

Ana Julia de Faria Coimbra Lichtenfels

**Associação entre os níveis ambientais de poluição
atmosférica e mudanças na razão sexual na
cidade de São Paulo: uma abordagem
epidemiológica e experimental**

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

Área de concentração: Fisiopatologia
Experimental
Orientador: Prof. Dr. Paulo Hilário
Nascimento Saldiva

**São Paulo
2006**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lichtenfels, Ana Julia de Faria Coimbra

Associação entre os níveis ambientais de poluição atmosférica e mudanças na razão sexual na cidade de São Paulo : uma abordagem epidemiológica e experimental / Ana Julia de Faria Coimbra Lichtenfels. -- São Paulo, 2006.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Paulo Hilário Nascimento Saldiva.

Descritores: 1.Poluição ambiental 2.Razão de masculinidade 3.Estudos epidemiológicos 4.Modelos animais 5.Camundongos

USP/FM/DBD-245/06

Dedico esta Tese

Primeiramente á Deus, meu Esteio.

A minha maior Benção, meu filho, Luís Guilherme, fonte inesgotável de alegria.

Meu amor por ele me enriquece a cada dia.

*Ao meu Pai, meu maior exemplo de retidão. Seus princípios norteiam a minha
existência.*

*A minha Mãe, que com o seu inestimável zelo, sempre me apóia nos momentos
certos.*

*E por fim, aos meus queridos irmãos e sobrinhos que com seu amor e apoio,
completam a minha caminhada.*

Agradecimentos

Ao meu estimado Orientador, Prof. Dr. Paulo Saldiva. Há 17 anos trabalhando com ele, hoje sei que ser pesquisador é muito mais do que desenvolver um protocolo científico e obter conclusões. Fazer pesquisa, envolve sensibilidade, paixão e extrema dedicação.

À Profa. Simone El khouri Miraglia e ao Eng. Joabner Breda Gomes pelas participação fundamental no desenvolvimento do estudo epidemiológico.

A Sandra Regina de Castro Soares e ao Ruy Camargo Pires Neto, pelo inestimável auxílio no transcorrer deste trabalho. Do início ao final, estiveram sempre presentes.

Ao Dr. Jorge Hallak pela possibilidade de ingresso ao inexplorado “mundo” da Reprodução Humana e pela disponibilidade do laboratório para a realização das análises seminais.

À Geneticista Patrícia Campos Pieri, pela extrema competência e dedicação empenhadas na escrita do trabalho submetido à publicação.

À biomédica Aline Presto Braga pela dedicação e presteza na realização das análises seminais.

Ao David Francisco e Carlos Eduardo pelo grande apoio dado ao cuidado e manutenção dos animais durante o transcorrer deste trabalho.

Às técnicas de histologia do Departamento de Patologia da FMUSP pela confecção das lâminas utilizadas neste trabalho.

À Dolores Helena, Mariângela e Dra. Lúcia Garcia pela carinhosa correção da Tese.

Às queridas Amigas e Companheiras de Laboratório: Adriana, Beatriz, Débora-Jã, Dolores Helena, Eliane Gazetto, Eliane Tigre, Mariângela, Heloísa e Rê, pelos momentos agradáveis e pelo auxílio mútuo, sempre presente entre nós.

A Márcia, Dalva e Emília, sempre presentes para ajudar nas “pequenas” dificuldades.

A Dona Severina (“baixinha querida”) e “Nildinho”, pelo eterno carinho.

A Ana Luíza e ao Reginaldo pelo pronto atendimento em relação aos registros fotográficos.

À Marilí, Lenira e Júlio do Departamento de Patologia da FMUSP.

Ao Departamento de Fisiopatologia, em especial a Sônia e Tânia, pela paciência em solucionar as pendências administrativas do curso de Pós-graduação.

À Fundação Faculdade de Medicina pelos recursos financeiros destinados a este trabalho.

Abstract

Some studies have observed abnormal sex ratios in industrial polluted areas but a direct association between urban levels of air pollutant and sex ratio at birth has not hitherto reported. To examine whether this relationship held true, we evaluated how ambient air pollution interferes on female/male ratio in human and mice models. The effect of air pollution was addressed by determining SSR (secondary sex ratio) across pollution gradients in the city of São Paulo, using inhalable particles (PM10) as a proxy variable for overall pollution levels. To provide biological plausibility to the foregoing epidemiological observation, we designed an experimental study exposing mice in controlled chamber conditions. Results disclosed a significant negative between SSR and PM10, within a relatively narrow range of PM10 levels (31 to 61 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). In the least polluted area the sex ratio was 51.7% (106.8) for 34,795 births recorded, and for the most polluted area the proportion decreased to 50.7 % (102.9) for 48,023 births recorded, indicating a difference of 1% in total male births. This result corresponds to a 1,180 unborn male offspring in the highest polluted areas. The group of male Swiss mice housed 10 days after birth in open top chambers exposed to air pollution, where they mate mature and non-exposed virgin female mice, produced an offspring with a 0.86 male/female ratio. The offspring of the group of mice concurrently raised in similar but filtered open top chamber was significantly ($p < 0.042$) higher (1.34). A remarkable result was the testicular histological morphometry with a significant ($p < 0.020$) reduction in the number of elongated spermatids and total cells ($p < 0.032$) of exposed males. In association, a decrease in sperm concentration in

the caudal portion of the epididymus was also found in the exposed mice ($46,95 \times 10^6$ /ml) compared to the non-exposed ($54,60 \times 10^6$ /ml). In conclusion the findings in our study support the concept that ambient air pollution may interfere with sex distribution of exposed populations.

Resumo

Prévios estudos têm demonstrado alterações nas taxas normais de razão sexual. No entanto, uma associação direta entre níveis ambientais de poluição e razão sexual, não tem sido ainda claramente demonstrada. A fim de investigarmos esta associação, desenvolvemos duas abordagens: uma epidemiológica e outra experimental. O efeito da poluição sobre a população da cidade de São Paulo foi verificado através da associação entre a razão sexual e gradientes de concentração de material particulado (PM10). A fim de conferir plausibilidade biológica aos achados epidemiológicos, camundongos machos com 10 dias de vida, foram expostos em câmaras do tipo Topo Aberto, sob condições de exposição mais controladas. Uma associação negativa e significativa foi observada entre razão sexual e PM10, dentro de uma faixa estreita de concentração de PM10 (31 a 61 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Na região menos poluída, a razão sexual foi de 51,7% (106,8) para 34.795 nascimentos registrados, enquanto que para a mais poluída, a proporção decresceu para 50,7% (102,9) para 48.023 nascimentos registrados, com uma redução de 1% no número total de nascimentos masculinos. O grupo de camundongos da linhagem Swiss, acasalados com fêmeas virgens, maduras e não expostas, produziu uma prole com alterações significativas ($p < 0,041$) na razão sexual (0,86) quando comparado com o grupo controle (1,34). Análises morfométricas dos testículos demonstraram alterações significativas no perfil da linhagem germinativa, com reduções no número das espermátides alongadas ($p < 0,020$) e no número total de células ($p < 0,032$). Um decréscimo na concentração dos espermatozóides ($46,95 \times 10^6$ /ml) também foi observado nos

animais expostos à poluição quando comparado ao grupo controle ($54,60 \times 10^6$ /ml). A partir dos nossos resultados podemos concluir que a poluição pode interferir com a distribuição do sexo nas populações expostas aos níveis ambientais de poluição.

Sumário

Summary

Resumo

<i>1 INTRODUÇÃO</i>	<i>01</i>
<i>1.1 Considerações Iniciais</i>	<i>02</i>
<i>1.2 Reprodução e Meio Ambiente</i>	<i>05</i>
<i>1.3 Efeitos da Poluição Atmosférica sobre o Aparelho Reprodutivo</i>	<i>07</i>
<i>1.4 Razão Sexual</i>	<i>14</i>
<i>1.5 Mecanismos Responsáveis pela Alteração da Razão Sexual</i>	<i>19</i>
<i>2 OBJETIVOS</i>	<i>23</i>
<i>3 MATERIAIS E MÉTODOS</i>	<i>25</i>
<i>3.1 Abordagem Epidemiológica</i>	<i>26</i>
<i>3.1.1 Análise Estatística</i>	<i>31</i>
<i>3.2 Estudo Experimental</i>	<i>31</i>
<i>3.2.1 Desenho Experimental</i>	<i>31</i>
<i>3.2.2 Caracterização da Exposição</i>	<i>35</i>
<i>3.2.3 Avaliação da Toxicidade Reprodutiva</i>	<i>35</i>
<i>3.2.4 Análise Estatística</i>	<i>41</i>
<i>4. RESULTADOS</i>	<i>43</i>
<i>4.1 Estudo Epidemiológico</i>	<i>44</i>
<i>4.2 Estudo Experimental</i>	<i>49</i>
<i>4.2.1 Monitoramento das Câmaras de Exposição</i>	<i>49</i>

<i>4.2.2 Exposição Animal</i>	<i>54</i>
<i>4.2.3 Parâmetros</i>	<i>57</i>
<i>5. DISCUSSÃO</i>	<i>65</i>
<i>6 CONCLUSÕES</i>	<i>86</i>
<i>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	<i>89</i>

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Considerações Iniciais

A partir da Revolução Industrial, em meados de 1850, o processo de contaminação ambiental vem ocorrendo em um ritmo crescente. A extração de energia a partir de combustíveis fósseis bem como a queima de matéria vegetal (biomassa), remonta séculos e contribui até hoje para a geração de poluição ambiental de forma global. Os principais poluentes emitidos na queima de combustíveis fósseis (petróleo ou carvão) são óxidos de enxofre e nitrogênio, monóxido de carbono e suspensão de particulados.

Nos dias de hoje, a grande preocupação com a utilização de combustíveis fósseis para a geração de energia não se resumem somente aos impactos sobre a natureza como a flora e a fauna silvestre. Os aspectos desta contaminação ambiental que realmente tem atraído a atenção de órgãos Governamentais, de inúmeras Organizações Não-Governamentais bem como da Comunidade Científica, são os impactos sobre a saúde humana.

O principal impacto sobre a população residente de grandes centros urbanos, desenvolvidos e em desenvolvimento, reside na produção e emissão de poluentes atmosféricos.

O histórico de crescimento demográfico urbano da cidade de São Paulo foi marcado pela facilidade de aquisição e utilização de veículos

automotores. Neste cenário, as emissões provenientes de veículos automotores são as grandes responsáveis pela geração de poluição atmosférica na cidade de São Paulo, contribuindo desta forma para o incremento do número de internações hospitalares, afecções respiratórias e cardiovasculares, além da degradação da qualidade de vida dos habitantes.

A poluição atmosférica urbana é composta por várias substâncias que são comumente subdivididos em duas categorias:

- Poluentes Primários: emitidos diretamente pelas fontes geradoras. Essas emissões são resultantes de processos industriais (fontes estacionárias) e gases de exaustão de motores de combustão interna (fontes móveis, no caso de automóveis, por exemplo).

- Poluentes Secundários: formados na atmosfera através de interações químicas entre poluentes primários e constituintes naturais da atmosfera.

Os níveis atmosféricos dos poluentes bem como a qualidade do ar é avaliada através de programas de monitoramento com aparato tecnológico para a quantificação destas substâncias presentes neste ar. No entanto, a fim de se caracterizar os efeitos adversos sobre os organismos, deve-se avaliar o grau de exposição dos receptores (ser humano, animais, plantas e materiais) e, portanto as suas consequências biológicas (Derisio, 2000).

A variedade de poluentes que podem estar presentes na atmosfera é muito grande. Estas substâncias podem ser classificadas da seguinte forma:

- Compostos sulfurosos (SO_2 , SO_3 , H_2S , sulfatos);
- Compostos sulfurosos (SO_2 , SO_3 , H_2S , sulfatos);
- Compostos de nitrogenados (NO , NO_2 , NH_3 , HNO_3 , nitratos);
- Compostos orgânicos de carbono (hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos);
- Monóxido de carbono e dióxido de carbono;
- Compostos halogenados (HCL , HF , cloretos, fluoretos);
- Material Particulado

O reconhecimento científico de episódios clássicos de poluição atmosférica fez com que a Agência Norte-Americana de Proteção Ambiental (EPA), despertasse para a necessidade de se criar um programa de controle de emissão de poluentes atmosféricos e a partir da década de 60, estabeleceram padrões de qualidade do ar.

Os padrões de qualidade do ar baseiam-se em diagnósticos ambientais. A partir destes padrões, consegue-se prever limites de concentração dentro de uma faixa, dita como segura, em relação aos efeitos adversos dos poluentes sobre a saúde. Os poluentes controlados pela EPA são: SO_2 , Ozônio, NO_2 , CO , particulados totais em suspensão (PTS), e frações ináveis como o PM_{10} e o $\text{PM}_{2,5}$ bem como o chumbo. No Brasil, o

Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA, através criação da Resolução Nº 3 de 28/6/90, estabeleceu os padrões nacionais de qualidade do ar, com base na Portaria Normativa Nº 348 de 14/3/90 do IBAMA, incluindo a mesma padronização da EPA com exceção do chumbo e PM2,5.

Dentro deste contexto, o monitoramento ambiental se constituiu em uma ferramenta de crucial importância para a avaliação da qualidade do ar, pois permitiu a adoção de medidas de controle de emissão, garantindo desta forma, a preservação dos níveis de concentração ditos “seguros”.

No estado de São Paulo, a agência responsável pelo monitoramento do ar é a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). A partir de meados da década de 1980, criou-se uma rede automática de monitoramento do ar, com estações medidoras de poluição, distribuídas pela Região Metropolitana de São Paulo - RMSP e Cubatão. Essa rede foi renovada em 1996 e contabiliza hoje um total de 29 estações.

1.2. Reprodução e Meio Ambiente

A sobrevivência das espécies depende da habilidade dos machos e das fêmeas reproduzirem-se de forma eficaz. A reprodução é um processo complexo envolvendo múltiplos estágios que conferem vulnerabilidade ao sistema reprodutivo dos pais, antes e após a concepção e, conseqüentemente, aos descendentes.

Os fatores que oferecem risco a cada uma dessas etapas do processo reprodutivo não estão bem estabelecidos. No entanto, sabe-se que o tempo e a duração de exposição seja ela prévia e/ou intra-uterina a contaminantes ambientais, constituí-se em fator determinante para a viabilidade e performance dos descendentes.

Em países industrializados observa-se uma crescente dificuldade do ser humano em reproduzir-se; aproximadamente de cada cinco casais, um apresenta dificuldade em gerar filhos (National Academy of Sciences, 1989).

A fisiopatologia do aparelho reprodutivo está relacionada com a exposição a diversos fatores como agentes químicos e físicos presentes no ambiente, bem como a aspectos intrínsecos a uma população como o nível *status* sócio-econômico. Todos estes fatores em conjunto, interagem, tornando complexa a avaliação dos efeitos adversos dos contaminantes ambientais sobre a saúde humana (Saldiva, 2006). Apesar da complexidade desta avaliação, crescentes evidências no âmbito epidemiológico e experimental, claramente suportam o conceito de que a contaminação ambiental representa um risco ao processo reprodutivo, cujos efeitos adversos vão desde a redução da fertilidade, até efeitos deletérios sobre as gerações subseqüentes.

1.3. Efeitos da Poluição Atmosférica sobre o Aparelho Reprodutivo

A exposição à poluição atmosférica de grandes centros urbanos tem sido o foco de atenção de muitos estudos, uma vez que os efeitos adversos à saúde tem sido observados em exposições com níveis de concentração, abaixo daqueles prescritos como seguros (Saldiva *et al.*, 1992, 1994 e 1995).

Nos últimos anos, a poluição atmosférica tem sido considerada uma importante causa de risco para a saúde reprodutiva, interferindo na fertilidade e no desenvolvimento fetal (Maisonet *et al.*, 2004).

Dentre os desfechos reprodutivos relacionados à saúde fetal, observa-se uma correlação positiva e significativa entre níveis ambientais de poluição com aumento na incidência de prematuridade fetal, diminuição do peso ao nascimento e redução do crescimento intra-uterino, bem como com a mortalidade intra-uterina e neonatal (Bobak, 2000; Yang *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003;).

Um recente estudo desenvolvido no Sul da Califórnia no período compreendido entre 1987 a 1993, avaliou os efeitos da poluição atmosférica sobre a ocorrência de malformações em fetos e neonatos, O risco de ocorrência de anomalias cardiovasculares tais como defeitos congênitos na formação das artérias, das válvulas e dos ventrículos cardíacos, aumentou com a exposição maternal ao monóxido de carbono (CO) e ao ozônio (O₃) (Ritz *et al.*, 2002).

Estes relatos representam uma associação entre poluição atmosférica e malformação humana durante a vulnerável janela de desenvolvimento embrionário.

Diversas abordagens epidemiológicas e experimentais têm demonstrado que a poluição atmosférica da cidade de São Paulo é alta o suficiente para induzir efeitos adversos à saúde humana.

Prévios estudos, utilizando roedores como animais sentinelas dos efeitos da poluição, demonstraram alterações funcionais do *clearance* mucociliar, mudanças inflamatórias ao longo do trato respiratório, hiper-responsividade brônquica, bem como efeitos cardiovasculares (Saldiva *et al.*, 1992; Lemos *et al.*, 1994, Rivero *et al.*, 2005).

Mais recentemente, demonstrou-se um significativo efeito promotor da poluição sobre a carcinogênese pulmonar, induzida experimentalmente em camundongos expostos à poluição da cidade de São Paulo (Reymão *et al.*, 1997).

Esses achados experimentais deram suporte toxicológico aos estudos epidemiológicos que demonstram uma associação significativa entre poluição atmosférica e morbi-mortalidade na cidade de São Paulo.

Diversas faixas etárias tornaram-se alvos de pesquisas no tocante aos efeitos adversos da poluição e saúde. No entanto, uma maior atenção foi dada aos idosos e às crianças, uma vez que essas faixas etárias são mais susceptíveis à poluição.

A relação entre poluição atmosférica e morbi-mortalidade nessas faixas etárias foi avaliada e verificou-se uma associação significativa entre a mortalidade de idosos e material particulado inalável (PM) e mortalidade infantil (causas respiratórias) e óxidos de nitrogênio (NOx) (Saldiva *et al.*, 1994 e 1995).

Nos últimos anos a poluição atmosférica tem sido considerada uma importante causa de risco para a saúde reprodutiva, interferindo com a fertilidade e o desenvolvimento fetal (Maisonet *et al.*, 2004).

Estudos anteriores realizados na cidade de São Paulo demonstraram que os seres humanos e animais de laboratório expostos aos níveis ambientais de poluição tiveram uma redução na performance reprodutiva caracterizada por um significativo aumento na mortalidade intra-uterina, fetal e neonatal, bem como uma redução no peso do feto.

Pereira *et al.* (1998), avaliando a população da cidade de São Paulo no período entre 1991 a 1992, mostraram uma associação positiva entre perdas fetais tardias e níveis ambientais de poluição atmosférica. Em etapa posterior deste trabalho, 47 gestantes foram acompanhadas no momento do parto. Coletas de amostras de sangue do cordão umbilical destas gestantes revelaram um aumento significativo da concentração de carboxihemoglobina no sangue das mães cujos bebês nasceram nos dias onde a concentração de poluição apresentou-se mais elevada.

Posteriormente, uma associação positiva e significativa foi observada entre mortes fetais e os níveis ambientais de ozônio (O₃) e NO₂ na cidade de

São Paulo. O aumento estimado na mortalidade associado a esses poluentes foi de 3,5 á 4% respectivamente. Para a mortalidade neonatal encontrou-se uma associação significativa com o PM10, dióxido de enxofre (SO₂) e NO₂, sendo que o aumento estimado para este evento foi de 10% (Lin *et al.*, 2004).

Gouveia *et al.* (2004), avaliaram o efeito da exposição sobre gestantes residentes na cidade de São Paulo demonstrando diferentes susceptibilidades dos fetos dependente do trimestre gestacional submetido á exposição. Após controlar o efeito das variáveis como sexo da criança, idade maternal, nível educacional, assistência pré-natal, tipo de parto, mês do nascimento e padrões de sazonalidade, observaram que o aumento de 1 ppm de monóxido de carbono (CO) e 10µg/m³ de PM10 na atmosfera foi associado com a redução do peso fetal em aproximadamente 23,0 e 13,7 g, respectivamente com estes poluentes. Observou-se também que o primeiro trimestre de gestação foi o mais vulnerável a esses efeitos.

A identificação de alvos reprodutivos masculinos e femininos aos níveis ambientais de poluição tem sido investigada também através de modelos animais.

Em 2005, Mohallem *et al.*, expondo camundongos fêmeas cronicamente à poluição atmosférica de São Paulo, verificaram diferenças nos parâmetros reprodutivos em animais expostos. O efeito sobre a fertilidade foi caracterizado por um aumento na taxa de perdas fetais tardias,

bem como uma maior incidência de falências implantacionais no grupo exposto à poluição, a partir do 10º dia de vida dos animais.

O desenvolvimento saudável de um indivíduo está intimamente relacionado à toxicologia reprodutiva, pois em muitos aspectos, a saúde e a integridade do sistema reprodutivo são influenciadas por eventos pré-natais. Em algumas situações, as conseqüências da exposição pré-natal são expressas imediatamente ou muito cedo na vida pós-natal. Em outros casos, no entanto, a exposição pré-natal pode influenciar o desempenho funcional e estrutural do sistema reprodutivo mais tardiamente.

Esses efeitos podem resultar não somente em desordens do trato reprodutivo masculino, assim como em vários processos maternos (ovulação, implantação, gestação e parto), mas também, em alterações no comportamento sexual e desenvolvimento de câncer genital (Sinawat, 2000; Dulskiene & Maroziene, 2002).

Exposições prévias de um indivíduo, ou seja, anteriores à maturidade sexual, podem afetar a descendência primariamente ou por alteração do perfil hormonal ou por ação tóxica direta às células germinativas parentais.

Tendências temporais e espaciais evidenciam o decréscimo na qualidade do sêmen com um incremento nas taxas de anormalidades do trato reprodutivo masculino representadas por hipospadias e criptorquidismo bem como por tumores (seminomas). Estas tendências indicam a ocorrência de um evento multifatorial, no qual a predisposição genética e os fatores

associados com o estilo de vida e o ambiente operam sobre a qualidade reprodutiva.

Desta forma, diversos estudos epidemiológicos relatam a influência de agentes tóxicos na diminuição da fertilidade masculina ao longo das últimas décadas, indicando que a qualidade e a concentração do sêmen humano estão sofrendo um sério declínio.

Uma meta análise composta por 61 publicações, demonstrou que no período compreendido entre 1938 a 1990, houve uma redução de 26% no volume de sêmen ejaculado e de 50% na concentração de espermatozoides nas populações avaliadas (Carlsen *et al.*, 1992).

Este estudo suscitou muitas discussões, pois a utilização de diferentes metodologias e a possível interferência de fatores de confusão presentes nas diferentes análises, traduz os achados de forma controversa.

Estudos mais controlados, no entanto, realizados em diferentes centros de pesquisa demonstraram reduções significativas nos parâmetros do sêmen ao longo do tempo (Auger *et al.*, 1995; Adamopoulos *et al.*, 1996; Irvine *et al.*, 1996; Zorn *et al.*, 1999), enquanto nenhuma alteração foi encontrada por outros autores (Bujan *et al.*, 1996; Paulsen *et al.*, 1996; Vierula *et al.*, 1996; Rasmussen *et al.*, 1997; Acácio *et al.*, 2000). Tal diferença poderia estar relacionada ao aumento da poluição ambiental gerada pelo incremento da industrialização nesta época (Bahadur *et al.*, 1996), pois estudos anteriores comprovaram não haver diferenças

significativas no sêmen relacionados à idade, (Haidl *et al.*, 1996), raça e diferenças sócio-econômicas.

Esta heterogeneidade de resultados presentes na literatura sugere que a produção e a qualidade do sêmen podem ser influenciadas por fatores ambientais e geográficos (Bahadur *et al.*, 1996), incluindo a poluição atmosférica.

A toxicidade reprodutiva masculina envolve uma gama de alvos e mecanismos fisiológicos que abrangem destes efeitos diretos sobre o epitélio seminífero e a linhagem germinativa, bem como alterações no sistema endócrino.

De Rosa *et al.* (2003) documentou uma associação inversa entre poluentes de tráfego automotivo e parâmetros seminais. Avaliando amostras de sangue dos indivíduos expostos, demonstrou que níveis de metais como o chumbo e de metahemoglobina estavam inversamente correlacionados com parâmetros funcionais do espermatozóide (concentração, motilidade, viabilidade, integridade do material genético, entre outros). Um outro achado deste estudo demonstrou que os níveis do hormônio folículo estimulante (FSH) foram também significativamente aumentados nestes indivíduos.

Muitos estudos têm investigado quais mecanismos tóxicos interferem no controle da espermatogênese. A partir dessas observações, fica evidente que um grande número de compostos exerce espermatotóxicos para os principais constituintes celulares envolvidos neste processo (Tannenbaum *et al.*, 2003).

Durante a formação dos órgãos sexuais na embriogênese, a correta diferenciação dos testículos depende da integridade e viabilidade das células de Sertoli, mantenedoras da espermatogênese.

Experimentos realizados com roedores expostos a partículas provenientes da queima de diesel demonstraram diversas alterações tais como a atrofia dos testículos, da vesícula seminal e do epidídimo, alterações na espermatogênese e uma diminuição na concentração de testosterona (Ong *et al.*, 1985; el Feki *et al.*, 2000; Tsukue *et al.*, 2001). Yoshida *et al.* (1999) observaram também mudanças ultraestruturais nas células de Leydig do epitélio seminífero de animais expostos à queima de gases de exaustão.

1.4. Razão Sexual

A razão sexual observada nas populações de forma geral é constante, variando de 102 a 106 nascimentos do sexo masculino para cada 100 nascimentos do sexo feminino (Bartleby.com. 2003). Desta forma, para cada 100 nascimentos femininos vivos registrados, observa-se um total de 106 nascimentos masculinos. Podemos então afirmar que a razão sexual esperada nas populações humanas deva ser de 106 : 100 , ou seja uma razão sexual de 1.06, ou uma proporção masculina de 0,515 (51,5%).

Alguns estudos têm observado alterações na razão sexual em áreas industriais poluídas, mas uma associação direta entre poluição atmosférica e

alterações na proporção masculina, não tem sido ainda claramente demonstrada (Davis *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2000).

Recentes observações em países industrializados incluindo a Dinamarca, o Canadá e os Estados Unidos, indicam que a proporção masculina vem declinando significativamente nas três últimas décadas (Figuras 1 e 2), (Davis *et al.*, 1998).

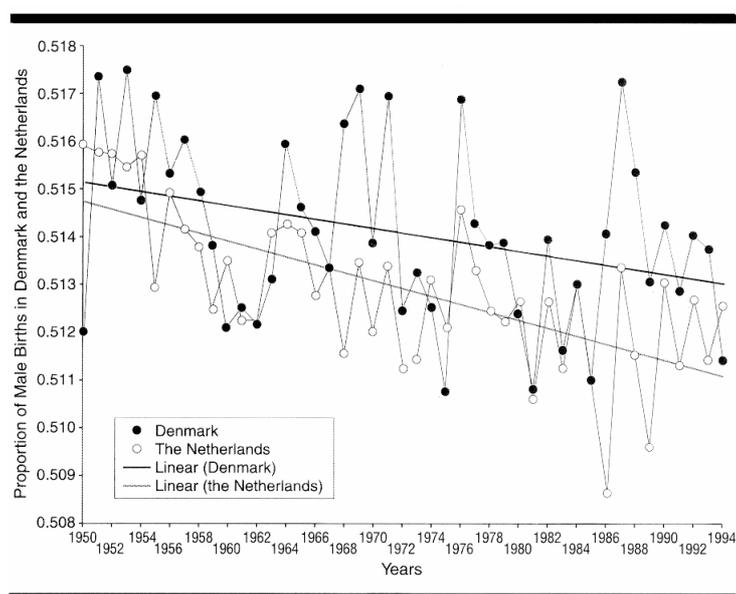


Figura 1. Proporção de nascimentos masculinos na Dinamarca e Holanda, no período entre 1950 a 1994.

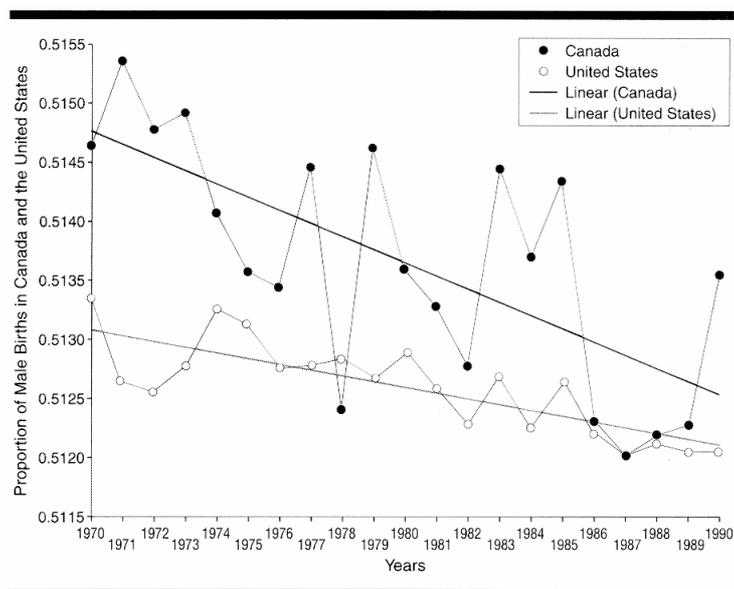


Figura 2. Proporção de nascimentos masculinos no Canadá e Estados Unidos, no período entre 1970 a 1990.

Em países como a Dinamarca e a Holanda, as proporções masculinas declinaram de forma paralela: de 51,5% em 1950 para 51,3% em 1994 e de 51,6% em 1950 para 51,3% em 1994, respectivamente.

Tendências similares têm sido observadas no Canadá no período de 1970 a 1990, onde se observou uma perda acumulada de 2,2 nascimentos masculinos para um total de 1000 nascimentos vivos. Na porção atlântica deste mesmo país, onde há uma piora das condições sócio-econômicas, a perda atingiu o valor de 5,6.

Em relação aos Estados Unidos, a perda de nascimentos masculinos vem sendo demonstrada de forma mais global nos últimos 20 anos,

acumulando uma perda de 1 nascimento para cada 1000 nascimentos vivos. Na América Latina observa-se um declínio da proporção masculina na faixa de 51,3% para 51,2% desde 1970.

Todas essas estimativas calculadas para estes países industrializados são obtidas em termos de frações de percentagem. Tais pequenas mudanças podem, no entanto, ter profundas implicações quando se tratam de grandes populações, onde centenas de milhares ou milhões de nascimentos ocorrem a cada ano. O decréscimo de 2,2 pontos percentuais em um país como o Canadá, por exemplo, com uma taxa média anual de 333.159 nascimentos, representa um declínio acumulado de 8.600 nascimentos masculinos desde 1970. Durante o mesmo período, nos Estados Unidos, o declínio de 1 nascimento em um total de 1.000 nascimentos, corresponde a aproximadamente 38.000 nascimentos masculinos a menos nesta população.

Alguns estudos têm observado alterações na razão sexual em áreas industriais poluídas, sendo estas alterações atribuíveis a distintas fontes de contaminação (Davis *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2000).

Uma surpreendente ilustração da aparente habilidade de poluentes atmosféricos influenciarem a proporção masculina vem do recente registro epidemiológico sobre a população de Seveso na Itália em 1976 (Mocarelli *et al.*, 1996).

Após a explosão de uma fábrica de herbicidas, uma grande quantidade de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) foi liberada para a atmosfera.

Passado alguns anos após o acidente, observaram-se mudanças na razão sexual da população com um aumento no número de nascimentos femininos. No período de 1977 a 1984 (meia vida de TDCC no organismo) 74 crianças nasceram na zona de maior exposição, sendo 48 meninas e 26 meninos, ou seja, uma proporção masculina de 35,1%. Após o período de sete anos, nenhum menino foi gerado a partir de pais expostos, cuja concentração de dioxina no sangue apresentava-se elevada. Só a partir de 1985, a proporção começou a voltar aos níveis esperados e a fertilidade da população aumentada.

Uma possível influência do sexo e/ou idade dos pais expostos sobre a razão sexual foi avaliada na população de Seveso. Os resultados indicam que o maior número de nascimentos femininos está relacionado à presença aumentada de TCDD nas amostras de soro dos genitores masculinos; concentrações ao redor de 20ng/kg de peso corpóreo foram correlacionadas com a diminuição de nascimentos do sexo masculino. Outro aspecto importante observado neste estudo foi à reduzida idade dos pais durante o episódio, inferior á 19 anos quando do início da exposição (Mocarelli *et al.*, 2000).

Em uma outra abordagem epidemiológica, Mackenzie *et al.* (2005), observaram um declínio na proporção masculina de populações residentes

em áreas próximas a indústrias químicas, petroquímicas e de polímeros. A proporção de machos mostrou uma diminuição significativa na última década: de 51,2% (razão sexual esperada no Canadá) para 41,2%, com o mais pronunciado decréscimo nos últimos cinco anos (para 34,8%).

1.5. Mecanismos Responsáveis pela Alteração da Razão Sexual

Fatores biológicos e ambientais, incluindo a raça, idade parental, dieta, perfil hormonal dos pais durante a concepção, técnicas de reprodução assistida, exposição a toxinas ocupacionais e ambientais e o *stress*, podem estar implicados na alteração da razão sexual.

Os mecanismos biológicos responsáveis pelas alterações na razão sexual induzida por contaminantes ambientais não estão ainda claramente definidos.

Diversas hipóteses têm sido propostas para explicar as alterações na razão sexual. Essas hipóteses não são necessariamente mutuamente exclusivas, pois mais de um mecanismo pode operar em uma dada espécie.

Os mecanismos propostos são enquadrados em duas classes distintas: estes que operam antes da concepção, e estes que favorecem um sexo em relação ao outro, após a ocorrência da fertilização (Rosenfeld & Roberts, 2004).

Diversos fatores operantes no trato reprodutivo feminino durante a concepção podem influenciar a determinação do sexo. A fisiologia do muco

cervical, o pH vaginal, o aporte de nutrientes e energia podem induzir a preferencial motilidade e o transporte, bem como a seletiva fertilização de uma classe de espermatozóide sobre a outra (Pratt *et al.*, 1987; Martin, 1997).

Uma classe de espermatozóides ligados ao X ou ao Y pode também ter diferenças fisiológicas intrínsecas na sua viabilidade, capacitação ou dinâmica de reação acrossômica (Gutierrez-Adan *et al.*, 1999; Madrid-Bury *et al.*, 2003).

Estudos de coorte têm demonstrado uma correlação entre qualidade do sêmen, níveis hormonais e alterações na razão sexual.

Goldsmith *et al.* (1984) citado por Davis *et al.*, (1998) observou que a razão sexual dos descendentes de pais expostos ao inseticida dibromocloropropano foi de 0.352, contrariamente a razão sexual de filhos concebidos anteriormente à exposição (0.529). Dentre os indivíduos que apresentaram oligozoospermia e azoospermia a razão sexual atingiu valores de 0.162. Embora os níveis sanguíneos de testosterona nesses indivíduos fossem normais, os de gonadotrofina mostraram-se aumentados.

Efeitos sobre o desenvolvimento reprodutivo podem ser induzidos também por uma classe de substâncias que interagem como o balanço hormonal.

Estas substâncias presentes diariamente em nosso meio, não são restritas ao pequeno grupo de agentes terapêuticos utilizados pela espécie

humana, mas também, a diversos compostos que são utilizados na indústria, na agricultura e nos ambientes domésticos (Toppari *et al.*, 1997).

Xenoestrógenos ou hormônios ambientais são uma classe de compostos que pode interferir com a função dos hormônios endógenos através de vários mecanismos, que vão desde a interrupção metabólica, alterações nos níveis de hormônios e seus precursores bem como a ligação aos receptores hormonais (Mantovani & Maranghi, 2005).

Uma variedade de estudos tem demonstrado as características estrogênicas, anti-estrogênicas e anti-androgênicas destas substâncias (Kelce *et al.*, 1995; Danzo, 1997).

James (2004), hipotetizou que a razão sexual dos mamíferos (incluindo o homem), é parcialmente controlada pelos níveis hormonais dos genitores durante a concepção, sendo o sexo feminino favorecido pelas altas concentrações de gonadotrofina e baixos níveis de testosterona.

A reprodução masculina humana é caracterizada pela produção de um grande número de espermatozóides e por um processo de gametogênese intrinsecamente determinante na normalidade fenotípica e integridade genômica dos gametas.

Contrariamente aos gametas femininos que na maior parte do tempo permanecem em estado de relativa dormência (como folículos primordiais), os gametas masculinos estão em constante divisão celular e atividade metabólica que conferem a linhagem germinativa masculina uma maior frequência de mutações. Observa-se que a razão de frequência de

mutações entre o sexo masculino e o feminino é de 3:6, para a espécie humana e primatas superiores.

Eventos relacionados à pós-concepção como, por exemplo, as diferenças na taxa de desenvolvimento ou na sensibilidade dos embriões XX ou XY às condições do trato reprodutivo feminino, causam uma perda seletiva de embriões de um sexo, anteriores à formação da placenta.

Todos estes processos conjuntamente ou não, poderiam estar induzindo uma vantagem competitiva de um sexo em detrimento do outro.

Face às todas as evidências descritas acima, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar os efeitos da poluição atmosférica urbana sobre os desfechos reprodutivos.

Com o intuito de se verificar esta associação, a concentração do poluente particulado fração inalável (PM10), foi dividido em gradientes de concentração e correlacionada com a proporção de nascimentos do sexo masculina na população da cidade de São Paulo.

A fim de verificar-se a plausibilidade biológica desses achados, camundongos machos foram expostos cronicamente aos níveis ambientais de poluição, em câmaras do tipo topo aberto, sob condições mais controladas de exposição.

2. Objetivos

2. Objetivos

A partir dos achados da literatura expostos acima, os objetivos deste trabalho foram:

- ✓ Avaliar a influência da exposição aos níveis ambientais de poluição atmosférica sobre a distribuição de sexo na população da cidade de São Paulo;
- ✓ Verificar a plausibilidade biológica dos estudos populacionais, utilizando-se modelos animais sob condições mais controladas de exposição;
- ✓ Após o período de exposição, avaliar os efeitos adversos da poluição sobre o aparelho reprodutivo de camundongos machos;
- ✓ Avaliar se a exposição à poluição anteriormente ao período de maturidade sexual, exerce efeitos deletérios sobre o processo reprodutivo;
- ✓ Após o acasalamento dos animais, verificar a influência da exposição sobre os desfechos relacionados à saúde fetal.

3. Material e Métodos

3. Material e Métodos

Com o intuito de se avaliar a associação da poluição atmosférica e efeitos adversos na saúde reprodutiva desenvolvemos duas abordagens, uma epidemiológica e outra experimental.

No estudo epidemiológico, analisamos a razão sexual da população da cidade de São Paulo. Posteriormente, a fim de conferir plausibilidade biológica aos achados epidemiológicos, camundongos machos foram expostos à poluição nos quais posteriormente verificamos os efeitos sobre aparelho reprodutivo e sobre a prole.

3.1. Abordagem Epidemiológica

O estudo epidemiológico verificou a associação entre a razão sexual na população da cidade de São Paulo e as concentrações de poluição no período de 2001 á 2003.

O termo razão sexual reflete a relação entre o número de nascimentos vivos masculinos e femininos em uma dada população, e pode ser expresso através de duas formas distintas: através da *razão sexual* que é representada pela razão entre o número de nascimentos masculinos e número de nascimentos femininos ou através da *proporção masculina*, que é expressa pelo número de nascimentos masculinos dividido pelo número total de nascimentos (masculinos+femininos) X 100 (Davis *et al.*, 1998).

Registros da concentração de partículas inaláveis com diâmetro aerodinâmico equivalente menor que 10 μm (PM10) foram obtidos de nove estações da rede de monitoramento da Cetesb no Município de São Paulo. A concentração de PM10 foi utilizada como um marcador da poluição total. As estações foram selecionadas na base de concentração média anual de PM10 e divididas em três áreas com níveis distintos de concentração, de acordo com o Padrão de Qualidade do Ar que prescreve o limite máximo de $50\mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM10 disperso na atmosfera (CONAMA nº 3, 1990). O valor de concentração de PM10 utilizado para a correlação com a razão sexual foi a média aritmética das concentrações das três estações selecionadas para cada nível de poluição, como demonstrado na (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios (\pm SD) das concentrações de PM10 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) nos níveis 1 (menos poluído), 2 (moderadamente) poluído e 3 (mais poluído), nos anos de 2001, 2002 e 2003 individualmente e acumuladamente.

Áreas	2001	2002	2003	2001+2002+2003
Nível 1	24.0 (10.4)	28.4 (6.3)	42.7 (12.4)	31.71
Nível 2	37.8 (8.7)	46.1 (11.7)	47.3 (14.7)	43.74
Nível 3	59.2 (11.1)	64.5 (12.5)	59.2 (18.8)	60.96

Desta forma foram definidas áreas menos poluídas – nível 1, ou seja, aquelas estações cujas concentrações estiveram abaixo do Padrão de Qualidade do Ar que foram representadas pelas estações do Ibirapuera, Cambucí e Nossa Senhora do Ó; nível 2 - áreas medianamente poluídas, cujas concentrações das estações estiveram em torno do limite de $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$, representadas pelas estações do Centro, Cerqueira César e Santo Amaro e finalmente, uma área mais poluída - nível 3, onde as concentrações mantiveram-se acima do Padrão, representadas pelas estações de Congonhas, Parque D. Pedro e Osasco.

Registros do número total dos nascimentos vivos de ambos os sexos em 23 distritos do município de SP e Osasco no período de 2001 á 2003 foram fornecidos pela Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados (FSEADE).

Os distritos foram selecionados de acordo com a localização nas 3 regiões e segundo o regime predominante de ventos que atinge o município de leste para oeste, seguindo para sudoeste e noroeste.

Consideraram-se os distritos situados a um raio de 2 km em torno das estações da rede automática da Cetesb (Martins *et al.*, 2003), ou seja, os distritos mais próximos das estações selecionadas, como demonstrado na Figura 3 e descrito na Tabela 2.

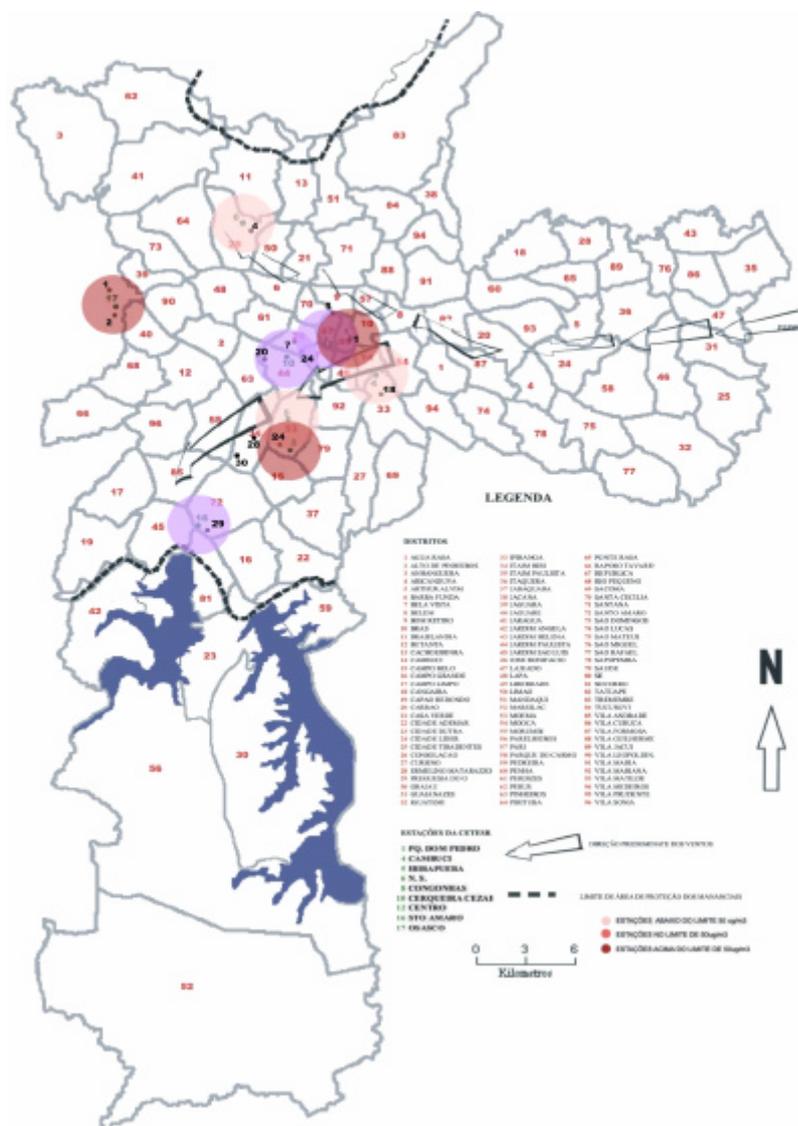


Figura 3. Mapa representativo da região Metropolitana de São Paulo, onde podemos visualizar as áreas correspondentes as três regiões, mais poluída (círculos em salmão), moderadamente poluída (círculos em lilás) e menos poluída (círculos em vermelho).

Tabela 2. Distritos selecionados dentro do raio de 2 km nos níveis de poluição 1, 2 e 3.

Estação/Distritos	Nível 1	Nível 2	Nível 3
<i>N. Senhora do Ó</i>	Freguesia do Ó Pirituba		
<i>Cambucí</i>	Ipiranga, Móoca, Cambucí, Liberdade		
<i>Ibirapuera</i>	Moema, Vila Mariana, Itaim Bibi		
<i>Santo Amaro</i>		Santo Amaro, Vila Andrade, Jardim São Luís	
<i>Cerqueira César</i>		Jardim Paulista, Perdizes	
<i>Centro</i>		Santa Cecília, Consolação, Bela Vista	
<i>Parque D. Pedro</i>			Sé, Brás, Pari, Bom Retiro
<i>Congonhas</i>			Campo Belo, Saúde
<i>Osasco</i>			Osasco

A razão sexual foi calculada através razão de masculinidade que é representada pelo número de nascimentos masculinos dividido pelo número total de nascimentos ($n^{\circ} / n^{\circ} + ?$).

3.1.1. Análise Estatística

A correlação entre a razão de masculinidade dos distritos selecionados no raio de 2 kms com os 3 gradientes de concentração de PM10 foi correlacionada através de uma função quadrática. O nível de significância adotado foi de 5%. O software utilizado para as análises foi o SPSS, versão 10.

3.2. Estudo Experimental

3.2.1. Desenho Experimental

No estudo experimental, dois grupos de camundongos machos da linhagem Swiss com dez dias de vida, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foram mantidos concomitantemente em câmaras de exposição do tipo Topo Aberto, durante quatro meses.

As câmaras do tipo Topo Aberto nos permitem simular a exposição em condições reais de poluição. As câmaras são estruturas cilíndricas

medindo 2,5 m de altura e 2,0 m de diâmetro, cujo ar atmosférico entra na base da câmara por meio de uma bomba de sucção, distribuí-se uniformemente por todo o interior da câmara e sai no topo por uma abertura (Figura 4).

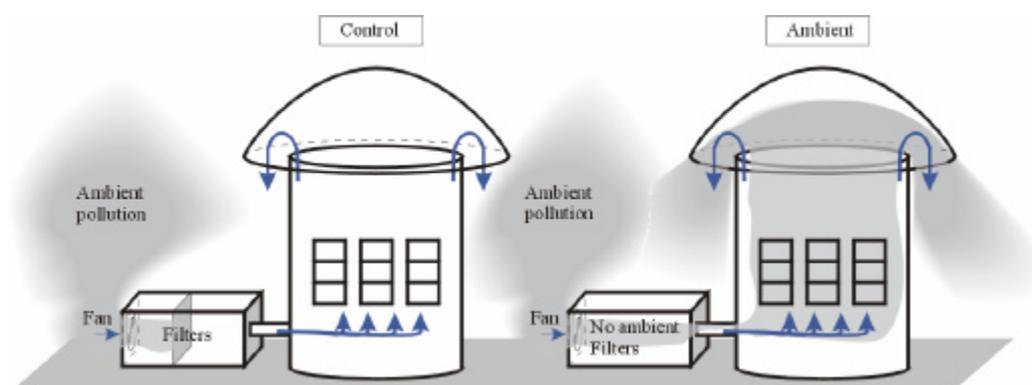


Figura 4. Ilustração esquemática das câmaras de exposição do tipo Topo Aberto, onde o ar atmosférico entra na base da câmara e sai por uma abertura na parte superior. À esquerda, observamos a câmara filtrada com dispositivo de filtragem, e à direita, a câmara não-filtrada.

A primeira câmara, designada como câmara filtrada, possui dispositivos de filtragem do ar que removem o material particulado, os componentes gasosos e os agentes microbianos da poluição atmosférica. No sistema de filtração, umas séries de quatro filtros estão alinhadas. O primeiro elimina partículas grossas (modelo TB, Purafil São Paulo,) o

segundo, elimina substanciais químicas ($\text{Al}_2\text{O}_3 + \text{KMNO}_4$) e, finalmente o terceiro e quarto, partículas finas e ultrafinas respectivamente (modelo JFL-90 e modelo HEPA, Purafil São Paulo). Desta forma, conseguimos reduzir ambos, partículas e componentes gasosos da atmosfera (Figura 5). Na outra câmara, denominada como câmara não-filtrada, os animais foram expostos ao ar atmosférico da cidade de São Paulo.

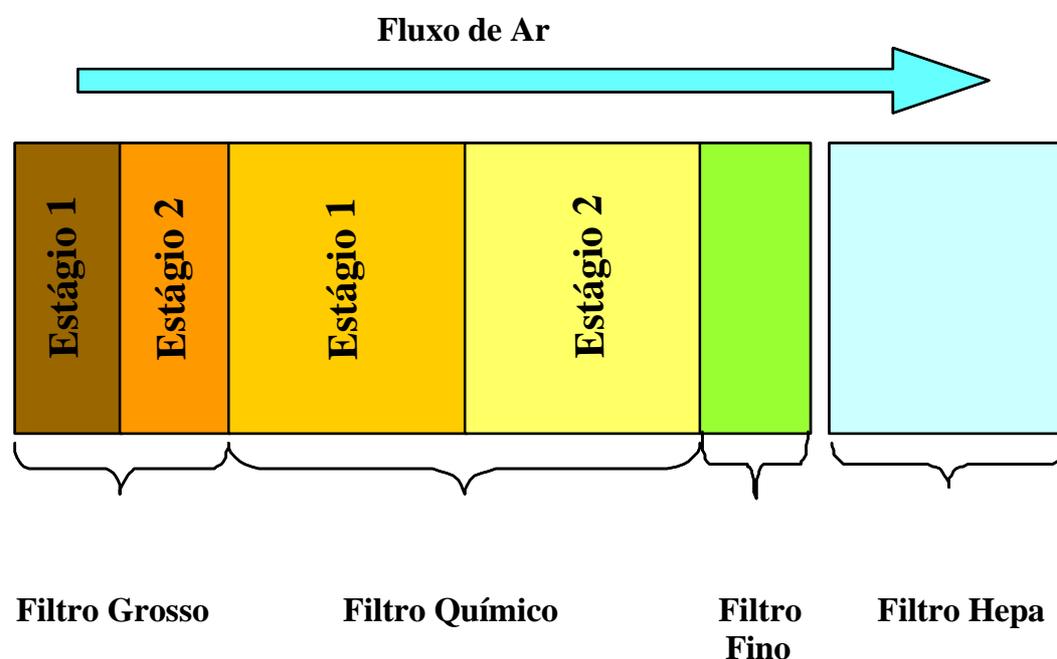


Figura 5. Esquema dos leitos de filtração da câmara não-filtrada onde à medida que o fluxo de ar passa pelos compartimentos, vai se depurando até adentrar a base da câmara.

Dois grupos de vinte e cinco animais machos foram expostos ao ar atmosférico da cidade de São Paulo, durante 24 horas por dia, 7 dias por semana, nas câmaras de exposição, que estão localizadas lado a lado, no jardim da Faculdade de Medicina da USP, próximas a uma estação da rede de monitoramento de poluentes da Cetesb.

Os animais foram aclimatados por cinco dias antes do início da exposição e alimentados com ração comercial balanceada (Nuvital-Nutrients Ltda., Colombo, Brasil) e água *ad libitum* (autoclavada), durante todo o período experimental (Cunliffe-Beamer & Les, 1987).

O peso dos animais foi registrado semanalmente a fim de se verificar diferenças existentes em termos de desenvolvimento corpóreo.

Após completarem o período experimental de 120 dias, fêmeas em idade reprodutiva e não expostas, foram introduzidas nas câmaras a fim de efetuarem-se os acasalamentos, na proporção de 1 macho para 1 fêmea. Os casais foram mantidos juntos por 10 dias, permitindo a ocorrência de pelo menos dois ciclos de estro. Durante todo o período de acasalamento, verificou-se a presença do *plug* vaginal, a fim de determinar-se o primeiro dia de gestação. Após o período de acasalamento, os reprodutores machos foram sacrificados e submetidos à coleta de material para estudos posteriores.

As fêmeas acasaladas permaneceram nas câmaras até o 19º dia de gestação, quando foram trazidas ao laboratório para sacrifício e retirada do material para análise.

3.2.2. Caracterização da exposição

Amostras diárias da atmosfera interna das câmaras foram coletadas para a avaliação da concentração dos poluentes, como descrito abaixo:

1. NO_2 (dióxido de nitrogênio), através do método colorimétrico descrito por Lodge (Lodge, 1989);
2. *Black carbon*, por refletância óptica (ABNT, 1989) coletado em filtros de celulose;
3. $\text{PM}_{2,5}$, gravimetricamente através da coleta em filtros de policarbonato, utilizando-se impactadores do tipo Harvard (Wilson *et al.*, 2002).

Registros diários de temperatura e umidade relativa também foram obtidos das atmosferas internas das câmaras através de um termohigrômetro digital (Soil Control, Tecnologia em Instrumentos do Solo, Ltda).

3.2.3. Avaliação da Toxicidade Reprodutiva

A avaliação dos efeitos da poluição sobre o sistema reprodutivo dos animais foi feita através da análise de parâmetros relacionados tanto ao sexo masculino bem como em relação à prole.

- Efeitos sobre o Aparelho Reprodutivo Masculino

A avaliação da toxicidade ao aparelho reprodutivo masculino tem sido evidenciada através da análise da linhagem germinativa. Alterações no número, na motilidade e na morfologia dos espermatozóides, têm sido descritas como marcadores de exposição a substâncias tóxicas presentes no meio (Mantovani & Maranghi, 2005).

Desta forma, avaliamos os efeitos adversos sobre o aparelho reprodutivo masculino através de dois parâmetros: análise do sêmen e quantificação da linhagem germinativa (*staging*) (Russel *et al.*, 1990; Mantovani & Maranghi, 2005).

A espermatogênese, ou seja, o processo de formação dos espermatozóides é dividida em quatro etapas de diferenciação e ocorre no interior dos túbulos seminíferos dos testículos (Figura 6).

A primeira fase, denominada *fase germinativa*, sob ação de estímulos hormonais, envolve a divisão ativa por mitose das células precursoras denominadas espermatogônias. Em mamíferos, a multiplicação mitótica das espermatogônias, diplóides, (acontece durante toda a vida do indivíduo). A fase subsequente, *fase de crescimento*, constituiu-se na etapa em que a espermatogônia cessa o processo de divisão e passa por um período de crescimento, antes de dar início à mitose. Com o crescimento, a espermatogônia transforma-se em espermatócito primário (*fase de maturação*), que através da meiose, produz dois espermatócitos tipo II, os

quais, novamente por divisão mitótica originam quatro células denominadas espermatídes. Os espermatócitos II e as espermatídes são haplóides. Subseqüentemente, na fase designada como *espermiogênese*, ocorre a diferenciação das espermatídes em espermatozóides. Tal processo de diferenciação é denominado como espermiogênese.

Em meio às células que formam o epitélio germinativo do homem, no interior dos túbulos seminíferos, existem também outras células. Destacam-se as células de Sertoli (ou células de sustentação). Estas células são responsáveis, entre outras coisas, pela produção de determinadas enzimas e hormônios (especialmente estrogênio), necessários ao desenvolvimento da espermatogênese. As células de Sertoli são também responsáveis, em grande parte, pela absorção do líquido citoplasmático das espermatídes, durante a transformação das mesmas em espermatozóides.

Externamente aos túbulos seminíferos existem também outras células muito importantes: as células de *Leydig*, responsáveis pela produção do hormônio testosterona, extremamente necessário tanto à espermatogênese normal como também ao desenvolvimento de todo o aparelho reprodutor masculino que ocorre durante a puberdade (Russel *et al.*, 1990).

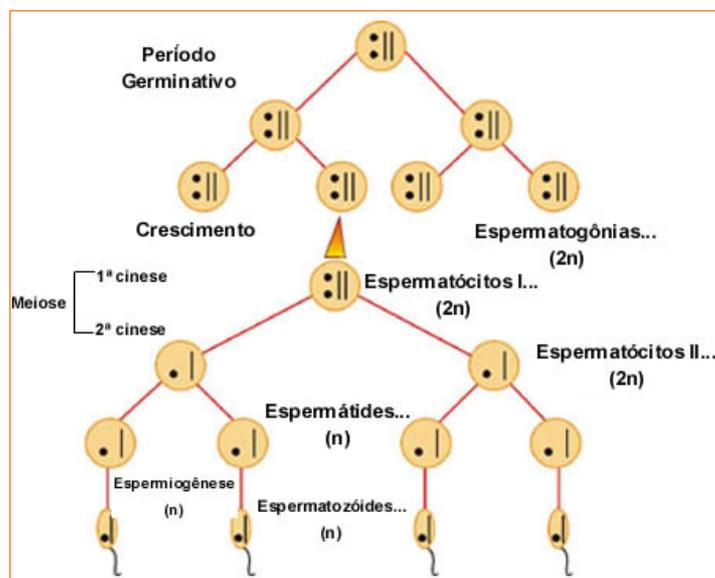


Figura 6. Etapas de diferenciação e formação dos espermatozoides nos tecidos germinativos de testículos de mamíferos.

Uma vez constatado o acasalamento, os animais foram colocados em uma caixa hermeticamente fechada e pré-anestesiados com isoflurano (Cristália Produtos Farmacêuticos, Ltda). Após a constatação de falta de sensibilidade os animais foram sacrificados por exsanguinação.

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

Para a avaliação da concentração dos espermatozoides utilizamos os espermatozoides presentes na porção caudal do epidídimo.

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

Os testículos foram fixados por 48 horas em líquido de Bouin. Posteriormente à fixação, cortes transversais de 5 µm corados com ácido periodic acid Schiff (PAS), foram obtidos para a quantificação histológica da linhagem germinativa (Russel, 1990).

A quantificação da linhagem germinativa foi feita através do *staging*, que representa as etapas de diferenciação das células germinativas até a formação dos espermatozóides.

Desta forma, a partir da diferenciação das espermatogônias primitivas até a formação dos espermatozóides observamos 12 perfis distintos de células (etapas) nas diferentes secções de túbulos seminíferos dispersos no parênquima testicular. Esses perfis distintos variam de acordo com o número, tipo e posição das células distribuídas ao longo do túbulo.

Dentre as doze etapas de diferenciação dos espermatozóides, a 7^a é a que nos dá a maior representatividade em termos de células germinativas. Desta forma, após a identificação dos túbulos seminíferos representativos da fase 7, quantificamos o número dos cinco tipos celulares constituintes do tecido germinativo: espermatogônias, células de Sertoli, espermátócitos tipo I e II, espermátides, bem como o número total das células da linhagem

germinativa. Essa quantificação foi realizada com o auxílio de um retículo em 4 áreas distintas de cada túbulo com áreas correspondentes á 100µm de membrana basal (Figura 7).

A densidade numérica das células foi então realizada com o auxílio da microscopia óptica sob o aumento de 400 X.

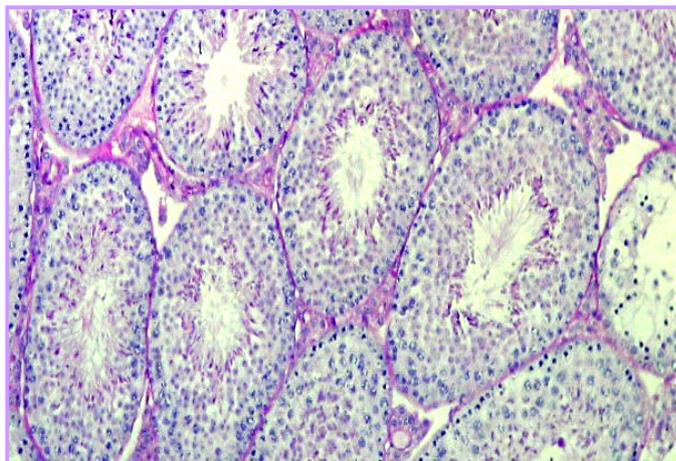


Figura 7. Corte transversal de um testículo exibindo os túbulos seminíferos em diferentes fases do ciclo espermatogênico. (Aumento 400 X, coloração PAS).

- Efeitos sobre a Prole

As fêmeas foram mantidas em suas respectivas câmaras e sacrificadas no 19º dia de gestação. Posteriormente ao sacrifício, realizamos

a abertura da cavidade abdominal para a retirada do útero bem como dos fetos e placentas.

Os parâmetros fetais avaliados foram:

- número total de fetos
- número de fetos vivos e fetos mortos
- número de abortos
- número de perdas pós-implantacionais
- peso dos fetos
- peso das placentas
- relação peso feto/peso placenta
- razão sexual: número de machos/número de fêmeas

3.2.4. Análise Estatística

Após a constatação de que nossos dados se enquadravam no perfil de medidas paramétricas (Teste de Homogeneidade), as diferenças entre os grupos foram calculadas pelo teste de comparações múltiplas entre as médias utilizando-se o Student's *t test*.

As concentrações de poluentes dentro das câmaras foram comparadas através de medidas pareadas, onde dia após dia se avaliou a diferença dessas concentrações nos dois ambientes.

O programa utilizado para os cálculos foi o “Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)” 8.0 (Chicago, EEUU).

Em todos os testes consideraremos um nível de significância de 5%.

4. Resultados

4. Resultados

4.1. Estudo Epidemiológico

A análise do comportamento do PM10 medido pela Cetesb nas três regiões selecionadas no período de 2001 á 2003, revelou que as concentrações apresentaram uma sazonalidade e picos nos meses de inverno (Figuras 8, 9 e 10). Como podemos observar nas figuras, as concentrações na região mais poluída mantiveram-se acima do padrão de qualidade do ar, em cerca de 90% do período analisado. Já nas regiões medianamente poluídas, as concentrações excederam o padrão nos meses de Junho e Julho de 2001 e de Maio á Setembro de 2003, mantendo-se as médias pouco abaixo do padrão. Em relação às médias de concentração de PM10 nas regiões menos poluídas, estas excederam o padrão de qualidade do ar, apenas nos meses de Junho á Agosto de 2003 com as médias mantendo-se abaixo de $50 \mu\text{m}/\text{m}^3$.

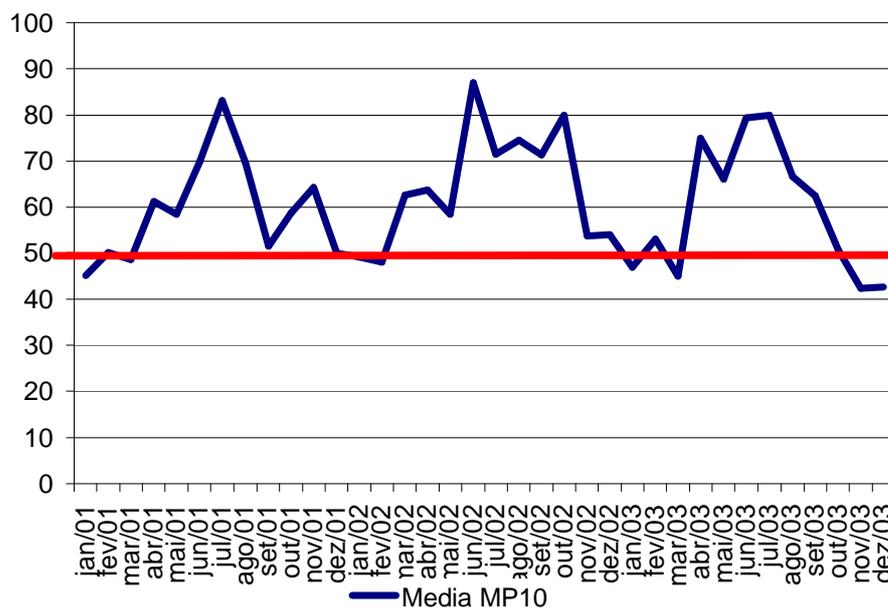


Figura 8. Variação da média mensal do PM10 nos distritos da região designada como mais poluída. A média do PM10 para o período 2001 á 2003 foi de $60,90 \mu\text{m}^3$, com picos de concentração em torno de $80 \mu\text{m}^3$.

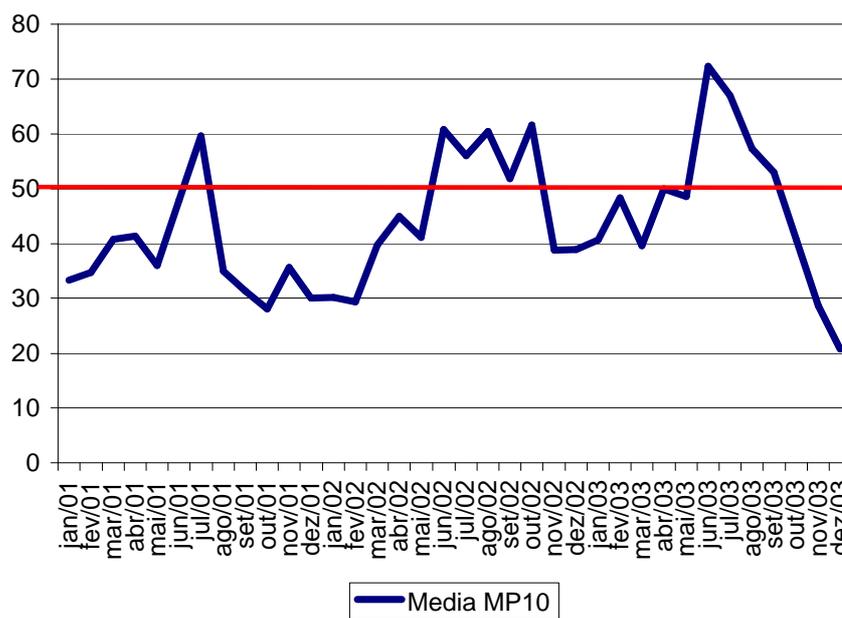


Figura 9. Variação da média mensal do PM10 nos distritos da região designada como moderadamente poluída. A média de concentração do PM10 foi de $31,70 \mu\text{m}^3$ com picos de concentração em torno de $45,80 \mu\text{m}^3$.



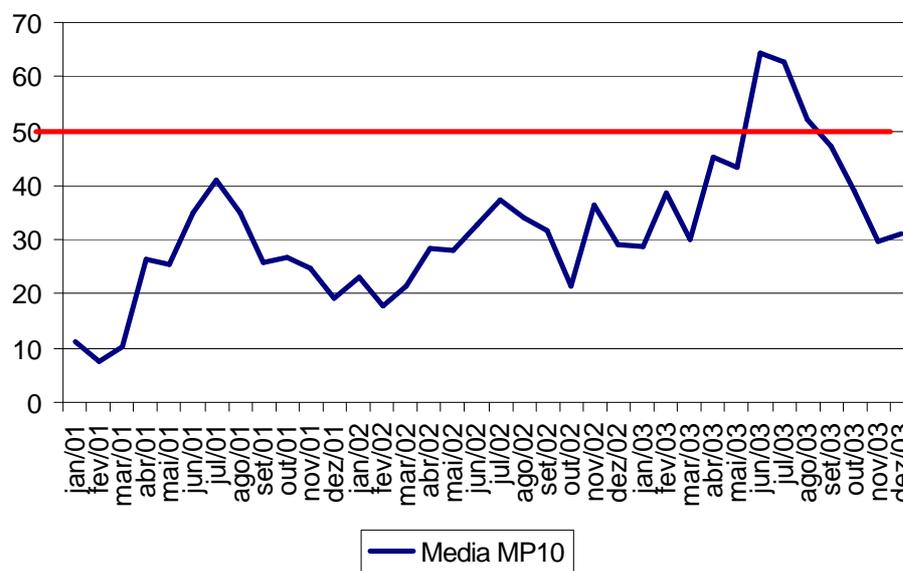


Figura 10. Variação da média mensal do PM10 nos distritos da região designada como menos poluída. A concentração de PM10 foi em média 31,70 μm^3 .

Comparando as três regiões analisadas observamos uma direta correlação entre os níveis de poluição atmosférica e um progressivo decréscimo na razão sexual da população, como representado na Figura 11. Os resultados revelam uma significativa associação negativa ($r^2=0,7642$; $p=0,013$) entre razão sexual e PM10, dentro de uma estreita faixa de concentração de PM10 (de 31 to 61 $\mu\text{g}/\text{m}^3$).

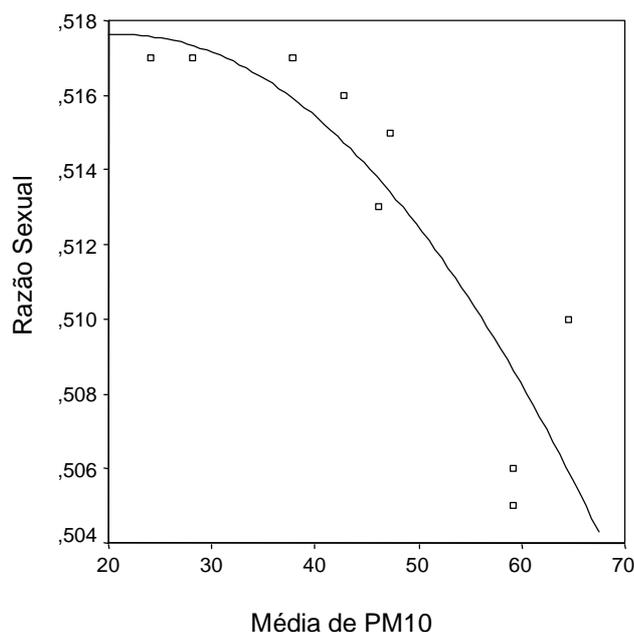


Figura 11. Associação entre a razão sexual e os níveis de concentração de PM10 nas três regiões analisadas, no período compreendido de 2001 a 2003 ($r^2=0,7642$; $p=0,013$).

Na região menos poluída, abrangente dos distritos de Nossa Senhora do Ó, Cambucí e Ibirapuera, a razão sexual foi de 51,7% (106.8) para 34.795 nascimentos registrados; na região medianamente poluída, representativa dos distritos de Santo Amaro, Cerqueira César e Centro, observamos a razão sexual de 51,5% para 35.341 nascimentos registrados, enquanto que na região mais poluída, constituída pelos distritos de Parque D. Pedro, Congonhas e Osasco, a proporção decresceu para 50,7 % (102.9) em um total de 48.023 nascimentos registrados. Este resultado corresponde à diferença de 1% no número total de nascimentos masculinos ou 1.180 nascimentos de meninos a menos nas regiões mais poluídas.

Na Tabela 3, podemos visualizar de forma mais sucinta a razão sexual com as respectivas médias de concentração em cada região estudada.

Tabela 3. Razão sexual e média das concentrações de material particulado nas três regiões analisadas designadas como nível 1 (mais poluída), nível 2 (moderadamente poluída) e nível 3 (menos poluída).

Área	Razão Sexual (%)	Média PM10 ($\mu\text{m}/\text{m}^3$)
Nível 1	50,7	60,90
Nível 2	51,5	43,80
Nível 3	51,7	31,70

4.2. Estudo Experimental

4.2.1. Monitoramento das Câmaras de Exposição

O monitoramento do ambiente interno das câmaras foi realizado com medidas de poluentes e variações nos parâmetros físicos, como temperatura e umidade.

Na Tabela 4 estão representas as concentrações internas dos poluentes, *black carbon*, PM2,5 e NO₂ e monitorados durante o período

experimental. A eficiência de filtração na câmara filtrada foi de 100% para Black Carbon, 55% para o PM_{2,5}, e 35% para NO₂.

Tabela 4. Concentração média (\pm DP) dos poluentes PM_{2,5}, *black carbon* e dióxido de nitrogênio medidos nas câmaras filtrada e não-filtrada em todo período experimental. A eficiência de filtração na câmara filtrada é descrita para cada poluente.

Câmara	<i>Black Carbon</i>	PM_{2,5}	NO₂
Filtrada	0	21,59	36,94
Não Filtrada	11,71	48,17	56,80
Filtração	100%	55%	35%

Podemos notar que a partir dos dados demonstrados na tabela, a eficiência de filtração da fração de partículas finas na câmara filtrada, foi máxima (100%). No entanto, as médias de concentração dos outros poluentes PM_{2,5} e NO₂ mantiveram-se em patamares mais inferiores. O comportamento da concentração dos poluentes ao longo de todo período experimental está representados nas Figuras 12, 13 e 14.

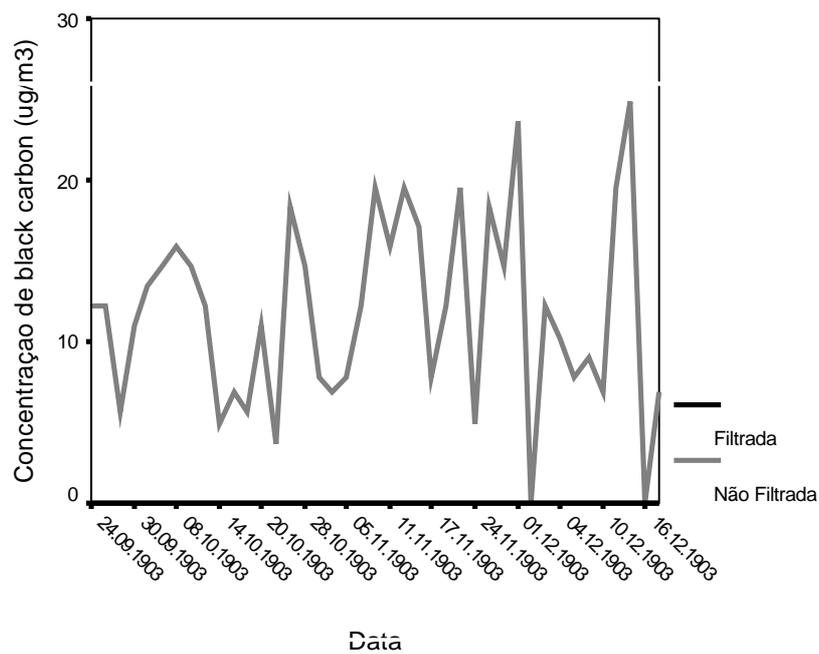


Figura 12. Perfil de variação das concentrações de *black carbon* coletado nas Câmaras Filtrada e Não Filtrada, no período de Setembro á Dezembro de 2003.

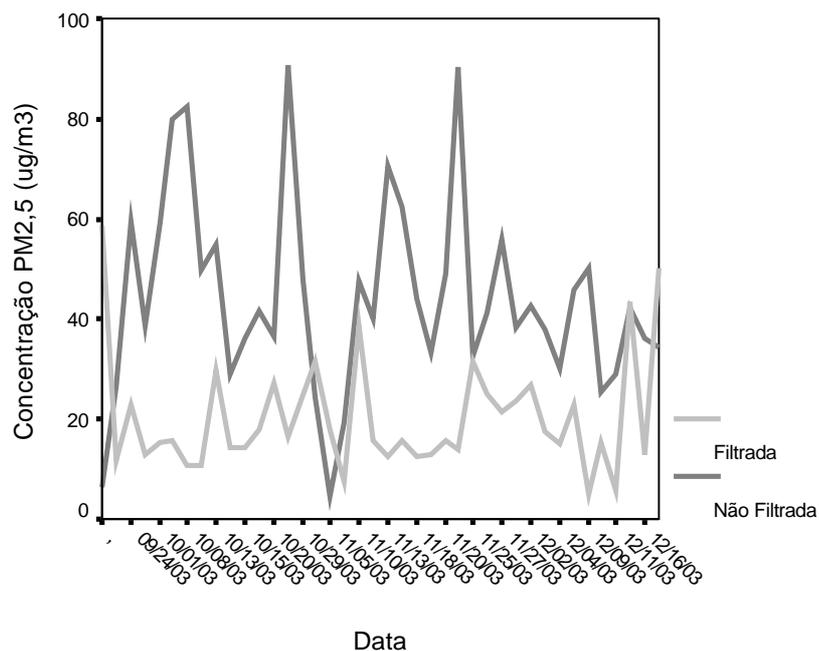


Figura 13. Perfil de variação das concentrações de material particulado (PM_{2,5}) coletados nos ambientes internos das Câmaras Filtrada e Não Filtrada no período de Setembro á Dezembro de 2003.

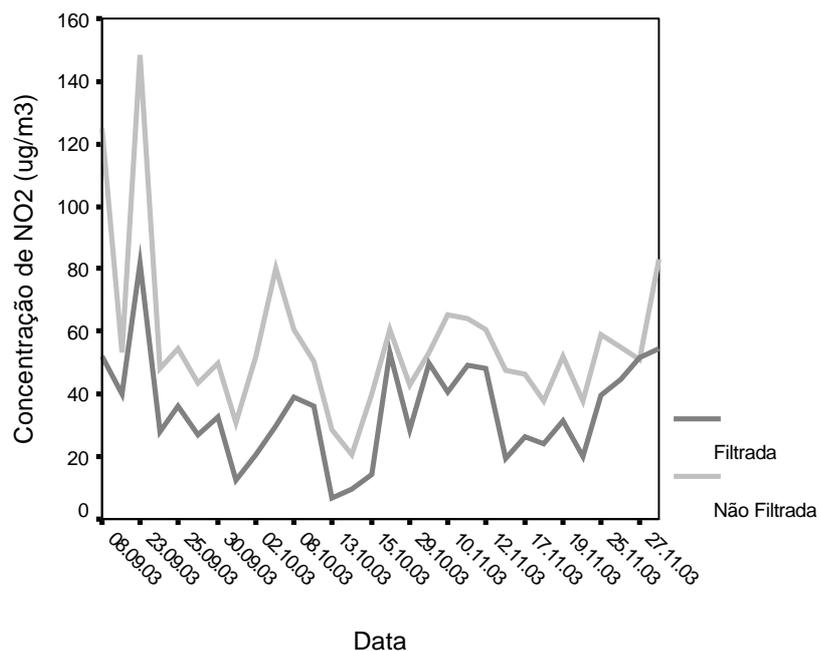


Figura 14. Perfil de variação das concentrações de NO₂ coletado nas Câmaras Filtrada e Não Filtrada, no período de Setembro á Dezembro de 2003.

Em relação aos parâmetros físicos como temperatura (máxima e mínima) e umidade relativa (máxima e mínima) monitorados nas câmaras, observamos que os registros diários médios foram similares em ambos os ambientes (Tabela 5).

Tabela 5. Registros médios (\pm DP) de temperatura ($^{\circ}$ C) e umidade relativa (%) nas Câmaras Filtrada e Não Filtrada, no período de Setembro á Dezembro de 2003.

CÂMARA		TEMEXTMA	TEMEXTMI	TEMINTMA	TEMINTMI	HUMINTMA	HUMINTMI
Filtrada	Mean	27,4537	16,9630	30,8130	18,5132	80,7889	43,9074
	N	54	54	54	53	54	54
	Std. Deviation	4,7684	2,9366	5,4506	2,8736	4,1888	13,2825
Não Filtrada	Mean	27,5558	17,6731	28,2731	18,6750	80,5400	48,5385
	N	52	52	52	52	50	52
	Std. Deviation	4,7486	3,2857	4,6811	3,3321	5,4743	11,8627
Total	Mean	27,5038	17,3113	29,5670	18,5933	80,6692	46,1792
	N	106	106	106	105	104	106
	Std. Deviation	4,7363	3,1183	5,2218	3,0952	4,8271	12,7599

4.2.2. *Exposição Animal*

Os parâmetros analisados na geração parental masculina demonstraram que o desenvolvimento corpóreo dos animais avaliados semanalmente foi estatisticamente diferente entre os dois grupos. A massa corpórea média foi de $40,06 \pm 2,53$ no grupo exposto e $47,06 \pm 4,91$ no grupo não exposto ($p < 0,03$), (Figura 15).

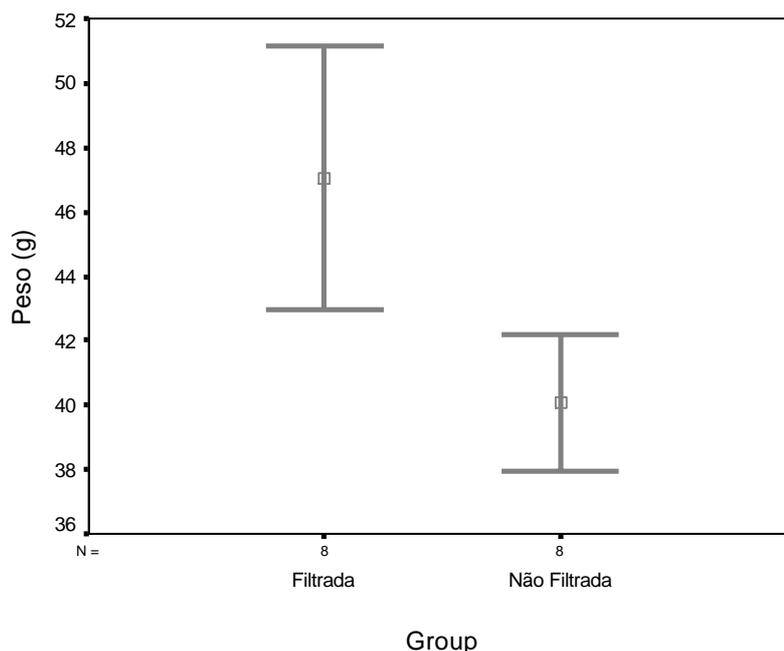


Figura 15. Peso corpóreo médio dos animais machos mantidos nas Câmaras Filtrada e Não Filtrada ($p < 0,03$).

A exposição crônica à poluição induziu efeitos espermatotóxicos nos testículos da geração parental masculina. A análise da qualidade do sêmen demonstrou uma redução na concentração de espermatozoides, sem prejuízo, no entanto, da capacidade reprodutiva desses animais. As médias de concentração obtidas para os grupo exposto e não exposto à poluição, foi respectivamente, de $46,95 \times 10^6/\text{ml}$ e $54,60 \times 10^6/\text{ml}$. A Figura 16 demonstra as concentrações de espermatozoides obtidas nos dois grupos experimentais. Observamos uma redução na concentração dos espermatozoides em torno de 15% nos animais expostos à poluição, embora esta queda não tenha sido significativa ($p < 0,176$).

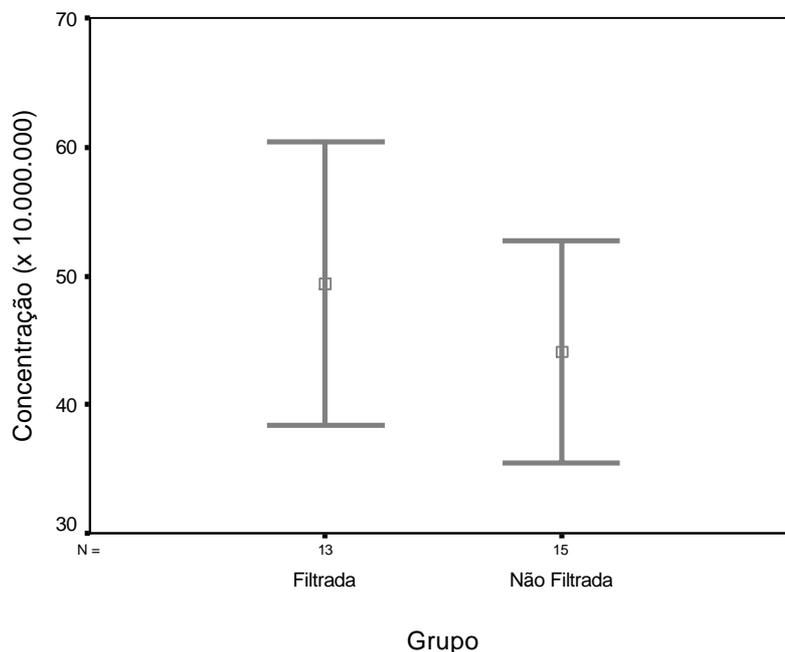


Figura 16. Análise da concentração do sêmen dos animais expostos e não expostos à poluição ($p < 0,176$).

A observada redução na concentração do sêmen dos animais expostos à poluição foi compatível com alterações no perfil da linhagem germinativa. Após a quantificação histológica dos testículos, observamos uma redução significativa no número de espermátides alongadas ($p < 0,020$) bem como no número total ($p < 0,032$) dos constituintes celulares envolvidos na espermatogênese (Figura 17).

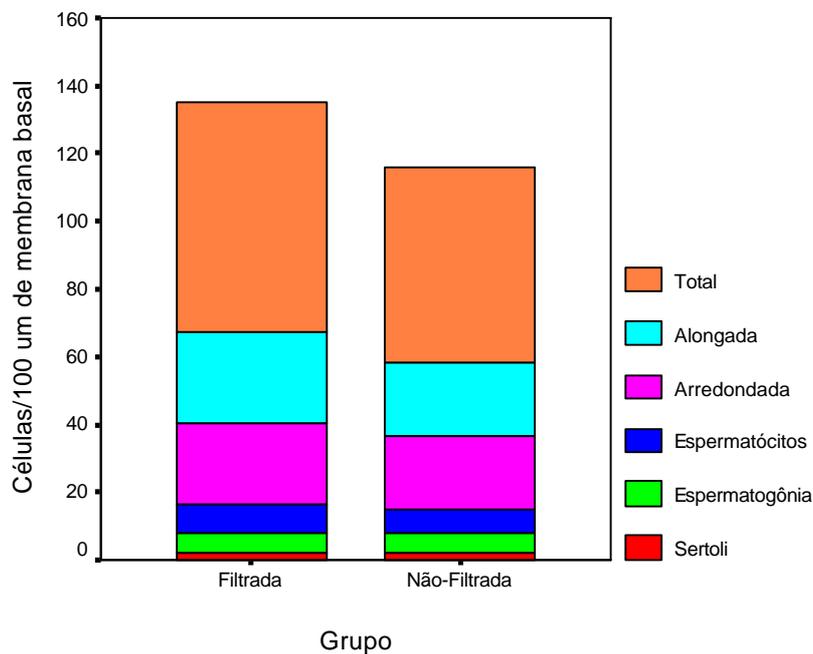


Figura 17. Densidade numérica das células de Sertoli, espermatogônias, espermatócitos, espermatídes redondas e alongadas ($p < 0,020$) e células germinativas totais ($p < 0,032$) quantificadas nos testículos dos animais expostos e não expostos à poluição.

4.2.3. Parâmetros Fetais

Os diferentes parâmetros fetais analisados em relação à prole revelaram alguns resultados intrigantes. Após a cesárea e a retirada do útero e respectivos fetos, quantificamos o número total de fetos nascidos, número de fetos vivos e mortos. Nenhum destes parâmetros exibiu diferenças entre os dois grupos analisados (Figura 18).

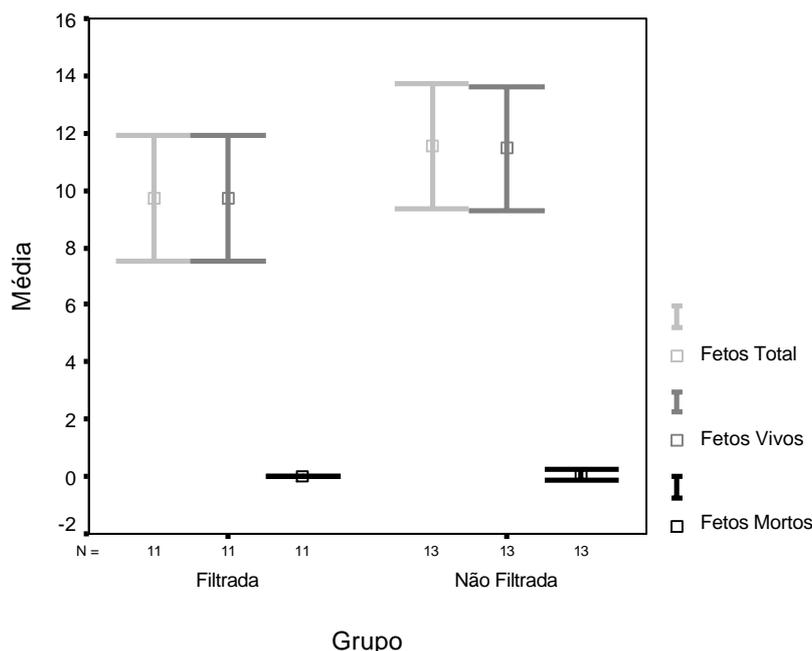


Figura 18. Número médio de fetos totais, vivos e mortos observados nos grupos exposto e não exposto à poluição ($p < 0,215$; $p < 0,231$ e $p < 0,369$, respectivamente).

Nas Figuras 19 e 20, observamos os valores médios da ocorrência de perdas pré-implantacionais e tardias (abortos) avaliada nos dois grupos. Diferentemente dos achados demonstrados em outros estudos, estes parâmetros de avaliação da qualidade da saúde fetal, não sofreu qualquer impacto decorrente da exposição à poluição, pois a ocorrência destes eventos foi semelhante entre os dois grupos analisados.

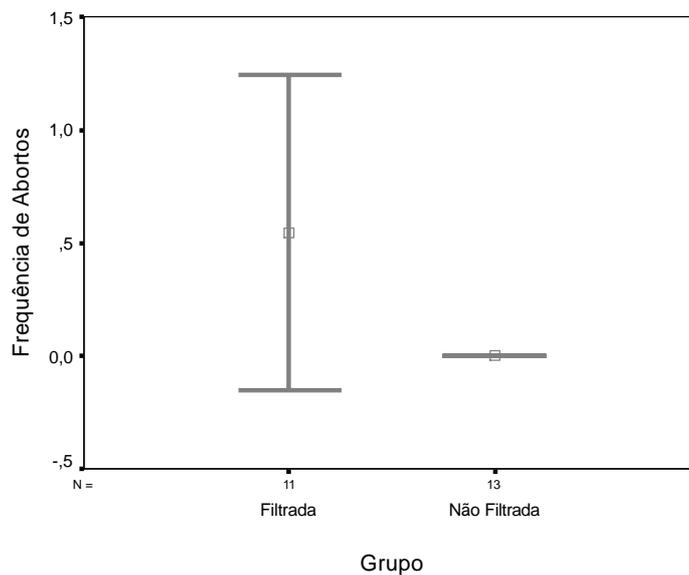


Figura 19. Frequência de abortos observados nos cornos uterinos das fêmeas provenientes dos grupos Câmara Filtrada e Não Filtrada ($p < 0,070$).

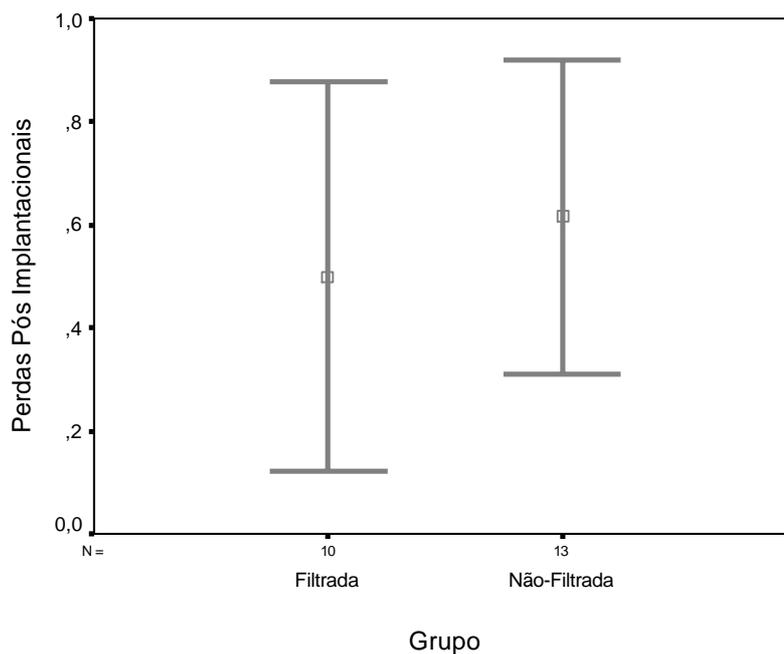


Figura 20. Frequência de perdas pós implantacionais presentes no útero das fêmeas dos grupos exposto e não exposto à poluição ($p < 0,863$).

No entanto, quando determinamos o sexo dos fetos, observamos um decréscimo na razão sexual em torno de 24% da prole proveniente dos animais expostos à poluição. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,041$), sendo a razão sexual para o grupo exposto e não-exposto de 86,0 e 134,0, respectivamente (Figura 21).

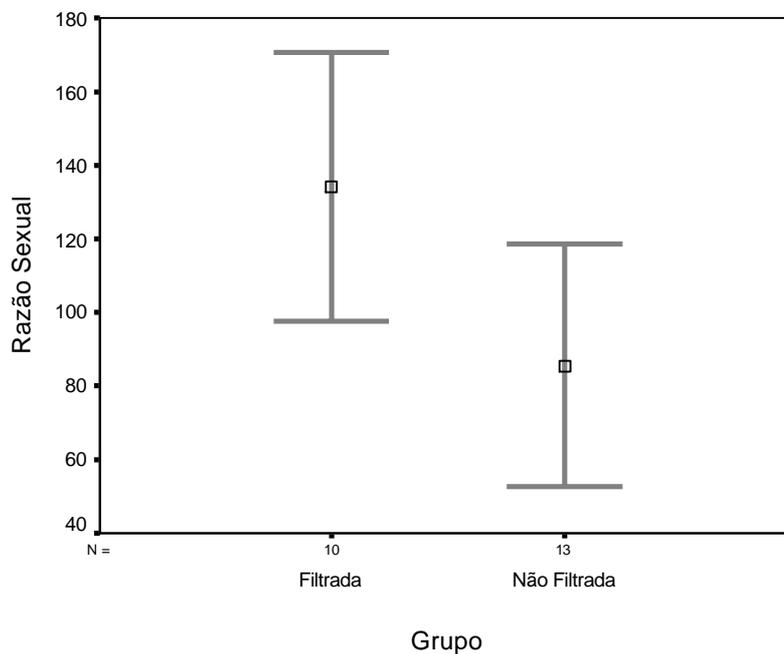


Figura 21. Razão média entre nascimentos de machos e fêmeas nos grupos exposto e não exposto à poluição ($p < 0,041$).

A avaliação dos efeitos da poluição sobre o retardo de crescimento intrauterino dos fetos foi investigada através da massa corpórea destes animais. O peso médio dos animais expostos à poluição foi semelhante ao grupo não exposto ($p < 0,209$), como pode ser observado na Figura 22.

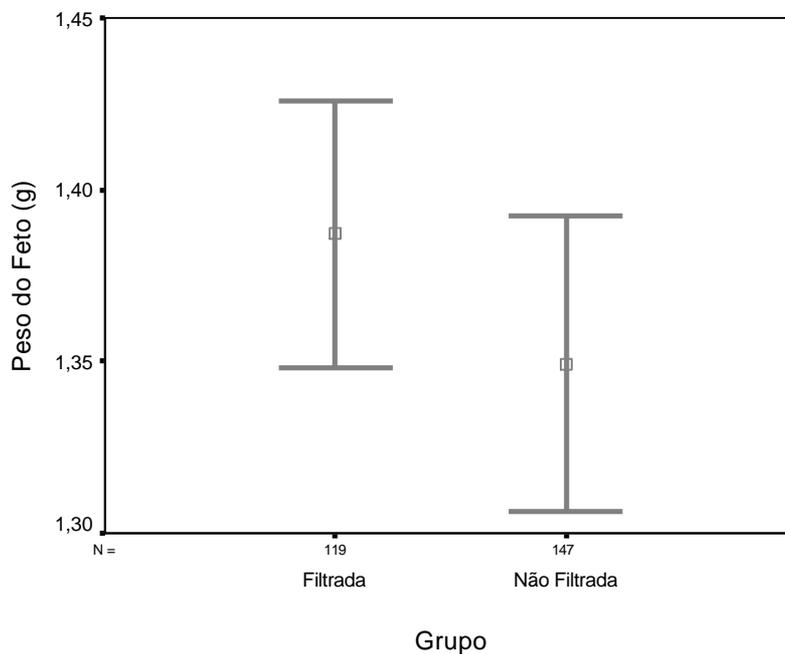


Figura 22. Peso médio dos fetos provenientes das Câmaras Filtrada e Não Filtrada ($p < 0,209$).

No entanto, quando avaliamos o peso das placentas, observamos uma diminuição significativa da massa do tecido placentário dos animais expostos à poluição ($p = 0,00$), indicando desta forma, que este órgão apresentou um desenvolvimento inadequado durante a sua formação (Figura 23).

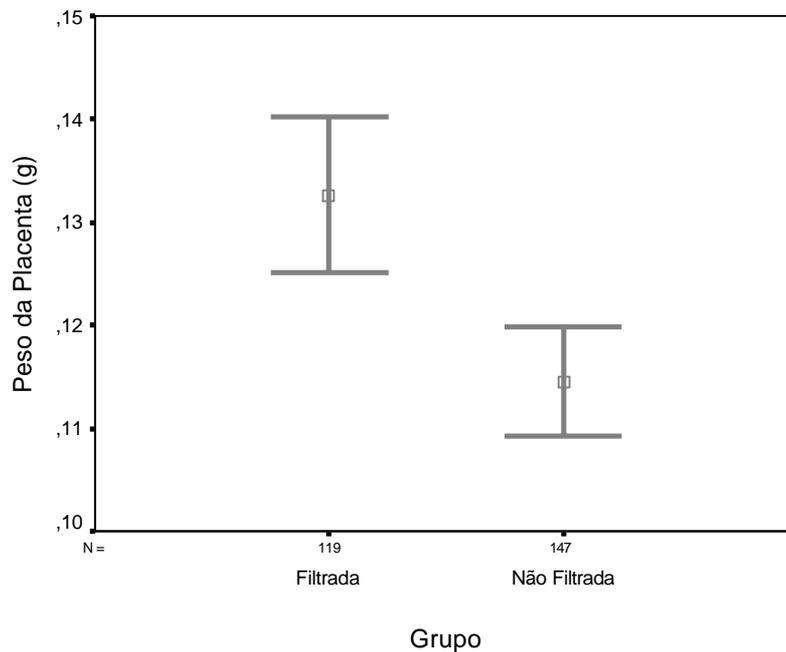


Figura 23. Peso médio das placentas provenientes das fêmeas dos grupos exposto e não exposto à poluição ($p=0,00$).

A relação peso fetal/peso placentário demonstrou de forma semelhante, uma redução significativa no grupo exposto ($p<0,02$). Esses resultados sugerem um descompasso entre o desenvolvimento fetal e tecidos extraembrionários e em última instância, um prejuízo na funcionalidade placentária (Figura 24).

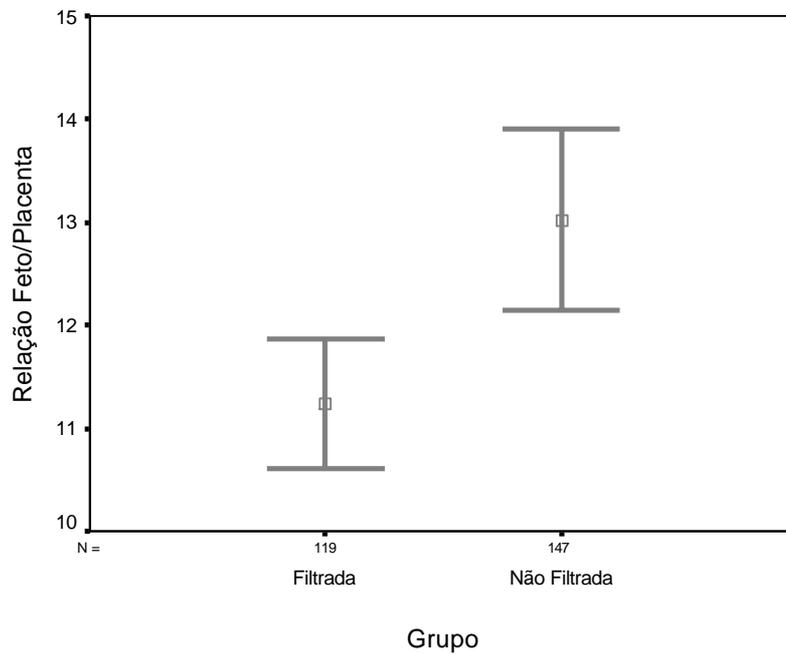


Figura 24. Relação entre as médias dos pesos fetais e das placentas das fêmeas provenientes dos grupos exposto e controle ($p < 0,02$).

5. Discussão

5. Discussão

O presente estudo aborda uma outra face do impacto da poluição atmosférica sobre a saúde humana, pois explora desfechos reprodutivos ainda não investigados na população da cidade de São Paulo.

A fim de avaliarmos os efeitos da poluição sobre a razão sexual, desenvolvemos duas abordagens, uma epidemiológica e outra com animais de experimentação.

No estudo epidemiológico observamos uma associação direta entre níveis ambientais de poluição e mudanças na razão sexual.

Dividindo-se a cidade de São Paulo em três regiões de acordo com gradientes de concentração de material particulado (PM10), baixo, moderado e alto, observou-se uma redução da razão sexual em torno de 1% representados por 1.180 nascimentos masculinos na população exposta ao gradiente mais alto de poluição.

Analisando os achados na literatura, observamos que há evidências plausíveis de que a razão sexual vem diminuindo ao longo dos anos (Davis *et al.*, 1998). A principal hipótese que justifica a diminuída razão sexual observada nas últimas décadas é a exposição dos indivíduos à poluição química ambiental e ocupacional.

A redução no número de nascimentos masculinos tem sido observada em populações expostas à dioxina, ao mercúrio, as bifenilas policloradas e ao fumo parental (Mocarelli *et al.*, 2000; Sakamoto *et al.*, 2001; Fukuda *et al.*, 2002; Garry *et al.*, 2003; Weisskopf *et al.*, 2003).

Diversos estudos investigaram a razão sexual de comunidades expostas a diferentes fontes de poluição atmosférica, porém os resultados mostraram-se conflitantes.

Observou-se um decréscimo na razão sexual em áreas residenciais próximas a um incinerador local (Williams *et al.*, 1992); Por outro lado, um aumento na razão sexual foi demonstrado em populações expostas à emissão de poluentes de uma siderúrgica (Lloyd *et al.*, 1984 e 1985), bem como à emissão de gás natural (Saadat *et al.*, 2002) e de indústria petroquímica (Yang *et al.*, 2000); No entanto, nenhum efeito foi observado em exposições à poluição atmosférica de forma geral (Williams *et al.*, 1995).

Uma hipótese que justifique esta heterogeneidade de achados é que diferentes poluentes podem afetar a razão sexual através de múltiplos mecanismos podendo, portanto, causar taxas anormalmente altas ou baixas de proporção masculina.

Como em qualquer abordagem epidemiológica, diversos fatores podem interferir na diferenciação sexual de um indivíduo. Estes fatores incluem a idade parental, a condição sócio-econômica, o perfil hormonal dos genitores durante a concepção, a utilização de técnicas de reprodução assistida, bem como exposições ocupacionais e a poluentes ambientais.

O estudo epidemiológico ora apresentado não avaliou a possível influência de fatores de confusão que poderiam ter um efeito sinérgico ou aditivo sobre a poluição.

A associação entre indicadores sociais, como a desvantagem étnica e/ou econômica, com o aumento do risco de exposição ambiental, levou a

criação do conceito de “justiça ambiental” ou “racismo ambiental”, que se baseia nas observações de que riscos ambientais e injustiça social são fatores coincidentes nas populações estudadas (Silbergeld & Patrick, 2005).

A exposição às substâncias tóxicas aliadas a aspectos dos ecossistemas físicos, biológicos, sociais, culturais e econômicos das populações expostas são fatores que interagem, tornando a avaliação dos efeitos da poluição sobre o aparelho reprodutivo muito complexa. Normalmente se observa que inadequadas condições de trabalho, carência de alimentação e estrutura sanitária, bem como limitado acesso à assistência médica, constituem-se do ponto de vista sócio-econômico, em marcadores de degradação ambiental.

No entanto, nota-se que os efeitos adversos da poluição não são restritos aos países em desenvolvimento; mesmo em economias desenvolvidas, a poluição ainda é abundante.

Apesar da interferência desses fatores nos nossos resultados não ter sido avaliada, com todo corpo de evidências descrito na literatura, não podemos minimizar a influência da poluição nos desfechos reprodutivos observados, mas sim ponderar que a poluição tem o seu efeito, porém expresso em diferentes graus de acordo com a prevalência de outros fatores envolvidos conjuntamente com a exposição.

A utilização de animais de laboratório como sentinelas de avaliação toxicológica é um poderoso instrumento para a análise dos riscos à poluição atmosférica, pois nos permite a combinação de elementos mais controlados

com a exposição direta aos níveis ambientais de poluição (Reichrtova *et al.*, 1995).

A fim de conferir plausibilidade biológica aos nossos achados epidemiológicos realizamos um experimento com roedores, onde camundongos machos e neonatos foram expostos aos níveis ambientais da poluição da cidade de São Paulo.

Dois grupos de animais foram concomitantemente expostos em câmaras de topo aberto localizadas lado a lado, sendo que uma das câmaras recebeu ar filtrado e a outra, o ar íntegro, sem filtragem.

Quando avaliamos a razão sexual da prole dos animais, observamos achados similares aos dados epidemiológicos; uma redução significativa no número de nascimentos masculinos foi observada nos animais mantidos na câmara não-filtrada, conferindo, portanto um efeito da poluição sobre a diferenciação sexual.

Os parâmetros monitorados no ambiente interno das câmaras durante todo o período experimental, demonstram que as variáveis como temperatura, umidade relativa e ciclo de luz (12/12) foram semelhantes nas duas câmaras. Variáveis nutricionais também não podem ser atribuídas como co-fatores na indução dos desfechos reprodutivos observados, uma vez que a alimentação e o fornecimento de água foram administrados de forma padronizada para os dois grupos. No entanto, a massa média corpórea e o histórico de desenvolvimento da geração parental foi significativamente diferente entre os dois grupos.

Uma vez que algumas variáveis de confusão puderam ser efetivamente mais controladas, podemos atribuir, portanto, de forma mais segura, que os efeitos observados sobre a razão sexual no modelo experimental decorrem da variação da qualidade do ar entre a câmara filtrada e não filtrada.

O monitoramento dos poluentes no ambiente interno das câmaras mostrou uma eficiência de filtração de 100% para o *black carbon*, 55% para o PM_{2,5} e 35% para o NO₂. Apesar da redução de PM_{2,5} ter sido em torno de 55%, a eficiência de filtração deve provavelmente ter sido mais elevada, uma vez que essa fração abrange a classe de material particulado fino e portanto, retida pelo filtro de alta eficiência (HEPA). Talvez um mecanismo de ressuspensão possa ter elevado esses valores, apesar das câmaras terem sido limpas três vezes por semana.

As reduções de concentração de NO₂ podem, por outro lado, também ter sido subestimadas, pois estudos anteriores realizados nestas mesmas câmaras, mostraram reduções em torno de 60-70% e 50%, para o NO₂ e PM_{2,5}, respectivamente (Guimarães, 2003; Mohallem *et al.*, 2005). Desta forma, esta discrepância de resultados pode ser intrínseca a utilização de diferentes metodologias empregadas e, portanto não reflita a real filtração para este gás.

Quais componentes da poluição atmosférica induzem alterações na razão sexual do organismo não é sabido. É importante reconhecer que a poluição é uma mistura complexa envolvendo múltiplas substâncias; desta

forma estabelecer casualidade entre um único composto e efeitos adversos torna-se difícil.

Em algumas circunstâncias torna-se possível à identificação precisa do poluente sobre os desfechos reprodutivos, como por exemplo, no caso dos metais. Em outros casos, no entanto, os efeitos adversos são o resultado de exposições a uma mistura complexa tais como substâncias provenientes da queima de biomassa, emissões industriais e automotivas ou substâncias que alteram o sistema endócrino.

A poluição atmosférica da cidade de São Paulo predominantemente produzida pela frota automotiva emite poluentes primários como os gases monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrogênio (NO_x), dióxido de enxofre (SO₂), material particulado (PM), incluindo os metais adsorvidos, compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PHAs) e compostos originados secundariamente na atmosfera como o ozônio (O₃) e os nitratos de peroxiacetil (PAN).

Os testículos são considerados órgãos alvo para a ação dos contaminantes ambientais. Mudanças na função ou no desenvolvimento da linhagem germinativa masculina podem ser um dos fatores responsáveis pelas alterações na razão sexual observada.

A avaliação dos parâmetros reprodutivos dos animais expostos à poluição mostrou que houve uma mudança na qualidade do sêmen com uma redução da concentração dos espermatozoides e alterações no perfil celular da linhagem germinativa.

Embora a reprodução masculina possa ser afetada por uma variedade de mecanismos que afetam o balanço hormonal e outros sistemas metabólicos, distúrbios da diferenciação da linhagem germinativa e da qualidade do espermatozóide, parecem envolver duas diferentes rotas de exposição.

Um estudo de coorte correlacionou alterações na qualidade do sêmen, níveis hormonais e alterações na razão sexual. A razão sexual dos descendentes de homens expostos ao inseticida dibromocloropropano foi de 0.352, contrariamente a razão sexual de filhos concebidos anteriormente à exposição (0.529). Dentre os indivíduos que apresentaram oligozoospermia e azoospermia a razão sexual atingiu valores de 0.162. Embora os níveis sanguíneos de testosterona nesses indivíduos fossem normais, os de gonadotrofina mostraram-se aumentados (Goldsmith *et al.*, 1984).

Em uma recente revisão, Jongbloet *et al.* (2002), propuseram que alteração na razão sexual causada pela exposição à dioxina é devida principalmente as suas propriedades antiestrogênicas, que entre outros efeitos, podem alterar o tempo de permanência do espermatozóide no epidídimo e, portanto sujeitá-lo a um período maior de ação por parte das enzimas locais.

Os estrógenos ambientais podem atuar diretamente sobre as células da linhagem germinativa dentro dos testículos maduros, diminuindo a função e/ou o desenvolvimento das células de Leydig, afetando desta forma, a produção de testosterona. Podem inibir também a ação dos receptores

moleculares para testosterona e outros hormônios e suprimir a expressão do hormônio de crescimento do testículo fetal (Silberg & Patrick, 2005).

Estas alterações na qualidade do sêmen aliadas às propriedades xenoestrogênicas das dioxinas e furanos presentes na poluição atmosférica podem ter sido responsáveis pela alteração na proporção masculina como observado por Dhooge *et al.* (2001), que avaliando indivíduos residentes de áreas industriais demonstraram uma redução na qualidade do sêmen e alterações endócrinas.

No presente estudo, faltaram-nos dados para estimarmos os níveis de poluentes designados estrógenos ambientais. No entanto, sabe-se que as concentrações de estrógenos ambientais são positivamente correlacionadas com os poluentes PM, e SO₂ (Yang *et al.*, 2000).

A alta taxa de proliferação e mecanismos de reparo de danos ao DNA característicos das espermatogônias (células precursoras da espermatogênese), significam que a linhagem germinativa tem uma das menores taxas de mutação dentre as células de um dado organismo (Aitken *et al.*, 2004). No entanto, a medida que estas células entram em meiose, a capacidade para reparo do DNA é reduzida e a habilidade para responder a tais danos através da indução da morte celular programada (apoptose) é perdida. Adicionalmente, uma vez que os espermatozoides são liberados do tecido germinativo, perdem a proteção conferida pelas células de Sertoli e pelas enzimas antioxidantes, tais como a catalase e a superóxido dismutase.

Essa perda de proteção bem como a ausência dos mecanismos de reparo ao dano genético e de auto-destruição, aliada à longa permanência

no epidídimo e no trato reprodutivo feminino, torna o DNA dos espermatozóides altamente vulneráveis ao dano, pela ação de diversos contaminantes ambientais.

A susceptibilidade das células germinativas ao *estresse* oxidativo observada na espécie humana tem sido investigada desde 1943. MacLeod (1943) citado por Aitken & Krauzs (2001), observou que espermatozóides humanos incubados sob altas tensões de oxigênio, perderam a motilidade, via mecanismos que puderam ser revertidos com a adição da enzima catalase ao meio.

Os fatores responsáveis pela excessiva geração de espécies reativas de oxigênio no sêmen de homens inférteis não bem estão compreendidos. No entanto, sabe-se que os espermatozóides humanos são particularmente vulneráveis ao *estresse* oxidativo devido ao grande enriquecimento de ácidos graxos insaturados da membrana plasmática, que são essenciais para a fluidez da membrana, associada aos eventos de fusão durante a fertilização (Jones & Sherins, 1979).

Aitken *et al.* (1989) observaram que a adição de íons ferro a suspensões de espermatozóides humanos resulta em uma acelerada peroxidação lipídica dose-dependente, com um concomitante decréscimo na motilidade e potencial de fertilização dessas células.

Metais presentes em grande quantidade nas partículas atmosféricas, tais como o cádmio, cromo e o chumbo acumulam-se nos testículos e promovem injúria tecidual (Danielsson *et al.*, 1984; Rodamilans *et al.*, 1998).

O decréscimo na concentração de enzimas antioxidantes presentes no epidídimo (glutaciona peroxidase e superóxido dismutase) e no fluido seminal (vitamina C, alfa tocoferol, tirosina, hipotaurina e ácido úrico) tem sido observado em ejaculado de pacientes e, portanto correlacionado com a infertilidade (Smith *et al.*, 1996, Barbieri *et al.*, 1999).

A indução de *estresse* oxidativo no tecido germinativo não só altera a capacidade de fertilização dos espermatozóides, mas também ataca a integridade do DNA nuclear e mitocondrial (Aitken & Krausz, 2001).

A fragmentação do DNA nuclear parece estar associada à perda da qualidade do sêmen, com alterações no número, na motilidade e na morfologia dessas células (Irvine *et al.*, 2000). Deleções nos genes sobre as regiões não recombinantes do cromossomo Y são responsáveis por 15% dos pacientes com azoospermia e 5-10% dos indivíduos com severa olizoospermia.

Rubes *et al.* (2005) avaliou a associação entre episódios de poluição atmosférica e parâmetros seminais. Observou uma associação significativa entre níveis altos de poluição e fragmentação do DNA, sem alteração dos outros parâmetros seminais, como concentração, motilidade e morfologia.

A redução de 15% na concentração dos espermatozóides dos animais expostos à poluição não alterou a sua fertilidade. Desta forma a implicação desses mecanismos nos nossos achados podem ser semelhantes ao observados em indivíduos fumantes. O ejaculado destes homens exibiu *estresse* oxidativo pela presença de dano de base ao DNA, alta fragmentação de cromatina e baixa concentração de vitaminas antioxidantes

(Fraga *et al.*, 1996). Embora a fertilidade tenha sido suprimida nestes indivíduos, eles permaneciam férteis.

Host *et al.* (2000) afirmam que a habilidade do embrião de sobreviver até o término da gestação parece estar correlacionada negativamente com o nível de fragmentação do DNA.

Podemos, portanto inferir que os espermatozóides alterados do sêmen dos animais mantidos na câmara não-filtrada, podem ter sido engajados no processo de fertilização, com conseqüências para a qualidade e viabilidade dos embriões masculinos.

Uma via alternativa para a etiologia das quebras de DNA observadas nos espermatozóides de homens inférteis envolve a apoptose mediada por Faz, que se constitui em um importante mecanismo pela qual as células de Sertoli regulam o número de células germinativas principalmente em períodos de *estresse* (Boekelheide *et al.*, 2000).

Raychoudhury & Kubinski (2003), incubando células de Sertoli de ratos com uma variedade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, observaram efeitos citotóxicos sobre as células do epitélio seminífero, com aumento da produção de lactato pelas células de Sertoli e alterações celulares, evidenciadas pelo mecanismo de apoptose.

No entanto, Sakkas *et al.* (1999), observou que pacientes oligozoospermicos possuem um grande número de espermatozóides, cujo conteúdo estava preenchido com Faz. Isto indica que essas células disfuncionais são produtos da incompleta cascata apoptótica.

Podemos inferir novamente que os espermatozóides dos animais expostos à poluição, com alterações no seu genoma, podem ter participado da fertilização e comprometido a viabilidade dos embriões. De outra forma a classe dos espermatozóides ligados ao Y no sêmen destes animais pode ter tido diferenças fisiológicas intrínsecas na sua viabilidade, capacitação ou dinâmica de reação acrossômica produzindo, portanto seletivamente mais embriões do sexo feminino (Gutierrez-Adan *et al.*, 1999; Madrid-Bury *et al.*, 2003).

Teoricamente, a determinação do sexo do embrião pode também ser atribuída a eventos que ocorrem antes da fertilização e que favorecem, portanto, a seleção de espermatozóides ligados ao cromossomo X ou Y.

De acordo com as descrições da literatura, a razão sexual primária, ou seja, a proporção de fertilização entre os espermatozóides X ou Y é de 1:1. Esta relação permanece constante mesmo quando se leva em consideração a idade do doador, em procedimentos de reprodução assistida como a criopreservação do sêmen e a seleção dos gametas para alta motilidade, bem como quando submetido à quimioterapia (Boklage, 2004).

Tiido *et al.* (2005), observaram um pequeno aumento na proporção de espermatozóides ligados ao cromossomo Y em ejaculados de homens expostos a organoclorados. Essa alteração na razão sexual primária foi atribuída a possível ocorrência de diversos mecanismos tais como apoptose, alterações endócrinas ou a formação de micronúcleos nos gametas ligados ao cromossomo X.

O quanto à exposição à poluição pode ter alterado a proporção entre os espermatozóides X ou Y nos animais expostos, nós não sabemos. No entanto, níveis ambientais de poluição foram mostrados aumentar a frequência de aneuploidia nos espermatozóides, principalmente representada pela dissomia YYX, uma situação que potencialmente favorece a perda de fetos masculinos (Sram *et al.*, 1999).

Todos estes mecanismos operantes durante o período crítico de diferenciação sexual podem afetar a determinação fenotípica bem como o desenvolvimento subsequente do feto (Aitken *et al.*, 2004).

A segunda rota de exposição aos contaminantes ambientais exerce uma influência sobre as células germinativas e o tecido somático do aparelho reprodutivo masculino com conseqüências que incluem mudanças patológicas coletivamente chamadas como síndrome da digenesia testicular (TDS) do recém nascido.

Os perfis da TDS incluem reduzida qualidade seminal, hipospadias, câncer testicular e criptorquidia. Os vários sintomas da TDS têm fatores de risco comuns, tais como baixo peso, placenta retida e histórico prévio de gestação, apoiando a idéia que há uma causa comum envolvendo a perturbação do desenvolvimento fetal normal (Skakkebaek, 2004).

Tumor testicular derivado de células germinativas (o mais comum entre homens de 15 a 35 anos nos países do oeste americano), desenvolve-se a partir de um carcinoma *in situ* que deriva de estágios precoces do desenvolvimento do testículo fetal.

A avaliação dos efeitos da poluição sobre os fetos demonstra que a exposição intra-uterina também teve um papel importante nos desfechos reprodutivos observados. Fêmeas maduras reprodutivamente e não expostas á poluição foram introduzidas nas câmaras para acasalamento e mantidas nos respectivos ambientes por todo o período gestacional (até o 19º dia). A avaliação da prole destes animais mostrou uma redução significativa da massa corpórea dos fetos provenientes da câmara não-filtrada.

Diversos estudos epidemiológicos têm demonstrado uma associação entre saúde fetal e níveis ambientais de poluição. Parâmetros como baixo peso ao nascer (LBW), retardo de crescimento intra-uterino (IUGR) e idade gestacional (parto precoce) (PTB) são comumente utilizados como indicadores.

Nos estudos epidemiológicos, preconiza-se que aumentos no risco do baixo peso ao nascer (<2500 g) do retardo de crescimento intra-uterino (peso abaixo de 10% do esperado para a idade gestacional e o sexo do feto) e da incidência de parto precoce (<37 semanas de gestação), são atribuíveis a eventos causais. (Maisonet *et al.*, 2004; Sram *et al.*, 2005).

Prévios estudos indicam que concentrações ambientais de CO, NO₂, SO₂ e PTS durante o primeiro trimestre de gestação foram associados com baixo peso (Ha *et al.*, 2001).

Em 2003, Lee *et al.*, também investigando quais trimestres gestacionais seriam mais susceptíveis aos efeitos da poluição demonstrou que exposição do primeiro e segundo trimestres foram associados com o

risco de baixo peso, sendo que o risco para o LBV aumentou com a exposição ao CO entre o 2º e 5º mês de gestação, e com SO₂ e NO₂ entre o 3º e 5º mês de gestação. As concentrações de PM10 foram correlacionadas ao LBV nos 2º e 4º meses.

A restrição do crescimento uterino tem sido associada com exposição a poluentes nas primeiras fases do período gestacional. O aporte de nutrientes e oxigênio são fatores chaves no desenvolvimento fetal.

Sabe-se que a exposição aos níveis ambientais de CO e NO₂ podem resultar respectivamente, na formação da carboxihemoglobina e metahemoglobina, no sangue materno e, portanto resultar no decréscimo de aporte de oxigênio aos tecidos, incluindo o feto.

A inalação das partículas atmosféricas, em contraste, tem sido demonstrada alterar parâmetros hematológicos. O aumento na viscosidade sanguínea e no fibrinogênio do plasma materno pode influenciar a perfusão sanguínea, alterando a função placentária e conseqüentemente restringir o crescimento fetal (Ha *et al.*, 2001). Alguns tóxicos podem ainda atravessar a barreira placentária e exercer efeitos diretos sobre o desenvolvimento fetal (Dejmek *et al.*, 1999).

A inflamação no tecido da placenta pode também ter um importante papel na fisiopatologia entre efeitos da poluição atmosférica e LBW. É possível que a poluição leve a inflamação da placenta diminuindo assim a sua função (Dexter *et al.*, 2000). Salafia *et al.* (1995) demonstrou que a presença de inflamação crônica na placenta restringiu o crescimento fetal independente da vasculopatia placentária.

Recentes achados sugerem que a patogênese envolvida no LBW e IUGR é decorrente de distorções da morfogênese nas fases iniciais da placentação (Duvekov *et al.*, 1995). Estas distorções podem ser resultantes de uma alterada invasão trofoblástica que resulta em alterações na implantação e desenvolvimento hemodinâmico materno (Roberts *et al.*, 1991).

Roberts *et al.* (1991) observaram também que exposição à poluição atmosférica nas fases iniciais do período gestacional pode causar insuficiente formação trofoblástica e conseqüentemente acarretar na inadequada vascularização placentária. Semelhantes achados também foram observados por Duvekov *et al.* (1995).

Um outro mecanismo possivelmente envolvido na redução do peso fetal é a indução da poluição sobre a formação de adutos de DNA no tecido placentário (Topinka *et al.*, 1997).

Estudos demonstram que mães expostas a altos níveis de poluição apresentaram uma maior prevalência de adutos de DNA (Perera *et al.*, 1998), semelhantes a esses induzidos pelo cigarro (Petruzzelli *et al.*, 1998). Postula-se que deva haver uma associação entre adutos de DNA e crescimento fetal, uma vez que alguns estudos mostram que fetos nascidos com uma maior formação de adutos apresentaram desenvolvimento (peso e altura) aquém do esperado.

O conjunto dessas alterações durante a formação do tecido embrionário pode em última instância, resultar em redução do crescimento fetal, bem como uma inadequada adaptação aos componentes nutricionais,

com subseqüentes mudanças na estrutura e função de órgãos e tecidos do novo indivíduo.

Preconiza-se que a seletiva reabsorção ou a perda fetal constitui-se nos mecanismos finais de alteração da razão sexual como uma resposta adaptativa a pressões seletiva ambiental ou maternal (Jimenez *et al.*, 2001).

A redução da sobrevivência observada na progênie masculina antes e após o nascimento é um achado constante em mamíferos. Morbidade e mortalidade prevalentes em cada fase do desenvolvimento da espécie humana permanecem elevadas durante o período neonatal, na infância, na adolescência e na idade adulta (razão sexual terciária), (Smith, 1989).

Análises dos registros de nascimentos na Noruega revelam que os embriões do sexo masculino parecem ser mais sensíveis ao *estresse* uterino e provavelmente apresentam uma maior freqüência de relatos de abortos do que embriões femininos (Vatten & Skjaerven, 2004).

A freqüência de abortos tardios na prole dos animais expostos à poluição foi semelhante entre os dois grupos. O decréscimo no número de nascimentos masculinos nos animais pode ser decorrente entre outros mecanismos, de alterações morfológicas ou perdas pré-implantacionais, como observado no estudo de Hales & Robaire (2001).

Mohallem *et al.* (2005), expondo camundongos em câmaras de topo aberto à poluição de São Paulo demonstrou um aumento na taxa de perdas fetais tardias e na incidência de falências implantacionais.

Efeitos nos padrões de fertilidade como índice de acasalamento e de gestação não foram observados nestes animais. No entanto de acordo com

a literatura, estes parâmetros de fertilidade não são considerados marcadores sensíveis para a detecção de efeitos adversos de compostos tóxicos, uma vez que uma redução abrupta (em torno de 70%) no decréscimo da concentração dos espermatozoides viáveis é requerida para significativamente alterar a fertilidade em roedores (Mangelsdorf *et al.*, 2003).

O corpo de evidências presente na literatura freqüentemente associa a fertilidade como o único efeito adverso dos contaminantes sobre o aparelho reprodutivo masculino (Whorton, 1986). No entanto, estudos epidemiológicos têm associado a exposição paternal com a qualidade e a sobrevivência da descendência (Schnitzer *et al.*, 1995).

Estudos toxicológicos clássicos usualmente não avaliam a exposição paternal isoladamente; no entanto, a perda do embrião nos estágios mais precoces do desenvolvimento é o efeito mais comumente observado nessas condições.

A preocupação com o efeito dos compostos químicos sobre as gerações futuras baseia-se principalmente, no fato de já existirem inúmeras evidências mostrando sua interferência no processo de gametogênese de mamíferos, inclusive no homem. O efeito deletério das mutações, resultante da exposição às substâncias genotóxicas, se reflete na percentagem de defeitos gênicos e aberrações cromossômicas presentes nos recém-nascidos, natimortos e abortos espontâneos. A maioria dessas anomalias surge de uma mutação nova, na linhagem germinativa parental (Evans, 1977).

Camundongos expostos aos níveis ambientais de poluição proveniente de regiões urbano-industriais mostraram um aumento na frequência de mutações hereditárias do DNA, no locus (ESTR), (Sommers *et al.*, 2002). Quando os animais foram transferidos para locais com menor concentração de poluição, o efeito de transmissão das mutações aos descendentes pôde ser revertido (Sommers *et al.*, 2004). Este efeito foi caracterizado como proveniente de alterações na linhagem germinativa paternal.

No protocolo experimental os animais foram expostos cronicamente à poluição (por um período de quatro meses) e a partir do décimo dia de vida. Essa exposição anterior ao acasalamento aliada à fase de desenvolvimento dos animais indica que a poluição afetou a linhagem germinativa masculina.

As conseqüências da exposição paternal em fases anteriores a maturidade sexual são descritas como cruciais para o processo reprodutivo. Esta vulnerabilidade pode ser observada em protocolos de animais expostos a pesticidas e a poluição atmosférica.

A queda na qualidade do sêmen humano, aliada a crescente exposição a contaminantes ambientais denota uma preocupação quanto à integridade do processo reprodutivo das gerações futuras.

Apesar de algumas incertezas na relação entre razão sexual e exposição ambiental, mudanças na proporção masculina aliada a indicadores como mortalidade infantil e perinatal, tem sido sugerida como um marcador não invasivo de saúde reprodutiva, podendo, portanto, ser utilizado como um indicador de saúde pública, pois reflete a perda de um

embrião em estágios anteriores ao desenvolvimento fetal (Williams *et al.*, 1995).

6. Conclusões

6 Conclusões

✓ Os níveis ambientais de poluição atmosférica da cidade de São Paulo exercem um efeito sobre a razão sexual, diminuindo a proporção do sexo masculino nas áreas mais poluídas.

✓ Os animais expostos à poluição apresentaram alterações no aparelho reprodutivo, com um decréscimo na concentração do sêmen e alterações significativas na linhagem germinativa;

✓ O estudo experimental da mesma forma que o epidemiológico, demonstrou que a exposição aos níveis ambientais de poluição, pode influenciar a razão sexual;

✓ A diminuição na razão sexual não foi resultante de perdas fetais, sugerindo, portanto, outros mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesta alteração;

✓ A exposição à poluição em fases anteriores a maturidade sexual exerceu efeitos deletérios sobre a reprodução;

✓ Da mesma forma como o exposto acima, a exposição à poluição atmosférica exerceu efeitos intra-uterinamente, evidenciados

pelas alterações placentárias observadas nos animais provenientes do ambiente não filtrado.

✓ Finalmente, apesar de algumas incertezas na relação entre razão sexual e exposição ambiental, mudanças na proporção masculina aliada a alterações nos parâmetros seminais, podem ser utilizados como marcadores de efeitos sobre o aparelho reprodutivo masculino e sobre as gerações futuras.

7. Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas *

ABNT. Material particulado em suspensão na atmosfera – determinação da concentração de fumaça pelo método da refletância da Luz. NBR 10736, Set., 1989.

Acacio BD, Gottfried T, Israel R, Sokol RZ. Evaluation of a large cohort of men presenting for a screening semen analysis. *Fertil Steril*. 2000; 73(Suppl 3):595-7.

Adamopoulos DA, Pappa A, Nicopoulou S, Andreou E, Karamertzanis M, Michopoulos J, Deligianni V, Simou M. Seminal volume and total sperm number trends in men attending subfertility clinics in the Greater Athens area during the period 1977-1993. *Hum Reprod*. 1996; 11(Suppl 9):1936-942.

Aitken RJ, Clarkson JS and Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod*. 1989; 41:183-87.

Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001;122(Suppl 4):497-506.

Aitken RJ, Koopman P, Lewis SE. Seeds of concern. *Nature* 2004; 432(Suppl 7013):48-52.

Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med*. 1995; 332(Suppl 5):327-8.

Bahadur G, Ling KLE, Katz M. Statistical modelling reveals demography and time are main contributing factors in global sperm count changes between 1938 and 1996. *Hum Reprod.*, 1996; 11:2635-639.

Barbieri ER, Hidalgo ME, Venegas A, Smith R and Lissi EA. Varicocele-associated decrease in antioxidant defenses. *J. Androl.* 1999; 20:713–17.

Bartleby.com. 2003. Sex ratio. In: *The World Factbook*. Washington, DC:Central Intelligence Agency. Available: <http://www.bartleby.com/151/fields/27.html>

Bobak M. Outdoor air pollution, low birth weight, and prematurity. *Environ Health Perspect.* 2000; 108(Suppl 2):173-76.

Boekelheide K, Fleming SL, Johnson KJ, Patel SR, Schoenfeld HA. Role of Sertoli cells in injury-associated testicular germ cell apoptosis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000; 225(Suppl 2):105-15.

Boklage CE. The epigenetic environment: secondary sex ratio depends on differential survival in embryogenesis. *Hum Reprod.* 2005; 20(Suppl 3):583-87.

Bujan L, Mansat A, Pontonnier F, Mieusset R Time series analysis of sperm concentration in fertile men in Toulouse, France between 1977 and 1992. *BMJ.* 1996; 312(Suppl 7029):471-72.

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* 1992; 305:609-13.

CETESB. Relatório de qualidade do ar do estado de São Paulo 2003. Série Relatório-Secretaria do Estado do Meio Ambiente. São Paulo: CETESB; 2003. Disponível em: URL: <http://www.cetesb.sp.gov.br/AR>

Cunliffe-Beamer TL, Les EP. The laboratory mouse. The care and management of laboratory animals, 6th ed., p.284-291, 1987.

Danielsson BR, Dencker L, Lindgren A, Tjalve H. Accumulation of toxic metals in male reproduction organs. Arch Toxicol Suppl. 1984;7:177-80.

Danzo BJ. Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins. Environ Health Perspect. 1997;105(Suppl 3):294-301.

Davis DL, Gottlieb MB, Stampnitzky JR. Reduced ratio of male to female births in several industrial countries: a sentinel health indicator? JAMA. 1998; 279(Suppl 13):1018-23.

Dejmek J, Selevan SG, Benes I, Solansky I, Sram RJ. Fetal growth and maternal exposure to particulate matter during pregnancy. Environ Health Perspect. 1999;107(Suppl 6):475-80.

De Rosa M, Zarrilli S, Paesano L, Carbone U, Boggia B, Petretta M, Maisto A, Cimmino F, Puca G, Colao A, Lombardi G. Traffic pollutants affect fertility in men. Hum Reprod. 2003; 18(Suppl 5):1055-61.

Derésio, JC. Introdução ao controle da poluição ambiental. 2000, ed. Signus, 2^a edição.

Dexter SC, Pinar H, Malee MP, Hogan J, Carpenter MW, Vohr BR. Outcome of very low birth weight infants with histopathologic chorioamnionitis. *Obstet Gynecol.* 2000;96(Suppl 2):172-77.

Dhooge W, Stuyvaert S, Kaufman JM, Koppe G, Nele V, Schoeters G, van Larebeke N, Comhaire F. Observations as to male fertility in the Flemish environment and health studies. *Folia Histochem Cytobiol.* 2001;39(Suppl 2):38-9.

Dulskiene V & Maroziene L. Impact on environmental factors on the reproductive system and fetal development. *Medicina (Kaunas)* 2002; 38(Suppl 11):1072-77.

Duvekot JJ, Cheriex EC, Pieters FA, Peeters LL. 1995. Severely impaired growth is preceded by maternal hemodynamic maladaptation in very early pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 74:693-97.

El Feki A, Ghorbel F, Smaoui M, Makni-Ayadi F, Kammoun A. Effects of automobile lead on the general growth sexual activity of the rat. *Gynecol Obstet Fertil.* 2000; 28(Suppl 1): 51-9.

Evans HJ. Chromosome anomalies among live births. *J Med Genet.* 1977; 14: 309-12.

Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM, Ames BN. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res.* 1996; 351(Suppl 2):199-203.

Fukuda M, Fukuda K, Shimizu T, Andersen CY, Byskov AG. Parental periconceptional smoking and male:female ratio of newborn infants. *Lancet* 2002; 359:407-08.

Garry VF, Holland SE, Erickson LL, Burroughs BL. Male reproductive hormones and thyroid function in pesticide applicators in the Red River Valley of Minnesota. *J Toxicol Environ Health A*. 2003;66(Suppl 11):965-86.

Goldsmith JR, Potashnik G, Israeli R. Reproductive outcomes in families of DBCP-exposed men. *Arch Environ Health*. 1984;39(Suppl 2):85-9.

Gouveia N, Bremner SA, Novaes HMD. Association between ambient air pollution and birth weight in São Paulo, Brasil. *J. Epidem. Comm. Health*. 2004 58:11-17.

Guimarães ET. Poluição atmosférica urbana na cidade de São Paulo e mutagênese: avaliação de riscos utilizando-se bioindicadores vegetais do gênero *tradescantia* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2003.

Gutierrez-Adan A, Garnelo P, Granados J, Garde JJ, Pérez-Guzman M, Pintado B, De La Fuente J. Relationship between sex ratio and time of insemination according to both time of ovulation and maturational state of oocyte. *Zygote* 1999; 7:37-43.

Ha EH, Hong YC, Lee BE, Woo BH, Schwartz J, Christiani DC. Is air pollution a risk factor for low birth weight in Seoul. *Epidemiology* 2001;12(Suppl 6):643-8.

Haidl G, Jung A, Schill WB. Ageing and sperm function. *Hum Reprod*. 1996 11:558-560,

Hales BF, Robaire B. Paternal exposure to drugs and environmental chemicals: effects on progeny outcome, *J Androl*. 2001; 22:927–936.

Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2000; 79(Suppl 7):559-63.

Irvine S, Cawood E, Richardson D, MacDonald E, Aitken J. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *BMJ.* 1996; 312(Suppl 7029):467-71.

Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl.* 2000; 21(Suppl 1):33-44.

James WH. Further evidence that mammalian sex ratios at birth are partially controlled by parental hormone levels around the time of conception. *Hum. Reprod.* 2004;19:1250-256.

Jimenez A, Gutierrez-Adan A, de la Fuentes R, Pintado B. Relationship between time to synchrony of embryo transfer and sex ratio on mice. *Theriogenology* 2001; 55:500 (abstract).

Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril.* 1979; 31(Suppl 5):531-37.

Jongbloet PH, Roeleveld N, Groenewoud HM. Where the boys aren't: dioxin and the sex ratio. *Environ Health Perspect.* 2002;110(Suppl 1):1-3.

Jongbloet PH. Over-ripeness ovopathy: a challenging hypothesis for sex ratio modulation. *Hum Reprod.* 2004;19(Suppl 4):769-74.

Kelce WR, Monosson E, Gray LE Jr. An environmental antiandrogen. *Recent Prog Horm Res.* 1995; 50:449-53.

Lee BE, Ha EH, Park HS, Kim YJ, Hong YC, Kim H, Lee JT. Exposure to air pollution during different gestational phases contributes to risks of low birth weight. *Hum Reprod.* 2003; 18(Suppl 3):638-43.

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

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

Liu S, Krewski D, Shi Y, Chen Y, Burnett RT. Association between gaseous ambient air pollutants and adverse pregnancy outcomes in Vancouver, Canada. *Environ Health Perspect.* 2003; 111(Suppl 14):1773-778.

Lloyd OL, Lloyd MM, Holland Y. An unusual sex ratio of births in an industrial town with mortality problems. *Br J Obstet Gynaecol.* 1984;91(Suppl 9):901-7.

Lloyd OL, Smith G, Lloyd MM, Holland Y, Gailey F. Raised mortality from lung cancer and high sex ratios of births associated with industrial pollution. *Br J Ind Med.* 1985;42(Suppl 7):475-80.

Lodge JP. *Methods of air sampling and analysis.* 3^o edição. Intersociety Committee, Lewis Publishers, Inc., 1989, pp.399-402.

Mackenzie CA, Lockridge A, Keith M. Declining sex ratio in a first nation community. *Environ Health Perspect.* 2005;113(Suppl 10):1295-298.

MacLeod J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa *Am J Physiol.* 1943, 138:512-18.

Madrid-Bury N, Fernandez R, Jimenez A, Perez-Garnelo S, Moreira PN, Pintado B, de la Fuente J, Gutierrez-Adan A. Effect of ejaculate, bull, and a double swim-up sperm processing method on sperm sex ratio. *Zygote* 2003; 11:229-35.

Maisonet M, Correa A, Misra D, Jaakkola JJK. A review of the literature on the effects of ambient air pollution on fetal growth. *Environ Res.* 2004;95:106-15.

Mangelsdorf I, Buschmann J, Orthen B. Some aspects relating to the evaluation of the effects of chemicals on male fertility, *Regul Toxicol Pharmacol.* 2003; 37:356-69.

Mantovani A, Maranghi F. Risk assessment of chemicals potentially affecting male fertility. *Contraception* 2005;72(Suppl 4):308-13.

Martin J. Length of the follicular phase, time of insemination, coital rate and the sex of offspring. *Hum Reprod.* 1997; 12:611-16.

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

Mocarelli P, Brambilla P, Gerthoux PM, Patterson DG Jr, Needham LL. Change in sex ratio with exposure to dioxin. *Lancet* 1996;348 (Suppl 9024):409.

Mocarelli P, Gerthoux PM, Ferrari E, Patterson DG Jr, Kieszak SM, Brambilla P, Vincoli N, Signorini S, Tramacere P, Carreri V, Sampson EJ, Turner WE, Needham LL Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offspring. *Lancet* 2000; 355(Suppl 9218):1858-863.

Mohallem SV, de Araújo Lobo DJ, Pesquero CR, Assunção JV, de Andre PA, Saldiva PHN, Dolhnikoff M. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of São Paulo. *Environ. Res.* 2005; 98(Suppl 2):196-202.

National Academy of Sciences. Biological Markers of Reproductive Toxicity. Washington, DC: National Academy of Sciences Press; 1989.

Ong T, Whong WZ, Xu J, Burchell B, Green FHY, Lewis T. Genotoxicity studies of rodents exposed to coal dust and diesel emissions particulates. *Environ Res*, 1985; 37:399-409.

Paulsen CA, Berman NG, Wang C Data from men in greater Seattle area reveals no downward trend in semen quality: further evidence that deterioration of semen quality is not geographically uniform. *Fertil Steril.* 1996; 65(Suppl 5):1015-20.

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, Brasil. *Environ. Health Perspect.* 1998;106: 325-329.

Perera FP, Whyatt RM, Jedrychowski W, Rauh V, Manchester D, Santella RM, Ottman R Recent developments in molecular epidemiology: A

study of the effects of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons on birth outcomes in Poland. *Am J Epidemiol.* 1998;147(Suppl 3):309-14.

Petruzzelli S, Celi A, Pulera N, Baliva F, Viegi G, Carrozzi L, Ciacchini G, Bottai M, Di Pede F, Paoletti P, Giuntini C. Serum antibodies to benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in the general population: effects of air pollution, tobacco smoking, and family history of lung diseases. *Cancer Res.* 1998; 58(Suppl 18):4122-126.

Pratt N, Huck U, Lisk R. Offspring sex ratio in hamsters is correlated with vaginal pH at certain times of mating. *Behav Neural Biol.* 1987; 48:310-16.

Rasmussen PE, Erb K, Westergaard LG, Laursen SB. No evidence for decreasing semen quality in four birth cohorts of 1,055 Danish men born between 1950 and 1970. *Fertil Steril.* 1997; 68(Suppl 6):1059-64.

Raychoudhury SS & Kubinski D. Polycyclic aromatic hydrocarbon-induced cytotoxicity in cultured rat sertoli cells involves differential apoptotic response. *Environ Health Perspect.* 2003; 111(Suppl 1): 33-8.

Reichrtova E, Foltinova J, Takac L. A non-traditional approach to risk assessment of respiratory exposure to outdoor air pollutants. *J Aerosol Med.* 1995; 8(Suppl 3):233-41.

Reymao MS, Cury PM, Lichtenfels AJ, Lemos M, Battlehner CN, Conceicao GM, Capelozzi VL, Montes GS, Junior MF, Martins MA, Bohm GM, Saldiva PH. Urban air pollution enhances the formation of urethane-induced lung tumors in mice. *Environ Res.* 1997; 74(Suppl 2):150-58.

Ritz B, Yu F, Fruin S, Chapa G, Shaw GM, Harris JA. Ambient Air Pollution and Risk of Birth Defects in Southern California. *Am J Epidemiol* 2002; 155(Suppl 1):17-25.

Rivero DH, Soares SR, Lorenzi-Filho G, Saiki M, Godleski JJ, Antonangelo L, Dolhnikoff M, Saldiva PH. Acute cardiopulmonary alterations induced by fine particulate matter of Sao Paulo, Brazil. *Toxicol Sci.* 2005; 85(Suppl 2):898-905.

Roberts JM, Taylor RN, Goldfein A.. Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia. *Am J Hypertens.* 1991; 4:700-8.

Rodamilans M, Osaba MJ, To-Figueras J, Rivera Fillat F, Marques JM, Perez P, Corbella J. Lead toxicity on endocrine testicular function in an occupationally exposed population. *Hum Toxicol.* 1988; 7(Suppl 2):125-28.

Rosenfeld CS, Roberts RM. Maternal diet and other factors affecting offspring sex ratio: a review. *Biol Reprod.* 2004 Oct;71(4):1063-70.

Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, Zudova D, Vozdova M, Zudova Z, Robbins WA, Perreault SD. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod.* 2005; 20(Suppl 10):2776-783.

Russel LD, Ettlín RA, Hikim APS, Clegg ED. Staging for the laboratory mouse. In: *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis.* 119-161 (Cache River Press 1990).

Saadat M, Ansari-Lari M, Bahaoddini A. Sex ratio at birth in Masjid-i-Sulaiman (Khozestan province, Iran). *Occup Environ Med.* 2002; 59(Suppl 12):853.

Sakamoto M, Nakano A, Akagi H. Declining Minamata male birth ratio associated with increased male fetal death due to heavy methylmercury pollution. *Environ Res.* 2001;87(Suppl 2):92-8.

Sakkas D, Mariethoz E, St John JC. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res.* 1999;251(Suppl 2):350-55.

Salafia CM, Ernst LM, Pezzullo JC, Wolf EJ, Rosenkrantz TS, Vintzileos AM. The very low birthweight infant: maternal complications leading to preterm birth, placental lesions, and intrauterine growth. *Am J Perinatol.* 1995;12(Suppl 2):106-10.

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

Saldiva PHN, Lichtenfels AJFC, Paiva PSO, Barone IA, Martins MA, Massad E, Pereira JCR, Xavier VP, Böhm GM. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo: a preliminary report. *Environ Res* 1994; 65:218-25.

Saldiva PHN, Pope II C, 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(Suppl 2): 159-63.

Saldiva P. Environmental and fertility. In: Reproductive Health and the Environment, 1-13. 2006 P. Nicopoulou-Stamati et al. (eds.). Springer. Printed in the Netherlands.

Schnitzer PG, Olshan AF, Savitz DA, Erickson J.D. Validity of mother's report of father's occupation in a study of paternal occupation and congenital malformations. Am J Epidemiol 1995; 141: 872-77.

Silbergeld EK, Patrick TE. Environmental exposures, toxicologic mechanisms, and adverse pregnancy outcomes. Am J Obstet Gynecol. 2005;192(Suppl 5):S11-21.

Sinawat S. The environmental impact on male fertility. J Med Assoc Thai. 2000; 83(8): 880-85.

Skakkebaek NE. Testicular dysgenesis syndrome: new epidemiological evidence. Int J Androl. 2004;27(Suppl 4):189-91.

Smith DWE. Is greater female longevity a general finding among animals? Biol Rev 1989; 64:1-12.

Smith R, Vantman D, Ponce J, Escobar J, Lissi E. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. Hum Reprod. 1996;11(Suppl 8):1655-660. (Abstract)

Sommers CM, Yauk CL, White PA, Parfett CL, Quinn JS. Air pollution induces heritable DNA mutations. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 99(25):15904-7.

Sommers CM, McCarry BM, Malek F, Quinn JS. Reduction of Particulate Air Pollution Lowers the Risk of Heritable Mutations in Mice. *Science* 2004; 304(Suppl 5673):1008-10.

SPSS statistical software version 10.0. Chicago: SPSS; 2000.

Sram RJ, Binkova B, Dejmek J, Bobak M. Ambient air pollution and pregnancy outcomes: a review of the literature. *Environ Health Perspect.* 2005; 113(Suppl 4):375-82.

Tannenbaum LV, Bazar M, Hawkins MS, Cornaby BW, Ferguson EA, Chantelle Carroll L, Ryan PF. Rodent sperm analysis in field-based ecological risk assessment: pilot study at Ravenna army ammunition plant, Ravenna, Ohio. *Environ Pollut.* 2003; 123(Suppl 1):21-9.

Tiido T, Rignell-Hydbom A, Jonsson B, Giwercman YL, Rylander L, Hagmar L, Giwercman A Exposure to persistent organochlorine pollutants associates with human sperm Y:X chromosome ratio. *Hum Reprod.* 2005; 20(Suppl 7):1903-909.

Topinka J, Binkova B, Mrackova G, Stavkova Z, Peterka V, Benes I, Dejmek J, Lenicek J, Pilcik T, Sram RJ. Influence of GSTM1 and NAT2 genotypes on placental DNA adducts in an environmentally exposed population. *Environ Mol Mutagen.* 1997; 30(Suppl 2):184-95.

Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ Jr, Jegou B, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Leffers H, McLachlan JA, Meyer O, Muller J, Rajpert-De Meyts E, Scheike T, Sharpe R, Sumpter J, Skakkebaek NE. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect.* 1997; 105(Suppl 2):162-63.

Tsukue N., Toda N, Tsubone H, Sagai M, Jin WZ, Watanabe G, Taya K, Birumachi J, Suzuki AK. J Toxicol Environ Health A 2001; 63(Suppl 2):115-26.

Vatten LJ, Skjaerven R. Offspring sex and pregnancy outcome by length of gestation. Early Hum Dev. 2004; 76:47-54.

Vierula M, Niemi M, Keiski A, Saaranen M, Saarikoski S, Suominen J. High and unchanged sperm counts of Finnish men. International J Androl. 1996; 19: 11-17.

Weisskopf MG, Anderson HA, Hanrahan LP; Great Lakes Consortium. Decreased sex ratio following maternal exposure to polychlorinated biphenyls from contaminated Great Lakes sport-caught fish: a retrospective cohort study. Environ Health. 2003; 2(Suppl 1):2.

Whorton, MD. Male reproductive hazards. Occup Med. 1986; 1:375-79.

Williams FL, Lawson AB, Lloyd OL. Low sex ratios of births in areas at risk from air pollution from incinerators, as shown by geographical analysis and 3-dimensional mapping. Int J Epidemiol. 1992; 21:311-19.

Williams FL, Ogston SA, Lloyd OL. Sex ratios of births, mortality, and air pollution: can measuring the sex ratios of births help to identify health hazards from air pollution in industrial environments? Occup Environ Med. 1995; 52(Suppl 3):164-69.

Wilson WE, Chow C, Claiborn C, Fusheng W, Engelbrecht J, Watson JG. Monitoring of particulate matter outdoors. Chemosphere 2002; 49:1009-43.

Yang CY, Cheng BH, Hsu TY, Tsai SS, Hung CF, Wu TN. Female lung cancer mortality and sex ratios at birth near a petroleum refinery plant. *Environ. Res.* 2000; 83:33-40.

Yang CY, Chiu HF, Tsai SS, Chang CC, Chuang HY. Increased risk of preterm delivery in areas with cancer mortality problems from petrochemical complexes. *Environ Res.* 2002; 89(Suppl 3):195-200.

Yoshida S, Sagai M, Oshio S, Umeda T, Ihara T, Sugamata M, Sugawara I, Takeda K. Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice. *Int J Androl.* 1999; 22:307-315.

Zorn B, Virant-Klun I, Verdenik I, Meden-Vrtovec H. Semen quality changes among 2343 healthy Slovenian men included in an IVF-ET programme from 1983 to 1996. *Int J Androl.* 1999; 22(Suppl 3):178-83.

*De acordo com:

Adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia AL. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Velhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.