independentemente. Na década de 60, a partir do Primeiro Congresso Internacional para Estereologia, com a formação da Sociedade Internacional de Estereologia, os princípios básicos foram se consolidando e sendo difundidos.

As medidas estereológicas só são válidas se as amostras do tecido forem representativas e obtidas randomicamente. Desse modo, pode-se obter resultados fidedignos se forem feitos cortes randômicos de estruturas que não se distribuem de maneira aleatória no tecido, ou num único corte se as estruturas apresentarem uma distribuição randômica (Gundersen et al., 1988).

Os procedimentos para uma investigação microscópica são essencialmente hierárquicos. Os blocos são feitos do material de estudo, secções ou cortes são feitos destes blocos, campos são examinados nestes cortes e finalmente as medidas são feitas nos campos (Figura 9).

Figura 9 - Desenho esquemático da amostragem em estereologia.

Para efetuar um estudo estereológico é necessário definir qual é a melhor ferramenta para detectar alterações na estrutura que se deseja estudar: número, volume, comprimento, área de superfície, tendo-se sempre em mente que é necessário um profundo conhecimento tanto do objeto de estudo quanto dos métodos à disposição.

Para obter informações sobre o número, o volume, o comprimento e a área de superfície das estruturas teciduais e celulares, empregam-se regras simples para as medidas dos perfis bidimensionais destas estruturas que aparecem nos preparados histológicos.

Sobre as imagens dos cortes sobrepõem-se sistemas-teste para a aquisição dos dados. Normalmente um sistema-teste tem área, número de pontos-teste e comprimento de linha-teste conhecidos e estes são usados em fórmulas para calcular diversos parâmetros, como por exemplo, densidades de volume (V_v), de comprimento (L_v , mm/mm³) e de superfície (S_v , mm²/mm³). É indispensável que seja determinado um compartimento de referência, pois as medidas são inicialmente obtidas como razões, densidades ou concentrações.

Quando se analisam razões corre-se sempre o risco de que aconteçam alterações nos dois componentes (objeto e compartimento de referência) e isso pode levar a conclusões equivocadas. Se há um aumento proporcional nas duas estruturas, a razão medida não se altera, dando a falsa impressão de que não houve mudanças. Por isso, o ideal é que se calculem sempre os valores absolutos sobre o objeto, pois isso fornece resultados fidedignos e indubitáveis, além de permitir a comparação entre os dados de diferentes grupos de estudo (Gundersen et al., 1988). Assim sendo, conhecer o volume absoluto do espaço de referência é um passo essencial para a aplicação dos métodos estereológicos.

Para a quantificação do volume absoluto de um objeto há vários métodos que podem ser aplicados em quantificação tecidual. Por exemplo,

pode-se seguir o princípio de Arquimedes, avaliando o deslocamento de líquido devido à imersão do objeto; outro método para cálculo do volume é dividir a massa do objeto pela sua densidade. Além desses, pode-se também usar a técnica proposta por Cavalieri, no século 17, que preconiza que o volume de qualquer objeto pode ser estimado cortando-se o objeto em fatias separadas por uma distância conhecida (espessura da fatia) e calculando-se a área da secção transversa de cada fatia; deste modo, o volume do objeto será dado pela soma das áreas de todas as fatias multiplicado pela sua espessura, o que equivale a somar o volume de cada fatia para estimativa do volume total.

Para avaliação do volume de objetos contidos em um volume de referência, como, por exemplo, volume de glândulas no útero, basta quantificar a densidade de volume das glândulas em cortes histológicos (segundo o princípio de Delesse) e multiplicá-la pelo volume absoluto do útero.

Para a avaliação do número de estruturas, classicamente usa-se o método do dissector físico (*physical disector*) publicado originalmente por Sterio (1984). Resumidamente o dissector é um sistema de amostragem tridimensional que avalia objetos proporcionalmente a seu número em um determinado volume conhecido sem levar em conta seu tamanho ou forma.

O método do dissector utiliza pares de secções paralelas e consecutivas separadas por uma distância conhecida, que é a espessura do dissector. Há regras para contagem de modo a evitar a superestimação: os perfis dos objetos são contados apenas em uma das secções (secção de

contagem) e somente podem ser contados perfis de estruturas que não estejam representadas na outra secção (secção de referência); além disso, duas das quatro linhas limitantes da área amostrada na secção de contagem são linhas de exclusão e perfis que cruzem estas linhas não podem ser contados (Figura 10).

Figura 10: Representação esquemática do dissecador que compreende duas secções paralelas separadas por um intervalo “h”. Os objetos em avaliação estão contidos, parcialmente, dentro do volume-teste definido pela área “A_T” multiplicada por “h”. Na figura, há sete objetos se relacionam com as secções e o volume do dissecador. A secção inferior é a de contagem e a superior é a secção de referência. Os objetos 2, 5 e 7 são contados porque estão presentes na secção de contagem e não aparecem na secção de referência. O objeto 1, embora obedeça esta regra, não pode ser contado porque seu perfil está na linha de exclusão. Os objetos 3 e 4 não podem ser contados porque aparecem nas duas secções. O objeto 6 não pode ser contado porque não aparece na secção de contagem.

Uma vez que o número de objetos está relacionado com o volume compreendido entre as duas secções paralelas e consecutivas, é possível estimar a densidade numérica destes objetos a partir da fórmula:

$$N_V = \sum Q / (A_T \times h \times n),$$

onde $\sum Q$ é a somatória de objetos contados, A_T é a área do campo de amostragem e “h” é a distância entre as secções paralelas e n é o número de dissecadores aplicados na amostra.

Uma vez obtida a densidade numérica, o número absoluto de objetos pode ser calculado pela multiplicação da densidade numérica (N_v) pelo volume absoluto do compartimento que contém os objetos.

1.7 Justificativa e Objetivos

Há evidências de que a exposição gestacional à poluição atmosférica associa-se ao baixo peso ao nascer, que por sua vez, associa-se à disfunção no desenvolvimento renal no embrião. Desta forma, parece interessante avaliar as consequências da exposição gestacional aos níveis ambientais de poluição em São Paulo sobre o desenvolvimento renal de camundongos, em um modelo experimental controlado. Além disso, levando-se em consideração que o ar atmosférico de São Paulo contém quantidades elevadas de metais e que estes têm propriedades nefrotóxicas, este trabalho pretende investigar a sua concentração nos fetos.

O objetivo geral do trabalho é estudar o efeito da poluição atmosférica sobre o desenvolvimento renal de camundongos expostos durante a gestação ao ar ambiente de São Paulo.

Os objetivos específicos são:

1- Nos rins dos camundongos gestados em câmaras de exposição com ar filtrado ou não filtrado, avaliar e comparar, ao nascimento:

- pesos animal e renal,
- volume renal absoluto,

- volume absoluto do córtex e da medula renais,
- densidade numérica de néfrons, e
- número de néfrons.

2- Avaliar a concentração de metais no feto.

MATERIAL E MÉTODOS

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido a partir de uma parceria entre o Laboratório Experimental de Poluição Atmosférica Experimental (LIM 05) e o Laboratório de Biologia Celular (LIM 59), tendo sido aprovado pela Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (CAPPesq), sob número 182/10.

2.1 Caracterização da exposição à poluição

A exposição dos animais foi realizada no jardim da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) em câmaras de exposição. A figura 11 ilustra a localização das câmaras no jardim da FMUSP que fica a 20 m da via de tráfego e a 150 m da intersecção da Rua Teodoro Sampaio com a Av. Dr. Arnaldo no centro de São Paulo onde há intenso tráfego de veículos automotores. Estimou-se que, à época do estudo, circulavam diariamente na avenida principal aproximadamente 84.000 carros, 10.000 veículos a diesel e 6.500 motocicletas; na rua lateral circulavam 25.000 carros, 5.200 veículos a diesel e 800 motocicletas (CETESB 2005). A poluição do ar neste local é caracterizada como veicular. Não há indústrias ou queima de biomassa na região. A 160 metros do local

das câmaras de exposição existe uma estação de monitoramento da CETESB que registra continuamente os níveis de NO_2 , CO e SO_2 .

Figura 11 – Diagrama esquemático do Campus da Faculdade de Medicina USP. CA: localização das câmaras de exposição no jardim do campus; CE: localização da estação de monitoramento da CETESB. Composição gráfica de Loris Calzolari.

Para a exposição dos animais foram usadas 2 câmaras cilíndricas montadas lado a lado (Figura 12). O ar entrava pela base do cilindro, sendo distribuído uniformemente a um fluxo de 50 l/seg e exaurido pelo topo por uma grande abertura. Esta câmara possuía um sistema normobárico e a pressão interna não excedeu 3 cm de H_2O . Uma das câmaras recebia ar ambiente (não filtrado) e outra ar filtrado através de três filtros sequenciais: o primeiro para as partículas grande, o segundo para partículas finas (Purafil, São Paulo, modelo TB e modelo JFL-90) e o último para adsorver substâncias químicas.

Nas câmaras, os animais foram mantidos sob as mesmas condições de temperatura e umidade relativa do ar, recebendo água e ração *ad libitum*.

Figura 12 – Representação esquemática das câmaras de exposição mostrando a circulação do ar e a disposição dos filtros. Adaptado a partir de composição gráfica de autoria do Prof. Dr. Paulo Silveira, Departamento de Patologia, FMUSP.

A concentração diária de $PM_{2.5}$ foi determinada gravimetricamente utilizando o impactador de Harvard (Air Diagnostics, Harrison, ME) com um fluxo de 10l/m^3 . Durante o experimento a concentração média de $PM_{2.5}$ na câmara recebendo ar não filtrado foi de $27,5\text{ }\mu\text{g.m}^{-3}$ ($CV = 44\%$) similar à concentração medida no ambiente externo, enquanto que a câmara recebendo ar filtrado apresentou uma redução de 71% deste valor ($6,5\text{ }\mu\text{g.m}^{-3}$, $CV = 49\%$, $p < 0,001$). Os valores ambientais médios aferidos pela CETESB de NO_2 (medido por quimioluminescência), CO (medido pelo analisador do gás filtrado) e SO_2 (medido por fluorescência pulsada) foram de $101\text{ }\mu\text{g.m}^{-3}$ ($CV = 43\%$), $1,81\text{ }\mu\text{g.m}^{-3}$ ($CV = 50\%$) e $7,66\text{ ppm}$ ($CV = 64\%$) respectivamente.

Amostras semanais dos filtros foram obtidas para medir a concentração do $PM_{2.5}$. A análise elementar do material particulado nos filtros foi realizada entre os meses de Agosto/2005 e Maio/2007 pelo método da fluorescência de raios-X por energia dispersiva (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise descritiva da composição elementar (em $\mu\text{g/g}$) nas amostras de $\text{PM}_{2,5}$ retido no filtro. O carbono (C) foi utilizado como parâmetro para o cálculo da composição relativa dos demais elementos.

<i>Elementos do $\text{PM}_{2,5}$</i>	Média (DP)	N
Massa	0,47 (0,03) mg	97
Al	5054 (668)	101
Ca	3271 (541)	102
Cu	238,6 (34,0)	102
Fe	3182 (620)	102
K	2720 (395)	102
Na	5540 (246)	91
Ni	40,68 (5,97)	102
P	1415 (184)	102
Pb	97,96 (23,8)	102
S	9837 (1021)	102
Si	3545 (406)	102
Ti	188,1 (42,6)	102
V	64,78 (9,06)	102
Zn	757,8 (110)	102
C	98,0 (0,30)	102

2.2 Grupos experimentais e obtenção do material

Neste estudo utilizamos camundongos Balb/c. A primeira geração (G1) foi obtida acasalando-se animais provenientes do Biotério Central da Faculdade da Medicina da Universidade de São Paulo.

Para obtenção dos rins fetais, foram criadas duas gerações de animais gestados e crescidos na câmara com ar filtrado ou na câmara com ar não filtrado (G1 e G2). Para obtenção dos fetos, foram acasalados 10 casais da segunda geração em cada câmara de exposição. Uma vez que o período gestacional em camundongos varia entre 19 e 21 dias, as fêmeas

foram eutanasiadas no 18º dia de gestação, para garantir a uniformidade da idade gestacional dos fetos (Figura 13).

Figura 13 – Representação esquemática do desenho experimental.

Para o presente estudo foram obtidos 27 fetos de mães diferentes, sendo 13 animais gestados na câmara com ar filtrado (que formaram o “grupo F”) e 14 fetos gestados na câmara com ar não filtrado (“grupo NF”).

Os fetos coletados (Figura 14) foram pesados e fixados inteiros em paraformaldeído 4% em PBS, para estudo histológico, ou congelados em tubos livres de metais, para análise dos elementos traço.

Figura 14 - Feto de camundongo com cordão umbilical e placenta aos 18 dias pós concepção.

Para a análise histológica, os fetos foram cuidadosamente dissecados com auxílio de uma lupa para obtenção dos rins. Para esta finalidade, foram designados 6 rins provenientes de animais do grupo F e 7 rins de animais do grupo NF (somente um rim de cada feto).

Para a determinação dos elementos traço foram utilizados 7 fetos congelados de cada grupo experimental (F e NF). Devido ao pequeno tamanho do rim, a quantidade de material não seria suficiente para a realização da técnica, por este motivo, os fetos inteiros foram processados para análise.

2.3 Processamento histológico do material

Os rins inteiros foram desidratados em gradiente alcoólico, diafanizados em xilol, emblocados em parafina e cortados em micrótomo (Leica RM2065), de modo a se obter cortes perpendiculares ao plano horizontal, definido como o maior eixo do órgão, gerando assim cortes verticais (Baddeley et al., 1986).

Foram obtidos cortes histológicos sequenciais de 4 µm de espessura até o esgotamento total do bloco. Os cortes foram distendidos em lâmina de vidro e corados pela hematoxilina eosina (HE), para o estudo histológico geral e avaliação quantitativa.

2.4 Análise estereológica de volume do rim e dos compartimentos renais

O volume renal e dos compartimentos (córtex e medula) foram estimados usando o método de Cavalieri e a quantificação das áreas teciduais nos cortes histológicos foi feita pelo método de contagem de pontos incidentes nas regiões de interesse.

O primeiro corte histológico a ser avaliado de cada rim foi selecionado randomicamente entre o 1º e o 10º corte e os seguintes a cada 100µm, ou seja foi avaliado um a cada 25 cortes. Desta forma, cada corte avaliado era representativo de 100 µm de espessura do tecido.

Destes cortes foram obtidas imagens digitais utilizando-se objetiva de 4X de modo a cobrir toda a extensão do rim. Para captura das imagens utilizou-se um microscópio Nikon acoplado a uma câmera de vídeo digital Nikon DXM1200F. As imagens foram transferidas para o programa Image J, do National Institute of Health (USA), que permitiu a sobreposição de um retículo de pontos sobre a imagem microscópica como demonstrado na Figura 15. Cada ponto estava associado a uma área de 100.000 µm².

Figura 15 - Ilustração do retículo de pontos sobreposto à imagem para avaliação dos volumes do rim e dos compartimentos renais (córtex e medula) pelo programa de análise de imagens *IMAGE J*. A área marcada em amarelo ilustra a área associada a cada ponto ($100.000 \mu\text{m}^2$).

Os pontos incidentes foram discriminados segundo sua incidência em “córtex”, “medula” ou “outras estruturas renais”, de modo que a soma dos pontos incidentes em cada categoria correspondeu ao total de pontos incidentes no rim como um todo (ΣP_{rim}):

$$\Sigma P_{\text{rim}} = \Sigma P_{\text{córtex}} + \Sigma P_{\text{medula}} + \Sigma P_{\text{outras}}$$

onde $\Sigma P_{\text{córtex}}$ e ΣP_{medula} e ΣP_{outras} , são a somatória de pontos incidentes nos compartimentos córtex ou medula ou outras estruturas, respectivamente.

O cálculo do volume renal total (V_{rim}) foi feito utilizando-se o princípio de Cavalieri de acordo com a seguinte equação:

$$V_{\text{rim}} = t \times a(p) \times \Sigma P_{\text{rim}}$$

onde t é a espessura de tecido representada por cada corte (no caso $100 \mu\text{m}$), $a(p)$ é a área associada a cada ponto ($100.000 \mu\text{m}^2$) e ΣP é a somatória de pontos incidentes no rim.

Os volumes de cada compartimento (V_{cortex} e V_{medula}) foram calculados de acordo com as seguintes equações:

$$V_{\text{cortex}} = (\Sigma P_{\text{cortex}} / \Sigma P_{\text{rim}}) \times V_{\text{rim}}$$

$$V_{\text{medula}} = (\Sigma P_{\text{medula}} / \Sigma P_{\text{rim}}) \times V_{\text{rim}}$$

onde ΣP_{cortex} e ΣP_{medula} correspondem à somatória de pontos incidentes no córtex ou medula e V_{rim} , corresponde ao volume total do rim.

2.5 Quantificação estereológica dos glomérulos renais

Com o objetivo de se realizar a avaliação da quantidade de glomérulos renais foi aplicada a técnica do dissector físico (Sterio, 1984). Para tanto, a cada 100 μm foi examinado um par de cortes histológicos separados por 16 μm . Os cortes de cada par foram fotomicrografados com a objetiva de 10X. Uma vez que o diâmetro médio do glomérulo é 90 μm , o intervalo de 16 μm entre as secções do dissector foi escolhido para garantir que nenhum glomérulo ficasse contido entre as secções sem possibilidade de ser representado.

As imagens de um mesmo par foram impressas e sobre cada imagem foi sobreposto um sistema teste constituído por um quadrado de área fixa e conhecida (*frame*, de 160.000 μm^2) delimitado por 4 linhas. As linhas limitantes superior e direita foram denominadas de linhas de inclusão e as linhas inferior e esquerda, linhas de exclusão. Foram contados os

glomérulos que não tocaram as linhas de exclusão e estavam presentes no plano de contagem, mas não plano de referência (Figura 16).

Figura 16 –Fotomicrografias de um disector utilizado para avaliação de numérica dos glomérulos. Trata-se um par de seções paralelas separadas por 16 µm. Em A está a secção de referência e em B a secção de contagem. A seta vermelha mostra um glomérulo que foi contado por aparecer somente na secção de contagem. As setas amarelas mostram glomérulo que não foram contados, pois aparecem em A e em B.

Em cada rim foram aplicados no mínimo 12 e no máximo 44 pares de disectores, segundo a dimensão do corte histológico.

Para se calcular a densidade numérica glomerular dividiu-se a quantidade de glomérulos contados em cada rim pelo volume total amostrado pela aplicação dos disectores no mesmo rim.

$$N_V \text{ glomérulos} = \frac{Q^-}{A_T \cdot h \cdot n}$$

onde, Q- é o número de glomérulos contados, AT é a área do sistema teste e t é a distância entre os cortes adjacentes e n é número de pares contatos em cada rim; desta forma, o denominador da equação corresponde ao volume amostrado por rim.

Para se estimar a quantidade total de glomérulos (N_T) multiplicou-se o valor da densidade numérica pelo volume total do rim.

$$N_T \text{ glomérulos} = N_V \text{ glomerular} \times V_{\text{rim}}$$

onde, N_V é a densidade glomerular e V_{rim} é o volume renal.

2.6 Análise dos elementos traço por espectrometria de massa

As análises foram realizadas no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob responsabilidade do Professor Doutor Fernando Barbosa Junior.

A espectrometria de massa é um método para identificar os diferentes átomos que compõem uma substância. Um espectrômetro de massa bombardeia a amostra com elétrons para produzir íons, ou átomos eletricamente carregados. Os íons atravessam um campo magnético que curva suas trajetórias de modo diferenciado, segundo sua massa. O campo separa os íons em um padrão chamado espectro de massa. A massa e a carga dos íons podem ser medidas por sua posição no espectro, sendo possível a identificação dos elementos presentes em uma amostra.

A espectrometria de massas com plasma acoplado (ICP-MS) é a técnica mais comum para detecção de elemento traço em amostras biológicas. Esta técnica permite a medida sequencial de múltiplos elementos com um limite de detecção muito baixo. A interpretação espectral é mais

simples que outras técnicas similares (Millos et al., 2008, Palmer et al., 2006).

Neste estudo, os fetos congelados e armazenados em tubos livres de metal foram analisados para detecção dos seguintes elementos traços: alumínio, antimônio, arsênio, bário, cádmio, cério, cobalto, chumbo, cobre, estrôncio, ferro, magnésio 24, manganês, selênio vanádio e zinco. Os resultados foram obtidos em partes por bilhão.

Após lavagem em acetona/água/acetona, os fetos foram secos em fluxo laminar e pesados. A seguir foram digeridos em ácido obtendo-se homogenatos para cada amostra.

Foram utilizados reagentes p.a. com exceção do ácido nítrico (HNO_3), que foi purificado em camadas de quartzo. As soluções foram preparadas em fluxo laminar. Água deionizada de alta pureza (resistividade 18.2 M Ω cm) obtida de um sistema de purificação Milli-Q classe 100 (ISO 5) (Millipore, Milli-Q RiOs®, Bedford, MA, USA) foi utilizada para preparo das soluções. A vidraria foi lavada por imersão em 10% (v/v) HNO_3 por 24 horas e enxaguada em cinco lavagens com água Milli-Q, depois secas em fluxo laminar classe 100 antes do uso. Todos os procedimentos eram desenvolvidos em bancada limpa e as soluções estocadas em frascos de polietileno de alta densidade. Utilizou-se hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) e L-cisteína Sigma (Sigma, St. Louis, MO, USA) as e soluções estoques contendo 1000mg de cada elemento traço foram compradas da Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA). Todas as medidas foram realizadas por

ICP-MS (Elan DRC II PerkinElmer, Norwalk, CT, USA) com argônio altamente purificado (99.999%, White Martins, Brasil).

O procedimento analítico propriamente dito iniciou-se com a adição de 1ml de solução de TMAH 25% (w/v) aos tubos contendo as amostras e o material foi incubado, à temperatura ambiente, por 12 horas. O volume de 10 ml da amostra com 0,5% (v/v) HNO₃, 0,01%(v/v) Triton®X100 e 10 µg L⁻¹ de ródio foi usado como padrão interno da amostra. Procedeu-se então a análise por ICP-MS segundo o método de Batista et al. (2009). A acurácia e precisão do método para determinação dos elementos traço nos fetos foram garantidas pela análise do material de referência (fígado bovino SmRM 1577b, músculo bovino em pó SRM 8414, ovo em pó SRM 8415, DOLT-3, DORM-3 e TORT-2). As amostras referência eram utilizadas antes e depois de uma sequência de 10 amostras.

2.7 Análises estatísticas

Todos os dados e análises estatísticas foram realizadas usando os aplicativos Microsoft Office Excel 2007, PAST (Palaeontological Statistics software package versão 1.81) e SigmaStat versão 3.11. As médias e desvios padrão foram calculados para cada grupo e variável avaliada.

Teste t pareado de Student foi utilizado para realizar as comparações dos valores de concentração de PM_{2,5} entre as câmaras.

O teste t de Student não pareado foi utilizado para realizar as comparações entre os grupos F e NF quando os dados obtidos apresentavam normalidade e homogeneidade das variâncias. Quando os dados se mostraram não normais ou não homogêneos foi aplicado o teste de Mann-Whitney para comparação entre os grupos.

Foi utilizado um nível de significância de 5%. Assim sendo, os testes que apresentaram nível descritivo menor que 5% ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significantes. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

RESULTADOS

3 RESULTADOS

3.1 Peso fetal e peso renal

A Tabela 2 mostra os dados obtidos para peso fetal e peso renal nos dois grupos de animais e o resultado da respectiva análise estatística pelo teste t de Student.

Tabela 2 – Média e desvio padrão do peso, em gramas, dos fetos e dos rins fetais expostos ao ar filtrado (F) ou ar não filtrado (NF).

	F (n=6)	NF (n=7)	p*
Peso fetal	0,85± 0,16	0,59±0,13	0,007
Peso renal	0,00243±0,00039	0,00166±0,00051	0,011

* Teste t de Student

Os Gráficos 1 e 2 ilustram estes resultados.

Gráfico 1 - Representação gráfica em box-plot dos pesos, em gramas, dos fetos expostos ao ar filtrado (F) ou ar não filtrado (NF).

* NF < F, p = 0,007

Gráfico 2 - Representação gráfica em box-plot dos pesos, em gramas, dos rins dos fetos expostos ao ar filtrado (F) ou ar não filtrado (NF).

* NF < F, $p = 0,011$

3.2 Análise morfológica qualitativa

Todos os rins foram examinados macroscopicamente e não foi detectada nenhuma anomalia congênita. Antes da realização das medidas estereológicas, os cortes histológicos foram analisados e, microscopicamente, os rins dos animais gestados no ar filtrado mostraram-se semelhantes aqueles dos animais gestados no ar ambiental de São Paulo.

Como esperado, aos 18 dias pós-concepção o rim do camundongo ainda não completou sua maturação, de modo que no mesmo corte histológico foi possível observar os diferentes estágios do desenvolvimento embrionário dos néfrons. A Figura 17 mostra fotomicrografias representativas de cortes histológicos de rins de fetos 18 dpc corados por hematoxilina-eosina.

17a- Pequeno aumento mostrando o córtex (C) e a medula (M) renais; no córtex estão os corpúsculos em diferentes estágios de maturação: a seta verde aponta um estágio inicial e a seta amarela aponta para um corpúsculo totalmente maduro.

17b- Estágio inicial de desenvolvimento do néfron, que aparece como um cordão celular de aspecto sinuoso (seta verde).

17c- Neste estágio o glomérulo já é identificado, embora não haja ainda a definição de seu pólo vascular; o espaço da cápsula de Bowman (seta amarela) começa a se delinear.

17d- Dois corpúsculos representantes do estágio seguinte de diferenciação; o glomérulo está revestido por uma camada contínua de células epiteliais cúbicas (folheto visceral da cápsula de Bowman); o espaço capsular encontra-se bem definido assim como o pólo vascular do glomérulo (seta verde).

17e- Numa etapa posterior, o tufo glomerular começa a se expandir revestido ainda por um estrato contínuo de células epiteliais. Nesta imagem nota-se o pólo vascular (seta verde) e o polo urinário (seta amarela).

17f – Final da diferenciação corpuscular (seta amarela) com maturação completa do glomérulo; notar a fragmentação de seu epitélio de revestimento, cujas células se diferenciam em podócitos. A seta verde aponta um corpúsculo do mesmo estágio mostrado em 17d.

3.3 Análise estereológica de volume do rim, córtex e medula

A Tabela 3 mostra o resultado obtido para as análises estereológicas dos volumes do rim, do córtex e da medula e o resultado da análise estatística pelo teste de Student. Os volumes tanto renal como dos compartimentos apresentaram-se menores no grupo NF em relação ao grupo F. Os dados estão ilustrados nos Gráficos 3, 4 e 5.

Tabela 3 – Média e desvio padrão dos volumes absolutos, em mm³, do rim, do córtex e da medula renais dos fetos expostos ao ar filtrado (F) ou não filtrado (NF).

	F (n=6)	NF (n=7)	p*
volume do rim	7,09±1,04	3,81±1,41	0,0007
volume do córtex	4,46±0,55	2,44±0,79	0,0003
volume da medula	2,35±0,43	1,24±0,61	0,0034

* Teste t de Student

Gráfico 3 - Representação gráfica em box-plot dos volumes dos rins dos fetos expostos ao ar filtrado (F) ou ar não filtrado (NF).

* NF < F, p = 0,0007

Gráfico 4 - Representação gráfica em box-plot dos volumes do córtex dos rins dos fetos expostos ao ar filtrado (F) ou ar não filtrado (NF).

* NF < F, $p = 0,0003$

Gráfico 5 - Representação gráfica em box-plot dos volumes da medula dos rins dos fetos expostos ao ar filtrado (F) ou não filtrado (NF).

* NF < F, $p = 0,0034$

Para avaliação da proporcionalidade, foi obtida a relação entre o volume renal e o peso dos animais. Os resultados mostraram que esta relação é estatisticamente menor para os fetos expostos ao ar ambiental quando comparada aos fetos expostos ao ar filtrado.. Os dados estão ilustrados na Tabela 4 e no Gráfico 6.

Tabela 4 – Média e desvio padrão da relação entre o volume renal e o peso dos fetos expostos ao ar filtrado (F) e ou não filtrado (NF).

	F (n=6)	NF (n=7)	p*
Volume renal / peso fetal (mm³)/mg)	8,49±1,42	6,41±1,79	0,0429

* Teste t de Student

Gráfico 6 - Representação gráfica em box-plot da relação entre os volumes renais e o peso do fetos expostos ao ar filtrado (F) ou não filtrado (NF) .

* NF < F, p = 0,0429

3.4 Densidade e número total de glomérulos no rim

Para avaliar a densidade dos néfrons por volume de tecido renal, a contagem dos glomérulos foi realizada pelo método do dissector físico, usando pares de cortes histológicos, corados pela hematoxilina-eosina.

A densidade glomerular mostrou-se estatisticamente semelhante entre os grupos os dados podem ser observados na Tabela 5 e no Gráfico 7.

Tabela 5 – Média e desvio padrão da densidade de glomérulos no rim dos fetos expostos ao ar filtrado (F) ou não filtrado (NF).

	F (n=6)	NF (n=7)	P*
Densidade de glomérulos no rim	1021,8±298,5	838,5±192,2	0,4452

* Teste Mann-Whitney

Gráfico 7 - Representação gráfica em box-plot da densidade de glomérulos no rim dos fetos expostos ao ar filtrado (F) ou não filtrado (NF).

O número de glomérulos nos rins fetais, calculado pela multiplicação de sua densidade pelo volume total do rim, foi menor para os fetos expostos ao ar não filtrado quando comparado aos fetos expostos ao ar filtrado. As médias e desvio-padrão obtidos são demonstrados na Tabela 6 e os dados estão ilustrados no Gráfico 8.

Tabela 6 – Média e desvio padrão do número de glomérulos no rim dos fetos expostos ao ar filtrado (F) ou não filtrado (NF).

	F (n=6)	NF (n=7)	p*
Número de glomérulos no rim	7199,5±2023,5	3301,0±1720,8	0,0082

* Teste Mann-Whitney

Gráfico 8 - Representação gráfica em box-plot do número de glomérulos no rim fetos expostos ao ar filtrado (F) e não filtrado (NF).

* NF < F, $p = 0,0082$

3.5 Análise da concentração de metais nos fetos

Nas análises realizadas nos fetos determinaram-se as concentrações de arsênio, bário, cádmio, cério, cobalto, chumbo, cobre, estrôncio, ferro, magnésio 24, manganês, selênio, vanádio e zinco.

Os dados mostraram que não foi possível detectar diferença estatística entre os grupos. A tabela 7 e os gráficos de 9 a 22 ilustram estes dados.

Tabela 7 – Média e desvio padrão (em partes por bilhão, ppb) da concentração de metais nos fetos expostos ao ar filtrado (F) ou não filtrado (NF)

	F	NF	p	Teste Estatístico
Arsênio (As)	5,429±0,72	4,904±0,37	0,1129	t de Student
Bário (Ba)	1,718±2,96	3,397±3,95	0,5135	Mann-Whitney
Cádmio	0,051±0,05	0,0506±0,55	0,9772	t de Student
Césio	13,0±2,4	13,8±1,3	0,4825	t de Student
Cobalto	11,37±3,48	14,61±7,78	0,3829	Mann-Whitney
Chumbo	0,3444±0,859	0,6061±1,05	0,9362	Mann-Whitney
Cobre	2172±511	2369±390	0,4347	t de Student
Estrôncio	97,7±66,3	96,4±82,2	0,9752	t de Student
Ferro	29839±10283	39352±19646	0,2785	t de Student
Magnésio 24	54816±32746	55051±41926	0,9908	t de Student
Manganês	13,04±7,91	16,16±15,71	0,6478	t de Student
Selênio	125,0±22,5	158,5±53,7	0,0973	Mann-Whitney
Vanádio	13,1±0,81	13,3±1,1	0,6183	t de Student
Zinco	17201±3377	19011±2505	0,2770	t de Student

Gráfico 9 - Concentração de arsênio em partes por bilhão (ppb) nos fetos dos grupos experimentais.

Gráfico 10 - Concentração de bário em partes por bilhão (ppb) nos fetos dos grupos experimentais.

Gráfico 11 - Concentração de cádmio em ppb (partes por bilhão) nos fetos dos grupos experimentais.

Gráfico 12 - Concentração de cério em ppb (partes por bilhão) nos fetos dos grupos experimentais.

Gráfico 13 - Concentração de cobalto em ppb (partes por bilhão) nos fetos dos grupos experimentais.

Gráfico 14 - Concentração de chumbo em ppb (partes por bilhão) nos fetos dos grupos experimentais.

Gráfico 15 - Concentração de cobre em ppb (partes por bilhão) nos fetos dos grupos experimentais.

Gráfico 16 - Concentração de estrôncio em ppb (partes por bilhão) nos fetos dos grupos experimentais.

Gráfico 17 - Concentração de ferro em ppb (partes por bilhão) nos fetos dos grupos experimentais.

Gráfico 18 - Concentração de magnésio 24 em ppb (partes por bilhão) nos fetos dos grupos experimentais.

Gráfico 19 - Concentração de manganês em ppb (partes por bilhão) nos fetos dos grupos experimentais.

Gráfico 20 - Concentração de selênio em ppb (partes por bilhão) nos fetos dos grupos experimentais.

Gráfico 21 - Concentração de vanádio em ppb (partes por bilhão) nos fetos dos grupos experimentais.

Gráfico 22 - Concentração de zinco em ppb (partes por bilhão) nos fetos dos grupos experimentais.

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

Brenner e Chertow (1994) foram os primeiros a postular que a restrição do crescimento uterino pode causar uma diminuição do número de nefrons, levando à hipertensão e função renal reduzida. Estudos epidemiológicos encontraram relação entre baixo peso ao nascer, com doenças na vida adulta (Barker, 2004 e 2008, Barker et al., 1989). A restrição de crescimento é cada vez mais proposta como um mecanismo na patogênese de doenças humanas como hipertensão, aterosclerose subclínica, eventos cardiovasculares não fatais, e mortes de causa cardiovascular (Hugson et al., 2006; Keller et al., 2003). A síndrome metabólica, doenças renais, osteoporose e algumas doenças mentais também têm sido relacionadas ao baixo peso ao nascer (Curhan et al., 1996; Hales & Ozanne, 2003; How et al., 1999; Lackland et al., 2000; Susser, et al., 1996).

Nosso estudo mostrou que o baixo peso ao nascer resultante da exposição gestacional ao ar ambiente da cidade de São Paulo está associado a menores volumes renais e menor quantidade de néfrons. Este é um resultado inédito e que tem grande importância para se compreender o conjunto de efeitos que a exposição à poluição provoca no organismo.

As condições do ambiente intra-uterino, nas quais o feto se desenvolve, exercem um papel importante na regulação dos diferentes sistemas fisiológicos na vida adulta. Alterações na disponibilidade intra-

uterina de nutrientes, oxigênio, hormônios, assim como a presença de substâncias tóxicas são fatores relevantes no que diz respeito a programação do desenvolvimento dos tecidos, que podem “compensar” um problema na vida intrauterina de maneira que o órgão formado não apresente-se completamente normal o que pode levar a disfunções na vida adulta (Fowden et al., 2006).

A partir da teoria da origem desenvolvimentista da saúde e doença, abriu-se um amplo campo para busca de alterações no desenvolvimento fetal que podem levar à prematuridade, baixo peso ao nascer e predispor o indivíduo ao surgimento de doenças crônicas na idade adulta (Hales & Ozanne, 2003; Barker 2008; von Bonsdorff et al., 2011; Sandboge et al., 2012). As observações iniciais dessa teoria foram feitas por Barker e seus colaboradores, que identificaram uma relação entre baixo peso ao nascer e o risco de desenvolver diabetes tipo II e doenças cardiovasculares na vida adulta (Barker et al., 1989; Barker, 1995). Estudos experimentais comprovam estas observações (Swanson et al., 2009; Velten et al. 2011).

O atual modelo proposto para explicar como a diminuição no número de néfrons se relaciona com os eventos adversos na idade adulta está representado na Figura 18.

Figura 18 - Mecanismo proposto para a programação fetal da hipertensão e doença renal.
Adaptado de Zandi-Nejad et al., 2006.

Hales e Barker et al. (1992) estabeleceram uma hipótese com base no mecanismo do fenótipo econômico, postulando que o desenvolvimento fetal é sensível ao ambiente, quando o ambiente é pobre em nutriente ocorre uma resposta adaptativa para priorizar o desenvolvimento dos órgãos vitais.

A hipótese de Barker postula que o número das estruturas no órgão e a função associada são programadas durante a vida embrionária e fetal, o que determina a regulação das respostas fisiológicas e metabólicas em adultos.

A programação fetal pode levar a mudanças no número ou distribuição de células diferenciadas e/ou mudanças na expressão gênica devidas a alterações epigenéticas (Bogdarina et al., 2007).

Sabe-se que a fase embrionária apresenta maior vulnerabilidade à ação dos poluentes. Em São Paulo a exposição materna a CO, material particulado e NO foi correlacionada ao baixo peso ao nascer tanto em humanos como em animais (Veras et al. 2008; Medeiros & Gouveia, 2005) e, o baixo peso, por sua vez, já foi associado à redução do número de néfrons

(Pearce et al., 2012, Hughson et al., 2006; Shreuder et al., 2005) e doença renal (Luyckx & Brenner, 2005). Muitos estudos epidemiológicos confirmam a associação entre os mecanismos de programação fetal e a progressão da doença renal (Puddu et al., 2009; Lackland, 2005). O déficit permanente de néfrons tem sido observado e associado com retardo do crescimento intra-uterino em humanos e animais (Merlet-Bénichou et al., 1999a).

Pesquisadores detectaram uma associação entre o peso ao nascer e o nível de creatinina no soro, sugerindo que indivíduos prematuros e de baixo peso ao nascimento apresentam maior risco de desenvolver falência renal progressiva (Keijzer-Veen et al., 2005). Brenner e Mackenzie (1997) sugeriram que o retardo no crescimento fetal resulta na redução do número de néfrons, o que está associado ao aumento na pressão hidrostática nos capilares glomerulares e hiperfiltração glomerular.

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a origem fetal de doenças renais. A redução do crescimento fetal do rim está associada a defeitos no desenvolvimento renal aumentando a vulnerabilidade a doenças (Ramírez-Vélez, 2012; Luyckx et al., 2009; Brenner & Mackenzie, 1997; Hinchliffe et al., 1992).

O fato de que a relação volume renal/peso do animal tenha sido significativamente menor nos fetos gestados na câmara que recebia o ar da cidade de São Paulo indica que estes animais tem menos tecido renal por grama de animal, o que pode não ter uma consequência imediata na vida do animal, mas pode sim predispor a doenças renais, fazendo com que o organismo responda com menos eficiência frente a um desafio fisiológico.

A princípio esta idéia pode parecer estranha, uma vez que a análise de situações clínicas de menor quantidade de néfrons (como por exemplo na doação de um rim) ou situações experimentais (como a nefrectomia parcial ou total unilateral) mostra que raramente estes procedimentos levam à hipertensão ou deterioração da função renal (Moritz et al., 2003). Porém, quando a redução do número de néfrons ocorre no útero, ou melhor dizendo, durante o período mais ativo da nefrogênese, o desfecho final parece ser diferente. Embora seja pouco comum em humanos, a agenesia renal unilateral aumenta o risco de redução na taxa de filtração glomerular e aumento de pressão arterial (De Santo et al., 1997). O mesmo acontece no modelo experimental com ovelhas que possuem tempo de gestação de 150 dias e a nefrogênese se completa aos 130 dias de gestação. Nestes animais a remoção de um rim aos 100 dias resulta em pressão arterial elevada na prole a partir dos 6 meses de vida (Moritz et al., 2002). Da mesma maneira, no rato a nefrogênese continua por cerca de 15 dias de vida pós-natal e a remoção de um de seus rins provoca hipertensão no animal adulto (Woods, 2000).

O presente estudo mostrou que há menor quantidade de néfrons nos rins dos fetos que se desenvolveram expostos ao ar ambiental de São Paulo, o que mostra que a exposição à poluição provoca uma anomalia no desenvolvimento embrionário. As provas funcionais nos animais adultos são necessárias para confirmar se, neste caso, esta anomalia pode aumentar o risco de doença no adulto, como em outros modelos (Moritz et al., 2003). Mauad et al. (2008) usando o mesmo modelo de exposição mostrou que o

desenvolvimento pulmonar era anômalo nos camundongos expostos à poluição e que os camundongos jovens apresentam disfunção respiratória compatível com os achados histopatológicos.

Um dos sistemas que se desenvolve dentro da programação do rim é sistema renina-angiotensina (SRA). Há evidências experimentais que o funcionamento eficiente deste sistema é essencial para o desenvolvimento normal do rim fetal, em particular para o controle da taxa de filtração glomerular (Lambers, 1995). A repressão da expressão gênica de qualquer do SRA leva a anomalias renais no desenvolvimento (Matsusaka et al., 2002). A diminuição do número de néfrons observada no presente estudo pode impactar também o sistema SRA, uma vez que as células do aparelho justaglomerular do corpúsculo renal produzem renina.

No rim humano não há adição de novos néfrons após o nascimento e o seu crescimento deve-se aumento em comprimento e diâmetro dos túbulos e glomérulos (MacDonald & Emery, 1959). O mesmo não acontece no caso do camundongo, de modo que um próximo passo a ser dado dentro deste tema seria realização do mesmo estudo em animais de 10 dias de idade crescidos expostos ao ar filtrado ou ar ambiental de São Paulo, além de mais dois grupos, os quais deverão passar o período pré-natal em uma das câmaras e o período pós-natal na outra câmara e vice-versa.

Nós observamos que o volume renal, cortical e medular são menores nos animais expostos a poluição o que pode estar relacionado a disfunção renal. Vehaskari et al. (2001) também encontraram menor volume do rim em animais com baixo peso ao nascer. As consequências clínicas destas

alterações foram investigadas em diferentes níveis e foram encontradas associações de baixo peso ao nascer e microalbuminúria e progressão mais rápida da disfunção renal em pacientes com doenças renais (Painter et al., 2005). O volume glomerular interfere na perda proteica e está associado ao número glomerular, que está associado ao baixo peso, isto evidencia que existe uma associação indireta entre baixo peso e proteinúria (Brenner et al., 1988).

Estudos estereológicos em humanos e animais durante o período gestacional mostraram que o desenvolvimento fetal é acompanhado por alterações na morfologia funcional da placenta (Jackson & Mayhew, 1992; Rutland et al., 2005). A gravidez em humanos pode ser complicada por fatores como pré-eclampsia, cigarro, anemia, diabetes mellitus e asma afetando o peso fetal e a morfologia da placenta (Teasdale, 1987; Mayhew et al., 1993; Reshetnikova, et al., 1995; Bush et al., 2000; Mayhew, et al., 2008), e estudos experimentais em ratos e camundongos mostraram que o peso fetal e a microestrutura placentária são influenciados por proteínas maternas e restrição de ferro (Lewis et al., 2001; Doherty et al., 2003). Foltin et al. (2011) demonstraram que contaminantes atravessam a barreira placentária.

Levando-se em consideração a evidência que a quantidade de carboxihemoglobina do sangue fetal, obtido de cordão umbilical humano no dia do parto, é diretamente proporcional aos níveis ambientais de monóxido de carbono (Pereira et al., 1988) é de se supor que a placenta tenha uma permeabilidade relativa que permite o contato do feto com substâncias que

são potencialmente tóxicas, incluindo os metais. O nosso estudo não foi capaz de mostrar diferenças nas concentrações teciduais de metais entre os grupos, porém a análise dos dados sugere que para alguns deles, o desvio padrão é muito elevado, de modo que é necessário repetir a análise da concentração de metais em uma amostra maior de animais.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

1. A poluição atmosférica da cidade de São Paulo foi capaz de promover o baixo fetal;

2. A exposição gestacional ao PM_{2.5} na cidade de São Paulo promoveu alterações no desenvolvimento renal de camundongos: menor volume renal e menor número de néfrons.

3. Não houve associação entre a concentração de metais nos fetos e as anomalias encontradas.

REFERÊNCIAS

6 REFERÊNCIAS

- Anderson JO, Thundiyil JG, Stolbach A. Clearing the air: a review of the effects of particulate matter air pollution on human health. *J Med Toxicol.* 2012; 8(2): 166-75.
- Andrade MI. Identificação das fontes de matéria particulado do aerossol atmosférico de São Paulo [Tese]. São Paulo: Instituto de Física da USP; 1993.
- Arbex MA, Saldiva PH, Pereira LA, Braga AL. Impact of outdoor biomass air pollution on hypertension hospital admissions. *J Epidemiol Community Health.* 2010; 64(7): 573-9.
- Baddeley AJ, Gundersen HJ, Cruz-Orive LM. Estimation of surface area from vertical sections. *J Microsc.* 1986; 142: 259-76.
- Bahttacharya MH, Whelton BD, Stern PH, Peterson DP. Cadmium accelerates bone loss in ovariectomized mice and fetal rat limb bones in culture. *Proc Nat Acad Sci (USA).* 1988; 85: 8761-65.
- Barker DJP. The fetal origins of type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern med.* 1999; 130: 322-24.
- Batalha JR, Saldiva PHN, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, Koutrakis P, Godleski JJ. Concentrated air particles induce vasoconstriction of small pulmonary arteries in rats. *Environ Health Perspect.* 2002; 115: 1192-7.
- Batista BL, Grotto D, Rodrigues JL, Souza VC, Barbosa F Jr. Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. *Anal Chim Acta.* 2009; 646(1-2): 23-9.
- Bobak M. Outdoor air pollution, low birth weight, and prematurity. *Environ Health Perspect.* 2000; 108: 173-6.
- Böhm GM, Saldiva PH, Pasqualucci CA, Massad E, Martins Mde E, Zin WA, Cardoso WV, Criado PM, Komatsuzaki M, Sakae RS, et al. Biological

- effects of air pollution in Sao Paulo and Cubatão. *Environ Res.* 1989; 49(2): 208-16.
- Braga AL, Saldiva PH, Pereira LA, Menezes JJ, Conceição GM, Lin CA, et al. Health effects of air pollution exposure on children and adolescent in São Paulo, Brazil. *Pediatr Pulmonol.* 2001; 31: 106-13.
- Brenner BM, Mackenzie HS. Nephron mass as a risk factor for progression of renal disease. *Kidney Int Suppl.* 1997; 63: S124-7.
- Brenner BM, Rector FC (eds). *The kidney*, 7th Ed., edited by W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2004.
- Brunekeerf B, Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet.* 2002; 360(9341): 1233-42.
- Bush KT, Stuart RO, Nigam SK. Development Biology of the kidney. In: Brenner BM, Rector FC (eds). *The kidney*, 7th Ed., edited by W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp 73–103. 2004.
- Calkins K, Devaskar SU. Fetal origins of adult disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2011; 41(6): 158-76.
- CETESB (São Paulo) 2005. – [Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB)]. Caracterização das Estações da Rede Automática de Monitoramento da Qualidade do Ar na RMSP- Estação Cerqueira César. Série Relatórios/Secretaria de Estado do Meio Ambiente, ISSN 0103-4103. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br>.
- CETESB (São Paulo) 2010. – [Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB)]. Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo 2010. <http://www.cetesb.sp.gov.br>.
- CETESB (São Paulo). 2012. Qualidade do ar no estado de São Paulo 2011. 120 p. (Série Relatórios / CETESB [Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental] ISSN 0103-4103). Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/ar/qualidade-do-ar/31-publicacoes-e-relatorios>.

- Colais P, Faustini A, Stafoggia M, Berti G, Bisanti L, Cadum E, Cernigliaro A, Mallone S, Pacelli B, Serinelli M, Simonato L, Vigotti MA, Forastiere F. Particulate Air Pollution and Hospital Admissions for Cardiac Diseases in Potentially Sensitive Subgroups. *Epidemiology*. 2012; 23(3): 473-81.
- Conceição GM, Miraglia SG, Kishi HS, Saldiva PH, Singer JM. Air pollution and child mortality: a time-series study in São Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect*. 2001; 109: 347-50.
- Correia-Deur JE, Claudio L, Imazawa AT, Eluf-Neto J. Variations in peak expiratory flow measurements associated to air pollution and allergic sensitization in children in Sao Paulo, Brazil. *Am J Ind Med*. 2012. [Epub ahead of print].
- Cowen, T. Quantification of nerves and neurotransmitters using image analysis. In: Wooton, R.; Springall, D.R.; Polak, J.M., ed. *Image analysis in histology: conventional and confocal microscopy*. Cambridge, Cambridge University Press, 1995.
- Cunningham J, Dockery DW, Speizer FE. Maternal smoking during pregnancy as a predictor of lung function in children. *Am J Epidemiol*. 1994; 139(12): 1139-52.
- Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Spiegelman D, Ascherio AL, Stampfer MJ. Birth weight and adult hypertension, diabetes mellitus, and obesity in US men. *Circulation* 1996; 94: 3246–50.
- Damaceno-Rodrigues NR, Veras MM, Negri EM, Zanchi AC, Rhoden CR, Saldiva PH, Dolhnikoff M, Caldini EG. Effect of pre- and postnatal exposure to urban air pollution on myocardial lipid peroxidation levels in adult mice. *Inhal Toxicol*. 2009; 21: 1129-37.
- de Burbure C, Buchet JP, Bernard A, Leroyer A, Nisse C, Haguenoer JM, Bergamaschi E, Mutti A. Biomarkers of renal effects in children and adults with low environmental exposure to heavy metals. *J Toxicol Environ Health*. 2003; 66(9): 783-98.

- de Burbure C, Buchet JP, Leroyer A, Nisse C, Haguenoer JM, Mutti A, Smerhovsky Z, Cikrt M, Trzcinka-Ochocka M, Razniewska G, Jakubowski M, Bernard A. Renal and neurologic effects of cadmium, lead, mercury, and arsenic in children: evidence of early effects and multiple interactions at environmental exposure levels. *Environ Health Perspect.* 2006; 114(4): 584-90.
- de Kok TM, Driece HAL, Hogervorst JG, Briede JJ. Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: a review of recent studies. *Mut Res.* 2006; 613: 103-22.
- Djemek J, Selevan SG, Benes I, Solanský I, Srám RJ. Fetal growth and maternal exposure to particulate matter during pregnancy. 1999. *Environ Health Perspect* 107:475–480.
- Dodge AH. Introduction: review of microscopic studies on the fetal and neonatal kidney. *Microsc Res Tech.* 1997; 39: 205–10.
- Freitas C, Bremner SA, Gouveia N, Pereira LA, Saldiva PH. Hospital admissions and mortality: association with air pollution in São Paulo, Brazil, (1993 to 2007). *Rev Saude Publica* 2004; 38: 751-7.
- Gouveia N, Bremner SA, Novaes HM. Association between ambient air pollution and birth weight in São Paulo, Brazil. *J Epidemiol Community Health* 2004; 58: 11–7.
- Gouveia N, Fletcher T. Respiratory diseases in children and outdoor air pollution in São Paulo, Brazil: a time series analysis. *Occup Environ Med* 2000; 57: 477-83.
- Gouveia N, Fletcher T. Time series analysis of air pollution and mortality: effects by cause, age and socioeconomic status. *J Epidemiol Community Health.* 2000. 54: 750-5.
- Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, West MJ. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 1988; 96(5): 379-94.

- Hinchliffe SA, Sargent PH, Howard CV, Chan YF, van Velzen D. Human intrauterine renal growth expressed in absolute number of glomeruli assessed by the disector method and Cavalieri principle. *Lab Invest.* 1991; 64(6): 777-84.
- Hodgson S, Nieuwenhuijsen MJ, Elliott P, Jarup L. Kidney disease mortality and environmental exposure to mercury. *Am. J. Epidemiol.* 2007; 165: 72-7.
- Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *British Med Bulletin.* 2003; 68: 167-82.
- Jasinski R, Pereira LA, Braga AL. Air pollution and pediatric hospital admissions due to respiratory diseases in Cubatão, São Paulo State, Brazil, from 1997 to 2004. *Cad Saude Publica.* 2011; 27(11): 2242-52.
- Jedrychowski W, Bendkowskal, Flak E, Penar A, Jacel R, Kaim I. Estimated risk for altered fetal growth resulting from exposure to fine particles during pregnancy: an epidemiologic prospective cohort study in Poland. *Environ Health Perspect.* 2004; 112: 1398-402.
- Korpela H, Loueniva R, Yrjanheikki E, Kauppila A. Lead and cadmium concentrations in maternal and umbilical cord blood, amniotic fluid, placenta, and amniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1986; 155: 1086-9.
- Lemos M, Lichtenfels AJ, Amaro Junior E, Macchione M, Martins MA, King M, Böhm GM, Saldiva PH. Quantitative pathology of nasal passages in rats exposed to urban levels of air pollution. *Environ Res.* 1994; 66: 87-95.
- Lepeule J, Laden F, Dockery D, Schwartz J. Chronic exposure to fine particles and mortality: an extended follow-up of the Harvard Six Cities study from 1974 to 2009. *Environ Health Perspect.* 2012; 120(7): 965-70.
- Levin B, Kline J, Stein Z, Susser M, Warburton D. Epidemiologic detection of low dose effects on the developing fetus. *Environ Health Perspect.* 1981; 42: 119-26.

- Lin CA, Amador Pereira LA, de Souza Conceicao GM, Kishi HS, Milani R Jr, Ferreira Braga AL, Nascimento Saldiva PH. Association between air pollution and ischemic cardiovascular emergency room visits. *Environ Res.* 2003; 92: 57-63.
- Lin CA, Martins MA, Farhat SC, Pope CA, Conceicao GM, Anastacio VM, Hatanaka M, Andrade WC, Hamaue WR, Böhm GM, Saldiva PH. Air pollution and respiratory illness of children in Sao Paulo, Brazil. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 1999; 13: 475-88.
- Macchione M, Oliveira AP, Gallafrio CT, Muchao FP, Obara MT, Guimaraes ET, Artaxo P, King M, Lorenzi-Filho G, Junqueira VC, Saldiva PH. Acute effects of inhalable particles on the frog palate mucociliary epithelium. *Environ Health Perspect.* 1999; 107: 829-33.
- Mannes T, Jalaludin B, Morgan G, Lincoln D, Sheppard V, Corbett S. Impact of ambient air pollution on birth weight in Sydney, Australia. *Occup Environ Med.* 2005; 62: 524-30.
- Mauad T, Rivero DH, de Oliveira RC, Lichtenfels AJ, Guimarães ET, de Andre PA, Kasahara DI, Bueno HM, Saldiva PH. Chronic exposure to ambient levels of urban particles affects mouse lung development. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 178(7): 721-8.
- Millos J, Costas-Rodríguez M, Lavilla I, Bendicho C. Multielemental determination in breast cancerous and non-cancerous biopsies by inductively coupled plasma-mass spectrometry following small volume microwave-assisted digestion. *Anal Chim Acta.* 2008; 622(1-2): 77-84.
- Miraglia SGE. Análise do impacto do consumo de diferentes combustíveis na incidência de mortalidade por doenças respiratórias no município de São Paulo. [Dissertação]. São Paulo: Escola Politécnica-USP; 1997.
- Mohallem SV, de Araujo Lobo DJ, Pesquero CR, Assuncao JV, de Andre PA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of Sao Paulo. *Environ Res.* 2005; 98: 196–202.

- Mugrauer G, Ekblom P. Contrasting expression patterns of three members of the myc proto-oncogene family in the developing and adult kidney. *J Cell Biol.* 1991; 112: 13–25.
- Novaes P, Saldiva PH, Matsuda M, Macchione M, Rangel MP, Kara-José N, Berra A. The effects of chronic exposure to traffic derived air pollution on the ocular surface. *Environ Res.* 2010; 110(4): 372-4.
- Olmo NRS, Saldiva PHN, Braga ALF, Lin CA, Santos UP, Pereira LAA. A review of low-level air pollution and adverse effects on human health: implications for epidemiological studies and public policy. *Clinics (São Paulo)* 2011; 66(4): 681-90.
- Osmond C, Barker DJ. Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ Health Perspect.* 2000; 108 Suppl 3: 545-53.
- Palmer CD, Lewis ME, Geraghty CM, Barbosa F, Parsons PJ. Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: A comparison between inductively coupled plasma-mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B.* 2006; 61: 980-90.
- Pearce MS, Glinianaia SV, Ghosh R, Rankin J, Rushton S, Charlton M, Parker L, Pless-Mulloli T. Particulate matter exposure during pregnancy is associated with birth weight, but not gestational age, 1962-1992: a cohort study. *Environmental Health* 2012; 9: 11-13.
- Pereira LA, Loomis D, Conceição GM, Braga AL, Arcas RM, Kishi HS, Singer JM, Böhm GM, Saldiva PH. Association between air pollution and intrauterine mortality in São Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect.* 1998 Jun;106(6): 325-9.
- Ribeiro H, Cardoso MR. Air pollution and children's health in Sao Paulo (1986-1988). *Soc Sci Med.* 2003; 57: 2013-22.

- Ritz B, & Yu F. The effect of ambient carbon monoxide on low birth weight among children born in Southern California between 1989 and 1993. *Environ Health Perspect.* 1999; 107: 17-25.
- Ritz B, Fruin S, Chapa G, Shaw GM, Harris JA. Ambient air pollution and risk of birth defects in Southern California. *Am J Epidemiol.* 2002; 155: 17-25.
- Rogers JF, Thompson SJ, Addy CL, McKeown RE, Cowen DJ, Decouflé P. Association of very low birth weight with exposures to environmental sulfur dioxide and total suspended particules. *Am J Epidemiol.* 2000; 151: 602-13.
- Rogers LK, Velten M. Maternal inflammation, growth retardation, and preterm birth: insights into adult cardiovascular disease. *Life Sci.* 2011; 89(13-14): 417-21.
- Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, Diaz E, Suh H, Tsuda A, Godleski JJ. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165: 1607-10.
- Saldiva PHN, Lichtenfels AJFC, Paiva PSP, Barone IA, Martins MA, Massad E, Pereira JCR, Xavier V P, Singer JM, Böhm GM. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo- Brazil. *Environ. Res.* 1994; 65: 218-25.
- Saldiva PHN, Pope CA, Schwartz J, Dockery DW, Lichtenfels AJFC, Salge JM, Barone IA, Böhm GM. Air pollution and mortality in elderly people: a time series study in São Paulo, Brazil. *Arch. Environ. Health.* 1995; 50: 159-63.
- Saldiva PHN. Air pollution in urban areas: the role of automotive emissions as a public health problem. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998; 2:868.
- Sallmen M, Lindbolum ML, Anttila A, Taskinen H, Hemminki K. Paternal lead exposure and congenital malformations. *J Epidemiol Community Health.* 1992; 46: 519-22.

- Sandboge S, Moltchanova E, Blomstedt PA, Salonen MK, Kajantie E, Osmond C, Barker DJ, Eriksson JG. Birth-weight and resting metabolic rate in adulthood - sex-specific differences. *Ann Med*. 2012; 44(3): 296-303.
- Sarić M. Reproduction and exposure to lead. *Ann Acad Med Singapore* 1984; 13: 383-8.
- Scoriza-Cortes, J N. Impacto da exposição pré-gestacional à poluição atmosférica sobre o processo da implantação embrionária. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2009.
- Sih T. Correlation between respiratory alteration and respiratory disease due to urban pollution. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1999; 49: 261-7.
- Smith AB, Jones MM, Sigh PK, James SG, Gale GR, Atkins LM, Smith AB. Structure-activity relationships for in vivo cadmium mobilization by dithiocarbamates derived from lactose and maltotriose. *Chemical Res Toxicol*. 1991; 4: 692-8.
- Solhaug MJ, Bolger PM, Jose PA. The developing kidney and environmental toxins. *Pediatrics*. 2004; 113: 1084-91.
- Souza MB, Saldiva PHN, Pope CA, Capelozzi VL. Respiratory changes due to long term exposure to urban levels of air pollution: a histopathologic study in humans. *Chest* 1998; 113:1312-8.
- Speller AM, Moffat DB. Tubulo-vascular relationships in the developing kidney. *J Anat*. 1977; 123: 487–500.
- Squadrito GL, Cueto R, Dellinger B, Pryor WA. Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter. *Free Radic Biol Med*. 2001; 31: 1132-8.
- Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc*. 1984; 134: 127-36.
- Stone V. Environmental air pollution. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162: 44-7.

- Tager IB, Hanrahan JP, Tosteson TD, Castile RG, Brown RW, Weiss ST, Speizer FE. Lung function, pre- and post-natal smoke exposure, and wheezing in the first year of life. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 147:811-7.
- Torricelli AA, Novaes P, Matsuda M, Alves MR, Monteiro ML. Ocular surface adverse effects of ambient levels of air pollution. *Arq Bras Oftalmol*. 2011; 74(5): 377-81.
- Veras MM, Caldini EG, Dolhnikoff M, Saldiva PH. Air pollution and effects on reproductive-system functions globally with particular emphasis on the Brazilian population. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2010 Jan;13(1):1-15.
- Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Maciel Ribeiro AA, Mayhew TM, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. *Biol Reprod*. 2008; 79: 578-84.
- Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Guimarães Silva RM, Scoriza JN, Saldiva PH, Caldini EG, Dolhnikoff M. Chronic exposure to fine particulate matter emitted by traffic affects reproductive and fetal outcomes in mice. *Environ Res*. 2009; 109: 536-43.
- Vidotto JP, Pereira LA, Braga AL, Silva CA, Sallum AM, Campos LM, Martins LC, Farhat SC. Atmospheric pollution: influence on hospital admissions in paediatric rheumatic diseases. *Lupus*. 2012; 21(5): 526-33.
- Vinitketkumnien U, Kalayanamitra K, Chewonarin T, Kamens R. Particulate matter, PM 10 and PM 2.5 levels, and airborne mutagenicity in Chiang Mai, Thailand. *Mutat Res*. 2002; 519: 121-31.
- Wang X, Ding H, Ryan L, Xu X. Association between air pollution and low birth weight: a community-bases study. *Environ Health Perspect*. 1997; 105: 514-20.
- Webster WS. Chronic cadmium exposure during pregnancy in the mouse influence of exposure levels on fetal and maternal uptake. *J Toxicol Environ Health* 1988; 24: 183-92.

Weibel, E.R. Stereological methods: Practical methods for biological morphometry. London, Academic Press; 1979.

Wier PJ, Miller RK, Maulik D. Toxicity of cadmium in the human perfused placenta. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1990; 105: 156-71.

Wilhelm M, Ghosh JK, Su J, Cockburn M, Jerrett M, Ritz B. Traffic-related air toxics and term low birth weight in Los Angeles County, California. *Environ Health Perspect.* 2012; 120(1): 132-8.

World Health Organization (WHO): Better Health, Better Lives: Research Priorities. Report on a WHO Working Group Bonn, England; 1995. (http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0018/174411/e96676.pdf).

Yoshizaki K, Brito JM, Toledo AC, Nakagawa NK, Piccin VS, Junqueira MS, Negri EM, Carvalho AL, Oliveira AP, Lima WT, Saldiva PH, Mauad T, Macchione M. Subchronic effects of nasally instilled diesel exhaust particulates on the nasal and airway epithelia in mice. *Inhal Toxicol.* 2010; 22(7): 610-7.