

Adriana Pires

**Efeito da exposição ao material particulado (PM_{2,5}) da
poluição atmosférica na espermatogênese de duas gerações
de camundongos**

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

Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva

São Paulo
2009

Adriana Pires

**Efeito da exposição ao material particulado (PM_{2,5}) da
poluição atmosférica na espermatogênese de duas gerações
de camundongos**

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

Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva

São Paulo
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pires, Adriana

Efeito da exposição ao material particulado ($PM_{2,5}$) da poluição atmosférica na espermatogênese de duas gerações de camundongos / Adriana Pires. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientador: Paulo Hilário Nascimento Saldiva.

Descritores: 1.Espermatogênese 2.Poluição do ar 3.Material particulado
4.Camundongos

USP/FM/SBD-185/09

Aos meus pais por todos os ensinamentos;
Aos meus irmãos e cunhados pelo apoio;
A minha avó pelo carinho;
As minhas sobrinhas por me fazerem virar criança outra vez.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva pela confiança depositada em mim para a realização deste trabalho;

À Dra. Heloisa Maria de Siqueira Bueno pela ajuda inestimável em todas as etapas deste trabalho, pela paciência em ensinar e corrigir, pelo apoio incondicional, sugestões, por acreditar sempre que eu era capaz, pela amizade e por tornar este trabalho possível;

Às Dras. Thais Mauad e Elizabeth Neves de Melo pelo auxílio e sugestões em etapas decisivas deste trabalho;

À Dra. Regiani Carvalho-Oliveira pela coleta e análise dos dados de poluição e disposição em esclarecer dúvidas e à Dra. Ana Júlia Lichtenfels pela coleta e análise de dados ambientais;

À Angela Batista Gomes dos Santos e Maria Cristina Rodrigues Medeiros pela competência e presteza para solucionar problemas com a imunohistoquímica;

Às estudantes da UFPE Andressa Brito e Amanda Vasconcelos pela hospitalidade e prontidão em ensinar o método da morfologia tubular;

Aos amigos e colaboradores Mariângela Macchione; Débora Lobo; Marcia Hage; Miriam Lemos; Luis Afonso Pires; Eliane Tigre; Dolores Rivero; Paulo Afonso de André; Luis Pereira; Nilsa Damaceno, Mariana Veras, Júlia Scoriza, Lúcia Bueno Garcia; Rodolfo de Paula Veira; José Mára de Brito; Juliana Andrietta; Beatriz Saraiva-Romanholo, Rogério Pazetti e Karina Andrighetti de Oliveira;

Às secretárias Maria Dalva Santana, Márcia Bento, Liduvina Barros, Adalzira, Ana Cláudia, Rafaela, Letícia que sempre estiveram prontas para ajudar;

À Francine Maria de Almeida; Angélica Baganha Ferreira; Paula Valença Bertacini; Ana Lúcia Lorente; e Ana Cristina Mielli por todo apoio, sugestões e acima de tudo pela amizade;

Ao pessoal do apoio técnico Davi; Carlos; Ivandir; Reginaldo; Nildo; Eunilda; e Severina.

Resumo

Pires A. *Efeito da exposição ao material particulado (PM_{2,5}) da poluição atmosférica na espermatogênese de duas gerações de camundongos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

Este trabalho caracteriza os efeitos das condições reais de exposição ao material particulado urbano na espermatogênese por meio de análises histológicas de testículos de duas gerações de camundongos BALB/c durante o período gestacional, pós-gestacional ou em ambos os momentos combinados. A geração parental foi exposta à poluição do ar em câmaras com ou sem filtros para PM_{2,5} (câmaras filtrada e não filtrada, respectivamente) por 4 meses, formando dois grupos: não exposto; e exposto. Estes animais foram acasalados e a frequência do plug vaginal apresentou tendência de queda nas fêmeas expostas ($p > 0,05$). O número de fêmeas prenhes também foi reduzido ($p = 0,007$) e o número de nativos foi menor na câmara não filtrada (186) quando comparada com a filtrada (268), contudo, o número de animais por ninhada não foi alterado ($p > 0,05$). Após o acasalamento os machos foram eutanasiados, seus testículos pesados, fixados em solução de Bouin ou paraformaldeído 4% e corados com HE, PCNA, Ki67 ou TUNEL. Metade dos animais produzidos na primeira geração, constituída de animais de 1 dia de vida, foi transferida de uma câmara para outra formando os grupos pré-natal e pós-natal. Os animais remanescentes das câmaras filtrada e não filtrada constituíram os grupos não exposto e pré+pós-natal, respectivamente. Após 90 dias, os animais da primeira geração foram eutanasiados e seus testículos foram retirados, pesados, fixados e corados da mesma forma que sua geração parental. Os animais expostos ao PM_{2,5} da geração parental apresentaram aumento do peso dos testículos ($p = 0,002$), dos epidídimos ($p < 0,001$) e do peso relativo testículo/corpo ($p = 0,003$), epidídimo/corpo ($p = 0,001$). Não houve alteração no número de células germinativas e somáticas e nem na proliferação celular ($p > 0,05$). A apoptose pela coloração de HE foi reduzida no estágio IV ($p = 0,046$) e aumentada no estágio VIII ($p = 0,019$) da espermatogênese. Pela técnica de TUNEL os estádios IV ($p = 0,017$), V ($p = 0,035$) e VIII ($p = 0,024$) mostraram apoptose menor nos animais do grupo exposto. O estágio IV foi identificado como o de maior apoptose espontânea nas duas técnicas empregadas, HE ($p < 0,001$); e TUNEL ($p < 0,001$), entre

os animais não expostos. O ciclo do epitélio seminífero foi alterado com frequência reduzida do estágio IV entre os animais expostos ($p=0,005$). Os animais da primeira geração expostos no período pré-natal apresentaram redução de peso corpóreo ($p<0,001$) e dos testículos ($p=0,012$), bem como, aumento do peso relativo testículos/corpo ($p=0,013$). O número de células somáticas não foi alterado, mas o de espermatócitos nos grupos pós-natal ($p=0,011$) e pré+pós-natal foi aumentado ($p=0,035$) enquanto nos grupos pré-natal e pós-natal houve redução no número de espermátides alongadas ($p<0,001$). Não houve diferença significativa na taxa de proliferação, apoptose e frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero entre os grupos de exposição ($p>0,05$). O estágio IV mostrou-se o mais sensível para a ocorrência de apoptose espontânea nas duas técnicas empregadas: HE ($p<0,001$); e TUNEL ($p<0,001$). A frequência normal dos estádios entre os animais não expostos mostrou que os estádios finais são os mais frequentes (VI, VIII e VII, nesta ordem) e os iniciais os menos frequentes (II e I, nesta ordem) para ambas as gerações. Estes resultados fornecem dados que sugerem que o $PM_{2.5}$ da poluição atmosférica urbana é capaz de alterar o sistema reprodutivo masculino e a espermatogênese não dependendo do período da vida (durante ou após a gestação) em que os animais são expostos.

Descritores: Espermatogênese; poluição do ar; material particulado; camundongos

Summary

Pires A. *Effects of exposure to urban PM_{2.5} from air pollution in spermatogenesis of two generations of mice* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

The present paper describes the effects of real exposure to urban PM_{2.5} on spermatogenesis by histological analysis of testes of mice (BALB/c) from two generations during fetal or postnatal phases of development and of mice exposed in both phases of development. Parental generations (BALB/c mice) were exposed to air pollution in chambers with or without filters for PM_{2.5} for 4 months (filtered and non-filtered chambers, respectively), forming two groups, namely non-exposed and exposed. These animals were mated and a frequency of decrease on vaginal plug in the exposed females was observed ($p > 0.05$). The number of pregnant females was reduced as well ($p = 0.007$) and the number of born alive decreased in the non-filtered chamber (186) when compared to the filtered chamber (268); however, the litter size was not altered ($p > 0.05$). After mating, the male were killed, their testes were weighed and fixed in Bouin's solution or 4% paraformaldehyde and stained in H&E, PCNA, Ki67 or TUNEL. Half of 1-day old offspring was crossed over between chambers forming the prenatal and postnatal groups; remaining offspring from filtered and non-filtered chambers comprised the non-exposed and pre+postnatally exposed groups, respectively. After 90 days, the animals from first generation were killed and their testes were removed, weighed, fixed and stained like the parental generation. The animals exposed to PM_{2.5} from the parental generation showed increased testis weight ($p = 0.002$), epididymis weight ($p < 0.001$), relative testis weight ($p = 0.003$), and relative epididymis weight ($p = 0.001$). The germ and somatic cells number was not reduced, and neither was cell proliferation ($p > 0.05$). The apoptosis labeled by H&E was reduced in stage IV ($p = 0.046$) and increased in stage VIII ($p = 0.019$) of spermatogenesis. By using the TUNEL technique, stages IV ($p = 0.017$), V ($p = 0.035$) and VIII ($p = 0.024$) showed fewer apoptosis in the exposed animal group. Stage IV was identified as the most spontaneous apoptosis in both methods: HE ($p < 0.001$) and TUNEL ($p < 0.001$), among the non-exposed animals. The cycle of

the seminiferous epithelium was altered with reduced frequency of stage IV between the exposed animals ($p=0.005$). The animals from the first generation exposed during the prenatal period had a reduced body ($p<0.001$) and testis weight ($p=0.012$) and an increased relative testis weight ($p=0.013$). Differences in germ cell proliferation, apoptosis, and staging were not significantly different among treatment groups ($p>0.05$). Nevertheless, germ cell populations of post- ($p=0.011$) and pre+postnatally ($p=0.035$) PM-exposed animals contained an increased percentage of spermatocytes, while pre- and postnatal groups ($p<0.001$) had a reduced number of elongated spermatids. Stage IV was shown to be the most sensitive for the occurrence of spontaneous apoptosis in both methods used: H&E ($p<0.001$); and TUNEL ($p<0.001$). The normal frequency of the stages between non-exposed animals showed that the final stages are more frequent (VI, VIII e VII) and the beginning stages less frequent (II e I) to both generations. These results suggest that $PM_{2.5}$ from urban air pollution is capable of altering the male reproductive system and spermatogenesis independently of the period of life when the animals are exposed to it (during or after pregnancy).

Descriptors: Spermatogenesis; air pollution; particulate matter; mice

Sumário

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Material particulado	2
1.2. Espermatogênese	4
1.3. Ciclo do epitélio seminífero	12
1.4. Proliferação celular e morte celular programada (apoptose)	16
1.5. Efeitos da poluição atmosférica na saúde reprodutiva	18
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo Geral	25
2.2. Objetivos Específicos	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Animais	28
3.2. Caracterização do sítio de exposição	28
3.3. Câmaras de exposição	28
3.4. Monitoramento das condições ambientais de exposição	30
3.4.1. Concentração de PM _{2,5}	30
3.4.2. Caracterização da composição química do material particulado (PM _{2,5})	31
3.4.3. Concentração de fumaça	32
3.4.4. Ambiente Externo	33
3.5. Protocolo experimental	33
3.6. Coleta e preparo do material biológico	35
3.7. Análise morfométrica quantitativa de células testiculares	37
3.7.1. Células germinativas e somáticas	37
3.7.2. Proliferação celular	38
3.7.3. Apoptose	38
3.8. Frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero	39
3.9. Análise Estatística	39

4. RESULTADOS	41
4.1. Geração Parental	42
4.1.1. Monitoramento das condições ambientais de exposição	42
4.1.1.1. Concentração de PM _{2,5}	43
4.1.1.2. Caracterização da composição química do material particulado (PM _{2,5})	44
4.1.1.3. Concentração de fumaça	45
4.1.1.4. Ambiente externo	46
4.1.2. Fertilidade	46
4.1.3. Peso corpóreo e dos órgãos	47
4.1.4. Análise morfométrica quantitativa de células testiculares	49
4.1.4.1. Células germinativas e somáticas	49
4.1.4.2. Proliferação celular	49
4.1.4.3. Apoptose	51
4.1.5. Frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero	55
4.2. Primeira Geração	56
4.2.1. Monitoramento das condições ambientais de exposição	56
4.2.1.1. Concentração de PM _{2,5}	57
4.2.1.2. Concentração de fumaça	58
4.2.1.3. Ambiente externo	59
4.2.2. Peso corpóreo e dos órgãos	59
4.2.2. Análise morfométrica quantitativa de células testiculares	60
4.2.2.1. Células germinativas e somáticas	60
4.2.2.2. Proliferação celular	64
4.2.2.3. Apoptose	65
4.2.3. Frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero	69
5. DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÕES	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

1. Introdução

A poluição do ar nos grandes centros urbanos é uma mistura complexa de compostos de toxicidade variável. Estes contaminantes são originados, principalmente, do tráfego de veículos automotores, que contribuem com uma variedade de gases poluentes do ar e material particulado (PM) de diferentes tamanhos e composições. Esta mistura que compõe o ar varia de acordo com a proximidade da fonte poluidora, tipo de combustível utilizado e presença de outras fontes de emissão (WHO, 2005a).

A cidade de São Paulo, como a maioria das grandes metrópoles mundiais, tem a frota de veículos como principal fonte de poluição. Entretanto, na maioria das outras cidades a fonte de energia é exclusivamente fóssil, enquanto que em São Paulo são usados, também etanol, gasolina e gás metano, resultando em uma mistura complexa de poluentes que podem provocar maior suscetibilidade da população, aumentando os diversos efeitos adversos à saúde (CETESB, 2007).

Estudos anteriores mostram que níveis ambientais de poluição do ar em São Paulo, são capazes de afetar a saúde pulmonar (Rivero *et al.*, 2005a; Mauad *et al.*, 2008), cardíaca (Rivero *et al.*, 2005a; Rivero *et al.*, 2005b) e reprodutiva (Mohallem *et al.*, 2005; Lichtenfels *et al.*, 2007; Veras *et al.*, 2008) de animais expostos cronicamente.

1.1. Material particulado

Nos grandes centros urbanos a poluição do ar é composta por diversas substâncias tóxicas, entre elas gases, tais como ozônio (O₃), óxidos de nitrogênio (NO_x) e monóxido de carbono (CO), e partículas derivadas principalmente da queima

de combustíveis fósseis. Contudo, o material particulado tem sido apontado como o principal causador de efeitos nocivos à saúde (EPA, 2006).

O material particulado que é formado diretamente na fonte emissora recebe o nome de partícula primária. As partículas secundárias são aquelas formadas no ar por meio de reações químicas de gases precursores (CETESB, 2007).

Os dois tipos de partículas são formadas por um núcleo de carbono ao qual estão associados metais, sais de nitrogênio, enxofre e cloro, poeira geológica e matéria orgânica como hidrocarbonetos (Donaldson e Stone, 2003). Por ser uma mistura complexa, o potencial do material particulado para causar dano varia de acordo com tamanho, características físicas, composição química e fonte emissora (Baird, 2002), além disso, seu potencial tóxico pode estar ligado à capacidade das partículas de ativar fontes endógenas de estresse oxidativo dentro do tecido pulmonar, ao contrário de partículas inertes como o carbono elementar (WHO, 2005b).

A classificação do material particulado é feita pelo tamanho da partícula, que é expresso por seu diâmetro aerodinâmico. Os tamanhos se estendem de agrupamentos moleculares com nanômetros de diâmetro, menores do que $0,1 \mu\text{m}$ (partículas ultrafinas), às partículas finas, menores do que $2,5 \mu\text{m}$ de diâmetro ($\text{PM}_{2,5}$) e partículas grossas, de $2,5$ a $10 \mu\text{m}$ (PM_{10}) (EPA, 2006) (Figura 1). O PM_{10} é considerado a fração inalável das partículas por ser suficientemente pequeno para entrar nas vias aéreas, já o $\text{PM}_{2,5}$ pode se depositar nas vias aéreas inferiores e alvéolos (Baird, 2002; WHO, 2005b), entrar na corrente sanguínea, ser levado a todos os órgãos e causar danos de forma sistêmica (Peters *et al.*, 2006).

Estas frações de material particulado diferem em sua contribuição para a massa total de partículas do ar, origem, características físicas e composição química

(WHO, 2005b). Por exemplo, a emissão veicular de partículas primárias é responsável pela liberação de 30% de $PM_{2.5}$. Outras emissões, também relacionadas com as vias de tráfego, como ressuspensão de poeira do asfalto e uso de freios pneumáticos, são as principais fontes de PM_{10} (WHO, 2005a).

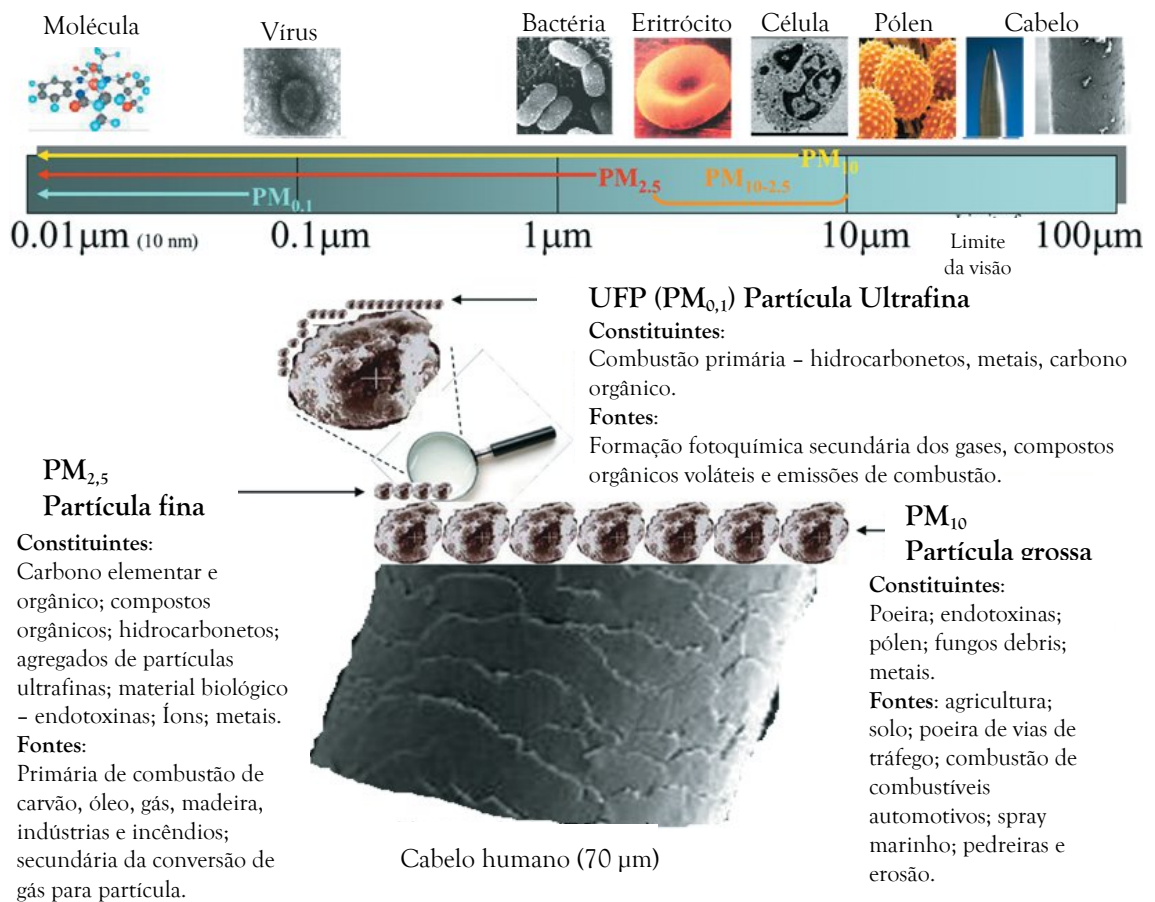


Figura 1. Tamanho, fonte e composição do material particulado da poluição atmosférica

(Adaptado de Brook, 2008).

1.2. Espermatogênese

O sistema reprodutor masculino é responsável pela contínua produção, nutrição e armazenamento temporário de gametas e pela síntese e secreção de hormônios sexuais masculinos, num processo chamado espermatogênese. Este

sistema é constituído pelos testículos, local onde ocorre a espermatogênese e a produção de andrógenos; pelos epidídimos, local de maturação do espermatozóide; pelos ductos deferentes, ductos ejaculadores e uretra, que transportam o espermatozóide; pelas glândulas acessórias, glândulas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais de Cowper, que formam o sêmen e nutrem o espermatozóide ejaculado; e pelo pênis que é o órgão copulador (Kierszenbaum, 2008).

Os testículos são órgãos pares localizados fora da cavidade abdominal no saco escrotal, associados ao epidídimo. Ambos ficam suspensos no saco escrotal pelo cordão espermático, que contém o ducto deferente, a artéria espermática e os plexos venoso e linfático. No mediastino testicular, que é um espessamento da túnica albugínea, se localiza a rede testicular. Septos fibrosos se projetam do mediastino para o parênquima testicular, dividindo o tecido em 250 a 300 lóbulos e cada um destes lóbulos contém de 1 a 4 túbulos seminíferos (Figura 2) (Kierszenbaum, 2008).

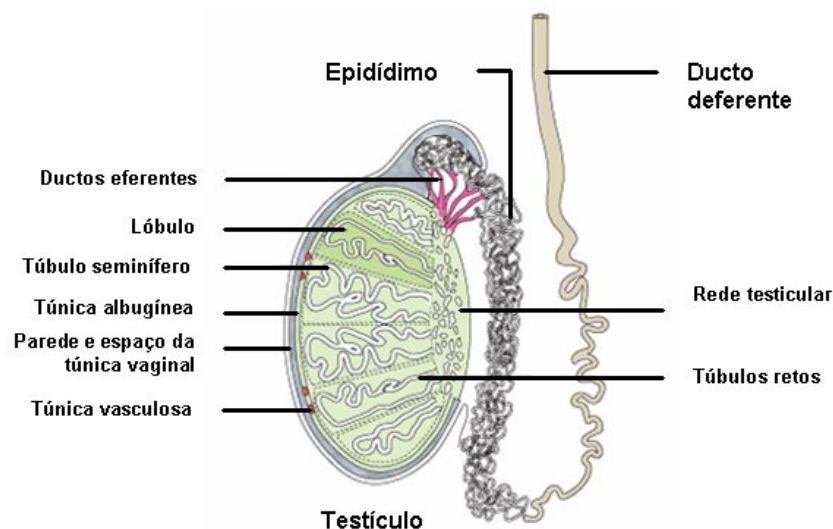


Figura 2. Desenho esquemático do testículo, epidídimo e ducto deferente (Adaptado de Kierszenbaum, 2008).

No testículo existem dois compartimentos: o intertubular ou intersticial; e o intratubular ou túbulo seminífero. O túbulo seminífero é formado por um lúmen central e por células germinativas altamente proliferativas misturadas a uma população de células de Sertoli somáticas. Estas células constituem o epitélio seminífero ou germinativo que está acomodado sobre a membrana basal e é circundado por uma parede de fibras colágenas, fibroblastos e células mióides responsáveis pela maior parte da atividade contrátil que impulsiona o esperma para a rede testicular (Stevens e Lowe, 1992). Ao redor destes túbulos seminíferos está o interstício ou espaço intersticial rico em vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e células, entre elas as de Leydig ou intersticiais, que constituem a principal população celular do interstício e que são produtoras de andrógenos, principalmente a testosterona (Russel *et al.*, 1990).

O epitélio seminífero pode ser classificado como um epitélio estratificado com características bastante incomuns não encontradas em outro epitélio estratificado do corpo. Neste epitélio ocorre a espermatogênese, que é o processo no qual a célula de Sertoli interage com as células germinativas: espermatogônias, que se dividem por mitose; espermatócitos, que se dividem por meiose; e espermatídes haplóides, que passam por um processo de diferenciação chamado espermiogênese (Kierszenbaum, 2008).

No túbulo seminífero a célula de Sertoli é o tipo celular mais abundante até a puberdade, mas a partir desse período não se dividem mais e sua população fica relativamente estável por toda a vida (Russel *et al.*, 1990). Além disso, são resistentes às infecções, desnutrição, radiações e temperatura corpórea, com taxa de sobrevivência muito maior do que as células da linhagem germinativa após agressões

(Stevens e Lowe, 1992).

As células de Sertoli possuem núcleo com grande nucléolo tripartido visível ao microscópio óptico com massas de heterocromatina associadas (Russel *et al.*, 1990). Estas células são grandes, se estendem da lâmina basal até o lúmen do túbulo seminífero atuando como células de ligação entre o interstício e o lúmen. Sua membrana plasmática em sua porção apical e lateral possui contorno irregular devido aos recessos que abrigam as células da linhagem germinativa (Kierszenbaum, 2008). Cada célula de Sertoli pode carrear um número definido de células germinativas, aproximadamente 50 (Radovsky *et al.*, 1999).

Em seu domínio basolateral, a célula de Sertoli apresenta junções oclusivas (*tight junctions*) entre células de Sertoli adjacentes formando dois compartimentos no epitélio seminífero: adluminal; e basal. Estas junções também determinam quais componentes podem passar e chegar até as células em desenvolvimento, pois as células de Sertoli formam a chamada barreira hemato-testicular e a transferência de substâncias para as células germinativas é determinada por elas (Kierszenbaum, 2008). Dessa forma, a barreira hemato-testicular pode ser também chamada de barreira da célula de Sertoli (Russel *et al.*, 1990) ou barreira hemato-tubular (Radovsky *et al.*, 1999).

Além das junções oclusivas as células de Sertoli também se ligam com a lâmina basal e com as células germinativas por meio de junções aderentes (hemidesmossomos e desmossomos, respectivamente). Outro tipo de junção presente entre todas as células do epitélio germinativo são as junções comunicantes (*gap junctions*), que exercem um intrincado sistema de comunicação celular (Cheng e Mruk, 2002). A adesão celular no epitélio germinativo é mostrada na figura 3.

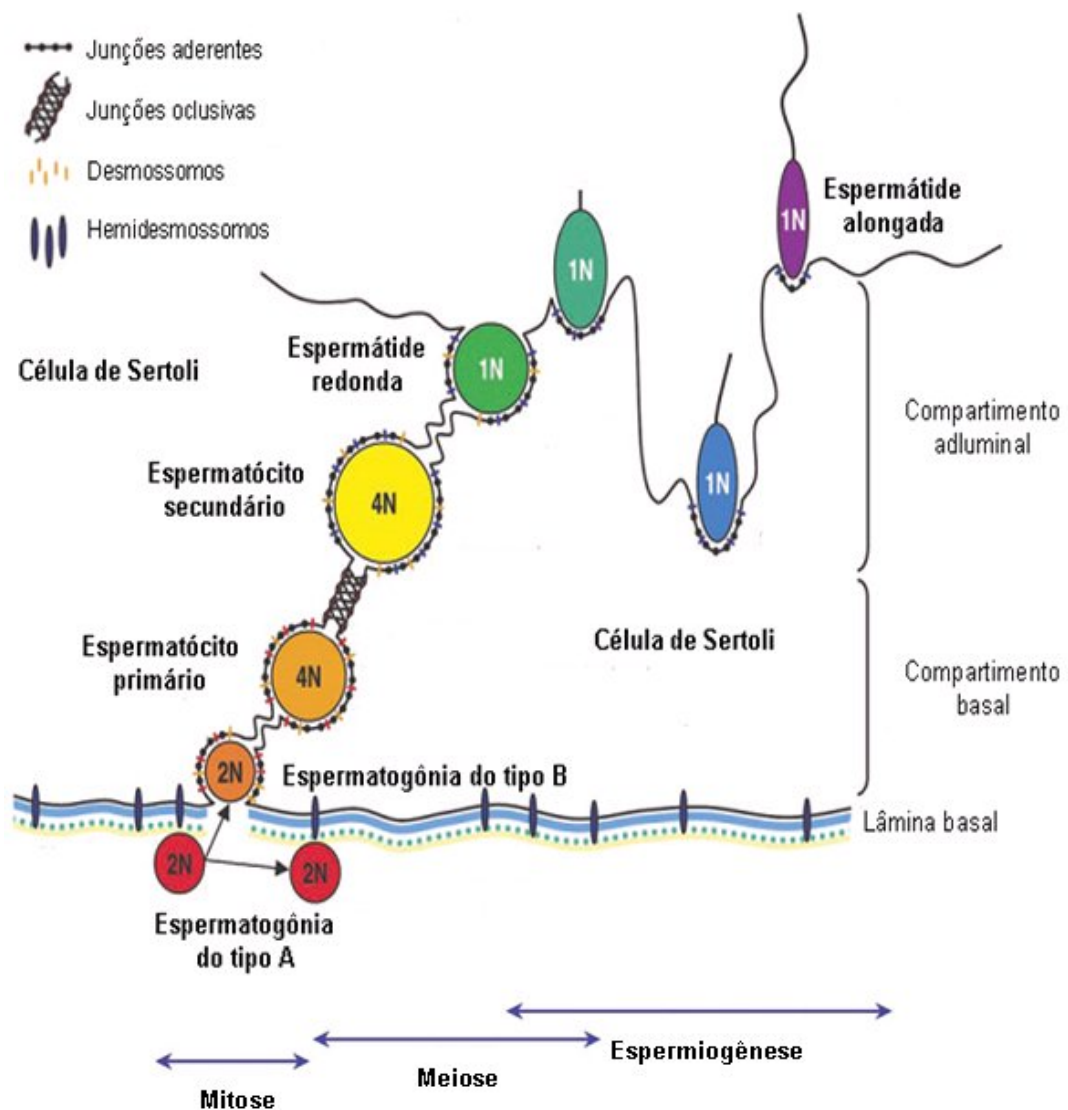


Figura 3. Desenho esquemático ilustrando os diferentes tipos de ligações das células de Sertoli entre si (junções oclusivas), com a lâmina basal (hemidesmossomos) e com as células da linhagem germinativa (desmossomos). As junções oclusivas dividem o epitélio seminífero em dois compartimentos dentro do epitélio seminífero, o basal que fica abaixo das junções oclusivas e o adluminal que fica acima. Esta divisão forma a barreira hemato-testicular que é responsável pela entrada seletiva de substâncias que chegam até as células germinativas em desenvolvimento, exercendo função protetora (Adaptado de Cheng e Mruk, 2002).

O resultado da íntima ligação entre as células germinativas e as células de Sertoli, além de promover sustentação física e manter a integridade estrutural do túbulo seminífero, cria um eficiente sistema de sinalização e intensa comunicação celular, o qual permite à célula de Sertoli prover às células da linhagem germinativa nutrientes e fatores biológicos necessários para seu desenvolvimento. Além disso, essa comunicação promove a coordenação e sincronia dos eventos da espermatogênese (Cheng e Mruk, 2002).

A espermatogênese é um processo complexo funcionalmente dividido em três fases nas quais ocorrem mudanças moleculares e celulares. A primeira é a fase proliferativa na qual espermatogônias sofrem sucessivas mitoses num processo de expansão clonal, que ocorre abaixo da barreira hemato-testicular (Figura 3), até a formação de espermatócitos. A segunda fase é a meiótica, na qual os espermatócitos se dividem por meiose I e II até a formação das espermatídes haplóides. O último evento, que ocorre dentro da barreira hemato-testicular (Figura 3), é a fase de diferenciação ou espermiogênica na qual ocorre a morfogênese da espermatíde arredondada em espermatíde alongada, o espermatozóide (Russel *et al.*, 1990).

Como a espermatogênese é um processo contínuo há necessidade de que as espermatogônias estejam sempre prontas para se dividirem e formar espermatócitos. As espermatogônias são células pequenas relativamente imaturas e que sofrem expansão clonal por meio de muitas mitoses, no qual formam mil vezes a sua própria população enquanto os espermatócitos, quatro vezes. Isso é necessário porque devem ser produzidas espermatogônias suficientes para dar continuidade à espermatogênese e ainda contar com uma população reserva. Nessa expansão as células não sofrem citocinese completa ficando ligadas umas as outras por pontes intercelulares ou

citoplasmáticas, que são responsáveis pela sincronia de desenvolvimento das células germinativas (Russel *et al.*, 1990).

As espermatogônias podem ser diferenciadas em três tipos em ratos e camundongos: espermatogônias do tipo A; do tipo B; e intermediária (Russel *et al.*, 1990). As espermatogônias do tipo A são células que apresentam cromatina pouco condensada e pouco corada, que representa a reserva de espermatogônias não comprometidas com a formação dos outros tipos de espermatogônias, podendo ser chamadas também de células tronco espermatogoniais (Clermont, 1972). Devido à baixa taxa de proliferação, estas células são mais resistentes do que os outros tipos espermatogoniais e por isso podem repovoar o epitélio germinativo se houver grande perda de células (Kierszenbaum, 2008). As espermatogônias do tipo B apresentam-se com cromatina condensada e fortemente corada, representando as espermatogônias que darão origem aos espermátócitos. As espermatogônias intermediárias apresentam quantidade de cromatina intermediária entre os outros dois tipos (Clermont, 1972). Existem ainda diversos outros tipos de espermatogônia, mas apenas estes três tipos são distinguíveis morfologicamente ao microscópio óptico (Russel *et al.*, 1990).

Após a última mitose sofrida pelas espermatogônias do tipo B são formados os espermátócitos primários (Russel *et al.*, 1990). Estas células são as maiores da linhagem espermatogênica sendo caracterizadas por modificações dos modelos de cromatina nos núcleos das células em prófase meiótica, sendo eles pré-leptóteno, leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno (Clermont, 1972). Logo após sua formação, os espermátócitos entram em meiose I, que é equacional, sem síntese significativa de DNA para produzir dois espermátócitos secundários, que rapidamente entram em meiose II (Kierszenbaum, 2008). A maioria dos espermátócitos

encontrados no epitélio germinativo são primários porque a meiose I é muito longa ao contrário da meiose II que é rápida e por isso os espermatócitos secundários são dificilmente encontrados (Stevens e Lowe, 1992).

No final da meiose II são formadas as espermatídes haplóides, que iniciam a fase final da espermatogênese, a espermiogênese, no qual as espermatídes transformam-se em células altamente diferenciadas através de uma série complexa de mudanças sem divisões celulares. Na espermiogênese as espermatídes redondas passam por modificações morfológicas que incluem a formação do acrossomo, condensação e alongamento do núcleo, desenvolvimento do flagelo e perda da maior parte do citoplasma na forma de corpos residuais (fagocitados pelas células de Sertoli) a fim de formar as espermatídes alongadas. A finalização da espermiogênese se dá pela espermição da espermatíde alongada, o espermatozóide, que é liberado na luz tubular (Stevens e Lowe, 1992).

No processo espermatogênico eventos bioquímicos, celulares e moleculares ocorrem no epitélio seminífero levando a formação de oito espermatozóides haplóides a partir de uma espermatogônia diplóide e a manutenção destes eventos se dá por meio de um forte controle hormonal (Russel *et al.*, 1990).

A célula de Leydig é responsável pela maior parte da produção de testosterona, que é regulada por um hormônio glicoproteico, o hormônio luteinizante (LH), produzido pela hipófise. Por conta da produção de testosterona, as células de Leydig possuem abundante retículo endoplasmático liso e mitocôndrias com enzimas associadas à síntese de esteróides, citoplasma eosinofílico que pode ser finamente vacuolizado, seu núcleo é arredondado com cromatina marginalizada e

ocasionalmente estas células podem ser alongadas ou poliedrais (Radovsky *et al.*, 1999).

Outro hormônio glicoproteico produzido pela hipófise também é importante na espermatogênese, o hormônio folículo estimulante (FSH), que age sobre a célula de Sertoli e estimula a produção de inibina e ativina. A inibina exerce *feedback* negativo sobre a liberação hipotalâmica e hipofisária de FSH e a ativina tem efeito oposto. Além destas proteínas, o FSH estimula também a síntese e secreção da proteína de ligação ao andrógeno (ABP), que tem alta afinidade de ligação pela testosterona e di-hidrotestosterona, formando um complexo que mantém altos os níveis de andrógeno na proximidade das células espermatogênicas em desenvolvimento (Kierszenbaum, 2008).

1.4. Ciclo do epitélio seminífero

A espermatogênese em mamíferos é muito dinâmica e altamente ordenada, com células germinativas sofrendo divisões celulares e diferenciação, associando-se repetidas vezes para a formação de gametas.

As associações celulares ou estádios são agrupamentos definidos de células em fases específicas do desenvolvimento em secções transversais de túbulos seminíferos. Cada tipo celular de uma associação de células é morfolologicamente integrado com outras células em seu processo de maturação (Russel *et al.*, 1990). Isso acontece porque as espermatogônias dão origem a novas células em intervalos regulares ao longo do túbulo seminífero (Kierszenbaum, 2008). Assim, as associações celulares evoluem de um estádio anterior para o seguinte de forma que a maturação de cada tipo celular germinativo esteja posicionado em um determinado tempo e

espaço, fazendo com que a geração de novas células seja perfeitamente sincronizada (Blanco-Rodríguez, 1998).

A série completa de associações celulares é chamada de ciclo do epitélio seminífero que representa subdivisões artificiais (estádios) de um fenômeno histológico dinâmico e contínuo (Clermont, 1972).

O ciclo do epitélio seminífero pode ser classificado de acordo com duas abordagens: 1) método acrossômico e; 2) método da morfologia tubular (Berndtson, 1977; Neves *et al.*, 2002).

O método acrossômico é baseado no desenvolvimento do sistema acrossômico nas espermatídes caracterizando a maturação das espermatídes redondas em alongadas. Esta técnica é composta de um grande número de estádios variáveis para cada espécie (12 para camundongos, 14 para ratos e para 6 homens) (Russel *et al.*, 1990).

O método da morfologia tubular identifica as associações de células germinativas dentro de muitas gerações em uma determinada área do túbulo (Amann, 1986), levando em consideração as diferentes formas do núcleo e o posicionamento das espermatídes, presença de divisões meióticas e composição total do túbulo seminífero (Berndtson, 1977), no qual é possível observar que as células mais jovens se arranjam em criptas e mergulham no epitélio em direção às células de Sertoli e depois migram para o lúmen para serem espermiadas (Clermont, 1972). Nesta abordagem de avaliação do ciclo, diferente do que ocorre no método acrossômico, existe número fixo de 8 estádios para mamíferos com exceção do homem que apresenta 6 estádios.

As associações das células neste método mostram no estágio I espermatócitos

primários em pré-leptóteno, leptóteno e paquíteno, uma geração de espermátides, representadas pelas espermátides redondas que ocupam o compartimento adluminal do túbulo e corpos residuais das espermátides alongadas que foram liberadas no estágio anterior (Figura 4 I). No estágio II estão presentes no epitélio espermatócitos primários em leptóteno e em paquíteno e espermátides redondas em início do processo de alongamento sem formar criptas (Figura 4 II). O estágio III apresenta espermatócitos primários em zigóteno e diplóteno, que são os maiores espermatócitos, e espermátides em alongamento formando, a partir deste estágio, criptas (Figura 4 III). No estágio IV há espermatócitos primários e secundários em meiose exibindo metáfase, anáfase e telófase, e espermátides ainda em processo de alongamento (Figura 4 IV). O estágio V mostra espermatogônias do tipo intermediário, espermatócitos primários em paquíteno e deste estágio em diante duas gerações de espermátides, com espermátides em alongamento em criptas profundas, muito próximas do núcleo das células de Sertoli (Figura 4 V). O estágio VI exhibe espermatogônias do tipo B, espermatócitos primários em paquíteno e espermátides em alongamento em criptas se dirigindo para o lúmen (Figura 4 VI). No estágio VII há espermatogônias do tipo B, espermatócitos primários em paquíteno e espermátides em alongamento, não mais em criptas, mas alinhadas em paliçada muito próximas da luz do túbulo (Figura 4 VII). Por fim o estágio VIII se caracteriza pela presença de espermatogônias do tipo B, espermatócitos primários em pré-leptóteno e em paquíteno, espermátides alongadas em paliçada prontas para serem espermiadas e corpos residuais (Figura 4 VIII) (Neves, 2001).

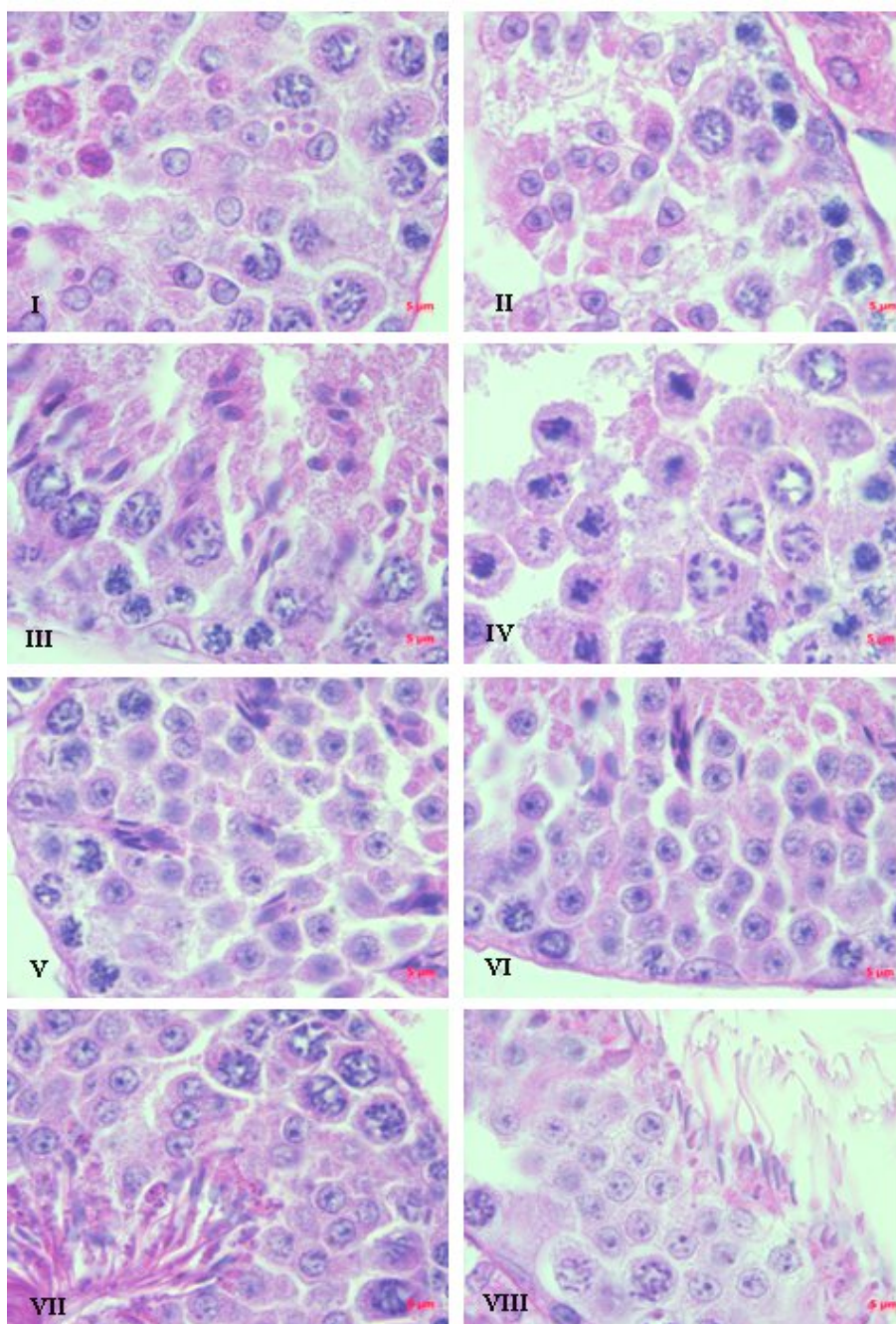


Figura 4. Fotomicrografias ilustrativas das principais características dos 8 estádios do ciclo do epitélio seminífero pelo método da morfologia tubular.

Independente da abordagem empregada, método acrossômico ou método da morfologia tubular, somente um estágio apresenta espermatócitos secundários em divisão meiótica, que têm uma vida muito curta, daí a dificuldade de encontrar este

tipo celular em qualquer espécie de mamíferos. Pela morfologia tubular este estágio é o IV. Por outro lado, dependendo da abordagem, uma ou duas associações celulares apresentam espermátides maduras alinhadas no lúmen do túbulo seminífero (Amann, 1996). Pelo método da morfologia tubular as espermátides estão prontas para espermição no estágio VIII que é muito representativo do andamento da espermatogênese por representar o final da maturação das espermátides (Clermont e Harvey, 1967).

1.4. Proliferação celular e morte celular programada (apoptose)

O ciclo celular é um processo no qual ocorre duplicação do DNA e seu resultado final é a proliferação das células que é a duplicação celular através de uma série ordenada de eventos, com cópia e transferência da informação genética para as células filhas. No decorrer deste processo existem mecanismos que asseguram a correta segregação dos cromossomos entre as novas células formadas e condições externas podem influenciar neste processo (Alberts *et al.*, 2004).

A proliferação celular pode ocorrer por mitose ou meiose. A mitose é a divisão equacional do material genético, porque o número de cromossomos é mantido em ambas as células filhas. Por outro lado, a meiose é a divisão reducional que dá origem aos gametas e por isso reduz pela metade o número de cromossomos (Stevens e Lowe, 1992). Na espermatogênese este mecanismo é importante, pois se trata de um ciclo de constantes divisões celulares iniciado em uma espermatogônia diplóide que sofre muitas mitoses formando muitas outras espermatogônias e por fim espermatócitos que passam por duas meioses para formar espermátides haplóides (Richburg, 2000).

A apoptose ou morte celular programada é, assim como a proliferação celular, um mecanismo contínuo e conservado evolutivamente fundamental para o desenvolvimento fetal e homeostase tecidual e uma resposta fisiológica para muitos estímulos como o dano irreversível ao DNA (Reed, 2000).

É um processo controlado ativamente pela própria célula que está morrendo (suicídio celular) levando a um fenótipo característico de encolhimento, fragmentação celular e picnose (Kerr *et al*, 1972), que é o resultado da condensação da cromatina, sendo essa a principal característica da apoptose. Com o encolhimento a célula diminui de tamanho, o citoplasma fica denso e as organelas mais fortemente empacotadas, formam-se vesículas na membrana plasmática e os fragmentos formados são divididos em corpos apoptóticos, que contém citoplasma e organelas íntegras com ou sem fragmentos nucleares. A célula apoptótica não libera seus conteúdos no tecido intersticial e não produz citocinas anti-inflamatórias, sendo rapidamente fagocitadas pelas células vizinhas (Elmore, 2007). Nos gametas masculinos, embora a maioria das células apresente as mesmas características apoptóticas das células somáticas, existem duas características distintas: inchaço celular com cromatina descondensada e cromatina homogênea (Blanco-Rodríguez, 1998).

A apoptose é tão importante na homeostase celular quanto a proliferação celular por exercer forte controle no número e tamanho de células e por proteger o organismo de células potencialmente perigosas (Hengartner, 2000).

Na espermatogênese de mamíferos a apoptose ocorre de forma muito acentuada, na qual estima-se que haja perda fisiológica de cerca de 75% de células germinativas (Huckins, 1978). Contudo, como as células são rapidamente removidas

do epitélio germinativo, a taxa de apoptose natural entre as células germinativas masculinas é apenas uma pequena porcentagem da apoptose do total ocorrida nos testículos (Miething, 1992). Este excesso de células germinativas se dá devido à expansão clonal das espermatogônias formando um número muito maior do que a célula de Sertoli pode carrear (Richburg, 2000). Por isso, algumas espermatogônias expressam o receptor Fas, que juntamente com a proteína FasL, expressa continuamente na superfície da célula de Sertoli, forma o sistema de apoptose Fas-FasL. Dessa forma, ocorrem ondas apoptóticas necessárias para equilibrar a proporção de células germinativas e células somáticas e com isso, garantir o desenvolvimento normal das células germinativas (Rodriguez *et al.*, 1997).

1.5. Efeitos da poluição atmosférica na saúde reprodutiva

Estudos epidemiológicos e experimentais mostram que a exposição à poluição gerada pelo tráfego de veículos resulta em risco de morte por doenças cardiopulmonares, aumento de sintomas respiratórios e câncer de pulmão, mudanças na regulação do sistema nervoso autônomo, aumento da resposta inflamatória e de efeitos adversos à saúde reprodutiva (WHO, 2005a).

Entre os efeitos reprodutivos a gestação e a saúde feminina receberam maior atenção a princípio, porque o embrião e o recém-nascido são mais sensíveis aos efeitos deletérios da poluição quando comparados com adultos. Por exemplo, mulheres grávidas expostas a baixos níveis de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) presentes na atmosfera apresentam níveis menores de alterações no DNA do que seus filhos (Perera *et al.*, 2004).

Esta maior vulnerabilidade do embrião em períodos críticos do desenvolvimento se dá devido à elevada taxa de proliferação celular ou por mudanças metabólicas (WHO, 2005a). Além disso, a placenta não é uma barreira para tóxicos da poluição atmosférica e por isso, as substâncias presentes no ar provocam efeitos como aumento de mortes entre recém-nascidos (Lin *et al.*, 2004), baixo peso ao nascer (Ha *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003) e restrição no crescimento intrauterino (Choi *et al.*, 2008).

Estudos experimentais também demonstram a suscetibilidade das exposições gestacionais. Fêmeas de camundongos expostas em condições reais à poluição atmosférica apresentam número menor de nascidos vivos devido ao maior número de falhas na implantação embrionária (Mohallem *et al.*, 2005). Além disso, há alteração da proporção sexual em recém-nascidos de mães expostas ao material particulado da poluição, com diminuição do sexo masculino (Lichtenfels *et al.*, 2007). O desenvolvimento placentário materno também pode ser afetado pela exposição aos níveis ambientais de PM_{2,5}, provocando falha no desenvolvimento da parte materna da placenta com conseqüente redução do peso fetal devido ao menor aporte de nutrientes para o feto (Veras *et al.*, 2008).

Embora a saúde materna e fetal tenham recebido maior atenção por parte da comunidade científica a saúde reprodutiva masculina também tem sido foco de estudos. Carlsen *et al.* (1992) analisou 61 publicações de trabalhos realizados exclusivamente em humanos e evidenciou que a qualidade do sêmen tem progressivamente piorado com o passar do tempo, provocando diminuição no número de espermatozóides e no volume de sêmen produzidos, sugerindo que fatores

ambientais, entre eles a poluição do ar, podem ser os responsáveis por esta queda de qualidade.

De fato, a saúde reprodutiva masculina pode ser afetada por tóxicos inaláveis como oxidantes e hidrocarbonetos provenientes do cigarro, que provocam aumento do dano ao DNA em homens adultos (Fraga *et al.*, 1996). Os agentes tóxicos presentes na poluição atmosférica também são capazes de provocar alterações na reprodução masculina, por exemplo, homens residentes de áreas altamente industrializadas apresentam redução da motilidade e do número de espermatozoides com morfologia normal, aumento de danos na cromatina do espermatozoide (Selevan *et al.*, 2000) e redução de fertilidade (Horák *et al.*, 2008), contudo, não ocorrem alterações do número de espermatozoides produzidos (Rubes *et al.*, 2005). A poluição gerada por veículos automotores também é capaz de alterar parâmetros reprodutivos de homens que trabalham expostos em pedágios, provocando redução da motilidade do espermatozoide, mas também sem alteração de número de gametas produzidos (De Rosa *et al.*, 2003).

Além da exposição de homens adultos às substâncias potencialmente tóxicas a exposição durante períodos precoces do desenvolvimento representa risco à saúde reprodutiva durante a vida adulta. Por exemplo, filhos de mães fumantes expostos durante a gestação ou durante a infância apresentam na idade adulta redução na concentração e contagem total de espermatozoides (Jensen *et al.*, 2004).

Estudos experimentais confirmam os perigos reprodutivos de tóxicos inaláveis como o 1,3-butadieno, derivado de fontes móveis e da indústria petroquímica, que pode alterar o DNA de camundongos (Koivisto *et al.*, 1998). Além disso, metais como o vanádio, que é produzido na combustão veicular, podem provocar alterações

ultra-estruturais nos túbulos seminíferos de camundongos, tais como vacuolização, edema, necrose e modificações na adesão celular entre as células do epitélio germinativo (Fortoul *et al.*, 2007).

Entre as partículas originárias da queima de combustíveis fósseis, as emissões produzidas pela queima de diesel são as mais estudadas. Uma série de trabalhos com exposições às partículas geradas por motores a diesel mostra que a espermatogênese de animais expostos durante a gestação ou após o nascimento pode ser alterada.

A injeção de partículas de exaustão de diesel em camundongos adultos provoca supressão da função testicular com aumento do peso do epidídimo, redução de espermátides alongadas e diminuição da produção diária de espermatozóides (Izawa *et al.*, 2007). A inalação destas partículas também provoca alterações em ratos e camundongos em exposição pré e pós-gestacional, sendo que exposições com animais adultos mostram que o interstício pode ser mais afetado apresentando edema, necrose e modificações estruturais nas células de Leydig (Yoshida *et al.*, 1999). As exposições gestacionais às partículas geradas pela combustão de motores movidos a diesel, por outro lado, podem provocar redução do número de células de Sertoli (Watanabe, 2005) e das células germinativas com conseqüente queda na produção diária de espermatozóides na idade adulta (Watanabe e Oonuki, 1999; Ono *et al.*, 2007; Ono *et al.*, 2008).

Em São Paulo exposições reais ao PM_{2,5} já foram relacionadas com problemas reprodutivos masculinos como redução da proporção de nascidos do sexo masculino e diminuição significativa do número de espermátides alongadas em testículos de camundongos expostos cronicamente após o nascimento (Lichtenfels *et al.*, 2007).

A diminuição de células germinativas pode ocorrer devido a um padrão reduzido da taxa de divisão das células tronco espermatogoniais (do tipo A), pois estas células periodicamente se dividem dando origem a mais espermatogônias do tipo A e aos outros tipos de espermatogônia, assim, o bloqueio em sua taxa proliferativa pode ter um impacto maior na espermatogênese. Espermátides alongadas podem ser reduzidas também pela parada ou retardo do desenvolvimento das células germinativas, embora normalmente o tempo para a espermatogênese ocorrer seja controlado rigidamente. Isso resulta em acúmulo de células dentro dos túbulos seminíferos, consequência da contínua proliferação (Russel *et al.*, 1990). Este tipo de resultado pode ser visto em animais com moléculas de adesão suprimidas, que apresentam redução de espermátides alongadas e acúmulo de espermátides redondas (van der Wayden *et al.*, 2006). Além disso, o retardo do ciclo pode provocar assincronia nos estádios do ciclo do epitélio seminífero. A falha na liberação das espermátides é outro problema que também pode causar redução de células germinativas, pois as células de Sertoli podem fagocitar espermátides em fases finais de desenvolvimento. Tanto o atraso no desenvolvimento das células germinativas quanto a falha na liberação de espermátides resultam em aumento de degeneração e apoptose entre as células germinativas e, conseqüentemente, redução de células da linhagem germinativa (Russel *et al.*, 1990).

Sendo assim, para investigar os efeitos da exposição real ao PM_{2,5} da poluição urbana na produção de gametas masculinos, este estudo explora alguns aspectos importantes da espermatogênese como densidade numérica das células germinativas, apoptose, proliferação celular e a freqüência dos estádios do ciclo do epitélio

seminífero em duas gerações de camundongos expostos durante o período gestacional, após o nascimento e na combinação destes dois períodos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Investigar os efeitos das condições reais de exposição ao PM_{2,5} da poluição atmosférica urbana no sistema reprodutor masculino em uma geração parental de camundongos expostos no período pós-gestacional e em sua prole exposta durante os períodos gestacional, pós-gestacional ou em ambos combinados.

2.2. Objetivos Específicos

- Verificar a influência do PM_{2,5} no desenvolvimento corpóreo, de testículos e epidídimos por meio de medidas de peso;
- Determinar a frequência dos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero pelo método da morfologia tubular em lâminas coradas com HE;
- Avaliar a frequência normal dos estádios do ciclo do epitélio seminífero em camundongos não expostos;
- Determinar o número de células do epitélio seminífero (células de Sertoli, espermatogônias, espermatócitos, espermatídes redondas e alongadas) em secções transversais de túbulo seminífero em estágio VIII do ciclo do epitélio seminífero bem como a densidade numérica de células de Leydig no interstício por meio de análise morfométrica em lâminas coradas com HE;
- Verificar o número de células em proliferação celular no epitélio seminífero entre as células germinativas masculinas em estágio VIII do ciclo do epitélio seminífero por meio das marcações imunohistoquímicas PCNA e Ki67;
- Verificar o número de células em apoptose no epitélio seminífero entre as

células germinativas masculinas pela reação de TUNEL e pela coloração de HE nos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero;

- Avaliar a taxa espontânea de apoptose nos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero em camundongos não expostos.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Para este trabalho foram utilizadas duas gerações de camundongos da linhagem isogênica BALB/c provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP.

Machos e fêmeas (geração parental) foram expostos, em duas condições, com 10 dias de vida à poluição até a idade adulta, quando foram acasalados a fim de produzir a primeira geração de animais deste estudo. Os animais da geração parental e primeira geração receberam, *ad-libitum*, ração comercial e água de torneira autoclavada.

3.2. Caracterização do sítio de exposição

O local de exposição ficou situado no campus da FMUSP na esquina de duas vias de alta frequência de veículos e distante 160m da Estação de Monitoramento Cerqueira César, da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Uma das vias é a Rua Teodoro Sampaio que fica a 20m do local de exposição, cujo fluxo veicular diário é de 25.590 carros, 5.299 veículos movidos a diesel e 808 motocicletas. A outra é a Av. Dr. Arnaldo, que fica a 150m do local de exposição, na qual transitam diariamente 83.941 carros, 9.936 veículos a diesel e 6.321 motocicletas. Não há contribuição de queima de biomassa nem de atividade industrial na região, sendo a fonte poluidora principal o tráfego de veículos (CETESB, 2005).

3.3. Câmaras de exposição

Duas câmaras de exposição de topo aberto ficaram localizadas lado a lado na FMUSP (Mohallem *et al.*, 2005; Pires-Neto *et al.*, 2006; Lichtenfels *et al.*, 2007,

Mauad *et al.*, 2008, Veras *et al.*, 2008) (Figura 5). A estrutura cilíndrica de alumínio com medidas de 2,0 metros de diâmetro e 2,15 metros de altura das câmaras era revestida de plástico com proteção aos raios ultravioleta. A base do cilindro, revestido por dupla camada de plástico, possuía orifícios de entrada de ar por toda extensão circular da parede interna, por onde entrava ar que era distribuído uniformemente dentro das câmaras a uma taxa de fluxo de 20 m³/min. A exaustão ocorreu pelo topo aberto, sendo essencialmente um sistema normobárico. Uma das câmaras, denominada câmara filtrada, recebeu ar filtrado e a outra, chamada câmara não filtrada, recebeu o ar ambiente sem passar por filtros. Na câmara com ar filtrado havia um sistema de filtragem composto por uma série de três filtros alinhados. O primeiro filtro estava em contato com o ar ambiente e eliminava partículas grandes (Purafil, São Paulo, modelo TB). O segundo retinha partículas finas (Purafil, São Paulo, modelo JFL-90), seguido pelo terceiro que reteve partículas ultrafinas com diâmetros aerodinâmicos de até 0,3 µm constituído por um filtro do tipo HEPA (*High Efficiency Particulate Air*).

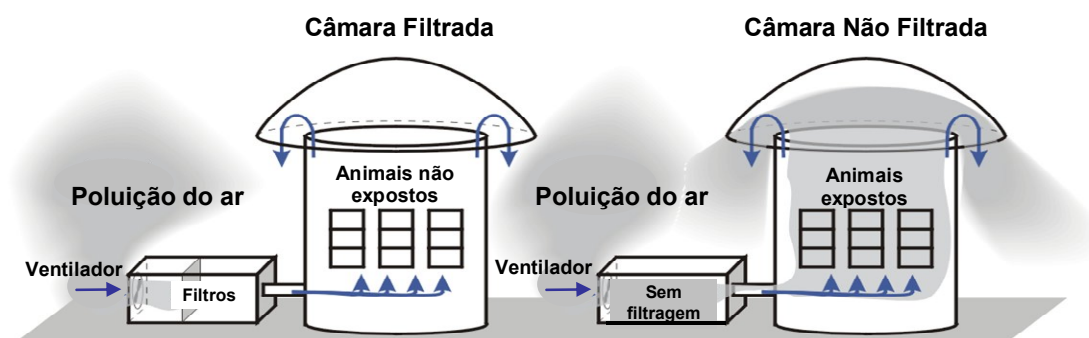


Figura 5. Desenho esquemático das câmaras de exposição do tipo topo aberto nas quais as duas gerações de animais utilizadas neste estudo ficaram expostas. Na câmara filtrada há um sistema de filtros em série no qual o primeiro filtro retira partículas grossas, o segundo partículas finas e o terceiro partículas ultrafinas. Com este sistema de filtragem pretendeu-se reduzir a concentração de poluentes atmosféricos dentro da câmara filtrada, ao contrário do que ocorreu com a câmara não filtrada na qual o ar ambiente não passou por nenhuma filtragem.

3.4. Monitoramento das condições ambientais de exposição

A temperatura e a umidade foram medidas mensalmente com auxílio de um termohigrômetro digital (modelo THD, SoilControl Instrumentos de Medição e Pesquisa Científica) no interior de cada uma das câmaras, bem como o ruído com um decibelímetro digital (modelo DEC-5000, Instrutherm, São Paulo, Brasil).

3.4.1. Concentração de $PM_{2,5}$

A concentração de material particulado ($PM_{2,5}$) nas câmaras de exposição foi feita pelo método gravimétrico. As partículas foram coletadas em filtros de polycarbonato (Isopore™ Membrane Filters Polycarbonate, 0,8 μm , 37 mm, Millipore, USA) por meio de impactadores de pequeno volume tipo *Harvard* (Air

Diagnosics, Harrinson, ME, USA) operando a uma vazão de 10L/min por um período de 24 horas. O impactador do tipo *Harvard* possui acoplado ao sistema uma cabeça separadora que determina ponto de corte para partículas com diâmetro aerodinâmico $\leq 2,5$ μm . Foram realizadas coletas cinco dias por semana durante os sete meses de exposição dos animais das duas gerações.

Para a determinação gravimétrica os filtros foram previamente condicionados por um período mínimo de 24h em sala com temperatura e umidade controladas para posterior pesagem em balança ultra-micro analítica (modelo UMX2, da Mettler e Toledo, Suíça).

3.4.2. Caracterização da composição química do material particulado (PM_{2,5})

A determinação semi-quantitativa da composição elementar do material particulado foi feita pelo método de espectrometria de fluorescência de raios-X por dispersão de energia (FRX-DE) (modelo EDX 700HS, Shimadzu Corporation Analytical Instruments Division, Kyoto, Japão) nas partículas coletadas em filtros de policarbonato após a determinação de massa pelo método gravimétrico.

O EDX-700HS utiliza um tubo gerador de raios-X de ródio (Rh-target tube), voltagem de 5 a 50 kV, corrente de 1 a 1000 A e um detector dos raios-X de Si/Li com capacidade para detecção dos elementos de sódio ao urânio (Na-U). As análises foram realizadas sob vácuo em uma área de 10 mm do filtro. Para a captura do espectro dos elementos a amostra foi irradiada 3 vezes por um período de 300 segundos.

Para o cálculo da concentração de cada elemento foi considerado o carbono, na forma de policarbonato (C₁₆H₆O₃) para balanço da matriz. Um filtro branco de cada

lote exposto foi analisado e os valores dos elementos encontrados foram descontados do valor de cada uma das amostras. O resultado é apresentado em $\mu\text{g/g}$ (Mauad *et al.*, 2008).

3.4.3. Concentração de fumaça

Dentro das câmaras foram monitoradas também as concentrações de fumaça (*black smoke*) para a determinação indireta do conteúdo de carbono elementar.

As partículas de fumaça foram coletadas em filtros de celulose (Whatman nº1, Energética Indústria e Comércio LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) por um equipamento adaptado (Energética Indústria e Comércio LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) que funcionava a uma vazão de 2L/min, por um período de 24 horas de amostragem.

Para determinação da concentração de fumaça presente nas amostras foi utilizada a técnica de refletância de luz (Refletômetro, modelo “Smoke Stain reflectometer - Model 43”, Diffusion Systems, Londres, Reino Unido) (Ccyollo, 2002).

A técnica de refletância consiste na incidência de luz de uma lâmpada de tungstênio no filtro amostrado, que reflete uma intensidade inversamente proporcional à quantidade de carbono elementar presente na amostra. Como as partículas de carbono elementar são boas absorvedoras de luz, quanto maior a sua presença, menor a intensidade de luz refletida pelo filtro e menor a detecção pelo foto sensor.

A fumaça é produto da queima de combustíveis fósseis, funcionando como indicadora da emissão veicular, particularmente de veículos a diesel. Por esta razão em vários trabalhos são realizadas medidas de fumaça para a determinação indireta de

carbono elementar em regiões urbanas (Watson *et al.*, 2002).

3.4.4. Ambiente Externo

Para o monitoramento do ambiente externo às câmaras foram utilizados dados obtidos de amostragens contínuas realizadas em uma Estação de Monitoramento da CETESB, próxima à região do estudo.

Os poluentes amostrados medidos foram CO (monóxido de carbono) pelo método infravermelho não dispersivo, PM₁₀ (partículas com diâmetro aerodinâmico de 10 µm) pelo método de separação inercial/filtração, NO₂ (dióxido de nitrogênio) pelo método de quimioluminescência e SO₂ (dióxido de enxofre) pelo método pararosanilina. Como estes poluentes não foram medidos dentro das câmaras, suas concentrações externas foram consideradas como as mesmas dentro das câmaras.

3.5. Protocolo experimental

A geração parental constituída por 60 machos e 60 fêmeas em cada uma das câmaras ficou exposta durante 120 dias, de agosto a dezembro de 2005. Após este período os animais foram acasalados na proporção de 1♂:1♀, mantidos em pares por 10 dias. A presença de plug vaginal em cada fêmea foi observada diariamente, durante o pareamento, como medida de efetivação de cópula.

Conforme os animais da primeira geração foram sendo produzidos, parte das fêmeas (n=30) com sua prole eram transferidas da câmara filtrada para a não filtrada, formando o grupo de exposição pós-natal. Da mesma forma, parte dos animais da primeira geração nascidos na câmara não filtrada foi transferida com suas mães (n=30) para a câmara filtrada constituindo o grupo pré-natal. Este processo de troca

de animais entre as câmaras foi chamado de *crossover* (terminologia inglesa para transferência, troca). Os animais remanescentes da câmara filtrada formaram o grupo de exposição não exposto e os da câmara não filtrada, o grupo de exposição pré+pós-natal. Os animais da primeira geração ficaram, então, expostos por 90 dias (Figura 6).

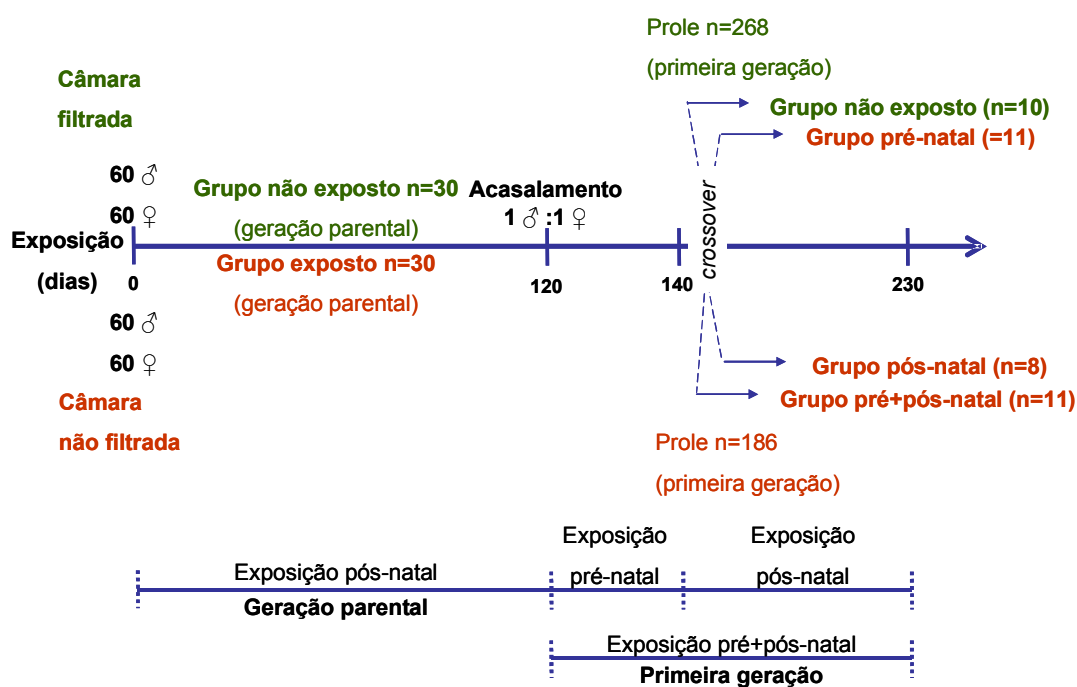


Figura 6. Esquema do protocolo de exposição dos animais da geração parental e da primeira geração. Os animais da geração parental (60♂ e 60♀ em cada câmara) ficaram expostos a partir dos 10 aos 120 dias de vida, após este período os animais foram acasalados. Até o momento do nascimento havia dois grupos (exposto e não exposto), mas enquanto os animais da primeira geração nasciam, era realizado o *crossover* entre as câmaras formando, então, quatro grupos experimentais (não exposto, pré-natal, pós-natal e pré+pós-natal), que ficaram expostos por 90 dias.

No nascimento foi registrado o número de nativos/fêmea, bem como o número total de animais produzidos pelos diferentes grupos parentais. A evolução do peso dos animais da primeira geração foi monitorada ao longo de 30 dias.

3.6. Coleta e preparo do material biológico

Após o acasalamento os machos da geração parental foram anestesiados com pentobarbital sódico intraperitoneal (50mg/kg), o peso corpóreo de cada animal foi registrado (balança eletrônica modelo BE-430H, Instrumentos Científicos CG, Campo Grande, Brasil). Os animais, após procedimento de eutanásia por secção da aorta abdominal, foram necropsiados para coleta e pesagem (Balança Modelo AL500, Marte Balanças e Equipamentos de Precisão, Brasil) dos órgãos de interesse neste estudo: testículos e epidídimos.

Para os procedimentos histológicos um dos testículos foi fixado em solução de Bouin (750 mL de ácido pícrico, 250 mL de formaldeído e 50 mL de ácido acético) e o outro em paraformaldeído 4%. Ambos, após fixação de 24 horas, foram transferidos para álcool 70% por mais 24 horas e seccionados transversalmente em três partes iguais para confecção de lâminas histológicas de 5µm de espessura.

Ao final de 90 dias os animais da primeira geração foram também eutanasiados, pesados, seus testículos retirados, pesados, fixados em Bouin ou paraformaldeído 4% e corados, assim como ocorreu com os animais da geração parental.

O tecido fixado em bouin foi corado com hematoxilina-eosina (HE) enquanto o fixado em paraformoldeído 4% recebeu marcação imunohistoquímica com os anticorpos PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) (Santa Cruz Biotechnology Inc, USA, sc7907) e Ki67 (Novocastra, UK, NCCL-L-Ki67Mi1) e marcação de

fragmentação de DNA com o método enzimático de TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) (kit POD, Roche Diagnostics, Germany).

O preparo da marcação com os anticorpos PCNA e Ki67 foi realizado nas secções transversais de testículo que foram desparafinizadas e reidratadas. A recuperação do antígeno foi feita em panela de pressão por 1 min: 30s em tampão citrato (pH 6.0). A atividade da peroxidase endógena foi, então, bloqueada pela incubação das amostras em H₂O₂ 10% por 5 min em temperatura ambiente, cinco ou seis vezes. As lâminas foram depois lavadas em água, água deionizada por 5 min e em tampão salina-fosfato (PBS). O anticorpo primário foi diluído em albumina de soro bovino (BSA) (1:250 para Ki67 e 1:1000 para PCNA) e incubado à temperatura de 4°C *overnight* em câmara umidificada. No dia seguinte, as amostras foram lavadas em PBS três vezes por 5 min cada. O anticorpo secundário *anti-mouse* (para Ki67) ou *anti-rabbit* (para PCNA) foi adicionado e incubado à temperatura ambiente (37°C) em câmara umidificada, seguido por lavagem em PBS três vezes por 5 min cada. Diaminobenzidina (DAB) (Sigma, D5637) foi usada como cromógeno (70mg DAB/70mL PBS em 3mL H₂O₂) por 5 min. As amostras foram incubadas por 5 min em temperatura ambiente e as lâminas foram contra coradas com hematoxilina.

O ensaio de TUNEL foi realizado usando o kit de detecção de morte celular *in situ*, POD. Depois de desparafinado e reidratado o tecido foi incubado em proteinase K para permeabilização por 30 min em temperatura ambiente, lavado duas vezes com PBS por 5 min cada a 37°C. As lâminas foram incubadas em H₂O₂-metanol 0.3% por 30 min em temperatura ambiente para inativar a peroxidase endógena. As amostras foram lavadas em PBS duas vezes por 5 min cada e, então, incubadas com 50µL de TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) por 60min à

37°C, foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com 50µL do Conversor POD (HRP) por 30min e lavadas três vezes por 3 min cada com PBS. As secções transversais foram contra coradas com verde de metila e examinadas em microscópio óptico.

3.7. Análise morfométrica quantitativa de células testiculares

As análises morfométricas em células germinativas e somáticas e a avaliação do número de células germinativas em proliferação presentes no epitélio seminífero foram feitas utilizando microscópio de luz (Eclipse E200, Nikon Corporation) acoplado a uma câmera de vídeo (Digital Color SCC-131, Samsung) e a um monitor (Security Monitor SM 20, Gradiente) no qual foi fixada uma área delimitada de 5.625 µm². O número de células em apoptose foi obtido utilizando-se apenas o microscópio de luz (Eclipse E200). Todas as contagens foram realizadas na objetiva de 40x em secções de túbulos, transversais ou levemente oblíquos em lâminas cegas que foram reveladas após as análises.

3.7.1. Células germinativas e somáticas

A análise morfométrica dos testículos dos animais das duas gerações quantificou células da linhagem germinativa masculina - espermatogônias, espermatócitos, espermatídes redondas e alongadas - bem como as células somáticas de Sertoli e de Leydig, em secções transversais de testículo coradas com HE.

A avaliação morfométrica quantitativa de células germinativas e células de Sertoli foi feita em túbulos no estágio VIII do ciclo do epitélio seminífero, em oito cortes de túbulo seminífero, transversais ou levemente oblíquos, em dois campos para

cada túbulo por animal. A densidade numérica dessas células foi determinada por comprimento linear (75 μm) de membrana basal (cél./ μm).

A densidade numérica de células de Leydig foi determinada pelo número médio de células presentes em área de referência (5.625 μm^2) em 16 campos aleatórios de testículo por animal (cél./ μm^2).

3.7.2. Proliferação celular

A atividade proliferativa foi avaliada pela detecção dos anticorpos Ki67 e PCNA, sendo a proliferação celular quantificada por comprimento de membrana basal (75 μm) com o auxílio do mesmo retículo de referência acima descrito, em oito secções transversais de túbulos em estágio VIII do ciclo espermatogênico por animal, sendo contadas como células proliferativas aquelas que apresentaram coloração marrom escura.

3.7.3. Apoptose

As células apoptóticas foram visualizadas usando tanto o método de TUNEL quanto a coloração de HE. A contagem foi realizada em 30 secções transversais de túbulos seminíferos por animal, identificando-se o estágio do ciclo do epitélio seminífero no qual cada secção contada se encontrava. Foram consideradas células apoptóticas aquelas marcadas com coloração marrom escura quando utilizada a técnica de TUNEL e aquelas que apresentavam condensação intensa da cromatina e do citoplasma com coloração roxa quando utilizada a técnica de HE em microscopia óptica.

3.8. Frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero

A contagem dos estádios do ciclo do epitélio seminífero foi realizada por meio da metodologia da morfologia tubular (Berndtson, 1977; Neves *et al.*, 2002), que divide o ciclo em oito estádios conforme organização e maturação das células germinativas. Cada animal teve 200 secções de túbulos, transversais ou levemente oblíquos, classificados em um dos oito estádios de maturação do epitélio seminífero estabelecidos pelo método, analisados em lâminas codificadas coradas com HE, em microscópio óptico.

3.9. Análise Estatística

Os dados obtidos na caracterização da composição química do material particulado foram submetidos à análise fatorial, adotando-se o método de componentes principais (Johnson e Wichern, 1992). Essa técnica constrói novas variáveis, denominadas fatores, a partir das variáveis originais, nas quais variáveis correlacionadas são agrupadas em um mesmo fator.

Os dados obtidos das análises das duas gerações foram submetidos ao teste de *Kolmogorov-Smirnov* para determinação da normalidade de distribuição, mostrando-se paramétricos.

Os dados da geração parental obtidos da quantificação das células testiculares e do estadiamento foram, então, submetidos à análise de comparação de média pelo teste-T e os dados da primeira geração à análise de variância *One-Way* (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey usado para comparar os valores medidos entre os animais dos grupos de exposição. Para os dados de efetivação de cópula foi aplicado o teste qualitativo chi-quadrado.

O programa estatístico utilizado foi o *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 13.0, sendo consideradas diferenças significativas quando $p \leq 0,05$. Os resultados são apresentados em média \pm erro padrão.

4. Resultados

Duas gerações de camundongos foram expostas ao material particulado da poluição atmosférica da cidade de São Paulo. Foram avaliadas para ambas as condições de exposição como temperatura, umidade relativa e nível de ruído, além de dados sobre o material particulado fino (PM_{2,5}) e fumaça (*black smoke*) dentro das câmaras de exposição, bem como outros poluentes fora delas. A espermatogênese foi avaliada após a exposição sob parâmetros como contagem de células da linhagem germinativa e células somáticas de Sertoli e de Leydig, proliferação celular, apoptose e ciclo do epitélio seminífero.

4.1. Geração Parental

4.1.1. Monitoramento das condições ambientais de exposição

A variação mensal de temperatura e de umidade relativa foi verificada no interior de cada uma das câmaras e não foram encontradas diferenças estatísticas entre elas ($p > 0,05$) no período de exposição da geração parental. Na câmara filtrada as temperaturas registradas mostraram máxima média (\pm EP) de $27,28 \pm 0,47$ °C e mínima média (\pm EP) de $17,16 \pm 0,33$ °C. Na câmara não filtrada a máxima e mínima (\pm EP) de temperatura foi respectivamente, $27,42 \pm 0,46$ °C e $16,21 \pm 0,32$ °C.

A umidade relativa na câmara filtrada mostrou máxima média (\pm EP) de $79,02 \pm 1,09$ % e mínima média (\pm EP) de $48,83 \pm 1,71$ %. Na câmara não filtrada a máxima e mínima média (\pm EP) foram, respectivamente, $82,12 \pm 0,89$ % e $48,48 \pm 2,31$ %.

O nível de ruído no interior de cada câmara foi verificado posteriormente ao período de exposição e, portanto, as médias (\pm EP) são consideradas as mesmas nos períodos de exposição de cada geração.

Na câmara filtrada a média máxima de ruído em decibéis foi $80,22 \pm 1,48$ e a mínima de $74,78 \pm 1,13$. Na câmara não filtrada a máxima foi de $79,33 \pm 1,41$ dB e a mínima foi de $74,82 \pm 0,89$ dB, não sendo estes valores estatisticamente diferentes entre as câmaras ($p > 0,05$).

4.1.1.1. Concentração de $PM_{2,5}$

A análise gravimétrica dos filtros expostos nas câmaras de exposição mostrou que a média de $PM_{2,5}$ no período de estudo referente à geração parental (agosto a dezembro de 2005) foi de $1,16 \pm 0,14 \mu\text{g}/\text{m}^3$ na câmara filtrada e de $18,39 \pm 1,49 \mu\text{g}/\text{m}^3$ na não filtrada, mostrando redução significativa após filtragem do ar ($p < 0,001$). No ambiente externo às câmaras foi registrado valor médio de material particulado fino de $20,24 \pm 1,63 \mu\text{g}/\text{m}^3$, que também foi significativamente diferente da câmara filtrada ($p < 0,001$), mas não apresentou alteração significativa na concentração de $PM_{2,5}$ ($p > 0,05$) quando comparado com a câmara não filtrada (Figura 7).

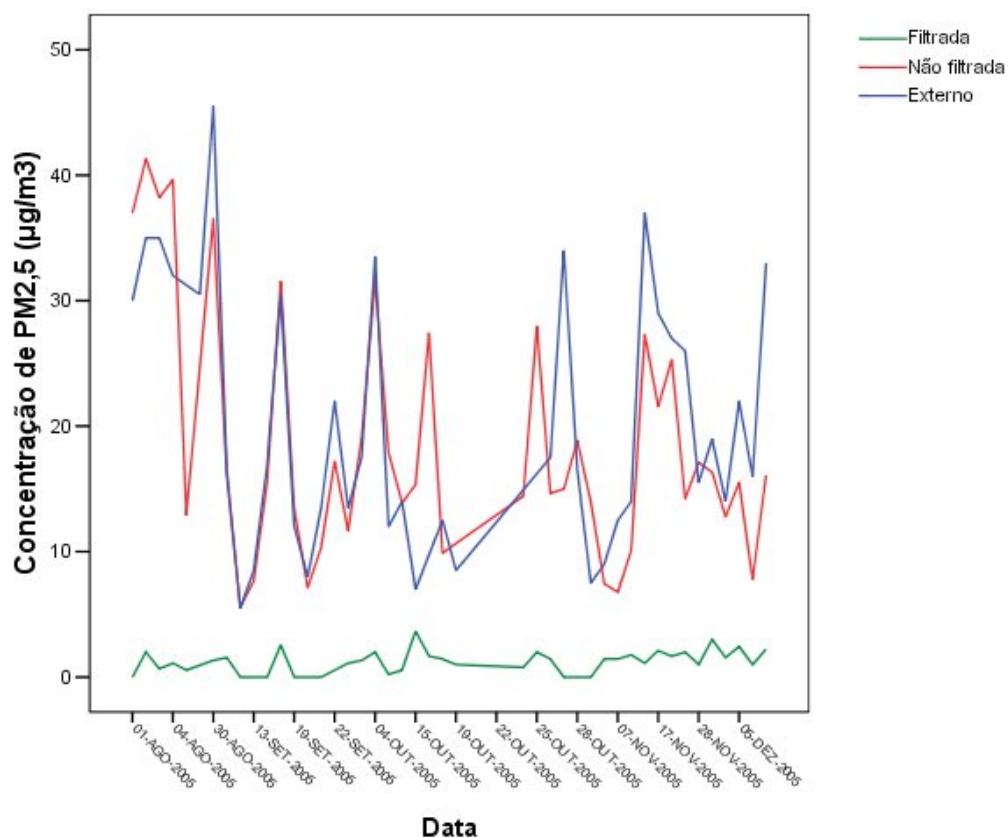


Figura 7. Média comparativa entre as câmaras filtrada, não filtrada e ambiente externo mostrando a concentração de material particulado em sua fração de 2,5 µm de diâmetro (PM_{2,5}) no período de exposição da geração parental (de agosto a dezembro de 2005).

4.1.1.2. Caracterização da composição química do material particulado (PM_{2,5})

Os filtros de policarbonato foram avaliados para a determinação semi-quantitativa da composição elementar do PM_{2,5} pelo método de espectrometria de fluorescência de raios-X. Os elementos encontrados nas amostras foram submetidos à análise de componentes principais de forma a caracterizar a fonte emissora de acordo com o comportamento destes elementos. A análise de componentes principais mostrou dois fatores principais, o primeiro identificou ferro, silício, vanádio, zinco e cobre (Fe, Si, V, Zn e Cu) e o segundo fator principal identificou chumbo e enxofre (Pb e S). Além destes elementos, foram encontrados outros compostos nas amostras,

tais como alumínio (Al), cálcio (Ca), potássio (K), sódio (Na), níquel (Ni), fósforo (P), titânio (Ti) e carbono (C), que foi utilizado como elemento balanço da matriz (Tabela 1).

Tabela 1. Análise descritiva da composição elementar presente no material particulado (PM_{2,5}) coletado nos filtros de policarbonato durante a exposição de agosto de 2005 a abril de 2006. Os dados estão representados em média ± desvio padrão.

Elementos adsorvidos ao PM_{2,5}	Média ± DP (µg/g)
Massa	0,47 ± 0,31
Al	5053,8 ± 6741,6
Ca	3271,4 ± 5490,3
Cu	238,6 ± 343,4
Fe	3181,8 ± 6263,7
K	2719,7 ± 3987,4
Na	5540 ± 2343,3
Ni	40,68 ± 60,25
P	1415,4 ± 1854,7
Pb	97,96 ± 240,15
S	9836,8 ± 10311,7
Si	3545,3 ± 4099,59
Ti	188,10 ± 430,74
V	64,78 ± 91,48
Zn	757,76 ± 1106,80
C (%)	98 ± 3

4.1.1.3. Concentração de fumaça

Durante o período de exposição da geração parental houve uma redução significativa ($p < 0,001$) de fumaça na câmara filtrada quando comparada com a

câmara não filtrada, observada através da análise de refletância dos filtros de celulose expostos, com concentração média (\pm EP) de $2,02 \pm 0,25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e na câmara não filtrada $47,80 \pm 5,46 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

4.1.1.4. Ambiente externo

Nos meses de agosto a dezembro de 2005, referente à exposição da geração parental, a concentração média (\pm EP) de PM_{10} , CO e SO_2 na região de exposição foi medida pela CETESB (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração média (\pm EP) de poluentes atmosféricos (CO, PM_{10} e SO_2) externos às câmaras no período de experimentação da geração parental, de agosto a dezembro de 2005.

Concentração	
PM_{10}	$39,53 \pm 1,73 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ^a
CO	$1,90 \pm 0,07 \text{ ppm}$ ^b
SO_2	$8,54 \pm 0,49 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ^a

Dados CETESB (2008). ^a média de 24h de amostragem, ^b média de 8h de amostragem.

4.1.2. Fertilidade

Durante o período experimental não houve mortalidade registrada entre os animais da geração parental nem entre os adultos da primeira geração.

Após pareamento com os machos foi constatado que a observação do plug vaginal (indicativo de cópula) foi menos freqüente em fêmeas expostas ao material particulado presente na câmara não filtrada (Figura 8), embora a diferença não tenha sido significativa ($p > 0,05$). No acasalamento dos animais da geração parental a

porcentagem de fêmeas prenhes no grupo não exposto foi de 85,0 % e no grupo exposto de 63,2 %, mostrando diferença significativa ($p=0,007$). O número total de nativos da prole na câmara filtrada foi maior do que a nascida na não filtrada com 268 e 186 nascimentos, respectivamente. Não houve diferença estatística ($p>0,05$) no número de animais por ninhada de cada fêmea entre os grupos não exposto ($4,47 \pm 0,42$) e exposto ($3,26 \pm 0,45$, $p>0,05$) ao material particulado fino.

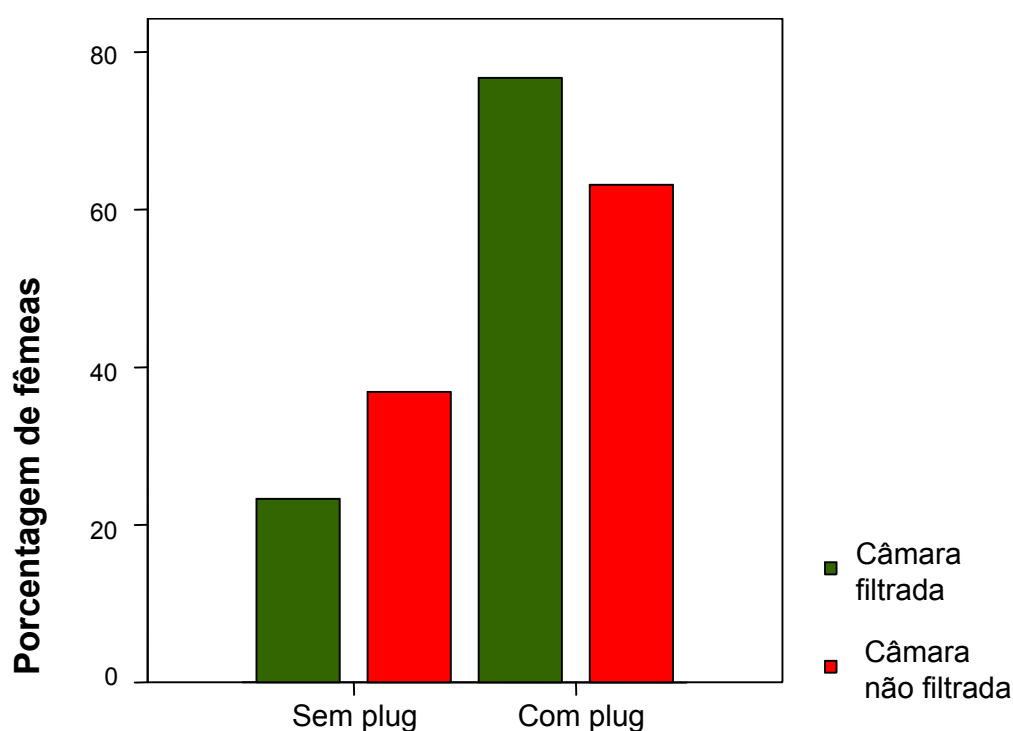


Figura 8. Porcentagem de efetivação de cópula através da presença ou ausência de plug vaginal em fêmeas mantidas e acasaladas nas câmaras filtrada e não filtrada, com machos nas mesmas condições de exposição.

4.1.3. Peso corpóreo e dos órgãos

Após o período experimental no qual os animais da geração parental ficaram expostos ao $PM_{2,5}$, o peso corpóreo dos animais do grupo exposto apresentou

redução, porém sem diferença significativa ($p=0,052$). Com relação ao peso dos órgãos houve aumento significativo do peso dos testículos ($p=0,012$) e epidídimos ($p<0,001$) nos animais do grupo exposto quando comparado com o grupo não exposto. O índice gonado-somático (IGS), que é expresso pela razão testículos/corpo, foi calculado e exibiu diferença significativa no grupo exposto ($p=0,003$), assim como o índice epidídimo-somático (IES), expresso pela razão epidídimos/corpo, no mesmo grupo ($p=0,001$) como mostra a tabela 3.

Tabela 3. Peso do corpo (g), testículos (mg), epidídimos (mg) e razão órgãos/corpo (mg) dos animais da geração parental exposta (grupo exposto) ou não (grupo não exposto) ao material particulado ($PM_{2,5}$).

Peso	Não exposto (n=30)	Exposto (n=30)
Corpóreo	26,27 ± 0,52 (14,48 - 30,05)	24,97 ± 0,39 (21,32 - 30,37)
Epidídimos	35,64 ± 0,90 (24,00 - 43,00)	40,72 ± 0,93 ^a (26,00 - 53,00)
Epidídimos/Corpo	2,76 ± 0,11 (1,69 - 5,11)	3,27 ± 0,08 ^b (2,07 - 3,93)
Testículos	96,08 ± 2,59 (37,00 - 117,00)	106,05 ± 1,20 ^c (87,00 - 120,00)
Testículos/Corpo	7,46 ± 0,33 (2,60 - 14,15)	8,53 ± 1,25 ^d (6,65 - 9,68)

Valores expressos em média ± erro padrão. Entre parênteses valores mínimo e máximo.^a

$p<0,001$, ^b $p=0,001$, ^c $p=0,012$ e ^d $p=0,003$

4.1.4. Análise morfométrica quantitativa de células testiculares

4.1.4.1. Células germinativas e somáticas

Nos animais da geração parental, o número de células somáticas de Sertoli (cél./ μm) não mostrou alteração, embora tenha havido uma tendência de redução ($p=0,078$) no grupo exposto quando comparado ao grupo não exposto ao $\text{PM}_{2,5}$, assim como as células de Leydig (cel./ μm^2) que também exibiram tendência de diminuição ($p=0,144$) no mesmo grupo (Tabela 4).

Comportamento semelhante foi visto também entre as espermatogônias, espermatócitos e espermátides alongadas que mostraram tendência à redução e as espermátides arredondadas que apresentaram tendência ao aumento ($p>0,05$) (Tabela 4), nos animais do grupo exposto ao $\text{PM}_{2,5}$ quando comparado aos que não foram expostos.

4.1.4.2. Proliferação celular

A proliferação celular nas células germinativas dos animais da geração parental, verificada com os testes de imunohistoquímica Ki67 e PCNA em secções transversais de túbulos seminíferos por comprimento de membrana basal (cél./ μm), não foi diferente ($p>0,05$) entre os grupos não exposto e exposto ao material particulado ($\text{PM}_{2,5}$) (Tabela 5).

Tabela 4. Valores médios (\pm EP) do número de células Sertoli (cél./ μm), de Leydig (cél./ μm^2) e células da linhagem germinativa (cél./ μm) masculina dos animais da geração parental.

Tipos celulares	Não exposto (n=30)	Exposto (n=30)
Sertoli	1,20 \pm 0,07 (0,44 - 1,81)	1,02 \pm 0,07 (0,31 - 1,88)
Leydig	9,58 \pm 0,45 (5,63 - 15,25)	8,74 \pm 0,32 (6,25 - 12)
Espermatogônia	4,12 \pm 0,15 (2,63 - 5,75)	3,94 \pm 0,17 (2,44 - 6,31)
Espermatócito	4,71 \pm 0,17 (3,25 - 6,56)	4,49 \pm 0,21 (2,88 - 7,13)
Espermátide arredondada	16,77 \pm 0,64 (11,75 - 23,19)	17,12 \pm 0,70 (11,81 - 22,38)
Espermátide alongada	9,23 \pm 0,59 (4,19 - 16,75)	9,20 \pm 0,49 (4,25 - 13)

Entre parênteses valores mínimo e máximo.

Tabela 5. Valores médios (\pm EP) do número de células germinativas em proliferação (cél./ μm) nos animais dos dois grupos experimentais da geração parental expostos ou não ao $\text{PM}_{2,5}$.

Teste de proliferação	Não exposto (n=30)	Exposto (n=30)
Células Ki67+	14,82 \pm 0,62 (9,50 - 16,38)	14,86 \pm 0,44 (13,44 - 16,63)
Células PCNA+	12,41 \pm 0,69 (8,56 - 16,25)	12,33 \pm 0,75 (8,81 - 15,00)

Entre parênteses valores mínimo e máximo.

4.1.4.3. Apoptose

O número de células germinativas em apoptose (cél. apoptóticas/túbulo) nas células germinativas dos animais dos grupos exposto e não exposto da geração parental foi verificado em 30 secções transversais de túbulos seminíferos identificando-se o estágio do ciclo espermatogênico em lâminas coradas com HE ou preparadas com a técnica de TUNEL.

Quando a apoptose foi avaliada com a coloração de HE houve redução significativa desse fenômeno durante o estágio IV do ciclo do epitélio seminífero dos animais do grupo exposto ($1,20 \pm 0,29$), quando comparado com o grupo não exposto ($2,27 \pm 0,39$, $p=0,046$), e aumentada no estágio VIII, deste mesmo grupo ($0,10 \pm 0,04$), em comparação com o grupo não exposto ($0,00 \pm 0,00$, $p=0,019$) (Figura 9). Pela técnica de TUNEL também houve, no grupo exposto ao $PM_{2,5}$, queda no número de células em apoptose nos estágios IV ($1,60 \pm 0,82$, $p=0,017$), V ($0,35 \pm 0,21$, $p=0,035$) e VIII ($0,12 \pm 0,06$, $p=0,024$), quando comparados aos mesmos estágios para o grupo não exposto: $4,51 \pm 5,8$; $1,18 \pm 0,30$; e $0,44 \pm 0,14$; respectivamente (Figura 10).

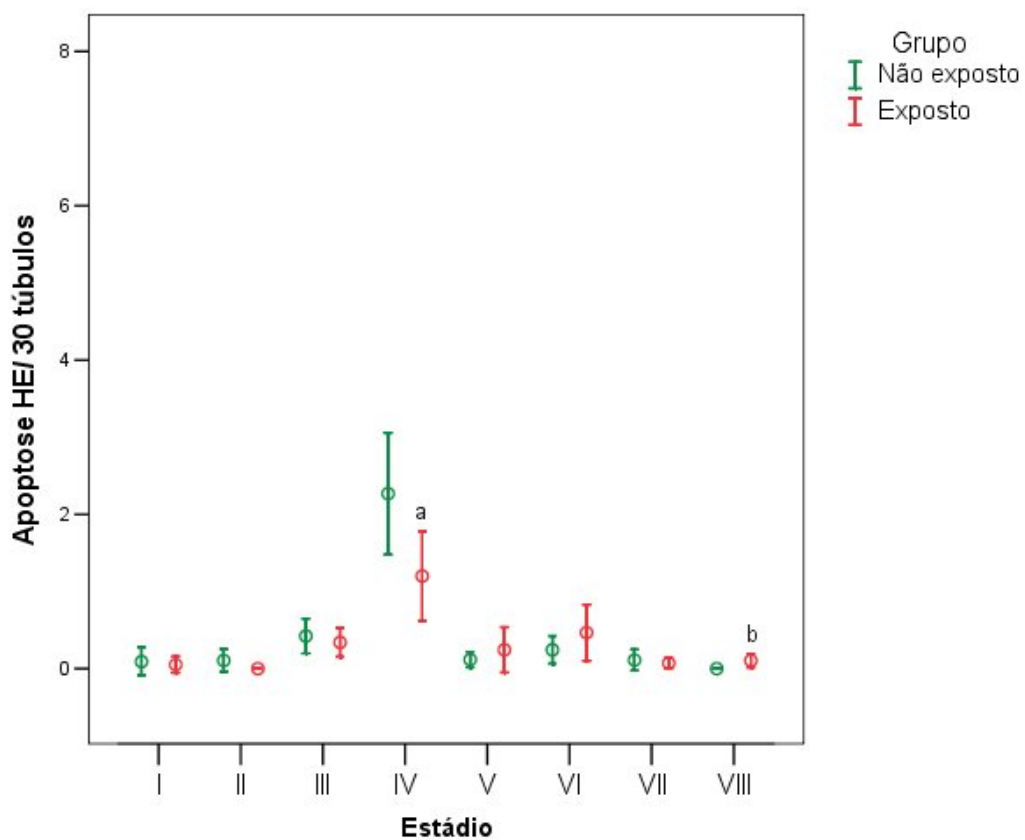


Figura 9. Número médio (\pm EP) de células em apoptose no epitélio germinativo nos diferentes grupos experimentais em coloração de HE. ^a $p=0,046$; ^b $p=0,019$.

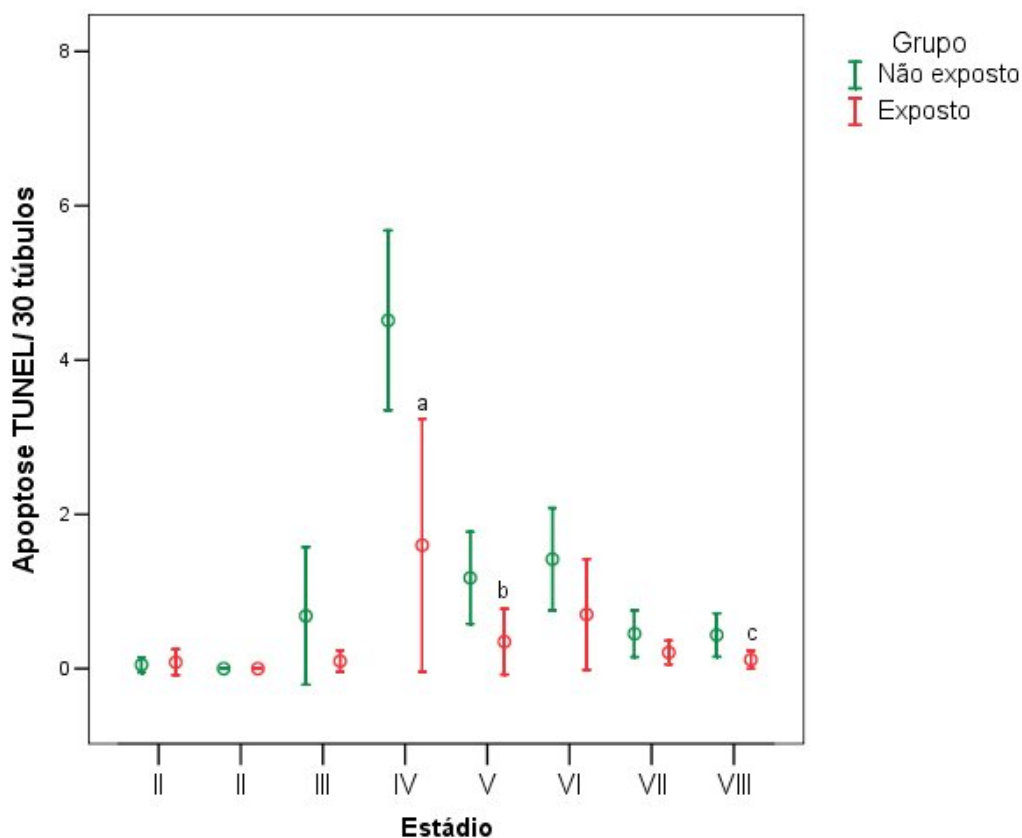


Figura 10. Número médio (\pm EP) de células em apoptose entre as células germinativas masculinas nos diferentes grupos experimentais quantificada pelo método de TUNEL. ^a

$p=0,017$, ^b $p=0,035$, ^c $p=0,024$

A apoptose espontânea verificada entre os animais do grupo não exposto mostrou-se aumentada apenas no estágio IV para as duas técnicas empregadas para a macacão de apoptose, HE e TUNEL ($p<0,001$ para ambas). Os demais estádios mostraram equivalência numérica de células germinativas em apoptose nos diferentes grupos experimentais, não apresentando diferença significativa ($p>0,05$) nem na avaliação pela coloração de HE (Tabela 6) nem pelo método de TUNEL (Tabelas 7).

Tabela 6. Apoptose espontânea pela coloração de HE nos animais da geração parental não expostos ao material particulado fino (PM_{2,5}) entre os diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero.

Estádio	Média ± EP	Mínimo	Máximo
I	0,09 ± 0,09	0	1
II	0,11 ± 0,07	0	1
III	0,42 ± 0,11	0	3
IV	2,27 ± 0,39 ^a	0	11
V	0,12 ± 0,05	0	1
VI	0,24 ± 0,09	0	2
VII	0,11 ± 0,07	0	3
VIII	0,00 ± 0,00	0	0

^a p<0,001

Tabela 7. Apoptose espontânea na geração parental pela técnica de TUNEL entre os estádios do ciclo do epitélio seminífero dos animais do grupo não exposto ao PM_{2,5}.

Estádio	Média ± EP	Mínimo	Máximo
I	0,05 ± 0,05	0	1
II	0,00 ± 0,00	0	0
III	0,68 ± 0,45	0	8
IV	4,51 ± 0,58 ^a	0	12
V	1,18 ± 0,30	0	9
VI	1,42 ± 0,33	0	10
VII	0,45 ± 0,15	0	7
VIII	0,44 ± 0,14	0	3

*p<0,001

4.1.5. Frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero

Duzentas secções de túbulos seminíferos foram contadas por animal para verificar a frequência dos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero pelo método da morfologia tubular nos animais experimentais.

A frequência do estágio IV do ciclo espermatogênico na geração parental apresentou diferença estatística ($p=0,005$), com redução de túbulos neste estágio nos animais do grupo exposto ($7,10 \pm 0,71$ %) em comparação ao grupo não exposto ($9,71 \pm 0,54$ %) (Figura 11). Os demais estádios não apresentaram diferença significativa entre os grupos exposto e não exposto ao material particulado fino ($p>0,05$).

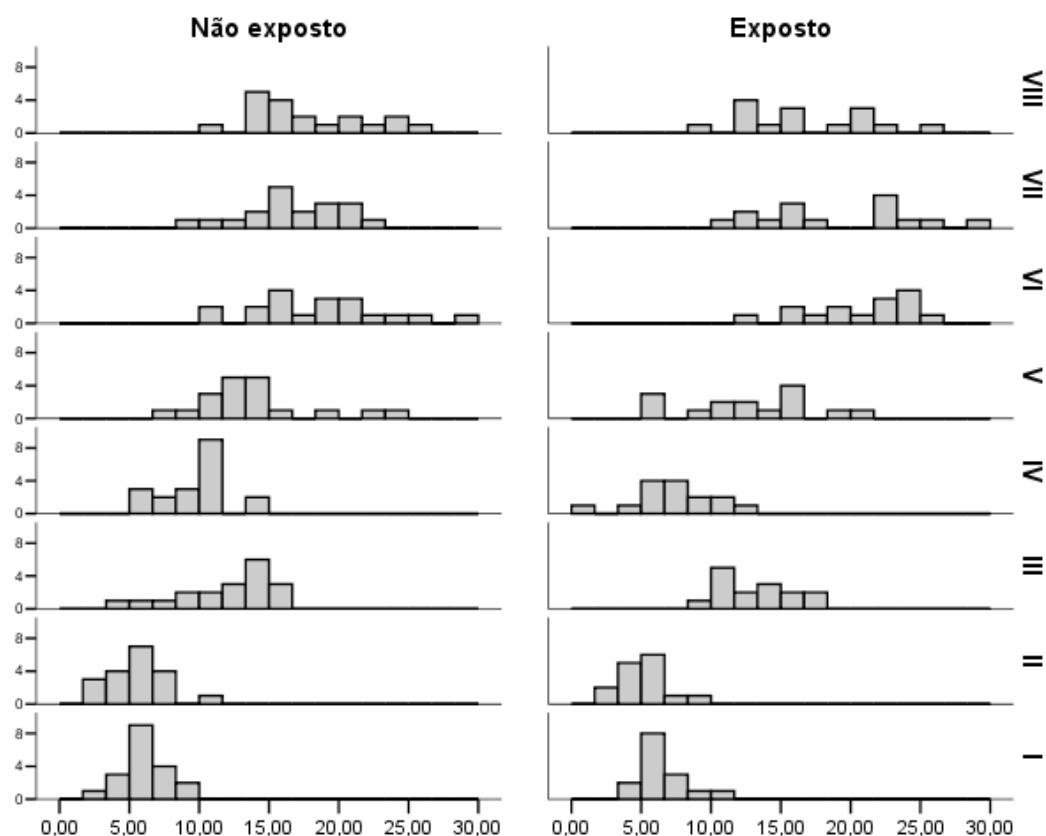


Figura 11. Histograma da frequência (%) dos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero em 200 túbulos pelo método da morfologia tubular nos animais da geração parental.

Os dados dos estádios foram também analisados apenas entre os animais dos grupos não expostos das duas gerações para avaliar a frequência normal dos estádios do ciclo do epitélio seminífero. Os dados dos animais não expostos da geração parental apresentaram os estádios iniciais com frequências médias menores do que os estádios finais de maturação dos espermatozóides (Tabela 8).

Tabela 8. Frequência normal dos estádios do ciclo do epitélio seminífero nos animais da geração parental dos animais do grupo não exposto ao PM_{2,5}.

Estádio	Não exposto
I	5,79 ± 0,37
II	5,79 ± 0,49
III	11,89 ± 0,79
IV	9,71 ± 0,54
V	13,89 ± 0,96
VI	18,68 ± 1,06
VII	16,58 ± 0,84
VIII	17,66 ± 1,01

4.2. Primeira Geração

4.2.1. Monitoramento das condições ambientais de exposição

A variação mensal de temperatura e umidade relativa no interior das câmaras durante a exposição da primeira geração (dezembro a abril de 2006) não apresentou

diferenças significativas ($p>0,05$), assim como aconteceu no período de exposição da geração parental.

Na câmara filtrada foi registrada temperatura máxima média (\pm EP) de $29,70 \pm 0,37$ °C e temperatura mínima média (\pm EP) de $20,92 \pm 0,32$ °C. Na câmara não filtrada as médias máxima e mínima de temperatura foram respectivamente, $28,99 \pm 0,46$ °C e $19,99 \pm 0,28$ °C.

A umidade relativa máxima e mínima média (\pm EP) foi de $81,39 \pm 1,13$ % e $51,11 \pm 1,32$ % na câmara filtrada e $85,24 \pm 1,08$ % e $49,89 \pm 1,64$ % na não filtrada.

4.2.1.1. Concentração de $PM_{2,5}$

No período de dezembro de 2005 a abril de 2006 foram registradas concentrações médias de $PM_{2,5}$ de $4,70 \pm 0,53$ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ na câmara filtrada e de $15,27 \pm 0,94$ $\mu\text{g}/\text{m}^3$, mostrando redução significativa ($p<0,001$) na câmara filtrada (Figura 12). No ambiente externo às câmaras foi registrado valor médio de material particulado fino de $17,19 \pm 0,67$ $\mu\text{g}/\text{m}^3$, valor este com diferença significativa ($p<0,001$) com relação à câmara filtrada, mas semelhante à câmara não filtrada ($p>0,05$).

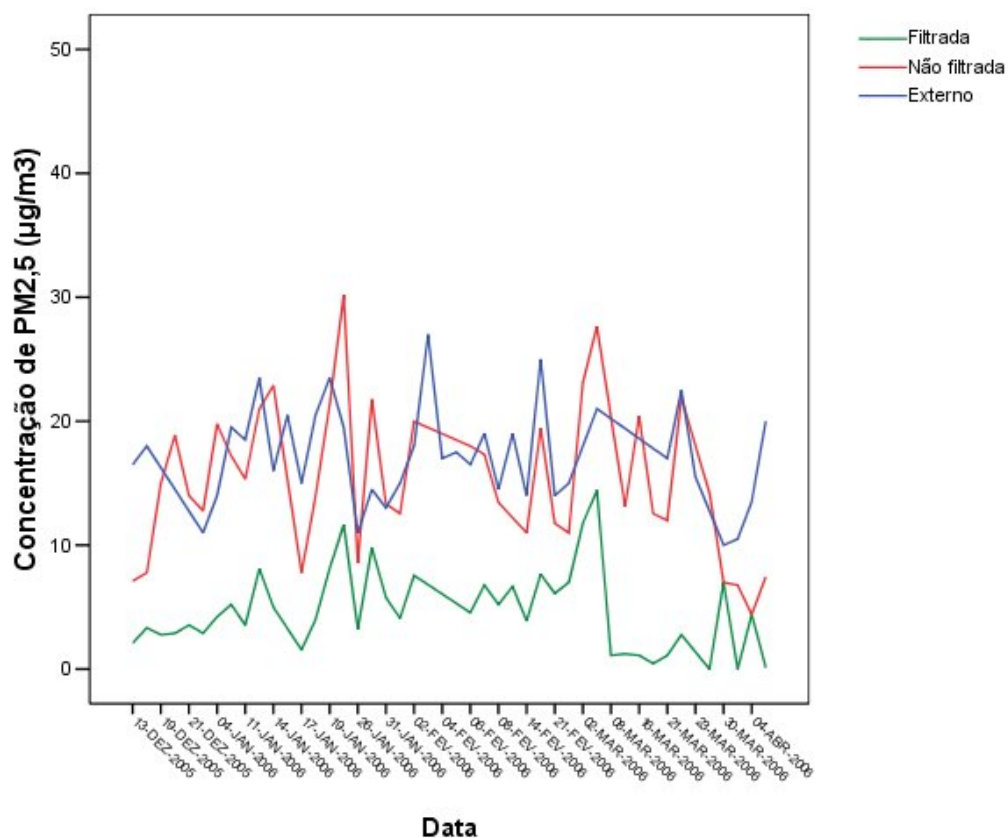


Figura 12. Média comparativa entre as câmaras filtrada e não filtrada mostrando a concentração de material particulado em sua fração de 2,5 µm de diâmetro (PM_{2,5}) no período de exposição da primeira geração (de dezembro de 2005 a abril de 2006).

4.2.1.2. Concentração de fumaça

Durante a exposição dos animais da primeira geração foi possível verificar que houve redução significativa ($p < 0,001$) de fumaça na câmara filtrada $8,66 \pm 1,10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ quando comparada com a câmara não filtrada $35,19 \pm 2,74 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

4.2.1.3. Ambiente externo

A concentração média de CO, PM₁₀, NO₂ e SO₂ na região de exposição no período de exposição da primeira geração foi obtida através de dados disponibilizados

pela CETESB (Tabela 9).

Tabela 9. Concentração média (\pm EP) de poluentes atmosféricos (CO, PM₁₀, NO₂ e SO₂) externos às câmaras no período de experimentação, de dezembro de 2005 a abril de 2006.

Concentração	
PM₁₀	32,36 \pm 0,90 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ^a
CO	1,55 \pm 0,05 ppm ^b
NO₂	89,03 \pm 3,34 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ^a
SO₂	6,91 \pm 0,40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ^a

Dados CETESB (2008). ^a média de 24h de amostragem, ^b média de 8h de amostragem.

4.2.2. Peso corpóreo e dos órgãos

Nos animais da primeira geração houve queda de peso corpóreo ($p < 0,001$) e dos testículos no grupo de exposição pré-natal ($p = 0,012$), contudo, não houve alteração no peso dos epidídimos ($p > 0,05$) neste mesmo grupo. A razão testículo/corpo foi diferente significativamente no grupo de exposição pré-natal ($p = 0,013$) (Tabela 10). Com relação aos outros grupos de exposição não houve diferença significativa quando foram comparados com o grupo não exposto ao material particulado fino ($p > 0,05$).

Tabela 10. Peso corpóreo (g), dos testículos (mg), epidídimos (mg) e razão órgãos/corpo (mg) dos animais da primeira geração nos diferentes grupos de exposição.

Peso	Não exposto (n=10)	Pré-natal (n=11)	Pós-natal (n=8)	Pré+pós-natal (n=12)
Corpóreo	27,08 ± 0,55 (23,82 - 30,06)	20,10 ± 0,76 ^a (16,05 - 24,80)	25,43 ± 0,22 (24,53 - 26,53)	27,17 ± 0,58 (26,53 - 31,28)
Epidídimo	56,40 ± 4,93 (36,50 - 89,00)	45,91 ± 3,19 (30,00 - 68,50)	55,44 ± 1,62 (49,00 - 62,00)	53,75 ± 1,87 (42,50 - 67,50)
Epidídimo/ Corpo	23,06 ± 2,07 (14,50 - 36,82)	25,04 ± 1,25 (19,33 - 34,29)	24,05 ± 0,08 (20,96 - 27,76)	21,90 ± 0,94 (17,43 - 30,77)
Testículos	105,40 ± 3,15 (92,50 - 129,50)	89,91 ± 3,81 ^b (64,50 - 113,50)	111,25 ± 2,72 (99,00 - 123,50)	102,50 ± 3,34 (82,00 - 121,00)
Testículos/ Corpo	7,76 ± 0,16 (7,05 - 8,86)	8,59 ± 0,33 ^c (7,42 - 10,42)	8,73 ± 0,21 (8,07 - 9,68)	7,56 ± 0,26 (5,98 - 8,99)

Valores médios ± erro padrão. Entre parênteses valores mínimo e máximo. ^a p<0,001; ^b

p=0,012; ^c p=0,013

4.2.2. Análise morfométrica quantitativa de células testiculares

4.2.2.1. Células germinativas e somáticas

Nas secções tubulares de testículos dos animais da primeira geração as células germinativas dos animais expostos ao PM_{2,5} apresentaram alteração após o período de exposição, mas as populações de células somáticas de Sertoli e de Leydig não mostraram alteração (p>0,05) (Tabela 11).

Tabela 11. Valores médios (\pm EP) do número de células de Sertoli (cél./ μ m), de Leydig (cél./ μ m²) e células da linhagem germinativa (cél./ μ m) nos testículos dos animais da primeira geração.

Tipos celulares	Não exposto (n=10)	Pré-natal (n=11)	Pós-natal (n=8)	Pré+pós-natal (n=12)
Sertoli	1,43 \pm 0,11 (0,94 - 2,13)	1,27 \pm 0,71 (0,94 - 1,75)	1,38 \pm 0,77 (1 - 1,63)	1,29 \pm 0,70 (0,81 - 1,63)
Leydig	4,94 \pm 0,26 (3,63 - 6,25)	4,86 \pm 0,30 (3 - 6,13)	5,03 \pm 0,38 (3,63 - 7,13)	5,10 \pm 0,27 (3 - 6,75)
Espermatogônia	4,96 \pm 0,19 (4,19 - 6,06)	5,14 \pm 0,19 (3,94 - 5,94)	5,26 \pm 0,19 (3,38 - 5,94)	5,22 \pm 0,17 (4,25 - 6,06)
Espermatócito	5,59 \pm 0,22 (4,56 - 6,50)	6,24 \pm 0,15 (5,50 - 7,31)	6,63 \pm 0,20 ^a (5,94 - 7,81)	6,41 \pm 0,23 ^b (5,19 - 7,50)
Espermátide arredondada	18,79 \pm 0,69 (15,38 - 22,06)	20,36 \pm 0,81 (15,44 - 24,25)	20,80 \pm 0,75 (17,50 - 23,56)	19,27 \pm 0,50 (15,88 - 2,06)
Espermátide alongada	15,57 \pm 1,13 (9,25 - 21,19)	10,56 \pm 0,77 ^c (6,81 - 14,31)	10,27 \pm 0,70 ^c (7,31 - 13,56)	16,39 \pm 0,71 (13,19-20,38)

Entre parênteses valores mínimo e máximo. ^ap=0,011, ^bp=0,035, ^cp=0,001

O número de espermatócitos (cél./ μ m) em secções transversais de túbulos seminíferos mostrou tendência de aumento no grupo pré-natal ($p > 0,05$), e aumento significativo nos grupos pós-natal ($p = 0,011$) e pré+pós-natal ($p = 0,035$), quando comparados com o grupo não exposto como mostra a figura 13.

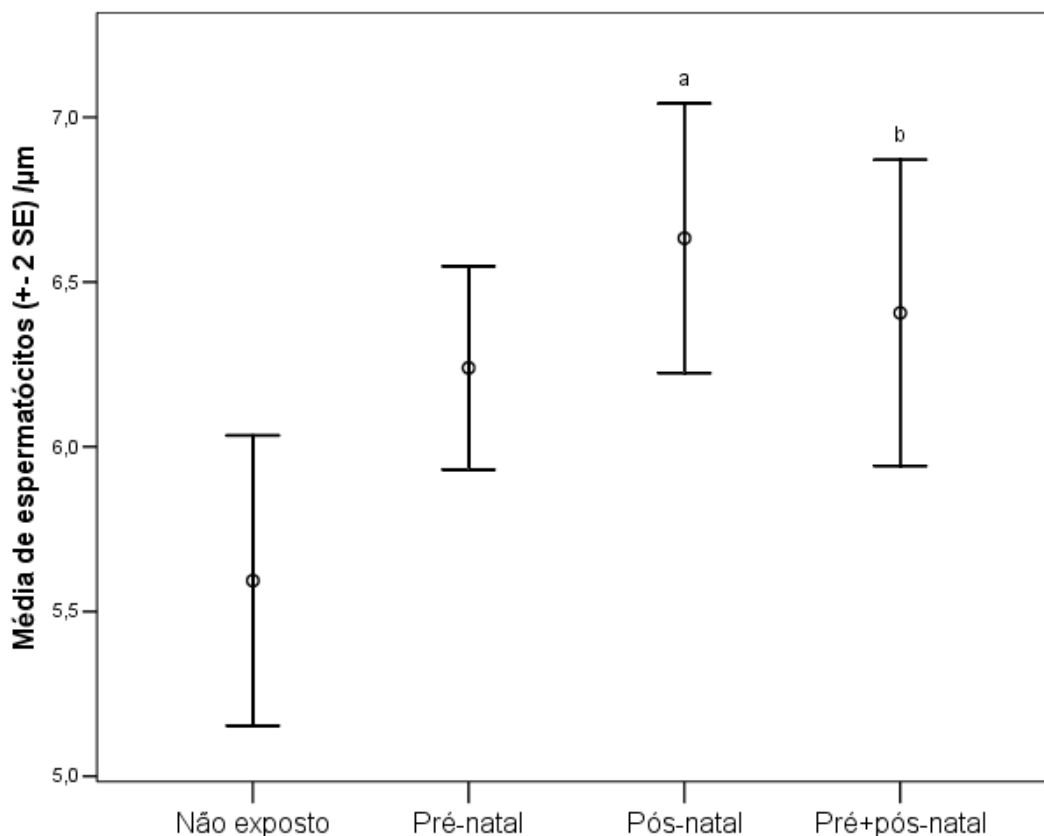


Figura 13. Média (\pm EP) de espermátócitos por comprimento de membrana basal (cél./ μ m) nos grupos experimentais em secções transversais de túbulos seminíferos em estágio VIII da espermatogênese. ^a $p=0,011$, ^b $p=0,035$.

A quantificação do número de espermátides alongadas, por outro lado, exibiu redução significativa nos grupos de exposição pré-natal e pós-natal ($p<0,001$) (Figura 14). Na figura 15 fotomicrografia ilustrando o aumento de espermátócitos e a redução de espermátides alongadas no grupo pós-natal.

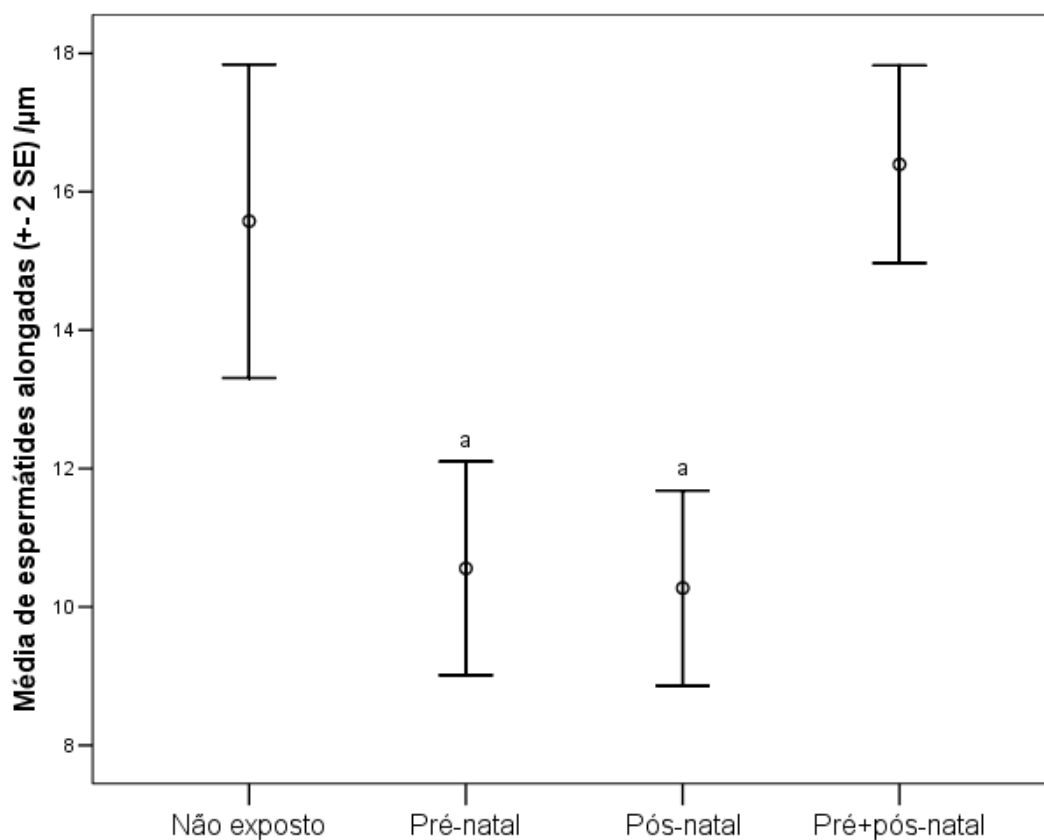


Figura 14. Número médio (\pm EP) de espermatídes alongadas (cél./μm) em seções transversais de túbulos seminíferos em estágio VIII do ciclo do epitélio seminífero nos diferentes grupos experimentais. ^a $p < 0,001$

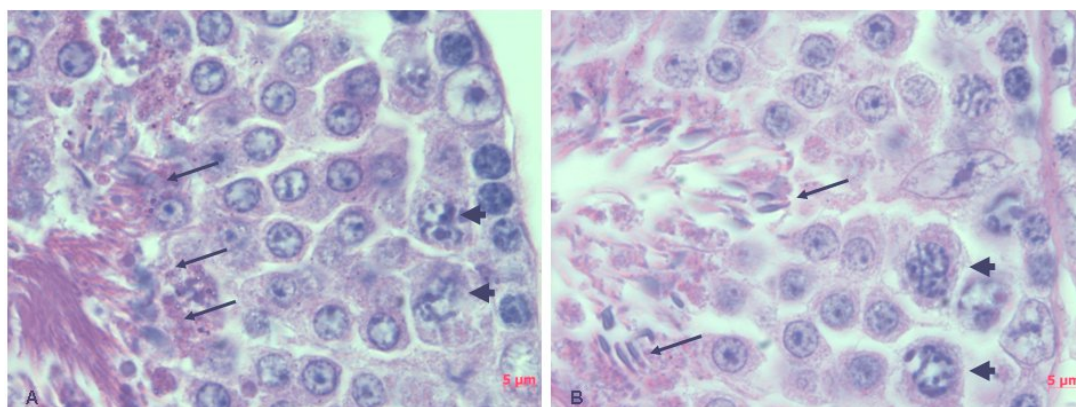


Figura 15. Morfologia do epitélio seminífero em estágio VIII mostrando aumento de espermatócitos e redução de espermátides alongadas no grupo pós-natal (B) quando comparado com o grupo não exposto (A). Setas indicam espermátides alongadas. Cabeças de setas mostram espermatócitos.

4.2.2.2. Proliferação celular

A proliferação celular das células da linhagem germinativa verificada com os testes de imunohistoquímica Ki67, em secções transversais de túbulos seminíferos em estágio VIII de maturação (proliferação cél+./ μm), não exibiu alteração. O teste com PCNA mostrou nos animais da primeira geração aumento de proliferação, embora não significativo, nos grupos de exposição gestacional (Tabela 12).

Tabela 12. Valores médios (\pm EP) de células em proliferação celular (cél+./ μ m) nos animais dos dois grupos experimentais da primeira geração expostos ou não ao PM_{2,5}.

Teste de proliferação	Não exposto (n=10)	Pré-natal (n=11)	Pós-natal (n=8)	Pré+pós-natal (n=12)
Ki67+	14,06 \pm 0,71 (11,31 - 19,56)	13,87 \pm 0,57 (6,69 - 16,00)	13,68 \pm 0,68 (11,38- 17,75)	14,60 \pm 0,48 (12,44 - 17,44)
PCNA+	11,83 \pm 0,57 (8,88 - 14,50)	13,14 \pm 0,95 (10,56 - 19,44)	11,87 \pm 0,64 (9,50 - 13,69)	14,20 \pm 0,84 (10,50 - 20,38)

Entre parênteses valores mínimo e máximo

4.2.2.3. Apoptose

A apoptose (cél. apoptótica/túbulo) nos animais expostos, assim como nos animais da geração parental, foi verificada em 30 secções transversais de túbulos seminíferos identificando-se o estágio do ciclo espermatogênico em lâminas coradas com HE ou preparadas com a técnica de TUNEL.

Os animais da primeira geração não apresentaram variação significativa da atividade apoptótica quando avaliada pela coloração de HE (Figura 16) ou pelo método de TUNEL ($p>0,05$) entre os grupos de exposição (Figura 17).

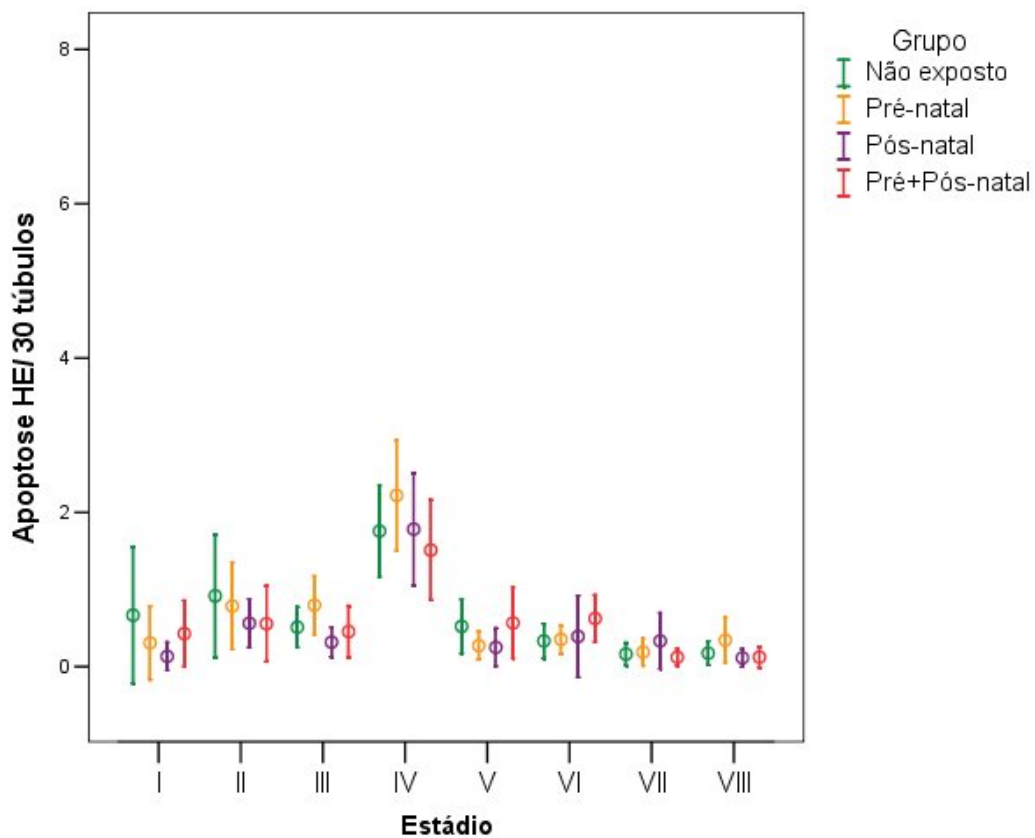


Figura 16. Número médio (\pm EP) de células em apoptose nos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero entre os grupos de exposição avaliada pela coloração de HE.

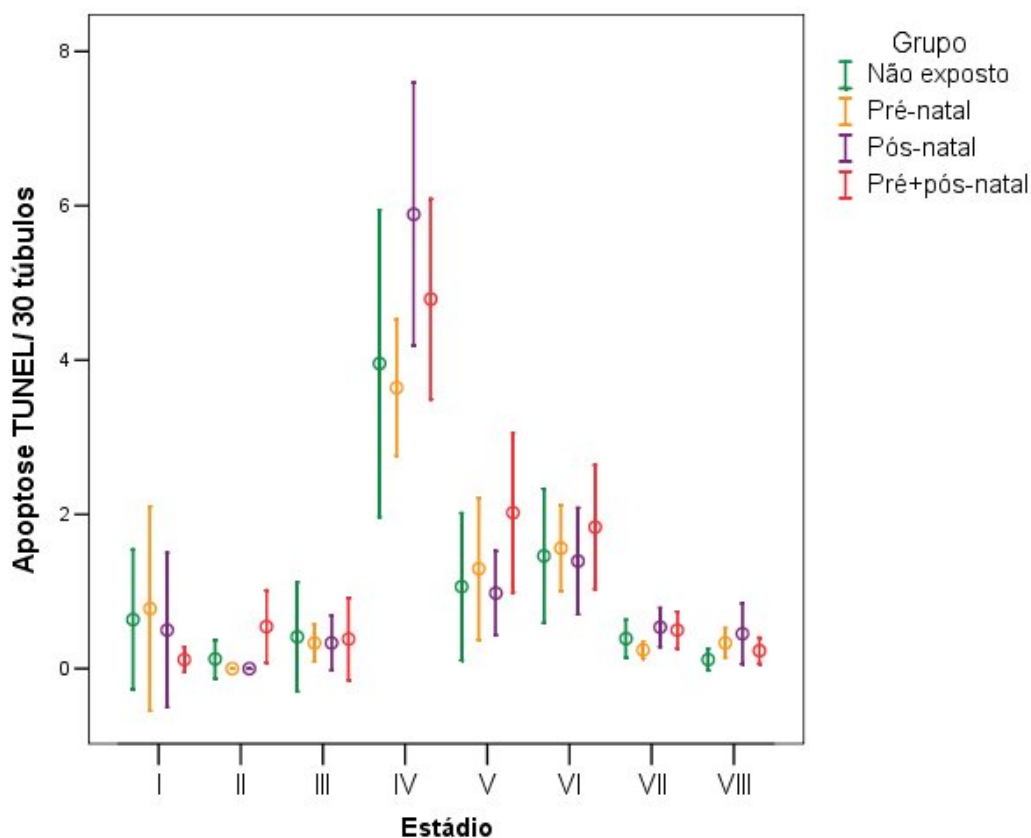


Figura 17. Número médio (\pm EP) de células em apoptose avaliada pela reação de TUNEL nos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero entre os grupos de exposição.

Houve maior freqüência de apoptose espontânea entre os animais do grupo não exposto no estágio IV quando este foi comparado com os estádios III, V, VI, VII e VIII do epitélio seminífero pela coloração de HE ($p < 0,001$). Contudo, os estádios I e II não foram estatisticamente diferentes do estágio IV ($p > 0,05$) (Tabela 13). Com o método de TUNEL, no entanto, assim como para os animais da geração parental, o estágio IV foi significativamente diferente de todos os demais, exibindo maior número de células em apoptose ($p < 0,001$), como mostra a tabela 14.

Tabela 13. Apoptose espontânea pela coloração de HE nos estádios do ciclo do epitélio seminífero dos animais da primeira geração do grupo não exposto.

Estádio	Média ± EP	Mínimo	Máximo
I	0,67 ± 0,44	0	4
II	0,92 ± 0,40	0	4
III	0,51 ± 0,13	0	3
IV	1,76 ± 0,30 ^a	0	8
V	0,25 ± 0,17	0	5
VI	0,33 ± 0,11	0	2
VII	0,16 ± 0,07	0	2
VIII	0,17 ± 0,08	0	3

^a p<0,000 quando comparado com os estádios III, V, VI, VII e VIII.

Tabela 14. Apoptose espontânea pela técnica de TUNEL na primeira geração entre os estádios do ciclo do epitélio seminífero dos animais do grupo não exposto ao PM_{2,5}.

Estádio	Média ± EP	Mínimo	Máximo
I	0,64 ± 0,45	0	5
II	0,13 ± 0,12	0	1
III	0,41 ± 0,35	0	6
IV	3,95 ± 0,99 ^a	0	20
V	1,06 ± 0,48	0	14
VI	1,46 ± 0,43	0	12
VII	0,39 ± 0,12	0	8
VIII	0,12 ± 0,70	0	2

^a p<0,001 com relação aos demais estádios.

4.2.3. Frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero

A frequência dos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero nos animais da primeira geração não mostrou alteração significativa entre os diferentes grupos experimentais ($p>0,05$) (Figura 9).

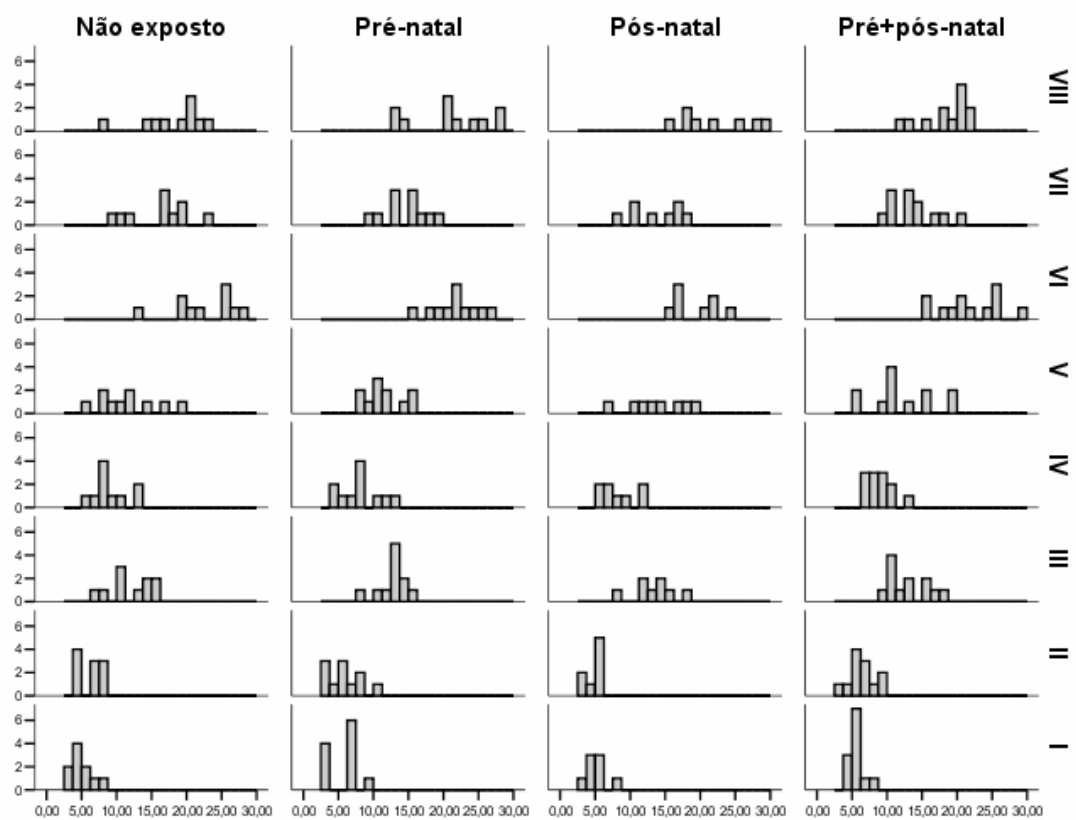


Figura 18. Frequência dos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero pelo método da morfologia tubular nos diferentes grupos experimentais.

Os dados dos estádios foram também analisados apenas entre os animais do grupo não exposto. Os estádios iniciais do ciclo do epitélio seminífero tiveram

freqüências médias menores do que os estádios finais de maturação dos espermatozóides (Tabela 15).

Tabela 15. Freqüência normal dos estádios do ciclo do epitélio seminífero nos animais da geração parental dos animais do grupo não exposto ao PM_{2,5}.

Estádio	Não exposto
I	4,80 ± 0,47
II	6,15 ± 0,52
III	11,80 ± 0,96
IV	8,95 ± 0,74
V	11,50 ± 1,36
VI	22,55 ± 1,44
VII	16,15 ± 1,33
VIII	18,10 ± 0,41

5. Discussão

Os resultados aqui apresentados mostram que a exposição tanto no período pré quanto pós-natal aos níveis ambientais de PM_{2,5} do ar urbano da cidade de São Paulo é capaz de afetar a espermatogênese de camundongos, alterando o peso corpóreo e testicular, a proporção de células germinativas, a apoptose e o tempo de duração do ciclo do epitélio seminífero.

Estudos realizados no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental demonstraram que a poluição do ar pode afetar o sistema reprodutivo feminino (Mohallem *et al.*, 2005; Veras *et al.*, 2008) e masculino (Lichtenfels *et al.*, 2007) de animais expostos ao material particulado urbano. Em particular, o estudo de Lichtenfels *et al.* (2007) mostrou que níveis ambientais de PM_{2,5} da cidade de São Paulo são capazes de reduzir o número de espermátides alongadas em camundongos adultos, quando expostos cronicamente logo após o nascimento até a fase adulta.

A partir deste trabalho duas hipóteses foram formuladas para a redução de células germinativas em animais expostos à poluição urbana: 1) aumento de apoptose; e/ou 2) redução da proliferação celular entre as células germinativas. Assim, o funcionamento destes processos celulares foi estudado para tentar indicar os mecanismos de ação do PM_{2,5} proveniente da exaustão veicular sobre a espermatogênese. O tempo de maturação das células germinativas no processo espermatogênico foi também pesquisado para verificar a interferência das partículas finas no ciclo do epitélio seminífero, assim como a densidade numérica das células germinativas masculinas. Estes dados foram avaliados em animais expostos após o nascimento (grupo exposto da geração parental e grupo pós-natal da primeira geração), no período gestacional (grupo pré-natal da primeira geração) e na combinação de ambos (grupo pré+pós-natal da primeira geração).

Alguns fatores foram controlados no decorrer do período experimental para excluir qualquer outro tipo de variável. Foram analisados dados de temperatura no interior das câmaras de exposição, bem como a umidade relativa e o nível ambiental de ruído. A temperatura e a umidade relativa médias não apresentaram diferença em ambos os valores máximo e mínimo médios medidos entre as câmaras filtrada e não filtrada. Da mesma forma, o nível de ruído nas duas câmaras não foi estatisticamente diferente. A OMS - Organização Mundial de Saúde - (WHO, 2003) recomenda que em áreas industriais, comerciais e de tráfego o ruído não ultrapasse o nível equivalente de 70 dB, pois além deste valor, pode haver comprometimento auditivo. Neste trabalho, os níveis mínimos de ruído foram superiores ao recomendado pela OMS ($74,78 \pm 1,13$ dB e $74,82 \pm 0,89$ dB câmaras filtrada e não filtrada, respectivamente), porém, equivalentes nas duas câmaras, e por isso houve igual fator de estresse em animais expostos e não expostos das duas gerações.

De acordo com a análise gravimétrica do material particulado coletado em filtros expostos no interior das câmaras, a concentração média de $PM_{2,5}$ apresentada no período de exposição da geração parental foi de $1,16 \pm 0,14$ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ na câmara filtrada e $18,39 \pm 1,49$ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ na câmara não filtrada (Figura 7). No período de exposição da primeira geração as médias de material particulado de diâmetro $\leq 2,5$ μm presentes no interior da câmara filtrada e não filtrada foram $4,70 \pm 0,53$ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e $15,27 \pm 0,94$ $\mu\text{g}/\text{m}^3$, respectivamente (Figura 12). Estes resultados evidenciam a grande eficiência na retirada do material particulado pelo sistema de filtros da câmara filtrada, 90 % e 70 % para os respectivos períodos de exposição.

O monitoramento do ambiente externo às câmaras mostrou que a concentração média de material particulado fino foi de $20,24 \pm 1,63$ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ no período de exposição

da geração parental (Figura 7) e $17,19 \pm 0,67 \mu\text{g}/\text{m}^3$ no período de exposição da primeira geração (Figura 12), mostrando que além da eficiência na filtragem de material particulado na câmara filtrada, havia na câmara não filtrada uma condição real de exposição durante todo o tempo em que os animais das duas gerações ficaram expostos.

A partir de dados epidemiológicos de exposição aguda e crônica a OMS (WHO, 2005b) em seu guia de qualidade do ar (*AQG - Air Quality Guidelines*) estabelece como concentrações permissíveis de $\text{PM}_{2,5}$ $10 \mu\text{g}/\text{m}^3/\text{ano}$ ou $25 \mu\text{g}/\text{m}^3/24\text{h}$. Em 2006, as emissões de $\text{PM}_{2,5}$ excederam valores de $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ em todas as estações de monitoramento da CETESB (CETESB, 2007). Assim, a concentração média de material particulado fino no período de exposição dos animais experimentais foi, na câmara não filtrada, maior do que a concentração recomendada internacionalmente para a integridade da saúde humana, levando-se em consideração os valores permissíveis anuais, já que as exposições duraram quatro e três meses, respectivamente, para a geração parental e primeira geração. Contudo, é improvável que qualquer padrão para níveis de material particulado possa ser seguro à saúde humana, porque mesmo concentrações ambientais baixas têm sido ligadas a efeitos nocivos (WHO, 2005b).

Além do seu tamanho aerodinâmico, um dos fatores que determinam a toxicidade do material particulado é a sua composição que pode variar conforme a fonte emissora (WHO, 2005b). Assim, a fonte emissora foi determinada pela análise dos filtros de policarbonato por fluorescência de raios-X. Nesta análise elementos existentes nos filtros foram agrupados em dois fatores principais, um dos quais identificou Fe, Si, V, Zn e Cu, que são elementos conhecidos das emissões dos

escapamentos dos veículos (V, Zn e Cu) e da ressuspensão promovida pelo trânsito de automóveis nas vias (Fe e Si) e como segundo fator principal identificou Pb e S, que são elementos característicos das emissões de diesel, confirmando que a principal fonte emissora da região na qual os animais das suas gerações ficaram expostos é de origem veicular, descartando contribuições importantes de queima de biomassa ou de indústrias.

A cidade de São Paulo tem 11 milhões de habitantes e 7,4 milhões de veículos. No ano de 2006, as emissões de material particulado para a atmosfera foram cerca de 60,5 mil toneladas, estimando-se que 40% desse material particulado seja derivado do tráfego de veículos (CETESB, 2007), como foi demonstrado na análise elementar do PM_{2.5} neste estudo.

Com relação à fumaça (*black smoke*), também foi mostrada a eficiência na filtragem, pois há redução na câmara filtrada ($2,02 \pm 0,25 \mu\text{g}/\text{m}^3$) quando comparada com a câmara não filtrada ($47,77 \pm 5,46 \mu\text{g}/\text{m}^3$) durante a exposição dos animais da geração parental. A redução também foi significativa quando os animais da primeira geração foram expostos na câmara filtrada ($8,66 \pm 1,10 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e na câmara não filtrada ($35,19 \pm 2,74 \mu\text{g}/\text{m}^3$). O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), resolução nº 3 de 28 de junho de 1990, estabeleceu padrões de emissão para fumaça de $60 \mu\text{g}/\text{m}^3$ anuais e $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ diário, sendo assim, as concentrações no período de exposição das duas gerações estavam abaixo da estipulada nas normas nacionais.

Outros poluentes foram avaliados no ambiente externo às câmaras, já que as condições de exposição eram reais. As concentrações médias de PM₁₀ ($39,53 \pm 1,73 \mu\text{g}/\text{m}^3$), CO ($1,90 \pm 0,07$ ppm) e SO₂ ($8,54 \pm 0,49 \mu\text{g}/\text{m}^3$) foram monitoradas pela CETESB no período de exposição da geração parental (Tabela 2).

Da mesma forma, durante a exposição da primeira geração, a concentração média de PM_{10} ($32,36 \pm 0,90 \mu\text{g}/\text{m}^3$), CO ($1,55 \pm 0,05 \text{ ppm}$), NO_2 ($89,03 \pm 3,34 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e SO_2 ($6,91 \pm 0,40 \mu\text{g}/\text{m}^3$), foi também monitorada pela CETESB (2008) (Tabela 9).

O PM_{10} é usado como indicador de partículas no ambiente em muitos estudos epidemiológicos e em São Paulo seus níveis são usados pela CETESB para monitorar a qualidade do ar. As concentrações de PM_{10} medidas durante o período de exposição para ambas as gerações estão de acordo com o padrão estabelecido pelo CONAMA em sua resolução n.º. 3, que estipulou como máximo anual permissível $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Para os outros poluentes monitorados pela CETESB os valores anuais permissíveis são: CO, $10.000 \mu\text{g}/\text{m}^3$; NO_2 , $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$; e SO_2 , $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$. A OMS estabelece níveis menores para estes poluentes. O padrão anual para PM_{10} é de $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$, para NO_2 $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e o padrão de 24 horas para SO_2 de $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (WHO, 2005b). Assim, segundo a resolução do CONAMA as concentrações de PM_{10} , CO, NO_2 e SO_2 estão dentro dos limites permissíveis, mas não estão de acordo com os limites estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde. Contudo, como estes poluentes estão em iguais proporções nas duas câmaras, o efeito da exposição pode ser atribuído exclusivamente às diferentes concentrações de $PM_{2,5}$ estabelecidas entre as câmaras.

Para o monitoramento da qualidade do ar neste estudo foram usadas medidas de $PM_{2,5}$, já que estas partículas são apontadas como principais causadoras de efeitos à saúde. Assim, para derivar um valor de $PM_{2,5}$ a partir do valor de PM_{10} monitorado pela CETESB, foi usada a proporção de $PM_{2,5}/PM_{10}$ de 0.5 (WHO, 2005b). Usando, então, a concentração média do PM_{10} externo às câmaras ($39,53 \mu\text{g}/\text{m}^3$, para a geração parental e $32,36 \mu\text{g}/\text{m}^3$ para a primeira geração), foi possível calcular a concentração de $PM_{2,5}$ ambiental durante o período de exposição da geração parental

e da primeira geração, $19 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e $16 \mu\text{g}/\text{m}^3$, respectivamente. Estes valores são equivalentes às concentrações de $\text{PM}_{2,5}$ medidos dentro da câmara não filtrada durante a exposição da geração parental ($18,39 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e primeira geração ($15,27 \mu\text{g}/\text{m}^3$), bem como, condizente com a concentração de $\text{PM}_{2,5}$ monitorado externamente às câmaras neste estudo ($20,24 \pm 1,63 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e $17,19 \pm 0,67 \mu\text{g}/\text{m}^3$, para os períodos de exposição da geração parental e primeira geração, respectivamente).

Assim, excluídos fatores ambientais interferentes (umidade relativa, temperatura e ruído) e outros poluentes (CO , NO_2 , SO_2) a análise dos dados coletados nos diferentes parâmetros mostrou resultados indicativos de que o $\text{PM}_{2,5}$ urbano é capaz de afetar o sistema reprodutivo e a fertilidade dos animais expostos.

Os primeiros resultados observados são referentes à performance reprodutiva dos animais da geração parental. Não houve diferença no número de fêmeas copuladas, que apresentaram plug vaginal, nas câmaras filtrada e não filtrada (Figura 8) nem no número de animais por ninhada de cada fêmea entre os grupos não exposto ($4,47 \pm 0,42$) e exposto ($3,26 \pm 0,45$) ao material particulado fino. Contudo, o número total de nativos na prole produzida na câmara filtrada foi maior do que a nascida na não filtrada, com 268 e 186 nativos, respectivamente. Isso aconteceu porque a porcentagem de fêmeas que ficaram prenhes no grupo não exposto (85%) foi maior do que no grupo exposto (63%). Com relação à mortalidade durante o período experimental, não foram registradas mortes entre os animais adultos das duas gerações. Não foi possível verificar o número de natimortos da primeira geração devido à ocorrência de canibalismo pelas mães.

Alguns estudos experimentais do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE) têm mostrado que a poluição do ar é capaz de afetar a saúde

reprodutiva de camundongos. A exposição materna ao PM₁₀ do ar de São Paulo foi estudada anteriormente, em camundongos fêmeas expostas nas mesmas câmaras de exposição usadas neste experimento. Após quatro meses de exposição aos níveis ambientais de poluição atmosférica, fêmeas prenhes apresentaram redução da fertilidade, com menor número de fetos viáveis e maior número de falhas de implantação embrionária (Mohallem *et al.*, 2005). A avaliação das fêmeas da geração parental utilizadas no presente trabalho, também mostrou que níveis ambientais de material particulado fino podem influenciar na saúde reprodutiva feminina e fetal por afetar o desenvolvimento placentário materno, provocando redução de peso dos fetos, mesmo que a parte fetal da placenta tenha tentado compensar o menor aporte de nutrientes com o aumento da área superficial dos capilares fetais (Veras *et al.*, 2008). Foi mostrado também que a exposição ao PM_{2,5} altera a razão entre os sexos com redução significativa do número de machos, reduz o número de espermátides alongadas no epitélio germinativo e a concentração de espermatozóides na porção caudal do epidídimo (Lichtenfels *et al.*, 2007).

No presente estudo, o sistema reprodutivo masculino de animais expostos ao PM_{2,5}, durante os períodos gestacional ou pós-gestacional, também mostrou alteração quando foram avaliados parâmetros de integridade física e gonadal.

Os primeiros parâmetros alterados foram os de peso corpóreo e de órgãos (testículo e epidídimo). Na geração parental o peso corpóreo, embora não tenha sofrido alteração significativa, apresentou-se menor no grupo exposto quando comparado com o grupo não exposto (Tabela 3). O peso dos testículos ($106,05 \pm 1,20$ mg) e epidídimos ($40,72 \pm 0,93$ mg) dos animais do grupo exposto foi significativamente maior em comparação com o grupo não exposto ($96,08 \pm 2,59$ mg

e $35,64 \pm 0,90$ mg, testículos e epidídimos, respectivamente). O peso relativo dos testículos ($8,53 \pm 1,25$ mg/g) e epidídimos ($3,27 \pm 0,08$ mg/g) apresentou-se significativamente maior com relação ao grupo não exposto ($7,46 \pm 0,33$ mg/g e $2,76 \pm 0,11$ mg/g, testículos e epidídimos, respectivamente), confirmando que o peso dos órgãos em questão foi aumentado com relação ao peso corpóreo.

Na primeira geração o peso corpóreo foi significativamente menor no grupo de exposição pré-natal ($20,10 \pm 0,76$ g), com relação ao grupo não exposto ($27,08 \pm 0,55$ g). O peso testicular dos animais do grupo pré-natal mostrou-se menor ($89,91 \pm 3,81$ mg) quando comparado ao peso dos testículos dos animais do grupo não exposto ($105,40 \pm 3,15$ mg). O peso dos epidídimos não foi diferente entre os grupos. O peso relativo dos testículos, entretanto, mostra que o baixo peso corpóreo foi mais acentuado do que o baixo peso dos testículos já que no grupo pré-natal o peso relativo dos testículos foi significativamente maior ($8,59 \pm 0,33$ mg/g) com relação ao grupo não exposto ($7,76 \pm 0,16$ mg/g) (Tabela 10).

Alguns autores têm também reportado resultados controversos, quando pequenos roedores são expostos às partículas geradas por exaustão de motores a diesel em diferentes períodos do desenvolvimento, mostrando ambigüidade na variação de peso corpóreo e de órgãos, a saber:

- Yoshida *et al.* (1999) mostraram que o peso corpóreo e de órgãos como pulmões e cérebro de camundongos adultos, expostos a partir de seis semanas até os seis meses, apresentou-se maior enquanto o peso dos testículos e epidídimos não varia, diferente do que ocorreu com os animais expostos da geração parental que tiveram testículos e epidídimos maiores;

- Watanabe (2005) em estudo com animais expostos durante o período pré-natal até o nascimento, por outro lado, mostrou que as partículas de diesel foram capazes de provocar queda no peso testicular;
- Ono *et al.* (2007), neste mesmo tipo de exposição, mostraram aumento do peso corpóreo, da vesícula seminal e da próstata;
- Watanabe e Oonuki (1999), contudo, em uma exposição do nascimento até os três meses de idade mostraram que o peso corpóreo, de testículos e epidídimos não sofre alteração;

mostrando que a exposição à poluição atmosférica gerada por fonte veicular tem variedade de resposta pelo sistema reprodutivo masculino, incluindo as encontradas neste trabalho.

Todos estes estudos se relacionam pela exposição à exaustão de motores a diesel, um dos principais combustíveis dos veículos e emissor da maior quantidade de poluentes no ar (CETESB, 2005), cuja ação das suas partículas parece ser também uma das principais causas dos efeitos sobre a alteração de peso corpóreo e órgãos de animais experimentais.

Uma possível explicação para a ambigüidade destes resultados de pesos entre exposições semelhantes está na variação de dose, já que uma dose de $0,3 \text{ mg/m}^3$ de partículas geradas por motores a diesel é capaz de reduzir significativamente o peso da próstata, enquanto uma dose de 3 mg/m^3 provoca aumento, e em nenhuma das duas doses há alteração no peso corpóreo ou dos testículos de ratos adultos (Tsukue *et al.*, 2001). No presente estudo, não há dose estabelecida porque a exposição é real e a concentração de $\text{PM}_{2,5}$ variou ao longo do período experimental, considerando-se a média do período (Figura 7 e 12). Resta ser avaliado o mecanismo pelo qual o peso

corpóreo e de órgãos, incluindo o testículo, é afetado uma vez que não está definido na literatura um padrão de variação de peso após exposição a poluentes provenientes da exaustão de veículos.

Outro parâmetro avaliado neste estudo foi o tempo de maturação das células germinativas no epitélio seminífero, cuja ação de agentes tóxicos pode interferir no processo cíclico de maturação e provocar assincronia na frequência dos estádios (Russel, *et al.*, 1983). Assim, para verificar a evolução da espermatogênese, a frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero foi avaliada por meio do método da morfologia tubular (Berndtson, 1977). Para este método a espermatogênese é dividida em oito estádios de acordo, principalmente, com as diferentes formas do núcleo e o posicionamento das espermatídes, presença de divisões meióticas e composição total do túbulo seminífero.

Existem duas abordagens para a identificação dos estádios do ciclo do epitélio seminífero (métodos acrossômico e da morfologia tubular), mas independente da metodologia empregada, somente um estágio apresenta espermatócitos em divisão meiótica. Pela morfologia tubular este estágio é o IV. Por outro lado, dependendo da classificação utilizada, um ou dois estádios mostram as espermatídes maduras e alinhadas no lúmen do túbulo seminífero prontas para a espermição (Amann, 1996). No método da morfologia tubular o estágio que apresenta estas características de fácil identificação pelo alinhamento das espermatídes no lúmen e de representatividade do final da maturação das espermatídes (Clermont and Harvey, 1967) é o VIII e por isso este foi escolhido para a avaliação do epitélio seminífero nas contagens de células intratubulares e proliferação celular.

Os animais da primeira geração não exibiram diferença significativa entre os

estádios do ciclo do epitélio seminífero nos diferentes grupos experimentais (Figura 18). Na geração parental, no entanto, a frequência de túbulos em estágio IV foi menor nos animais do grupo exposto ($7,10 \pm 0,71$ % de túbulos em estágio IV) em comparação ao grupo não exposto ($9,71 \pm 0,54$ % de túbulos em estágio IV) (Figura 11). Estes resultados confirmam que a poluição do ar é capaz de causar disfunção no tempo de duração do estágio IV entre os animais da geração parental. Isso pode indicar que o $PM_{2,5}$ urbano proporcionou um ambiente desfavorável provocando assincronia na maturação celular.

No presente estudo a avaliação da distribuição normal de cada estágio do ciclo do epitélio seminífero nos animais estudados mostra que os mais frequentes são os estádios VI, VIII e VII, nesta ordem, e os menos frequentes os estádios II e I, nesta ordem, nas duas gerações (Tabelas 8 e 15). Estes resultados são referentes aos animais não expostos das duas gerações e, portanto, foram aqui considerados normais para camundongos. O estadiamento para ratos está bem definido na literatura (Clermont, 1972), mas em camundongos não há trabalhos que determinem as frequências de cada estágio em situações de normalidade. Os animais dos grupos não expostos das duas gerações apresentam frequências semelhantes dos estádios, independente da geração analisada (Tabelas 8 e 15). Assim, parece correto afirmar que, em situações normais, os estádios menos frequentes são os iniciais e mais frequentes os finais. Com este estudo o tempo de duração dos estádios do ciclo do epitélio seminífero foi padronizado pela primeira vez em camundongos.

O número de células germinativas e somáticas foi também alvo de injúria no epitélio seminífero de camundongos após exposição ao $PM_{2,5}$. Nos animais das duas gerações não ocorreram alterações significativas no número de células somáticas. A

densidade de células de Sertoli apresentou tendência de redução nos animais do grupo exposto da geração parental (Tabela 4) e nos animais dos grupos pré-natal, pós-natal e pré+pós-natal da primeira geração em comparação com seus respectivos grupos não expostos (Tabela 11).

As células de Leydig, embora também não tenham mostrado diferença significativa entre os grupos, apresentaram-se em número reduzido nos camundongos do grupo exposto da geração parental com relação aos do grupo não exposto ao $PM_{2,5}$ (Tabela 4). Na primeira geração os animais exibiram redução de células de Leydig no grupo pré-natal e aumento nos grupos pós e pré+pós-natal com relação ao grupo não exposto (Tabela 11).

As principais células somáticas que participam diretamente do processo de espermatogênese são as células de Sertoli e Leydig. As células de Sertoli são responsáveis pela manutenção da integridade estrutural do epitélio seminífero e sustentação física das células germinativas, carregando um número definido de células germinativas (Richburg, 2000), são células resistentes às condições adversas como infecções, desnutrição, radiações e temperatura corpórea, tendo taxa de sobrevivência muito maior que as células da linhagem germinativa após agressões, e não se dividem durante a vida adulta (Stevens e Lowe, 1992). As células de Leydig constituem a maior população de células no interstício. Produzem hormônios esteróides, entre os quais a testosterona, que é responsável pela maturação das células germinativas (Kierszenbaum, 2008).

Agentes tóxicos provenientes de partículas de exaustão de diesel são capazes de afetar estas duas populações de células somáticas dos testículos de animais. Fêmeas prenhes de ratos quando expostas à doses altas de partículas de exaustão de

motores a diesel ($1,71 \text{ mg/m}^3$ de PM e $0,80 \text{ ppm NO}_2$) apresentam prole com redução do número de células de Sertoli, sem modificações histológicas nas células de Leydig (Watanabe, 2005). Por outro lado, ratos adultos de seis semanas de vida também expostos às partículas de exaustão de diesel em três concentrações diferentes ($0,3 \text{ mg/m}^3$, 1 mg/m^3 e 3 mg/m^3), 12 horas por dia durante seis meses, exibiram alteração do tecido intersticial com edema, necrose e modificações ultra-estruturais das células de Leydig, com efeitos dose-dependente. Contudo, as células de Sertoli não apresentam qualquer tipo de dano quando avaliadas em microscopia eletrônica (Yoshida *et al.*, 1999). Apesar destes resultados, aparentemente a toxicidade das partículas urbanas ambientais de $\text{PM}_{2,5}$, no atual trabalho, não tiveram influência significativa sobre a densidade numérica de células somáticas de Sertoli e de Leydig.

Com relação à quantificação de células germinativas no epitélio seminífero a geração parental não apresentou alteração quando os grupos exposto e não exposto foram comparados (Figura 4), enquanto que em animais da primeira geração alguns tipos celulares sofreram modificações (Figura 11).

Os espermatócitos aumentaram significativamente no epitélio seminífero dos animais expostos dos grupos pós-natal ($6,63 \pm 0,20 \text{ cél./}\mu\text{m}$) e pré+pós-natal ($6,41 \pm 0,23 \text{ cél./}\mu\text{m}$) em comparação ao grupo não exposto ($5,59 \pm 0,22 \text{ cél./}\mu\text{m}$) (Figura 13 e 15). As espermátides redondas apresentaram aumento nos grupos de exposição, mas sem diferença significativa (Tabela 11). Entre as espermátides alongadas houve queda significativa nos grupos de exposição pré-natal ($10,56 \pm 0,77 \text{ cél./}\mu\text{m}$) e pós-natal ($10,27 \pm 0,70 \text{ cél./}\mu\text{m}$) comparando-se com o grupo não exposto ($15,57 \pm 1,13 \text{ cél./}\mu\text{m}$) (Figura 14 e 15).

Alterações no número de células germinativas também foram reportadas em animais expostos às partículas de exaustão de motores a diesel. A exposição pré-natal ou neonatal (do nascimento até 3 meses de idade) provoca redução de espermatogônias, espermatócitos e espermátides em epitélio seminíferos nos estádios VI, VII e VIII de maturação com conseqüente queda na produção de espermatozóides na idade adulta de ratos (Watanabe e Oonuki, 1999; Ono *et al.*, 2007). Mesmo quando as partículas de exaustão de diesel são filtradas (filtro HEPA 0,3 μm) ocorre redução de células germinativas, sugerindo a participação importante das partículas ultrafinas ($< 0,1 \mu\text{m}$) nos efeitos nocivos da exposição uterina (Ono *et al.*, 2008). A concentração das partículas ultrafinas não foi medida no presente trabalho e também não foram retiradas do ambiente da câmara filtrada, assim, estas partículas estavam presentes nas duas câmaras de exposição e por isso não parece razoável afirmar que elas tenham participação na promoção dos efeitos adversos verificados entre os animais expostos das duas gerações.

Outros estudos indicam que adesão e comunicação celular têm papel importante no número de células germinativas alterando a produção de espermatozóides e reduzindo a fertilidade.

A redução de espermátides alongadas pode ser vista em camundongos no qual a molécula de adesão TSLC1 (*tumor suppressor of lung cancer 1*), fortemente expressa na superfície das células germinativas, está silenciada. A falta da adesão entre as células provoca atraso no desenvolvimento das células germinativas bloqueando a diferenciação das espermátides e, devido ao maior tempo de permanência destas no epitélio, aumento da degeneração e apoptose. As poucas células germinativas que conseguem seguir no ciclo espermatogênico formam espermatozóides anormais e

com cauda rudimentar que podem ser vistos no epidídimo. Alguns túbulos seminíferos, ainda, apresentam degeneração com grandes vacúolos e formação de células multinucleadas gigantes (van der Weyden *et al.*, 2006).

Ainda que não se saiba ao certo quais sejam os mecanismos pelos quais agentes tóxicos possam causar depleção celular, sabe-se que a comunicação entre as células de Sertoli e as células germinativas e suas complexas interações podem criar múltiplos alvos para a ação de agentes tóxicos. Por exemplo, o ftalato é um agente tóxico presente no meio ambiente com propriedade endócrino-desreguladora, que tem como alvo primordial a célula de Sertoli. Este agente tóxico age na internalização e degradação de proteínas de adesão presentes na membrana da célula de Sertoli, impedindo a adesão das células germinativas e conseqüentemente o movimento delas pelo epitélio germinativo. Desta forma, as células germinativas não completam seu processo de maturação e, devido ao maior tempo de permanência nos túbulos, as células entram em apoptose e o túbulo seminífero apresenta-se degenerado (Richburg *et al.*, 2002).

Embora no presente trabalho não tenha havido comprometimento tão severo da espermatogênese, como visto nos trabalhos de van der Weyden *et al.* (2006) e Richburg *et al.* (2002), a falha na adesão e comunicação entre as células de Sertoli e células germinativas, pode ter de alguma forma provocado alterações nas populações de espermatócitos e espermátides alongadas (Figuras 13 e 14). O objetivo deste trabalho não foi, entretanto, estudar a adesão entre as células do epitélio germinativo, assim fica a ser esclarecida a possível participação das moléculas de adesão nos resultados encontrados.

Apesar do número de espermátides alongadas ser reduzido nos grupos pré e pós-natal, os resultados não foram mantidos no grupo de exposição pré+pós-natal, que se apresentou semelhante ao grupo não exposto (Figura 15). Israel-Assayag e Cormier (2002) observaram que trabalhadores em suinocultura e residentes nas fazendas de criação são expostos à poeira com altos níveis de matéria orgânica como bactérias, fungos, endotoxinas e gases tóxicos, apresentam sintomas respiratórios, mas sem inflamação severa dos pulmões. Por outro lado, trabalhadores não residentes nessas fazendas e com exposição tóxica apenas durante a jornada de trabalho apresentam intensa inflamação pulmonar. Os autores sugerem que a alternância exposição/não exposição pode promover sensibilidade ao agente tóxico, contudo, a exposição contínua pode promover resistência e/ou adaptação. Neste caso, o mecanismo de adaptação do tecido pulmonar à poeira ocorreu pelo aumento de L-Selectina, uma molécula de adesão expressa nos leucócitos que exerce iniciação e migração destas células até a área de inflamação. Sabe-se que nas células germinativas deve haver um delicado equilíbrio entre a integridade genética, para assegurar a correta propagação das espécies, e mutação, que deve ser suficiente para que os organismos possam se adaptar (Walter *et al.*, 2003). Dessa forma, pode ser que a exposição no período gestacional, prolongada até a vida adulta, tenha induzido nos animais do grupo pré+pós-natal da primeira geração, um aumento de resistência ao efeito do material particulado, impedindo que houvesse redução na produção de espermatozoides. Os mecanismos desta possível adaptação, no entanto, necessitam ser mais explorados.

Além disso, pode ser que a espermatogênese seja afetada apenas em parte, pois Selevan *et al.* (2000) e Rubes *et al.* (2005) a poluição do ar não foi capaz de

alterar parâmetros reprodutivos de homens jovens expostos em áreas urbanas industrializadas, tais como volume, concentração total e número de espermatozóides, mas foi capaz de provocar alteração na motilidade, morfologia e aumento de dano no DNA do espermatozóide.

No presente trabalho, os resultados no grupo pré+pós-natal da primeira geração podem assim, ser compatíveis com os trabalhos acima citados, que apresentaram invariabilidade do número de espermatozóides quando homens são expostos à poluição do ar. Rubes *et al.* (2007) apontam polimorfismos genéticos como responsáveis pelas diferenças encontradas entre homens que apresentam sensibilidade à poluição do ar com dano na espermatogênese.

Assim, os resultados do grupo de exposição pré+pós-natal devem ser mais explorados para identificar a possível resistência das células germinativas masculinas à exposição prolongada ao material particulado fino urbano e os danos genéticos no espermatozóide.

Uma das hipóteses iniciais do presente trabalho, que explicaria a redução de espermátides alongadas, foi a diminuição na proliferação celular.

Na geração parental as quantificações da proliferação celular com as marcações imunohistoquímicas Ki67 e PCNA em células germinativas não apresentaram diferença entre os grupos experimentais (Tabela 5). Assim, a hipótese de redução na proliferação celular não foi confirmada para esta geração. Na primeira geração, da mesma forma, os dois testes de proliferação empregados, Ki67 e PCNA, não mostraram variação significativa da proliferação celular entre os animais dos diferentes grupos experimentais. Contudo, o teste com PCNA, embora não significativamente, apresentou leve aumento de proliferação celular nos grupos pré-

natal e pré+pós-natal quando comparados ao grupo não exposto, resultado este inverso do que era esperado inicialmente (Tabela 12).

Apesar dos dados das duas gerações não confirmarem a hipótese inicial, o sutil aumento da proliferação celular no grupo pré+pós-natal da primeira geração é adequado ao aumento de espermátocitos nesse mesmo grupo (Figura 13). Assim, esse fenômeno pode indicar também a atividade proliferativa como mecanismo compensatório para a redução de espermátides alongadas no compartimento adluminal dos túbulos seminíferos (van der Weyden *et al.*, 2006).

Na espermatogênese, a proliferação celular é fundamental, pois é um processo de constantes divisões celulares iniciado em uma célula diplóide que passa por mitose e duas meioses para formar oito células haplóides (Richburg, 2000). Qualquer alteração na atividade proliferativa das células pode modificar a população de células em qualquer tecido, por isso este processo é regulado por proteínas que verificam o correto funcionamento da divisão. O material particulado do ar urbano pode interferir neste processo, por exemplo, através das espécies reativas de oxigênio (ROS), que têm sua ação potencializada por componentes do material particulado, como os metais de transição, entre eles ferro (Fe), cobre (Cu), cádmio (Cd), cromo (Cr), chumbo (Pb), níquel (Ni) e vanádio (V). Esta potencialização pode resultar em diversas respostas adaptativas celulares como parada do crescimento e morte celular (apoptose ou necrose), dependendo do nível de toxicidade, além de peroxidação lipídica e dano ao DNA (Stohs e Bagchi, 1995).

Zhang *et al.* (2007) mostraram que o PM_{2,5} ambiental é capaz de impedir a progressão do ciclo celular em culturas de células epiteliais alveolares, pela inibição de ciclinas reguladoras do ciclo. Estes autores relatam que a apoptose, evidenciada

pela técnica de TUNEL, no entanto, não sofre alteração, sugerindo que a parada do ciclo não é uma diminuição da sobrevivência celular, mas sim uma diminuição da proliferação celular. Resultados contrários são mostrados em culturas de células musculares lisas de ratos expostos a extratos orgânicos de partículas de exaustão de motocicletas, que contém compostos semelhantes aos emitidos por motores a diesel. Neste tipo de exposição ocorre também, formação de ROS, que promovem estresse oxidativo e interferem na proliferação celular, provocando aumento de células marcadas com PCNA (Tzeng *et al.*, 2007).

No epitélio seminífero as ROS, na presença de metais, iniciam e propagam a cascata da peroxidação lipídica (Ochesendorf, 1999) reduzindo o número de espermatozoides produzidos e aumentando os danos no DNA, bem como os níveis de citocromo c e caspase-9 (marcadores de apoptose) no espermatozoide (Wang *et al.*, 2003). Assim, é possível que os metais de transição (Tabela 1) presentes na atmosfera da região de exposição, em certo grau, tenham promovido estresse oxidativo nos testículos dos animais dos grupos pré e pré+pós-natal da primeira geração, indicado pelo sutil aumento na proliferação destes grupos. Além disso, como as respostas provocadas pelas ROS são diversas pode ser que a alteração de número das células germinativas, bem como, de peso de órgãos, esteja ligada a ação deletéria destes elementos nos testículos dos animais expostos. Contudo, não foi feita análise de níveis de ROS e nem de dano no DNA das células germinativas, restando ainda ser investigada a participação do estresse oxidativo nos presentes resultados. Contudo, não foi feita uma análise mais detalhada do material particulado para determinar qual ou quais componentes são responsáveis pelas alterações mostradas.

O aumento de apoptose foi a segunda hipótese para a redução de células germinativas no epitélio seminífero. No entanto, a apoptose não apresentou variação significativa quando avaliada pela coloração de HE (Figura 16) ou pelo método de TUNEL (Figura 17), entre os animais da primeira geração nos diferentes grupos de exposição. Desta forma, também não foi confirmada a segunda hipótese deste trabalho para esta geração.

Ao contrário do que era esperado a geração parental mostrou queda da apoptose no grupo exposto. Nas quantificações em coloração com HE, houve redução da apoptose no estágio IV, entre os animais do grupo exposto, apresentando $1,20 \pm 0,29$ cél. apoptóticas/túbulo, enquanto o grupo não exposto apresentou $2,27 \pm 0,39$ cél. apoptóticas/túbulo. No estágio VIII, a apoptose grupo exposto, foi aumentada ($0,10 \pm 0,04$ cél. apoptóticas/túbulo), em comparação com o grupo não exposto ($0,00 \pm 0,00$ cél. apoptóticas/túbulo) (Figura 9). Pela técnica de TUNEL também houve, no grupo exposto ao $PM_{2,5}$, queda no número de células em apoptose no estádios IV ($1,60 \pm 0,82$ cél. apoptóticas/túbulo), V ($0,35 \pm 0,21$ cél. apoptóticas/túbulo) e VIII ($0,12 \pm 0,06$ cél. apoptóticas/túbulo), em comparação com seus respectivos grupos não expostos: $4,51 \pm 5,8$; $1,18 \pm 0,30$; e $0,44 \pm 0,14$ cél. apoptóticas/túbulo (Figura 10).

A apoptose é um mecanismo complementar e oposto à mitose na regulação da população de células, que pode ser iniciada ou inibida por uma variedade de estímulos (Kerr *et al.*, 1972), por isso pode também ser um indicativo de injúria nos tecidos e seu aumento tem sido sugerido como um importante mecanismo de resposta a agentes tóxicos (Richburg 2000). Embora o $PM_{2,5}$ tenha mostrado afetar a espermatogênese em outros parâmetros, tais como peso testicular, alteração do

número de células germinativas e assincronia do ciclo do epitélio seminífero, ele não foi capaz de alterar a apoptose nos animais expostos da primeira geração. Por outro lado, a geração parental indicou menor número de células germinativas em apoptose, mostrando que o mecanismo de morte celular programada é afetado por partículas finas. Esta diferença entre as gerações pode ser atribuída à variação de PM_{2,5} durante sua exposição, além disso, pode haver também variação na composição do material particulado o que explicaria tal fenômeno.

Na espermatogênese de mamíferos a apoptose ocorre de forma muito acentuada, na qual estima-se que haja perda de cerca de 75% de células germinativas (Huckins, 1978). Este excesso de produção de células germinativas se dá porque as espermatogônias sofrem expansão clonal formando uma população muito maior de células germinativas do que a célula de Sertoli pode suportar (Richburg, 2000). Assim, para avaliar a apoptose espontânea nos animais experimentais, foi feita uma avaliação da apoptose nos diferentes estádios de maturação apenas com os dados do grupo de animais não expostos das duas gerações, fornecendo assim, a apoptose normal nos animais experimentais.

Na geração parental foi possível notar aumento da apoptose espontânea no estágio IV com relação aos demais estádios, em ambas as técnicas empregadas para a marcação de apoptose, HE (Tabela 6) e TUNEL (Tabelas 7). É provável que a redução na apoptose, mostrada anteriormente, para esta geração seja consequência da frequência reduzida de túbulos em estágio IV nos animais expostos da geração parental, já que este estágio é o de maior apoptose espontânea.

Na primeira geração também houve, pela análise com a coloração de HE, maior frequência de apoptose no estágio IV quando comparado com os estádios III,

V, VI, VII e VIII. Contudo, os estádios I e II não foram diferentes do estágio IV (Tabela 13). Por meio do método de TUNEL, da mesma forma como aconteceu com os animais da geração parental, o estágio IV foi diferente de todos os demais, exibindo maior apoptose espontânea (Tabela 14).

O aumento de apoptose basal calculada entre os animais não expostos das duas gerações mostrou que o estágio IV é o mais suscetível à morte celular programada. Esta suscetibilidade em estágio análogo já foi demonstrada em ratos, que apresentaram aumento da apoptose nos estádios XII e XIV (Kerr, 1992) do método acrossômico, sendo o estágio XIV (do método acrossômico) e IV (do método da morfologia tubular) representativos da meiose (Russel *et al.*, 1990). Este fenômeno de aumento de apoptose nesta fase de maturação do ciclo provavelmente ocorre devido aos *checkpoints* da meiose que asseguram a correta segregação de cromossomos durante a divisão celular (Walter *et al.*, 2003), mostrando que o estágio IV é crítico para manter a integridade e a remoção de células danificadas, embora normalmente a apoptose seja mais freqüente entre as espermatogônias devido ao processo de expansão clonal (de Rooij e Grootegoed, 1998). Assim, um menor número de células em apoptose, como o que foi observado no grupo exposto da geração parental, pode significar que os espermatozoides formados não têm a qualidade esperada para fertilização, tendo sido isso refletido no menor número de fêmeas prenhes, embora este fato não possa ser atribuído exclusivamente aos machos, já que as fêmeas também estavam expostas.

A poluição atmosférica tal qual respiramos todos os dias é mistura complexa de substâncias que atinge todas as pessoas, por isso identificar os componentes exatos do material particulado que contribuíram para o aparecimento dos efeitos observados

não foi um dos objetivos deste trabalho, mas é um tema que pode e deve ser melhor explorado.

Assim, foi possível mostrar que a espermatogênese de camundongos expostos ao PM_{2,5} do ar urbano pode ser afetada em exposições pré, pós-natais e nos dois períodos combinados. Estas alterações são vistas no peso corpóreo e testicular, na densidade numérica de células germinativas, na apoptose e no tempo de duração do ciclo do epitélio seminífero. Contudo, não se sabe ainda os mecanismos de ação dos vários compostos presentes no material particulado fino urbano e qual o impacto destas exposições na saúde reprodutiva das gerações futuras.

6. Conclusões

- Os níveis ambientais de $PM_{2,5}$ da poluição atmosférica são capazes de afetar o sistema reprodutor masculino de camundongos expostos durante o período gestacional, pós-gestacional ou nos dois períodos combinados em ambas as gerações;
- Independente do período de vida, os camundongos expostos ao $PM_{2,5}$ apresentam alteração de peso corpóreo, de testículo e de epidídimo;
- A exposição ao $PM_{2,5}$ é capaz de alterar a frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero em camundongos expostos durante o período pós-gestacional;
- A frequência normal dos estádios do ciclo do epitélio seminífero indica que os estádios finais são mais frequentes (VI, VIII e VII, nesta ordem) com relação aos estádios iniciais (II e I, nesta ordem);
- A exposição ao $PM_{2,5}$ não altera a densidade numérica de células de Sertoli e de Leydig, mas altera a de células da linhagem germinativa em camundongos expostos durante ou após a gestação;
- A exposição ao $PM_{2,5}$ não altera a proliferação celular nas diferentes fases de vida dos animais estudados de ambas as gerações;
- A exposição ao $PM_{2,5}$ é capaz de provocar alteração no número de células em apoptose nos estádios do ciclo espermato gênico em camundongos expostos após a gestação;
- A apoptose espontânea em animais não expostos é maior no estágio IV do ciclo do epitélio seminífero.

7. Referências Bibliográficas

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia molecular da célula*. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.

Amann RP. Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals. *Environ Health Perspect*. 1986;70:149-58.

Baird, C. *Química Ambiental*. 2ª ed. Porto Alegre: Bookman Companhia Editora; 2002.

Berndtson WE. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J Anim Sci*. 1977; 44:818-33.

Blanco-Rodríguez J. A matter of death and life: the significance of germ cell death during spermatogenesis. *Int J Androl*. 1998;21:236-248.

Brook RD. Cardiovascular effects of air pollution. *Clinical Science*. 2008;115:175-87.

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br Med J*. 1992;305:609-613.

Ccoyllo, OR. *Identificação da contribuição das fontes locais e remotas de poluentes na Região Metropolitana de São Paulo*. [Tese]. São Paulo: Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas, Universidade de São Paulo; 2002.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. (CETESB): Caracterização das Estações da Rede Automática de Monitoramento da Qualidade do Ar na RMSP - Estação Cerqueira César. 2005. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br>.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. (CETESB): Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo 2006/CETESB. 2007. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br>.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. (CETESB): Boletins diários de qualidade do ar [internet]. 2005. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br>.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. (CETESB): Boletins diários de qualidade do ar [internet]. 2006. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br>.

Cheng CY, Mruk DD. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol. Rev.* 2002;82:825-74.

Choi H, Rauh V, Garfinkel R, Tu Y, Perera FP. Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of intrauterine growth restriction. *Environ Health Perspect.* 2008;116, 658-65.

Clermont Y, Harvey SC. Effect of hormones on spermatogenesis in the rat. Ciba Foundation Colloq *Endocrinol.* 1967;16:173-96.

Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Ver.* 1972;52:198-236.

Donaldson K, Stone V. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann Ist Super Sanità.* 2003;39:405-10.

Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35:495-516.

Environmental Protection Agency. (EPA): National ambient air quality standards for particulate matter: proposed rule. Fed. Regist. 71, 2620–2708. 2006. Disponível em: <http://www.labsafety.com/refinfo/fedreg/FRPDF/011706.pdf>.

Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM, Ames BN. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res.* 1996;315:199-203.

Fortoul TI, Bizarro-Navares P, Acevedo-Naya S, Piñón-Zárate G, Rodríguez-Lara V,

Colín-Barenque L, Musssali-Galante P, Ávila-Casado MDC, Ávila-Costa EME, Saldívar-Osorio L. Ultrastructural findings in murine seminiferous tubules as a consequence of subchronic vanadium pentoxide inhalation. *Reproductive Toxicology*. 2007;23:588-92.

Ha EH, Hong YC, Lee BE, Woo BH, Schwartz J, Christiani D. Is air pollution a risk factor for low birth weight in Seoul? *Epidemiology*. 2001;12:643-48.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407:770-6.

Horák S, Kamińska J, Olejek A. The fertilization potential of donor semen between 1982 and 2004 in the industrial area of upper Silesia (Poland). *Ann Agric Environ Med*. 2008;15, 113-8.

Huckins C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rec* [abstract]. 1978;190:905-26.

Israël-Assayag E, Cormier Y. Adaptation to organic dust exposure: a potential role of L-selectin shedding? *Eur respire J*. 2002; 19:833-7.

Izawa H, Kohara M, Watanabe G, Taya K, Sagai M. Diesel exhaust particle toxicity on spermatogenesis in the mouse is aryl hydrocarbon receptor dependent. *J Reprod Dev*. 2007;53:1069-78.

Jensen KJ, Jorgensen N, Punab M, Haugen TB, Suominen J, Zilaitiene B, Horte A, Andersen AG, Carlsen E, Magnus O, Matulevicius V, Nermoen I, Vierula M, Keiding N, Toppari J, Skakkebaek NE. Association of in utero exposure to maternal smoking with reduced semen quality and testis size in adulthood: A cross-sectional study of 1,770 young men from the general population in five European countries. *Am J Epidemiol*. 2004;159:49-58.

Johnson RA, Wichern, DW. *Applied multivariate statistical analysis*. 3rd Ed. New

Jersey, USA: Prentice-Hall International Editions; 1992.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-57.

Kerr JB. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *J Reprod Fertil*. 1992;95:825-30.

Kierszenbaum AL. *Histologia e biologia celular: Uma introdução à patologia*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora; 2008.

Koivisto P, Adler ID, Pacchierotti F, Peltonen K. DNA adducts in mouse testis and lung after inhalation exposure to 1,3-butadiene. *Mutat Res*. 1998;397,3-10.

Lee BF, 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: 638-43.

Lichtenfels AJFC, Gomes JB, Pieri PC, Miraglia SGEK, Hallak J, Saldiva PHN. Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in Sao Paulo, Brazil. *Fertil Steril*. 2007; 87: 230-2.

Lin CA, Nishioka DC, Conceição GMS, Braga ALF, Saldiva PHN. Air pollution and neonatal deaths in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37:765-70.

Lodge JP, *Methods of air sampling and analysis*. 3rd edition. Intersociety Committee, Lewis Publishers, Inc.; 1989. pp. 399-402.

Mauad T, Rivero DHRF, Oliveira RC, Lichtenfels AJFC, Guimarães ET, André PA, Kasahara DI, Bueno HMS, Saldiva PHN. Chronic exposure to ambient levels of urban particles affects mouse lung development. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178:721-8.

Miething A. Germ-cell death during prespermatogenesis in the testis of the golden

hamster. *Cell Tissue Res.* 1992;267:583-90.

Mohallem SV, Lobo DJA, Pesquero CR, Assunção JV, André PA De, Saldiva PHN Dolhnikoff. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of São Paulo. *Environ Res.* 2005;98:196-202.

Neves ES. *Estudo comparativo da estrutura do testículo e do processo espermatogênico em jumentos (Equus asinus) e burros (Equus mulus mulus)* [Tese]. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais; 2001.

Neves ES, Chiarini-Garcia H, França LR. Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. *Biol Reprod* 2002;67:247-55.

Ochesendorf FR. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod Update.* 1999; 5:399-420.

Ono N, Oshio S, Niwata Y, Yoshida S, Tsukue N, Sugawara I, Takano H, Takeda K. Prenatal exposure to diesel exhaust impairs mouse spermatogenesis. *Inhal Toxicol.* 2007;19:275-81.

Ono N, Oshio S, Niwata Y, Yoshida S, Tsukue N, Sugawara I, Takano H, Takeda K. Detrimental effects of prenatal exposure to filtered diesel exhaust on mouse spermatogenesis. *Arch Toxicol.* 2008;82:851-9.

Perera FP, Tang D, Tu YH, Cruz LA, Borjas M, Bernet T, Whyatt RM. Biomarkers in maternal and newborn blood indicate heightened fetal susceptibility to procarcinogenic DNA damage. *Environ Health Perspect.* 2004;112:1133-6.

Peters A, Veronesi B, Calderón-Garcidueñas L, Gehr P, Chen LC, Geiser M, Reed W, Rothen-Rutishauser B, Schürch S, Schulz H. Translocation and potential

neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. *Part Fibre Toxicol.* 2006;3:1-13.

Radovsky A, Mitsumori K, Chapin RE. Male reproductive tract: testis and epididymis, accessory sex glands, and penis. In: Maronpot RR. *Pathology of the mouse: Reference and Atlas.* Vienna, Illinois: Cache River Press; 1999. p.381-407.

Reed JC. Warner-Lambert/Parke-Davis award lecture: Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol.* 2000;157:1415-30.

Richburg JH. The relevance of spontaneous and chemically-induced alterations in testicular germ cell apoptosis to toxicology. *Toxicol Letters.* 2000;112-113:79-86.

Richburg JH, Johnson JK, Schoenfeld HA, Meistrich ML, Dix DJ. Defining the cellular and molecular mechanisms of toxicant action in the testis. *Toxicol Letters.* 2002;135:167-183.

Rivero DHRF, Soares SRC, Lorenzi-Filho G, Saiki M, Godleski JJ, Antonangelo L, Dolhnikoff M, Saldiva PHN. Acute Cardiopulmonary Alterations Induced by Fine Particulate Matter of São Paulo, Brazil. *Toxicol Sciences.* 2005a; 85:898–905.

Rivero DHRF, Sasaki C, Lorenzi-Filho G, Saldiva PHN. PM_{2.5} induces acute electrocardiographic alterations in healthy rats. *Environ Res.* 2005b; 99:262–266.

de Rooij DG, Grootegoed JA. Spermatogonial stem cells. *Cur Opin Cell Biol* 1998;10:694-701.

de Rosa M, Zarrilli S, Paesano L, Carbone U, Boggia B, Petretta M, Maisto A, Cimmino F, Puca G, Calao A, Lombardi G. Traffic pollutants affect fertility in men. *Hum Reprod.* 2003;18:1055-61.

Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassali P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J.* 1997; 2262-70.

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;20:2776-83.

Rubes J, Selevan SG, Sram RJ, Evenson DP, Perreault SD. GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutat Res.* 2007;625:20-8.

Russel LD, Lee IP, Ettlín IP, Malone PP. Morphological pattern of response after administration of procarbazine: alteration of specific cell associations during the cycle of the seminiferous epithelium of the rat. *Tissue Cell.* 1983;15:391-404.

Russel LD, Ettlín IP, Sinha HAP, Clegg ED. *Histopathology of the testis.* Clearwater, Florida: Cache River Press; 1990.

Selevan SG; Borkovec L; Slott VL; Zudová Z; Rubes J; Evenson DP; Perreault SD. Semen quality and reproductive health of young czech men exposed to seasonal air pollution. *Environ Health Perspect.* 2000;108:887-93.

Stevens A, Lowe J. *Histology.* New York: Gower Medical Publishing; 1992.

Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med.* 1995;18:321-36.

Tsukue N, Toda N, Tsubone H, Sagai M, Jin WZ, Watanabe G, Taya K, Birumachi J, Suzuki AK. Diesel exhaust (DE) affects the regulation of testicular function in male Fischer 344 rats [abstract]. *J Toxicol Environ Health A.* 2001;63:115:26.

Tzeng HP, Yang RS, Uren TH, Liu SH. Up regulation of cyclooxygenase-2 by motorcycle exhaust particulate-induced reactive oxygen species enhances rat vascular smooth muscle cell proliferation. *Chem. Res. Toxicol.* 2007;20:1170-6.

Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Ribeiro AACM, Mayhew TM, Saldiva PHN, Dolhnikoff M. Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. *Biol Reprod.* 2008;79: 578-84.

Walter CA, Walter RB, McCarrey JR. Germline genomes-A biological fountain of youth? *Sci Aging Knowl Environ.* 2003;8:PE4.

Wang X, Sharma RK, Sitka SC, Thomas Jar AJ, Falconer T, Agawam A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril.* 2003;80:531-5.

Watanabe N, Oonuki Y. Inhalation of diesel engine exhaust affects spermatogenesis in growing male rats. *Environ Health Perspec.* 1999;107:539-44.

Watanabe N. Decreased number of sperms and Sertoli cells in mature rats exposed to diesel exhaust as fetuses. *Toxicol Letters.* 2005;155:51-8.

Watson JG, Chow JC, Rosenthal DH, Stoltenberg MR, Kreisler NM, Herring SV. Particle size relationships at the Fresno Supersite. *J Air Waste Manage Assoc.* 2002; 52(7):822-7.

World Health Organization. (WHO): Guidelines for community noise. 1999. Disponível em: [http://: whqlibdoc.who.int/hq/1999/a68672.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/a68672.pdf).

World Health Organization. (WHO): Health effects of transport-related air pollution. 2005a. Disponível em: [http://:www.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?sesslan=1&codlan=1&codcol=34&codcch=51](http://www.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?sesslan=1&codlan=1&codcol=34&codcch=51).

World Health Organization. (WHO): Air quality guidelines global updates 2005. 2005b. Disponível em: http://www.who.int/entity/phe/health_topics/outdoorair_aqg/en/.

Yoshida S, Sagai M, Shigeru O, Umeda T, Ihara T, Sugamata M, Sugawaras I, Takeda K. Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice. *Internat J Andrology*. 1999;22:307-15.

Zhang J, Ghio AJ, Gao M, Wei K, Rosen GD, Upadhyay D. Ambiente particulate matter induces alveolar epithelial cell cycle arrest: Role of G1 cyclins. *FEBBS Lett*. 2007.581:5315-20.