

**FABIANA MAIA NOBRE ROCHA**

**Relação da poluição atmosférica com a citologia  
nasal em pacientes com rinite alérgica, residentes na  
cidade de São Paulo, nas diferentes estações do ano**

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

Área de concentração: Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. João Ferreira de Mello Júnior

**SÃO PAULO  
2005**

**FICHA CATALOGRÁFICA**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rocha, Fabiana Maia Nobre

**Relação da poluição atmosférica com a citologia nasal em pacientes com rinite alérgica, residentes na cidade de São Paulo, nas diferentes estações do ano** / Fabiana Maia Nobre Rocha. -- São Paulo, 2005.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia.

Área de concentração: Otorrinolaringologia.

Orientador: João Ferreira de Mello Júnior.

Descritores: 1.POLUIÇÃO DO AR 2.NARIZ/citologia 3.RINITE ALÉRGICA

USP/FM/SBD-200/05

## Dedicatória

A o meu querido esposo Caio, pelo amor e companheirismo, sempre presente em todos os momentos de minha vida.

A os meus queridos pais, Jurandir e Laís, por todo amor, carinho e dedicação, e a quem devo tudo que sou.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. João Ferreira de Mello Júnior, grande amigo e orientador brilhante, modelo de sucesso acadêmico e profissional, meu respeito, admiração e gratidão pela inestimável ajuda nesta jornada.

Ao Prof. Dr. Hilário Nascimento Saldiva, chefe do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas valiosas orientações a respeito de poluição atmosférica.

À Profa. Dra. Leila Antonângelo, patologista do laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, minha gratidão pelo imensurável auxílio na leitura de todas as lâminas desta tese.

Ao Prof. Dr. Aroldo Minitti, Professor Titular da Disciplina de Clínica Otorrinolaringológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio e oportunidade indispensáveis.

Aos Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes, Prof. Dr. Sílvio Marone, Prof. Dr. Rui Imamura, Prof. Dr. Ossamu Botugan e Profa. Dra. Signe Grael, membros da banca examinadora do exame de qualificação, pelas excelentes sugestões para o aperfeiçoamento desta tese.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento, Coordenador do Curso de Pós-graduação da Disciplina de Clínica Otorrinolaringológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade para realização desta tese de doutorado.

À Dra. Christiana Maia, irmã e amiga de todas as horas.

À Dra. Eliézia Alvarenga, grande amiga, pela ajuda e incentivo de forma irrestrita na realização desta tese.

Ao Dr. Olavo Mion, pelo estímulo e apoio durante a realização desta tese.

Aos meus familiares, pela ajuda e compreensão nesta fase da minha vida.

A todos os meus amigos e pacientes, que voluntariamente e despojados de qualquer outro interesse, senão o de contribuir com os avanços da ciência, participaram deste estudo.

A todos os amigos da Disciplina de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela colaboração direta ou indireta na realização deste estudo.

Ao Dr. Alfésio Braga e a Dra. Lourdes Martins, pelo grande auxílio na análise estatística desta tese.

Aos técnicos Geni Pedrozo, Antonieta Lamana, Luís César Moreira e Tânia Cabral pela grande ajuda no processamento das lâminas.

Às Sras. Maria Marilede Alves, Lucivânia da Silva Quintão, Maria Márcia Alves, Bárbara Fusco, pela colaboração durante todo o curso de pós-graduação.

À Sra. Lígia Atháide Lima e Silva, pela cuidadosa correção ortográfica.

À Sra. Maria Helena Vargas, pela imensa ajuda na formatação desta tese.

Esta tese está de acordo com:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação  
*Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2004.

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

## SUMÁRIO

Normas da revista

Artigo

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de quadros

Lista de figuras

Lista de gráficos

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	001
2	OBJETIVOS.....	009
2.1	Objetivo geral .....	010
2.2	Objetivo específico.....	010
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	011
3.1	Histologia nasal.....	012
3.2	Citograma nasal .....	012
3.3	Efeitos dos poluentes no sistema respiratório.....	014
3.3.1	Ozônio .....	014
3.3.2	Material particulado .....	021
3.3.3	Dióxido de nitrogênio.....	023
3.3.4	Dióxido de enxofre.....	024
3.3.5	Mistura dos poluentes.....	025
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS .....	026
4.1	Casuística .....	027
4.1.1	Critérios de inclusão - Grupo alérgico.....	028
4.1.2	Critérios de inclusão - Grupo controle .....	029
4.1.3	Critérios de exclusão .....	029
4.1.4	Restrições que foram observadas .....	030
4.2	Métodos .....	031
4.2.1	Técnica de coleta da secreção nasal.....	031
4.2.2	Técnica de preparo das lâminas.....	032
4.2.3	Técnica de preparo da coloração .....	032
4.2.4	Leitura das lâminas.....	033
4.2.4.1	Análise do Leishman .....	033
4.2.4.2	Análise do "Periodic Acid Schiff" .....	036
4.2.4.3	Sistema para análise de AgNOR.....	038
4.2.4.4	Análise das áreas de AgNOR nas células ciliadas e caliciformes .....	039
4.2.5	Células analisadas.....	040
4.2.6	Análise da poluição atmosférica .....	040
4.2.7	Análise estatística.....	041

5	RESULTADOS .....	043
5.1	Comparação entre os grupos alérgico e controle.....	044
5.1.1	Método de coloração: Leishman.....	044
5.1.2	Método de coloração PAS.....	047
5.1.3	Método de coloração AgNOR.....	048
5.2	Comparação dos pacientes de cada grupo entre eles mesmos.....	049
5.2.1	Método de coloração Leishman.....	049
5.2.2	Método de coloração: PAS.....	050
5.2.3	Método de coloração AgNOR.....	051
5.3	Relação das variáveis significantes com os dados dos poluentes atmósfericos, da temperatura e da umidade do ar.....	052
5.3.1	Método de coloração Leishman.....	053
5.3.1.1	Eosinófilos.....	053
5.3.1.2	Neutrófilos.....	054
5.3.1.3	Células epiteliais ciliadas.....	056
5.3.1.4	Células caliciformes.....	058
5.3.2	Método de coloração PAS.....	059
5.3.3	Método de coloração AgNOR.....	060
5.3.4	Resumo das relações significantes dos poluentes com as células.....	062
5.3.5	Níveis de poluição no ano de 2003.....	063
6	DISCUSSÃO.....	068
7	CONCLUSÕES.....	084
8	ANEXOS.....	087
9	REFERÊNCIAS .....	101

# American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine

## Guidelines for Authors

### Guidelines for Development of Official ATS Documents

#### MANUSCRIPT PREPARATION

Manuscripts should be typed in 12-point type with margins of 2.5 centimeters (1 inch). Double spacing should be used throughout. All papers should be organized to include: title page, abstract, text, acknowledgments, references, figure legends, footnotes, tables, and figures. Each of the preceding elements should begin on a separate page. While the Introduction should begin on a separate page, it is not necessary for the Methods, Results, and Discussion section to begin on a separate page; instead, they should follow after the Introduction, with two spaces separating each section. Pages should be numbered consecutively, beginning with the abstract.

#### Abbreviations and Acronyms

The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine discourages the use of abbreviations and acronyms, and requires authors to avoid them completely in the abstract. Abbreviations impose a burden on a reader because the reader must first decipher the writer's code. This task distracts the reader from concentrating on the science in an article. A reader should not need a glossary to understand an article. If a reader is already familiar with an abbreviation and the writer uses it skillfully, it can ease communication. It is acceptable to substitute a standard abbreviation for an unwieldy word or phrase appearing more than five times in a manuscript. An abbreviation should never replace one short word: for example, do not use ETX for endotoxin or AR for arousal, whereas LAM for lymphangioleiomyomatosis is acceptable. A simple way of avoiding abbreviations is to use a substitute word. Instead of writing "IRL" for "inspiratory resistive load", simply write "load" after first stating what type.

If an abbreviation is used, the term should always be first written in full with the abbreviation in parentheses immediately after it. Do not invent new abbreviations where pre-existing ones exist. If you use an abbreviation, make it a sensible one, such as three capital letters without periods. Avoid using terms like Group 1 or Group A; readers should not have to remember what Group 1 or Group A stands for. Instead, write the "treated patients" or the "control group."

Specialized jargon should also be avoided.

#### Title Page

List all of the following items.

1. Title, which should be limited to 100 characters (count letters and spaces, use no abbreviations)
2. First name, middle initial, and last name of each author
3. Name of department(s) and institution(s) to which the work should be attributed linked to each author with a corresponding number
4. Name and address of the author to whom requests for reprints should be addressed
5. Corresponding Author's e-mail address, FAX number, and phone number (this can be a different Corresponding Author than the Corresponding Author listed in ScholarOne)
6. All source(s) of support in the form of grants, gifts, equipment, and/or drugs
7. A short running head of no more than 35 characters (count letters and spaces)
8. List ONE descriptor number that best classifies the subject of your manuscript, using the Subject Category List for Authors (<http://www.thoracic.org/publications/ajrccm/codelist.asp>)
9. State the word count for the body of the manuscript, excluding abstract, references and online supplementary information for the Online Repository; state the word count for the Abstract on the Abstract page (numbered page 1)
10. If material is being submitted for the Online Data Supplement, please include the following statement on the title page of the main manuscript, "This article has an online data supplement, which is accessible from this issue's table of content online at [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org)"

#### Abstract

The second page (numbered page 1) should carry an abstract of not more than 250 words and labeled Abstract. The AJRCCM requires that the abstract be written in a structured format for original research articles. An abstract is required for State of the Art, Workshop reports, Clinical Commentaries, Critical Care Perspectives, and Pulmonary Perspectives, but need not be structured. An abstract is not required for manuscripts of the types Occasional Essay and Pro and Con.

A structured abstract must include the following headings: Rationale, Objectives, Methods, Measurements and Main Results, and Conclusions. Avoid a long introductory section. A clear conclusion is imperative, and all speculation should be avoided. The abstract should be written in a format that can be understood by both researchers and clinicians.

Do not use abbreviations, acronyms, footnotes or references in the abstract

At the bottom of the page, state the number of words in the abstract and list 3 to 5 key words for use as indexing terms. These terms should not include words in the title of the manuscript. Key words are best expressed as MeSH (Medical Subject Headings) terms, the controlled vocabulary used by Pub Med. The MeSH browser available at (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>) provides an online guide to the selection of key words.

#### Text

The text of articles should usually, but not necessarily, be divided into the following sections: Introduction, Methods, Results, and Discussion. Long articles may require subheadings within some sections to clarify the contents, especially the Results and Discussion sections. There should not be more than two levels of subheadings. Subheadings must never be used in the Introduction section.

Manuscripts should be concise. Verbose reports containing excessive redundancy and repetition are less likely to be accepted.

The Introduction should contain background material, and, most importantly, a clear rationale and hypothesis or central question. With rare exceptions, the introduction should contain less than 450 words (one and a half typed pages).

Statements referring to work in progress that implies future publication, in the Journal or elsewhere, should not be used. Unpublished work should not be cited in References, but may be cited in full parenthetically within the text. Written permission from the author for citation of unpublished work should be mailed to the Peer Review Office.

All cases of tuberculosis and all designators of mycobacteria should be classified according to the 1990 edition of Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis, published by the American Lung Association.

Generic names of drugs should be used instead of trade names. The location (city, state, country) of a manufacturer listed in the text should be provided after the first reference to the manufacturer.

Units of measurement should conform to current scientific usage and can be abbreviated when they follow a number (e.g., cm, nm, ml, g, mg, nmol) but not otherwise. Unusual units should be defined.

Statistical methods must be described and the program used for data analysis, and its source, should be stated. Summary statistics should define whether standard deviation ( $\pm$  SD), variability of the sample, or standard error of the mean ( $\pm$  SEM), uncertainty about the average, is being used.

Clinical trials must follow the CONSORT guidelines (<http://www.consort-statement.org/statement/revisionstatement.htm>). The authors should ensure that their manuscript complies with the 22-item CONSORT checklist. The first figure in a report of a clinical trial must contain information regarding progress through the phases of the trial, including enrollment, patient allocation, follow-up, and analysis.

### **Methods in the Print Version**

Materials and Methods should be limited to essential new information. Information that is available in previous publications should be cited rather than repeated. A limit of 500 words is recommended. Authors are encouraged to submit additional detail on Methods as a supplement for the Journal's Online Repository. Exceptions to the 500-word limitation for Methods in the print version of the paper will be granted if authors make a convincing case in a letter in the "Author Comments" area on the website that the use of novel methodologies is central to the main point of the article. The availability of the Online Repository makes it possible for authors to describe their Methods in greater detail than was ever possible in the past. Many manuscripts are declined for publication because authors fail to describe their methods in sufficient detail. To indicate the presence of supplementary material being submitted for the Online Repository, authors should include sentences at appropriate points in the main manuscript to alert the reader; for example, "additional detail on the method for making these measurements is provided in an online data supplement."

### **Online Data Supplement**

Authors may submit materials supporting the manuscript for posting in the Online Data Supplement of the American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.

Additional text, tables (and supporting information), figures (and supporting information), and video and soundtrack files can be included in this section. Whenever possible, large video files should be broken down into separate files of five megabytes or less.

The supplementary material must be submitted simultaneously with the rest of the manuscript and it will undergo peer review and be judged by the same criteria as the rest of the manuscript. The supplementary material (text, figures, tables) must be appended to the main manuscript being submitted for consideration in the print journal. The cover sheet of material being submitted for the Online Data Supplement should give only the manuscript title, list the authors (not affiliations), and include the statement "Online Data Supplement."

Material in the Online Data Supplement is independent from the manuscript and will appear online only. In contrast, material in the main manuscript will appear in both the print version and the online version of the Journal.

When writing material for the Online Data Supplement, authors are allowed to repeat sentences included in the manuscript submitted for the print journal if this will make comprehension easier. The figures and tables in the Online Data Supplement should be labeled Figure E1, Table E1, and so on. To indicate the presence of these items, the author must make a statement in the main manuscript, such as "see Figure E1 in the online data supplement."

If citations are made in the Online Data Supplement, this supplement must contain its own independent reference section with the references numbered sequentially, even if some of these references duplicate those in the print version. The references should be numbered E1, E2, and so on.

If supplementary material was initially submitted for consideration for posting in the Online Data Supplement, the material needs to be included again when a revised manuscript is being submitted.

When submitting a REVISED manuscript, either online or in hard-copy format, that contains supplementary material for the Online Data Supplement, authors must mail a copy of the supplementary material on a 3.5 inch diskette.

The Editorial Office staff is not responsible for extracting supplementary material from the main manuscript for posting in the Online Data Supplement. All information included in the Online Data Supplement should be carefully reviewed, as it will not be copyedited or proofread by the Journal staff. The Editorial Office staff will create the hypertext link between the Online Data Supplement and the online version of the American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.

### **Acknowledgments**

All acknowledgments should be grouped into one paragraph and placed after the Discussion. Information about grants, funding, financial support, or previous publication of an article as an abstract should not appear in the acknowledgements; it should appear as a footnote on the first page of the article.

### **References**

The number of references cited in an article is not limited. References should be typed double-spaced, should begin on a separate sheet, and be numbered in the order that they appear in the text. All author's names (do not use "et al.," except for references with more than ten authors), complete article titles, and articles in press should be included. Supply inclusive page numbers. Submitted manuscripts that have not been accepted for publication are considered as unpublished work and should not be included in the references. If an article cited in References is in press, it must be appended at the end of the online submission.

Authors should make every effort to discuss their work in the context of the most recent research in their field of inquiry. Before submitting a manuscript (including a revised manuscript), authors are encouraged to search the Year-in-Review site on the Homepage of the American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine (<http://ajrccm.atsjournals.org/cgi/collection/>), and also to use other literature search engines, to ensure that their references are up to date.

Use abbreviations for the names of all journals as provided in Index Medicus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>). Spell out the names of journals that are not listed.

A reference for the statistical methods used should be cited.

### **Examples of References**

#### **Journal Articles**

Gandevia SC, Gorman RB, McKenzie DK, DeTroyer A. Effects of increased ventilatory drive on motor unit firing rates in human inspiratory muscles. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1598-1603.

#### **In Press**

Lakatos E, DeMets DL, Kannel WB, Sorlie P, MacNamara P. Influence of cigarette smoking on lung function and COPD incidence. *Chronic Dis*. (In press)

#### **Abstracts**

Carr MJ, Udem BJ. Trypsin-induced, neurokinin-mediated contraction of guinea pig isolated bronchus [abstract]. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:A466.

#### **Books**

Lang TA, Secic M. How to report statistics in medicine. Philadelphia: American College of Physicians; 1997.

#### **Articles in Books**

Voyce SJ, Urbach D, Rippe JM. Pulmonary artery catheters. In: Rippe JM, Irwin RS, Alpert JS, Fink MP, editors. *Intensive care medicine*, 2nd ed. Boston, MA: Little Brown; 1991. p. 48-72.

#### **Government or Association Report**

U.S. Public Health Service. Smoking and Health. A Report on the Surgeon General. Washington, DC.: U.S. Government Printing Office; 1979. DHEW Publication No. (PHS)79-50066.

#### **Journal Article in Electronic Format**

Manoloff ES, Francioli P, Taffé P, van Melle G, Bille J, Hauser PM. Risk for *Pneumocystis carinii* transmission among patients with pneumonia: a molecular epidemiology study. *Emerg Infect Dis* [serial online] 2003 Jan [cited 2004 Jul 14]; vol. 8. Available from: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol9no1/02-0141.htm>

## Tables

Each table should constitute a single unit of communication, completely informative in itself. It should be possible to understand the information in a table without reading the text. The information in a very small table can be presented more economically as one or two sentences of text.

Tables should be configured to fit vertically on the printed page. They will be typeset to fit a width of 3½ inches (9 centimeters) for single column or up to 7¼ inches (18½ centimeters) for double column. Tables that do not fit into this format will be returned for reworking.

With Revisions, each table should be typed double-spaced on a separate sheet. Do not submit tables as photographs or figures. Tables should be numbered consecutively, have a brief title, and be cited in text. Compare the titles of tables with one another, and remove redundant words. Avoid very broad and very narrow tables. All tables should be rotated through 90 degrees to determine the orientation that achieves the best presentation. Do not insert horizontal or vertical lines in a table. Large collections of data in a table are of interest to very few readers. Such tables should be submitted for consideration for the Journal's Online Repository rather than for the print version of the Journal.

Avoid arbitrary labels or classifications, such as groups A and B, when specific descriptors, such as "control" and "hypoxia", can be used.

All non-standard abbreviations used in each table should be explained in footnotes. For footnotes, use the following symbols in this sequence: \*, †, ‡, §, ll, \*\*, ††, etc.

## Illustrations

Two copies of line drawings and graphs, and two photographic glossy prints of each halftone should be submitted with the revised manuscript. Two photographic prints of all illustrations are required on submission of revised manuscripts. Illustrations must be good quality, unmounted prints, sized so they can be reduced to a width of 3 ½ inches (8.7 centimeters) for single column, and not exceeding 7 ¼ inches (18.2 centimeters) for double column. All figures must be submitted in a format that allows their publication without reduction. Halftones must be on glossy paper. Line drawings need not be on glossy paper; however, they may not be photocopies. We reserve the right to request glossy prints and to return unacceptable configurations for additional cropping and/or vertical orientation at the author's expense.

The size of the symbols and lettering should be in scale with the figure. Lettering on figures should have a sans serif font, such as Helvetica, and be of uniform size. All figures within a manuscript should be the same point size.

Multipart figures should be submitted as single composites, with each panel labeled (e.g., A, B). Labels indicating subparts of a figure (A, B, C, etc.) should be boldface and capitalized, but should not be larger than the type used in the text of the published article (i.e., after the figure is reduced to fit the width of one column, the labels and text in the figure should not be larger than 10 points [3-4 mm in height]).

Do not put a caption above a figure. The title for a figure should be described only in the figure legend, and not appear on the figure. Explanations of symbols should appear only in the figure legend, and not in the actual figure. Labels should be placed within the body of the figure, not outside it. The abscissa and ordinate of each graph should be labeled clearly.

Minimize the number of tick marks on the axes, and do not number each tick. Design figures so that you need the least possible number of letters.

Avoid bold lettering, because this looks unpleasantly dark when printed. The style and format of lettering except for indicating subparts of figures should be uniform throughout all the figures in a manuscript. Use lower case rather than capital letters in the labels of a figure. Make letters and numbers of a size that will enable them to appear about 2 to 3 mm high after reduction. Leave adequate space between the lettering and the axis.

The legend and figure form a separate unit and must be fully self-explanatory. By reading the legend, the reader should be able to understand the main findings in an illustration without looking at the text of an article.

The back of each illustration should be marked with its number, the first author's name, and the top indicated. Mark lightly or use a label; do not use paperclips on figures.

Additional figures may be submitted as supplementary information, subject to peer review, for publication in the Online Data Supplement.

## Color

The cost of publishing color art in the Journal is partially subsidized by the ATS with a portion of the costs billed to authors according to the following prices: \$650 for the first color page and \$400 for each additional page that contains color. Corresponding authors with manuscripts accepted for publication will be asked to confirm in writing their acceptance and responsibility for payment of this color art billing. If the color quote is not accepted, the author must indicate whether the figure should be printed in black and white or deleted. Color prints are preferred to transparencies. There is no charge for having color figures appear in an Online Data Supplement.

## Legends for Illustrations

Legends for illustrations should convey the findings and be typed double-spaced. The text included in each legend should be sufficient to enable a reader to understand the information in an illustration without reading the body of the text. Start the legends section on a separate page with Arabic numerals corresponding to the illustrations. When symbols, arrows, numbers, or letters are used to identify parts of the illustrations, each one should be identified and explained clearly in the legend. In photomicrographs, explain internal scale and identify the method of staining. Each figure should be cited in numerical order in the text.

## COVER

Color cover illustrations will be chosen each month from an article appearing in the Journal. The choice of cover art illustration will be made by the Editor. Authors are also encouraged to submit suitable high-quality color figures that do not appear in the actual article for consideration as cover illustrations. These figures should be related to the topic of their article and be accompanied by a short explanatory legend. Color figures will be published on the cover without additional charge; normal plate charges will continue to apply for color figures used within an article. The dimensions of cover illustrations should be 7-1/2 X 10 inches (width X height). These figures should be submitted according to the Submission of Digital Art Guidelines.

**Relationship between atmospheric pollution and nasal cytology in patients with allergic rhinitis living in the city of São Paulo during the different seasons of the year.**

Rocha FMN, Mello Jr. JF, Antonângelo L, Saldiva PHN, Braga A, Mion OG, Alvarenga EL. Department of Otorhinolaryngology, University Hospital, São Paulo University School of Medicine.

Address correspondence to: Fabiana Maia Nobre Rocha, Rua Dr. Djalma Lins Buarque, 85 – 57050-060, Maceió – AL – Brasil.

E-mail address: [fabianamaia@click21.com.br](mailto:fabianamaia@click21.com.br)

Phone number: 55-82-3221-2548 Fax number: 55-82-3336-3859

Descriptor number: 118

**ABSTRACT**

Atmospheric pollution has damaging effects on health and represents an important cause for the increase in morbidity and cardiorespiratory mortality, especially in winter. Different studies have demonstrated an increase in the prevalence of allergic rhinitis in urban areas, suggesting an effect resulting from exposure to pollutants. Therefore, we studied the relationship between atmospheric pollution and nasal cytology findings in patients with allergic rhinitis during the four seasons of the year and compared them to normal subjects. Nasal cytology was performed on 20 allergic patients and 20 normal subjects during the four seasons of 2003 using three types of staining: Leishman, PAS and AgNOR. Using statistical regression analysis, the cytological results were compared to the levels of pollutants on the day of collection of nasal secretion and up to 7 days before collection. Since some samples were lost over the year, patients with incomplete data were excluded, with 11 allergic patients and 12 normal subjects thus remaining. In summer, a significant increase of eosinophils was observed in the allergic group ( $p = 0.007$ ) and of ciliated cells in the control group ( $p = 0.021$ ). In autumn, neutrophils predominated in the control group ( $p = 0.027$ ). In winter, an increase of neutrophils was observed in the control group ( $p = 0.015$ ), and of goblet cells in the allergic group ( $p = 0.019$ ). In spring, there was an increase of neutrophils in the control group ( $p = 0.025$ ). No significant difference

in PAS or AgNOR staining was found between groups. In the allergic group, an association was observed between alterations in nasal cellularity and PM10, O<sub>3</sub> and SO<sub>2</sub> levels, with emphasis on PM10. In the control group, an association was noted between cellular alterations and O<sub>3</sub>, PM10 and SO<sub>2</sub>, with emphasis on O<sub>3</sub>. In the present study, we demonstrated that an acute increase of pollutant levels in the city of São Paulo results in changes in nasal cellularity, with distinct variations according to time of the year and sensitivity of each individual. The allergic individual reacts differently from the normal subject in terms of both the cell types found upon cytology and the type of pollutant. PM10 was the pollutant that most triggered inflammatory alterations in the nasal mucosa of allergic patients, whereas a broader spectrum of pollutants causing inflammation, with a predominance of O<sub>3</sub>, was found in normal subjects.

Descriptors: Air Pollution, Nose/cytology, Rhinitis Allergic Perennial

## INTRODUCTION

Atmospheric pollution represents one of the largest public health problems in the world not only because of its influence on climate change but also because of its damaging effect on human health. Since the 1960s, Europe and the United States have been suffering from the increases in atmospheric pollution during winter which are responsible for acute epidemic mortality resulting from respiratory and cardiovascular diseases. These effects are caused by high concentrations of sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) and particulate matter (PM) in the air of cities, together with unfavorable meteorological conditions and air stagnation<sup>1</sup>. An important fact is that even at low concentrations the association of different types of pollutants might even be more harmful to health<sup>2</sup>.

Allergic rhinitis has become a public health problem in developed and developing countries, especially among children and adolescents<sup>3</sup>. The results of epidemiological studies investigating the relationship between pollution and allergic rhinitis are contradictory. Preliminary studies conducted in Germany<sup>4,5</sup> and Italy<sup>6</sup> suggest a positive correlation between road traffic and morbidity due to allergic rhinitis. Levels of atmospheric pollution have also been associated with the prevalence and severity of allergic rhinitis<sup>7</sup>. In contrast to these results, a series of other epidemiological studies did not find any significant association between traffic-related air pollution and allergic rhinitis<sup>8-10</sup>.

As a developing country, Brazil is already facing severe problems due to environmental pollution. Saldiva *et al.*<sup>11</sup> concluded that a long period of exposure to atmospheric pollution may contribute to the pathogenesis of inflammatory airway disease and that the urban levels of pollution have adverse consequences for the respiratory tract.

Pollutants cause irritation of the nasal mucosa that leads to edema, alterations in mucus characteristics<sup>12,13</sup> and a reduction in ciliary activity<sup>14</sup>, causing chronic nasal obstruction and infection<sup>15</sup>. The nasal symptoms triggered by atmospheric pollution have been reported for some allergic<sup>4,16,17</sup> and nonallergic patients<sup>18-21</sup>. However, few studies regarding the effects of pollution and cellular alterations on the nasal mucosa of humans are available.

Since the condition of allergic patients is known to worsen with high pollution levels, we followed up and compared the nasal cytogram of patients with

allergic rhinitis and of subjects without nasal disease exposed to environmental pollution in the city of São Paulo during the different seasons of the year, quantifying eosinophils, neutrophils, ciliated cells and goblet cells. The cytological findings were then correlated with the levels of atmospheric pollution, relative air humidity and ambient temperature.

### **Patients and Methods**

An observational longitudinal study was conducted throughout 2003 on 40 patients from whom nasal secretion was collected on four different occasions for nasal cytology. The patients were divided into two groups, an allergic group and a control group. The first group consisted of 20 patients with allergic rhinitis living in the city of São Paulo and recruited from the outpatient clinic of the Division of Clinical Otorhinolaryngology, University Hospital, São Paulo University School of Medicine. The control group consisted of 20 healthy volunteers without nasal complaints also living in the capital. Some nasal secretion samples were lost over the year due to several reasons, and these patients with incomplete data were excluded, with 11 allergic patients and 12 normal subjects thus remaining.

The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of the São Paulo University School of Medicine. All patients with allergic rhinitis and normal subjects signed a free informed consent form to participate in the study.

Included in the study were patients of both sexes and any race ranging in age from 18 to 45 years, non-smokers, without any nasal complaint except for allergic rhinitis in the study group, and who had not been using any medication for the treatment of allergic diseases for less time than recommended so that its pharmacological effect would not interfere with the clinical-laboratory studies<sup>22</sup>.

The patients were submitted to anamnesis, physical-otorhinolaryngological examination and a skin prick test (IPI ASAC - International Pharmaceutical Immunology do Brasil Ltda) using inhalatory antigens common in Brazil. Nasal secretion was then collected for cytogram analysis. Samples were collected on four different occasions, one during each season of the year, always by the same examiner. Nasal secretion was collected with a cervical brush (cytobrush, Kolplast<sup>®</sup>, São Paulo, Brazil) placed in the middle meatus under direct vision for 30 seconds,

with the examiner performing circular movements and placing discrete pressure on the mucosa. After collection, the brush was shaken inside a test tube containing 5 ml physiological saline. The side of best visualization of the middle meatus, which varied from patient to patient, was chosen for sample collection.

The slides were prepared for three types of staining (AgNOR, Leishman and PAS) by the same technician of the Central Laboratory of the University Hospital, São University School of Medicine, using standard laboratory methods. The slides were then analyzed by the same pathologist who performs all nasal cytology analyses at the Central Laboratory.

Leishman-staining was used to analyze and quantify the different cell types by light microscopy (Leica-DMLS, Allendale, USA). An overall cell count of epithelial and inflammatory cells was obtained, corresponding to 100% of the cells found on the slides.

In PAS-stained slides, the intensity of staining was analyzed by light microscopy and a number was allocated to the different intensities in 100 intact goblet (secretory) cells in a good state of conservation. All cells received a number from 0 to 3 according to the intensity of staining that ranged from absent to intense. This number was multiplied by the number of corresponding cells and a score resulting from the sum of these multiplication results was obtained. This technique permits the quantification of staining of secretory cells, i.e., the more intense the staining, the higher the production of mucus by the secretory cell.

Silver (Ag) staining of the nucleolar organizer region (NOR), which is important for protein synthesis, is used to evaluate cell proliferation and the amount of proteins produced by the cell irrespective of their destination. The more intense the silver staining of the nucleolus, the higher the protein synthesis by the cell, and vice-versa<sup>23-27</sup>. The expression of AgNORs was analyzed quantitatively using a digital image analysis system (Leica-DMLS microscope, JVC model TK-C 1380 E video camera, Pentium 133 MHz computer, and Leica Qwin Colour – RGB software). A total of 100 cells per slide<sup>24,28</sup> were analyzed at 1000X magnification under oil immersion. Only intact cells where the AgNOR points were easily identified without interference from artifacts of the staining technique were used<sup>29,30</sup>. The intensity of silver staining was then determined in the area occupied by these

points (expressed as  $\mu\text{m}^2$ ). For each slide, the sum of all areas divided by 100 was calculated to obtain the mean nuclear AgNOR area of each specimen and the mean AgNOR area in each group.

The levels of atmospheric pollution were obtained based on data provided by the Company of Environmental Sanitation Technology (CETESB). In addition, mean daily temperature and air humidity provided by the Institute of Astronomy, Geophysics and Atmospheric Sciences (IAG), University of São Paulo, were analyzed. Since the subjects lived and worked in different neighborhoods of the city of São Paulo, general daily means of pollutants in the neighborhoods were obtained and an overall mean for the city was calculated. The following pollutants were analyzed: particulate matter less than 10 micrometers (PM10), sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) and ozone (O<sub>3</sub>). The nasal cytology results were compared to the levels of atmospheric pollution measured up to 7 days before collection.

Nonparametric tests were used for the analysis of all variables, with the level of significance set at 5%. One asterisk (\*) indicates significant values ( $p < 0.05$ ) and two asterisks indicate a borderline significance (\*\*) ( $0.05 < p < 0.10$ ). Statistical analysis was performed using the SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) for Windows version 10.0 and Statistica for Windows version 5.0 programs. The Mann-Whitney test was applied to compare the allergic and control groups during the four seasons of the year. Patients in each group were compared to themselves in the different seasons by the Friedman test. The Wilcoxon signed-rank test was used to identify this difference between seasons. Pollutants, temperature and humidity on the day of sample collection and on the 7 days preceding it were analyzed quantitatively and correlated with cell numbers that showed a significant difference in each group during the different seasons of the year. Multiple linear regression was used to determine a significant correlation between the different variables, with a negative value indicating an inverse relationship with a given variable (i.e., whereas one cell type increases, the variable decreases and vice-versa) and a positive value indicating the concomitant increase or decrease in one cell type and the variable analyzed. A level of significance of  $Z \geq 2.017$  was adopted, which corresponds to 43 degrees of freedom (44 observation – 1 – 43). The S-Plus professional program was used for this analysis.

## **Results**

### **Comparison between the allergic and control groups**

The nasal cytogram of patients with allergic rhinitis revealed an increase of eosinophils during summer and of goblet cells during winter. On the other hand, in the control group an increase of ciliated cells was observed during summer, whereas neutrophils increased during autumn, winter and spring. In addition, there was a borderline significance toward an increase of ciliated cells in winter (Figures 1, 2, 3 and 4).

No significant difference in PAS-stained cells was observed, with only a borderline significance toward an increase during winter being detected in the allergic group and during spring in the control group (Figure 5).

With respect to the expression of AgNORs in epithelial cells, there was only a borderline significance toward a higher expression in the allergic group during winter.

### **Comparison of patients in each group between each other**

#### ***Leishman staining***

In the allergic group, no difference was observed when comparing the patients to themselves. In the control group there was a difference in ciliated cells between spring and autumn ( $p = 0.041$ ).

#### ***PAS staining***

In the allergic group, a significant difference was observed when comparing the number of PAS-stained cells between the different seasons of the year, with a difference between winter and summer ( $p = 0.003$ ), between winter and autumn ( $p = 0.008$ ) and between spring and winter ( $p = 0.021$ ). A significant difference was also observed for the control group, with a difference between spring and summer ( $p = 0.005$ ) and between spring and autumn ( $p = 0.003$ ).

#### ***AgNOR staining***

No difference in AgNOR expression was observed when comparing the patients of each group to themselves.

### **Relationship between significant variables and levels of atmospheric pollutants, temperature and air humidity**

No significant correlation between cell numbers and alterations in temperature or air humidity was observed for any of the staining techniques.

#### ***Leishman staining***

##### ***Eosinophils***

In the allergic group, a positive correlation was observed between eosinophils and PM10 four days before sample collection, with the difference being significant ( $Z = + 2.18$ ).

In the control group, there was a positive association between eosinophils and O<sub>3</sub> two days before collection ( $Z = + 2.10$ ), and an inverse relationship between these cells and O<sub>3</sub> three days before collection ( $Z = - 2.60$ ).

##### ***Neutrophils***

In the allergic group, a positive correlation was observed between neutrophils and O<sub>3</sub> on the day of collection ( $Z = + 2.11$ ).

In the control group, neutrophils were positively associated with NO<sub>2</sub> on the day of collection ( $Z = + 2.33$ ) and with PM10 ( $Z = + 2.68$ ), SO<sub>2</sub> ( $Z = + 2.11$ ) and NO<sub>2</sub> ( $Z = + 2.17$ ) two days before collection. There was a positive association between neutrophils and O<sub>3</sub> five days before collection.

##### ***Ciliated epithelial cells***

In the allergic group, an inverse relationship was observed between ciliated cells and PM10 ( $Z = - 2.90$ ) five days before collection, and a positive association with O<sub>3</sub> ( $Z = + 2.51$ ) on the day of collection.

In the control group, a positive correlation was observed between ciliated cells and SO<sub>2</sub> ( $Z = + 2.43$ ) and O<sub>3</sub> ( $Z = + 2.09$ ) on the day of collection, and an inverse relationship between these cells and NO<sub>2</sub> ( $Z = - 2.19$ ) three days before collection.

##### ***Goblet cells***

In the allergic group, a positive association was observed between goblet cells and PM10 ( $Z = + 2.32$ ) and SO<sub>2</sub> ( $Z = + 2.17$ ) five days before collection.

In the control group, an inverse relationship was noted between goblet cells and O<sub>3</sub> ( $Z = - 2.22$ ) two days before collection.

### ***PAS staining***

In the allergic group, an inverse relationship was observed between PM10 ( $Z = - 2.30$  and  $- 2.31$ ) and  $\text{NO}_2$  ( $Z = - 2.86$  and  $- 2.46$ ) one and two days before collection, respectively, and PAS-stained cells.

A negative association between  $\text{O}_3$  ( $Z = - 2.12$ ) two days before collection and PAS-stained cells was observed in the control group.

### ***AgNOR staining***

In the allergic group, a positive correlation was observed between the expression of AgNORs and  $\text{NO}_2$  ( $Z = + 2.07$ ) on the day of collection and  $\text{O}_3$  ( $Z = + 2.13$ ) six days before collection.

In the control group, an inverse relationship was observed between  $\text{SO}_2$  ( $Z = - 2.13$ ) five days before collection and AgNOR expression.

### **Levels of pollution in 2003**

The air pollution levels in 2003 are shown in Figure 7. Pollutants that exceeded the limits of good air quality were PM10 and  $\text{O}_3$ . PM10 showed increases in April, May, June, July, August and September, with the highest indices being observed in June and July.  $\text{O}_3$  increased in January, February, July, August, September, October and November, with the highest indices being observed in January and February. Good  $\text{SO}_2$  levels regarding air quality were observed throughout the year. The levels of atmospheric pollutants indicating good air quality in the city of São Paulo according to CETESB are shown in Table 1.

### **Discussion**

The present results demonstrate an association between inflammatory parameters of nasal cytology determined by Leishman, PAS and AgNOR staining in patients with allergic rhinitis and normal subjects and exposure to atmospheric pollutants over the year. In summer, a predominance of eosinophils was observed in the allergic group, whereas there was an increase of ciliated cells in the control group. In autumn, only an increase of neutrophils was observed in the control group. In winter, there was an increase of neutrophils in the control group and of goblet

cells in the allergic group. In spring, a predominance of neutrophils was observed in the control group.

In normal subjects, epithelial cells accompanied by a moderate number of neutrophils are usually found upon nasal cytology, whereas an increase of eosinophils<sup>31-34</sup>, basophils and goblet cells is observed in allergic patients<sup>35</sup>. On the other hand, patients with irritative rhinitis caused by atmospheric pollution present an increase in goblet cells<sup>35</sup>. In the present study, control subjects exposed to atmospheric pollution in the city of São Paulo did not show an increase of goblet cells but did show an increase of ciliated cells. This finding might be explained by the fact that these subjects did not present clinical signs of irritative rhinitis resulting from atmospheric pollution, demonstrating that they responded with desquamation of these cells which led to an increase of ciliated cells on the nasal cytogram. The finding of an increase of goblet cells in allergic individuals during winter might indicate a sign of defense characterized by the production of mucus for the protection of the epithelium. When comparing the patients to themselves in the different seasons of the year, our results also showed a significant difference in ciliated and PAS-stained cells in the control group, and only in PAS-stained cells in the allergic group. In allergic patients, an important association was observed between particulate matter and eosinophils and goblet cells as determined by Leishman, PAS and AgNOR staining, suggesting that PM10 acts as an amplification factor of the allergic inflammatory reaction. In contrast to allergic patients, an association of neutrophils and ciliated cells with a larger number of pollutants, with emphasis on O<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>, and PM10, was observed in normal subjects. Analysis of the effect of temperature and/or air humidity showed no significant association with inflammatory parameters, as also reported by other investigators<sup>36</sup>.

In the present study, a sequence of cellular alterations was observed in allergic patients soon after exposure to PM10 which triggered an inflammatory process similar to the inflammation cascade observed in allergic rhinitis. First, there may be an aggression of epithelial goblet cells, characterized by an increase in the number of these cells, which would lead to the release of cytokines and chemokines, promoting the migration of eosinophils to the nasal mucosa. This increase in goblet cells exactly occurs to protect the organism against the irritating agent by producing

a larger amount of mucus, thus reducing penetration of particles into the respiratory mucosa. In the present study, we first observed a decrease in mucus production two days after exposure to the pollutant, followed by an increase three days later. As the number of goblet cells increased to produce more mucus, that of ciliated cells decreased, leading to an inversion in the epithelial cell pattern of the normal nasal cytogram. Normal subjects responded to the aggressor with an increase in ciliated cells and a decrease in goblet cells, whereas an increase of goblet cells and higher mucus production were observed in allergic patients, also considering that the latter already present a larger number of goblet cells. Some authors<sup>37-39</sup> also reported that diesel exhaust particles can trigger an increase in allergic inflammation due to an increase in the number of epithelial cells. It is known that cells of the respiratory epithelium represent the first defense against harmful polluting agents, including particulate matter, 50% of which is retained in the nasal fossae causing different alterations and being responsible for the release of cytokines such as IL-8, a potent factor of neutrophil attraction<sup>40-44</sup>. In normal subjects, a positive association was observed between neutrophils and PM10 two days before collection, i.e., an increase in the number of neutrophils occurred two days after exposure to PM10.

SO<sub>2</sub>, since it is 100% retained in the nasal mucosa, causes acute mucosal inflammation<sup>45</sup>, interfering with the action of the mucociliary barrier by reducing nasal secretion and significantly increasing upper airway resistance<sup>46</sup>. Our results demonstrated an increase of inflammatory cells (neutrophils) in normal subjects two days after exposure to SO<sub>2</sub>. Similar findings have been reported by Sandström *et al.*<sup>45</sup>, with small particularities, since the authors observed an increase in the inflammatory process involving lymphocytes, macrophages and mast cells. We also observed an increase of ciliated cells in normal subjects after SO<sub>2</sub> exposure, with a decrease in AgNOR expression five days thereafter. Considering that when the number of ciliated cells increases that of goblet cells decreases, the reduction in AgNOR expression might be interpreted as a decline in the number of goblet cells leading to lower mucus production. On the other hand, in the allergic group an increase in goblet cells was observed five days after SO<sub>2</sub> exposure, which would lead to higher mucus production, interfering with the mucociliary barrier, and would explain the hypersecretory pattern observed in allergic subjects. We found no studies

on the association between SO<sub>2</sub> and AgNOR expression. Mello Jr.<sup>47</sup> reported a decline in protein synthesis determined by AgNOR staining in epithelial cells and mucosal glands of rats chronically exposed to particulate matter. These results are similar to those obtained in the present study regarding the association between AgNOR expression and SO<sub>2</sub>, but no relationship with particulate matter was observed. We believe that these differences are due to the fact that we evaluated subjects exposed to acute increases in pollutants, whereas Mello Jr.<sup>47</sup> observed a chronic effect of pollution, suggesting a phenomenon of adaptation and tolerance to the pollutant.

In the present study, the increase in ozone caused an increase of ciliated cells and neutrophils in allergic patients. Six days after ozone exposure an increase in AgNOR expression occurred. We agree with Bascom *et al.*<sup>48</sup> who stated that ozone induces an increase of neutrophils in the nasal airways of subjects with allergic rhinitis; however, in contrast to that study, we did not find an association between eosinophils and ozone. We only know that this increase occurred within 24 hours of exposure, considering that the present study was not a laboratory investigation employing a controlled amount of ozone. We did not find any study regarding the effects of ozone on the nasal mucosa using the AgNOR staining technique as an inflammatory marker; however, AgNOR evaluates the protein synthesis of cells regardless of whether the cell is responsible for mucus production or for an increase in the inflammatory process. One may suppose that in allergic patients protein synthesis is higher, as demonstrated by a tendency toward increased AgNOR expression represented by a more intense inflammatory process, since we observed an increase in ciliated cells and neutrophils. There are several reports showing an association between ozone exposure and eosinophil influx in allergic patients<sup>46,49-54</sup>; however, this was not observed in the present study. We found an increase in eosinophils in association with particulate matter, in contrast to these authors who did not observe an association between PM10 and inflammatory parameters. Some investigators<sup>50,51,55,56</sup> also demonstrated an increase in neutrophils after ozone exposure, in agreement with the present results, suggesting that ozone acts as a trigger of the nasal inflammatory reaction.

The most aggressive pollutant in normal subjects was ozone which caused an

increase in the number of ciliated cells, eosinophils and neutrophils. A negative association with goblet cells was noted two days after exposure to this gas, i.e., there was a decrease in the number of these cells together with a reduction in the mucus produced by them as determined by PAS staining. Curiously, eosinophil attraction was observed in normal subjects two days after exposure to ozone. Neutrophil attraction by IL-8 is expected in normal subjects, this being a marker of any inflammatory process including ozone exposure<sup>57</sup>, a fact confirmed in the present study showing an increase in neutrophils five days after ozone exposure. Neutrophils are attracted during any inflammatory process affecting our organism, in contrast to eosinophils which are inflammatory cells involved in allergic reactions. The increase in the number of eosinophils observed in the control subjects was less than the 10%, considered to be normal by some investigators<sup>22</sup>. In the present study, a significant increase of eosinophils in the allergic group compared to the control group was observed during summer and a strong tendency during winter.

In the present study, we demonstrated that an acute increase in pollutant levels in the city of São Paulo results in changes in nasal cellularity, with distinct variations according to time of the year and sensitivity of each individual. The allergic individual reacts differently from the normal subject in terms of both the cell types found upon cytology and the type of pollutant. PM10 was the pollutant that most triggered inflammatory alterations in the nasal mucosa of allergic patients, whereas a broader spectrum of pollutants causing inflammation, with a predominance of O<sub>3</sub>, was found in normal subjects. To explain these different responses resulting from the effects of pollutants between allergic and normal subjects, we need studies that will demonstrate a relationship between inflammatory mediators and nasal cells in these two groups of subjects chronically exposed to different pollutants by comparing them with individuals living in places without atmospheric pollution.

## REFERENCES

1. Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N; Aria Workshop Group; World Health Organization. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 108(5 Suppl):S147-334.
2. Becker S, Soukup JM, Gilmore MI, Devlin RB. Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates: effects on oxidant radical generation and cytokine production. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996; 141:637-48.
3. Lundback B. Epidemiology of rhinitis and asthma. *Clin Exp Allergy*. 1998; 28(2):3-10.
4. Weiland SK, Mundt KA, Ruckmann A, Keil U. Selfreported wheezing and allergic rhinitis in children and traffic density on street of residence. *Ann Epidemiol*. 1994; 4:243-7.
5. Duhme H, Weiland SK, Keil U, Kraemer B, Schmid M, Stender M, Chambless L. The association between self-reported symptoms of asthma and allergic rhinitis and self-reported traffic density on street of residence in adolescents. *Epidemiology*. 1996; 7:578-82.
6. Ciccone G, Forastiere F, Agabiti N, Biggeri A, Bisanti L, Chellini E, Corbo G, Dell'Orco V, Dalmasso P, Volante TF, Galassi C, Piffer S, Renzoni E, Rusconi F, Sestini P, Viegi G. Road traffic and adverse respiratory effects in children. SIDRIA Collaborative Group. *Occup Environ Med*. 1998; 55(11):771-8.
7. Diaz-Sanchez D, Penichet-Garcia M, Saxon A. Diesel exhaust particles directly induce activated mast cells to degranulate and increase histamine levels and symptom severity. *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 106:1140-6.
8. Mygind N, Dahl R. Epidemiology of allergic rhinitis. *Pediatr Allergy Immunol*. 1996; 7:57-62.
9. Aberg N, Sundell J, Eriksson B, Hesselmar B, Aberg B. Prevalence of allergic diseases in schoolchildren in relation to family history, upper respiratory infections, and residential characteristics. *Allergy*. 1996; 51:232-7.

10. Wyler C, Braun-Fahrlander C, Kunzli N, Schindler C, Ackermann-Liebrich U, Perruchoud AP, Leuenberger P, Wuthrich B. Exposure to motor vehicle traffic and allergic sensitization. The Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults (SAPALDIA) Team. *Epidemiology*. 2000; 11:450-6.
11. Saldiva PHN, Souza, MB, Pope CA, Capelozzi VL. Respiratory changes due to long-term exposure to urban levels of air pollution. *Chest*. 1998; 113(5):1312-18.
12. Saldiva PHN, King M, Delmonte VLC, Macchione M, Parada MAC, Daliberto ML, Sakae RS, Criado PMP, Silveira PLP, Zin WA, Böhm GM. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. *Environ Res*. 1992; 57:19-33.
13. Saldiva PHN, Lichtenfels AJFC, Paiva PSO, Barone IA, Martins MA, Massad E, Pereira JCR, Xavier VP, Singer JM, Böhm GM. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in Sao Paulo, Brazil: a preliminary report. *Environ Res*. 1994; 65:218-25.
14. Schiffman SS, Nagle T. Effects of environmental pollutants on taste and smell. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1992; 106:693-700.
15. Trevino RJ. Air Pollution and its effect on the upper respiratory tract and on allergic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1996; 114:239-41.
16. Shusterman DJ, Murphy MA, Balmes JR. Subjects with seasonal allergic rhinitis and nonrhinitic subjects react differentially to nasal provocation with chlorine gas. *J Allergy Clin Immunol*. 1998; 101:732-40.
17. Keles N, Ilicali C, Deger K. The effects of different levels of air pollution on atopy and symptoms of allergic rhinitis. *Am J Rhinology*. 1999; 3(13):185-90.
18. Calderon-Garciduenas L, Osorno-Velasquez A, Bravo-Alvarez H, Delgado-Chavez R, Barrios-Marquez R. Histopathologic changes of the nasal mucosa in southwest Metropolitan Mexico City inhabitants. *Am J Pathol*. 1992; 140:225-32.
19. Calderon-Garciduenas L, Roy-Ocotla G. Nasal cytology in southwest metropolitan Mexico City inhabitants: a pilot intervention study. *Environ Health Perspect*. 1993; 101:138-44.

20. Chen PC, Lai YM, Wang JD, Yang CY, Hwang JS, Kuo HW, Huang SL, Chan CC. Adverse effect of air pollution on respiratory health of primary school children in Taiwan. *Environ Health Perspect* .1998; 106:331-5.
21. Wongsurakiat P, Maranetra KN, Nana A, Naruman C, Aksornint M, Chalermpanyakorn T. Respiratory symptoms and pulmonary function of traffic policemen in Thonburi. *J Med Assoc Thai*. 1999; 82:435-43.
22. Howarth PH, Persson CGA, Meltzer EO, Jacobson MR, Durham SR, Silkoff PE. Objective monitoring of nasal airway inflammation in rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115(3): S414-441.
23. Ruschoff J, Plate KH, Müller R, Maasberg M, Thomas C. Nucleolar organizer region-associated proteins: A diagnostic tool in cytology? *Recent Results Cancer Res*. 1993; 133:81-9.
24. Antonângelo L, Saldiva PHN, Amaro Júnior E, Capelozzi VL. Utility of computerized combined with AgNOR staining in distinguishing benign from malignant pleural effusions. *Analyt Quant Cytol Histol*. 1994; 16:247-52.
25. Chern JH, Lee YC, Yang MH, Chang SC, Perng RP. Usefulness of argyrophilic nucleolar organizer regions score to differentiate suspicious malignancy in pulmonary cytology. *Chest*. 1997; 111(6):1591-6.
26. Tuccari G, Giuffre G, Ofner D, Ruschoff J. Standardized use of the AgNOR method. *J Oral Pathol Med*. 2000; 29(10):526-7.
27. Ray JG, Chattopadhyay A, Caplan DJ. Usefulness of AgNOR counts in diagnosing epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med*. 2003; 32(2):71-6.
28. Cavalcanti CEO. Estudo da morfometria e expressão de AgNOR no epitélio do trato aerodigestivo superior e respiratório no fumo passivo em ratos. Um modelo experimental para a análise do campo de cancerização [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1996.
29. Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ. How should we count AgNORs? Proposal for a standardized approach. *J Pathol* .1989; 158: 85-8.
30. Rüschoff J, Plate KH, Contractor H, Kern S, Zimmermann R, Thomas C. Evaluation of nucleolus organizer regions (NORs) by automatic image analysis: a contribution to standardization. *J Pathol*. 1990; 161:113-8.

31. Pelikan Z, Pelikan-Filipek M. Cytologic changes in the nasal secretions during the immediate nasal response. *J Allergy Clin Immunol*. 1988; 82:1103-12.
32. Pipkorn U, Karlsson G, Enerback L. Nasal mucosal response to repeated challenges with pollen allergen. *Am Rev Respir Dis*. 1989; 140:729-36.
33. Klementsson H, Andersson M, Baumgarten CR, Venge P, Pipkorn U. Changes in non-specific nasal reactivity and eosinophil influx and activation after allergen challenge. *Clin Exp Allergy*. 1990; 20:539-47.
34. Togias A, Naclerio RM, Proud D et al. Studies on the allergic and non-allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 1988; 81:782-90.
35. Meltzer EO, Jalowayski AA. Nasal cytology in clinical practice. In: Settipane GA. *Rhinitis second edition*. 1991. OceanSide Publications, Inc. 36, 291-8.
36. Gluck U, Gebbers JO. Cytopathology of the nasal mucosa in smokers: a possible biomarker of air pollution? *Am J Rhinol*. 1996; 1(10):55-7.
37. Miyabara Y, Takano H, Ichinose T, Lim HB, Sagai M. Diesel exhaust enhances allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157:1138-44.
38. Fujieda S, Diaz-Sanchez D, Saxon A. Combined nasal challenge with diesel exhaust particles and allergen induces in vivo IgE isotype switching. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998; 19:507-12.
39. Devalia JL, Bayram H, Abdelaziz MM, Sapsford RJ, Davies RJ. Differences between cytokine release from bronchial epithelial cells of asthmatic patients and non-asthmatic subjects: effect of exposure to diesel exhaust particles. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999; 118:437-9.
40. Marano F, Boland S, Bonvallet V, Baulig A, Baeza-Squiban A. Human airway epithelial cells in culture for studying the molecular mechanisms of the inflammatory response triggered by diesel exhaust particles. *Cell Biol Toxicol*. 2002; 18:315-20.
41. Salvi S, Blomberg A, Rudell B, Kelly F, Sandstrom T, Holgate ST, Frew A. Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 159:702-9.

42. Salvi SS, Nordenhall C, Blomberg A, Rudell B, Pourazar J, Kelly FJ, Wilson S, Sandstrom T, Holgate ST, Frew AJ. Acute Exposure to Diesel Exhaust Increases IL-8 and GRO - Production in Healthy Human Airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161(2):550-7.
43. Fireman EM, Lerman Y, Ganor E, Greif J, Fireman-Shoresh S, Lioy PJ, Banauch GI, Weiden M, Kelly KJ, Prezant DJ. Induced sputum assessment in New York City firefighters exposed to World Trade Center dust. *Environ Health Perspect.* 2004; 112(15):1564-9.
44. Riechelmann H, Rettinger G, Lautebach S, Schmittinger S, Deutschle T. Short-term exposure to urban dust alters the mediator release of human nasal mucosa. *J Occup Environ Med.* 2004; 46(4):316-22.
45. Sandstrom T, Stjernberg N, Andersson M, Kolmodin-Hedman B, Lundgren R, Rosenhall L, Angstrom T. Cell response in bronchoalveolar lavage fluid after exposure to sulfur dioxide: A time-response study. *Am Rev Respir Dis.* 1989; 140: 1828-31.
46. Peden DB, Setzer RW Jr, Devlin RB. Ozone exposure has both a priming effect on allergen-induced responses and intrinsic inflammatory action in the nasal airways of perennially allergic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 151:1336-45.
47. Mello Jr. JF. *Avaliação da síntese protéica na mucosa nasal após exposição prolongada à poluição atmosférica* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1998.
48. Bascom R, Naclerio RM, Fitzgerald TK, Kagey-Sobotka A, Proud D. Effect of ozone inhalation on the response to nasal challenge with antigen of allergic subjects. *Am Rev Respir Dis.* 1990; 142:594-601.
49. Peden DB. Mechanisms of pollution-induced airway disease: in vivo studies. Is pollution a cause or trigger for the increase in allergic disease? *Allergy.* 1997; 52(38):37-44.
50. Hiltermann TJ, de Bruijne CR, Stolk J, Zwinderman AH, Spijksma FT, Roemer W, Steerenberg PA, Fischer PH, van Bree L, Hiemstra PS. Effects of photochemical air pollution and allergen exposure on upper respiratory tract inflammation in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156(6):1765-72.

51. Schierhorn K, Zhang M, Kacy M, Kunkel G. Ozone-induced augmentation of eicosanoid metabolism in human nasal mucosa in vitro. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997; 113:312-5.
52. Michelson PH, Dailey L, Devlin RB, Peden DB. Ozone effects on the immediate-phase response to allergen in the nasal airways of allergic asthmatic subjects. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999; 120(2):225-32.
53. Depuydt PO, Lambrecht BN, Joos GF, Pauwels RÄ. Effect of ozone exposure on allergic sensitization and airway inflammation induced by dendritic cells. *Clin Exp Allergy.* 2002; 32(3):391-6.
54. Wagner GJ, Hotchkiss JA, Harkema JR. Enhancement of nasal inflammatory and epithelial responses after ozone and allergen coexposure in brown Norway rats. *Toxicol Sci.* 2002; 67:284-94.
55. Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of inhaled ozone on exhaled nitric oxide, pulmonary function, and induced sputum in normal and asthmatic subjects. *Thorax.* 1999; 54:1061-9.
56. Newson EJ, Krishna MT, Lau LC, Howarth PH, Holgate ST, Frew AJ. Effects of short-term exposure to 0.2 ppm ozone on biomarkers of inflammation in sputum, exhaled nitric oxide, and lung function in subjects with mild atopic asthma. *J Occup Environ Med.* 2000; 42(3):270-7.
57. . Polosa R, Sapsford RJ, Dokic D, Cacciola RR, Prosperini G, Devalia JL, Holgate ST, Howarth PH, Davies DE. Induction of the epidermal growth factor receptor and its ligands in nasal epithelium by ozone [Mechanisms of Allergy]. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 113(1): 120-6.

**Table 1 – Atmospheric pollutant limits of good air quality in São Paulo according to CETESB**

<b>Pollutant</b>	<b>Atmospheric limits of good air quality (<math>\mu\text{g}/\text{m}^3</math>)</b>
SO <sub>2</sub>	0 - 80
PM10	0 - 50
O <sub>3</sub>	0 – 80

## **Figure legends**

**Figure 1.** Comparison of eosinophils between the allergic and control groups over one year (Leishman staining)

**Figure 2.** Comparison of neutrophils between the allergic and control groups over one year (Leishman staining)

**Figure 3.** Comparison of ciliated cells between the allergic and control groups over one year (Leishman staining)

**Figure 4.** Comparison of goblet cells between the allergic and control groups over one year (Leishman staining)

**Figure 5.** Comparison of PAS-stained cells between the allergic and control groups over one year (PAS staining)

**Figure 6.** Comparison of AgNOR counts between the allergic and control groups over one year (AgNOR staining)

**Figure 7.** Variation in pollutant levels in 2003

Figure 1

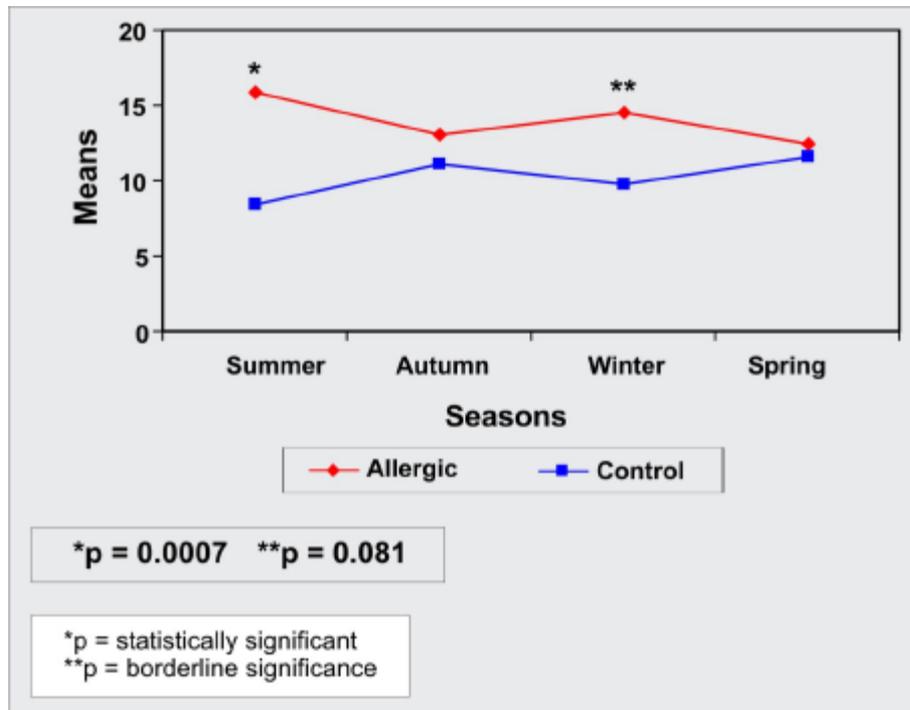


Figure 2

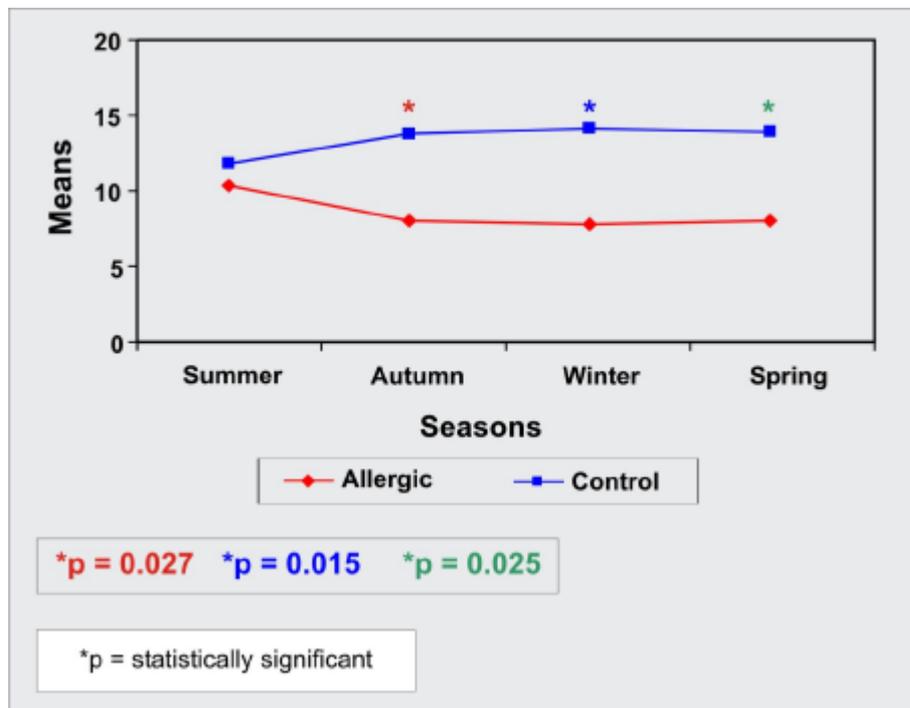


Figure 3

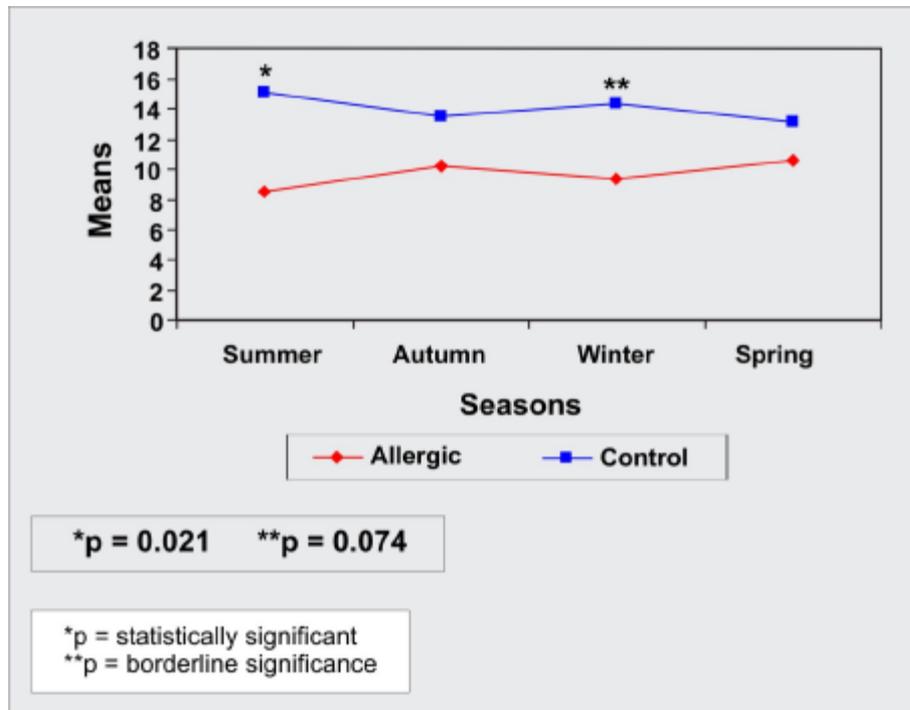


Figure 4

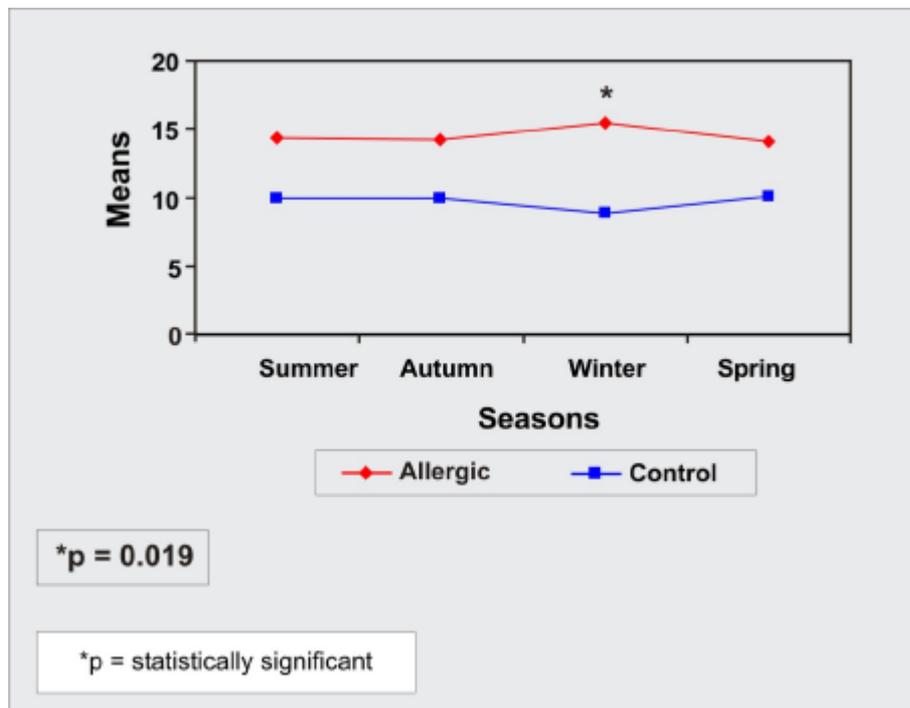


Figure 5

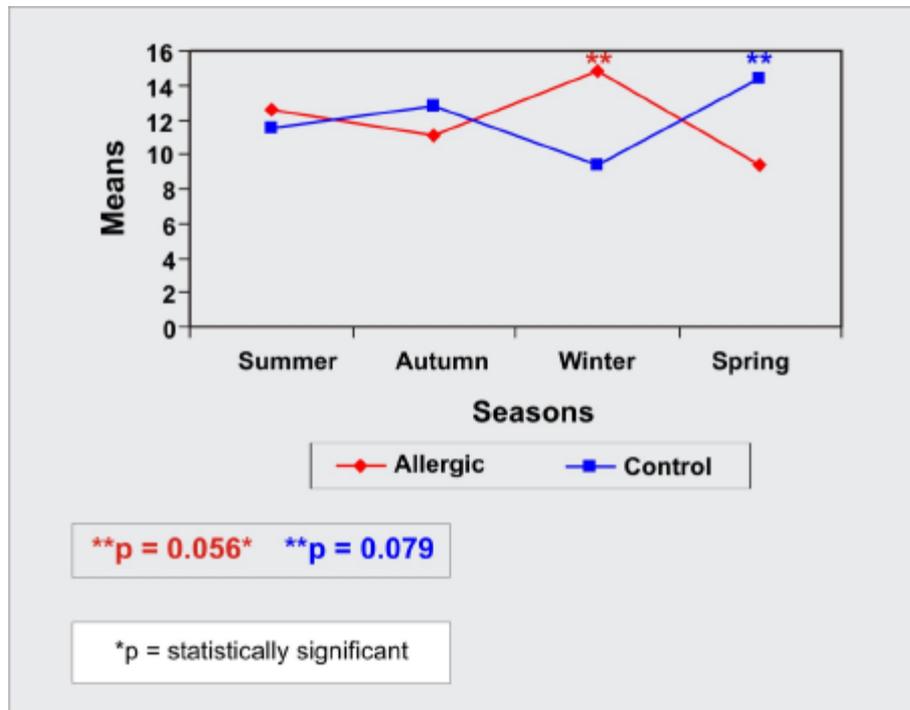


Figure 6

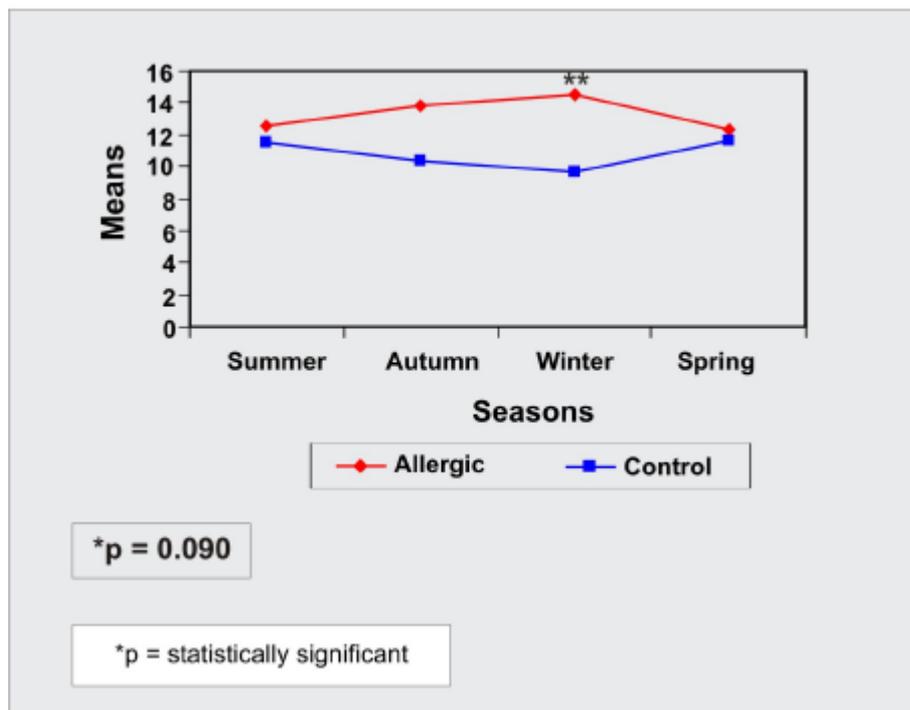
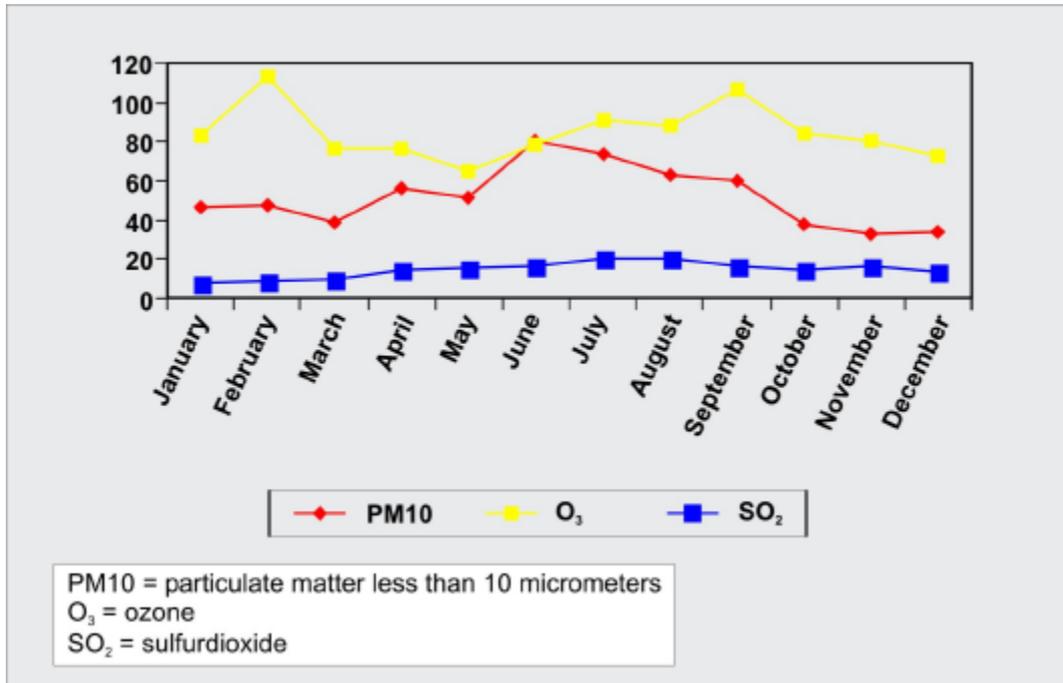


Figure 7



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

>	maior
$\mu$	média
$\mu\text{g}/\text{m}^2$	micrograma por metro quadrado
$\mu\text{g}/\text{m}^3$	micrograma por metro cúbico
$\mu\text{g}/\text{ml}$	micrograma por mililitro
$\mu\text{m}$	micrômetro
$\mu\text{m}^2$	micrômetro quadrado
Ag	prata
AgNOR	região organizadora nucleolar corada pela prata
CETESB	Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental
CO	Monóxido de carbono
CO <sub>2</sub>	gás carbônico
g	grama
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófagos
IAG	Instituto Astronômico, Geofísico e de Ciências Atmosféricas da Universidade São Paulo
ICAM-1	molécula de adesão intercelular um
IgA	imunoglobulina A
IgE	imunoglobulina E
IgE	imunoglobulina E
IL-1	interleucina-1
IL-6	interleucina-6
IL-8	interleucina-8
IVAS	infecções de vias aéreas superiores
LAG	dia anterior
ml	mililitro
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear $\kappa$ B
NO <sub>2</sub>	dióxido de nitrogênio
NOR	região organizadora nucleolar
NO <sub>x</sub>	óxido de nitrogênio
O <sub>2</sub>	oxigênio
O <sub>3</sub>	ozônio
°C	graus Celsius

p	nível descritivo de significância
PAS	“Periodic Acid Schiff”
PM	material particulado
PM10	material particulado menor que 10 micra
PM2,5	material particulado menor que 2,5 micra
ppb	parte por bilhão
ppm	parte por milhão
RANTES	“Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted”
rpm	rotação por minuto
SO <sub>2</sub>	dióxido de enxofre
TNF-a	fator a de necrose tumoral
VCAM-1	molécula de adesão da célula vascular um

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Exame citológico nasal pelo método de coloração de Leishman.....	033
Quadro 2 -	Resultado da técnica de coloração PAS.....	036
Quadro 3 -	Níveis atmosféricos para boa qualidade do ar segundo a Cetesb em São Paulo.....	067

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Neutrófilos e célula epitelial ciliada. Coloração Leishman.....	034
Figura 2 - Eosinófilo pela Coloração Leishman .....	034
Figura 3 - Células epiteliais ciliadas e caliciformes. Coloração Leishman....	035
Figura 4 - Células epiteliais ciliadas pela coloração Leishman.....	035
Figura 5 - Coloração PAS - células caliciformes com impregnações.....	037
Figura 6 - Coloração PAS - Célula caliciforme com impregnação .....	037
Figura 7 - Analisador de imagens .....	038
Figura 8 - Células epiteliais ciliada e caliciforme coradas com AgNOR com os “dots” no nucléolo das células.....	039

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Comparação dos eosinófilos do grupo alérgico com o grupo controle no decorrer do ano .....	045
Gráfico 2 - Comparação dos neutrófilos do grupo alérgico com o grupo controle no decorrer do ano .....	045
Gráfico 3 - Comparação das células ciliadas do grupo alérgico com o grupo controle no decorrer do ano .....	046
Gráfico 4 - Comparação das células caliciformes do grupo alérgico com o grupo controle no decorrer do ano.....	046
Gráfico 5 - Comparação do PAS do grupo alérgico com o grupo controle no decorrer do ano.....	047
Gráfico 6 - Comparação do AgNOR do grupo alérgico com o grupo controle no decorrer do ano.....	048
Gráfico 7 - Comparação dos indivíduos do grupo controle entre eles mesmos no decorrer do ano sendo encontrado a célula ciliada com diferença estatisticamente significativa .....	049
Gráfico 8 - Comparação dos pacientes do grupo alérgico entre eles mesmos no decorrer do ano sendo encontrado o PAS com diferença estatisticamente significativa .....	050
Gráfico 9 - Comparação dos pacientes do grupo controle entre eles mesmos no decorrer do ano sendo encontrado o PAS com diferença estatisticamente significativa .....	051
Gráfico 10 - Variação dos níveis de NO <sub>2</sub> durante o ano de 2003.....	064
Gráfico 11 - Variação dos níveis de O <sub>3</sub> durante o ano de 2003 .....	064
Gráfico 12 - Variação dos níveis de CO durante o ano de 2003.....	065
Gráfico 13 - Variação dos níveis de PM10 durante o ano de 2003.....	065
Gráfico 14 - Variação dos níveis de SO <sub>2</sub> durante o ano de 2003.....	066
Gráfico 15 - Variação dos níveis de temperatura durante o ano de 2003 .....	066
Gráfico 16 - Variação dos níveis de umidade durante o ano de 2003.....	067

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Relação entre os eosinófilos de pacientes alérgicos e os poluentes significantes .....	053
Tabela 2 -	Relação entre os eosinófilos de indivíduos normais e os poluentes significantes .....	054
Tabela 3 -	Relação entre os neutrófilos de pacientes alérgicos e o poluente significativo.....	054
Tabela 4 -	Relação entre os neutrófilos de indivíduos normais e os poluentes significantes .....	055
Tabela 5 -	Relação entre as células epiteliais ciliadas de pacientes alérgicos e os poluentes significantes .....	056
Tabela 6 -	Relação entre as células epiteliais ciliadas de indivíduos normais e os poluentes significantes.....	057
Tabela 7 -	Relação entre as células epiteliais caliciformes de pacientes alérgicos e os poluentes significantes.....	058
Tabela 8 -	Relação entre as células epiteliais caliciformes de indivíduos normais e o poluente significativo.....	058
Tabela 9 -	Relação entre o PAS de pacientes alérgicos e os poluentes significantes .....	059
Tabela 10 -	Relação entre o PAS de indivíduos normais e o poluente significativo.....	060
Tabela 11 -	Relação entre o AgNOR de pacientes alérgicos e os poluentes significantes .....	060
Tabela 12 -	Relação entre o AgNOR de indivíduos normais e o poluente significativo.....	061
Tabela 13 -	Resumo da relação entre as células nasais e os poluentes atmosféricos nos dois grupos .....	062

## RESUMO

Rocha FMN. *Relação da poluição atmosférica com a citologia nasal em pacientes com rinite alérgica, residentes na cidade de São Paulo, nas diferentes estações do ano* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. xxp.

A poluição atmosférica tem causado efeitos nocivos à saúde, constituindo uma causa importante do aumento da morbidade e mortalidade cardio-respiratória, principalmente durante o inverno. Diferentes estudos têm demonstrado que a prevalência de rinite alérgica tem aumentado nas áreas urbanas, sugerindo um efeito decorrente da exposição a poluentes. Por essa razão, resolvemos estudar a relação da poluição atmosférica com os achados do citológico nasal em pacientes com rinite alérgica nas quatro estações do ano e compará-los a indivíduos normais. Realizamos a citologia nasal em 20 pacientes alérgicos e 20 indivíduos normais em quatro ocasiões diferentes no ano de 2003, onde realizamos três tipos de colorações: Leishman, PAS e AgNOR. Observamos as diferenças entre os dois grupos e ainda entre eles mesmos no decorrer do ano. A seguir comparamos por método de regressão estatística, os resultados dos citológicos com os níveis de poluentes, de temperatura e de umidade do ar do dia da coleta de secreção nasal e até 07 dias antes. No decorrer do ano, houve perdas de algumas coletas nasais, conseqüentemente excluimos os pacientes com dados incompletos, restando 11 alérgicos e 12 normais. No verão, observamos um aumento significativo de eosinófilos no grupo alérgico ( $p = 0,007$ ) e de células ciliadas no grupo controle ( $p = 0,021$ ). No outono, houve um predomínio de neutrófilos no grupo controle ( $p = 0,027$ ). No inverno, ocorreu um aumento de neutrófilos ( $p = 0,015$ ) no grupo controle e das células caliciformes ( $p = 0,019$ ) no grupo alérgico. Na primavera, ocorreu um aumento dos neutrófilos ( $p = 0,025$ ) no grupo controle. Na coloração do PAS e AgNOR não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Quando comparamos os pacientes entre eles mesmos no decorrer no ano, observamos diferença significativa, quanto às células ciliadas, entre a

primavera e o outono ( $p = 0,041$ ) no grupo controle. No grupo alérgico, houve diferença estatisticamente significativa quando comparamos o PAS entre o inverno e o verão ( $p = 0,003$ ), entre o inverno e o outono ( $p = 0,008$ ) e entre a primavera e o inverno ( $p = 0,021$ ). No grupo controle, houve também diferença estatisticamente significativa, quanto ao PAS, entre a primavera e o verão ( $p = 0,005$ ) e entre a primavera e o outono ( $p = 0,003$ ). Através do método AgNOR, não houve diferença quando comparamos os pacientes de cada grupo entre eles mesmos. No grupo alérgico, ocorreu uma associação entre as alterações na celularidade nasal e o PM10, o CO, o O<sub>3</sub>, o SO<sub>2</sub> e o NO<sub>2</sub>, destacando-se o PM10. No grupo controle, observamos uma associação entre as alterações celulares e o O<sub>3</sub>, PM10, SO<sub>2</sub> e NO<sub>2</sub>, destacando-se o O<sub>3</sub>. A temperatura e umidade relativa do ar não interferiram no citograma nasal nas diferentes estações. No presente estudo, demonstramos que a elevação aguda dos níveis de poluentes, na cidade de São Paulo, resulta em mudanças na celularidade nasal, com variações distintas, de acordo com a época do ano e com a sensibilidade de cada indivíduo. Pudemos observar que o indivíduo alérgico reage de maneira diferente do indivíduo normal, tanto em relação aos tipos celulares encontrados no citológico, quanto ao tipo de poluente. Constatamos que o PM10, foi o poluente que mais desencadeou alterações inflamatórias na mucosa nasal de pacientes alérgicos, enquanto que nos indivíduos normais, existiu um maior espectro de poluentes ocasionando inflamações, com predominância do O<sub>3</sub>.

Descritores: Poluição do ar, nariz, rinite alérgica.

## SUMMARY

Rocha FMN. *Relationship between atmospheric pollution and nasal cytology in patients with allergic rhinitis living in the city of São Paulo during the different seasons of the year* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. xxp.

Atmospheric pollution has damaging effects on health and represents an important cause for the increase in morbidity and cardiorespiratory mortality, especially in winter. Different studies have demonstrated an increase in the prevalence of allergic rhinitis in urban areas, suggesting an effect resulting from exposure to pollutants. Therefore, we studied the relationship between atmospheric pollution and nasal cytology findings in patients with allergic rhinitis during the four seasons of the year and compared them to normal subjects. Nasal cytology was performed on 20 allergic patients and 20 normal subjects during the four seasons of 2003 using three types of staining: Leishman, PAS and AgNOR. Differences were determined between the two groups and between the subjects themselves over the year. Using statistical regression analysis, the cytological results were compared to the levels of pollutants, temperature and air humidity on the day of collection of nasal secretion and up to 7 days before collection. Since some samples were lost over the year, patients with incomplete data were excluded, with 11 allergic patients and 12 normal subjects thus remaining. In summer, a significant increase of eosinophils was observed in the allergic group ( $p = 0.007$ ) and of ciliated cells in the control group ( $p = 0.021$ ). In autumn, neutrophils predominated in the control group ( $p = 0.027$ ). In winter, an increase of neutrophils was observed in the control group ( $p = 0.015$ ), and of goblet cells in the allergic group ( $p = 0.019$ ). In spring, there was an increase of neutrophils in the control group ( $p = 0.025$ ). No significant difference in PAS or AgNOR staining was found between groups. When comparing the patients to themselves over the year, a significant difference in ciliated cells was observed between spring and autumn in the control group ( $p = 0.041$ ). In the allergic group, there was a significant difference in PAS-stained cells

between winter and summer ( $p = 0.003$ ), between winter and autumn ( $p = 0.008$ ), and between spring and winter ( $p = 0.021$ ). In the control group, a significant difference in PAS-stained cells was also observed between spring and summer ( $p = 0.005$ ) and between spring and autumn ( $p = 0.003$ ). No significant difference in AgNOR expression was observed when comparing the patients in each group to themselves. In the allergic group, an association was observed between alterations in nasal cellularity and PM<sub>10</sub>, CO, O<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub> and NO<sub>2</sub> levels, with emphasis on PM<sub>10</sub>. In the control group, an association was noted between cellular alterations and O<sub>3</sub>, PM<sub>10</sub>, SO<sub>2</sub> and NO<sub>2</sub>, with emphasis on O<sub>3</sub>. Temperature or relative air humidity did not interfere with the nasal cytogram during the different seasons. In the present study, we demonstrated that an acute increase of pollutant levels in the city of São Paulo results in changes in nasal cellularity, with distinct variations according to time of the year and sensitivity of each individual. The allergic individual reacts differently from the normal subject in terms of both the cell types found upon cytology and the type of pollutant. PM<sub>10</sub> was the pollutant that most triggered inflammatory alterations in the nasal mucosa of allergic patients, whereas a broader spectrum of pollutants causing inflammation, with a predominance of O<sub>3</sub>, was found in normal subjects.

Keywords: Air pollution, nose/cytology, rhinitis allergic perennial

# **1 INTRODUÇÃO**

A poluição ambiental constitui um dos maiores problemas de saúde pública mundial, não apenas pela sua influência na mudança climática do mundo, mas também pela sua ação nociva sobre a saúde humana. Desde a década de 60, a Europa e os Estados Unidos da América sofrem com os aumentos de poluição atmosférica no inverno, que são responsáveis por mortalidade aguda epidêmica, decorrente de doenças respiratórias e cardiovasculares. Tais efeitos foram causados pelas altas concentrações de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) e material particulado (PM) no ar das cidades, juntamente com condições meteorológicas desfavoráveis e a estagnação do ar (Bousquet *et al.*, 2001). Um fato muito importante é que, mesmo em baixas concentrações, a associação entre os diferentes tipos de poluentes pode ser ainda mais prejudicial à saúde (Becker *et al.*, 1996).

A rinite alérgica, especialmente em crianças e adolescentes, tem se tornado um problema de saúde pública nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (Lundback, 1998). De acordo com o estudo respiratório Tucson Children (Wright *et al.*, 1994), a prevalência de rinite alérgica em crianças com até seis anos de idade foi estimada em 42%. Evidências importantes têm surgido sobre o crescimento da prevalência de asma, rinite alérgica e eczema atópico (Omran e Russel, 1996; Magnus e Jaakkola, 1997).

Os resultados dos estudos epidemiológicos que investigam a relação entre poluição e rinite alérgica são contraditórios. Estudos preliminares na Alemanha (Weiland *et al.*, 1994; Duhme *et al.*, 1996) e na Itália (Ciccone *et al.*, 1998) sugerem uma correlação positiva entre o tráfego e a morbidade da rinite alérgica. Níveis de poluição ambiental também são associados com a prevalência e a severidade da rinite alérgica (Diaz-Sanchez *et al.*, 2000). Em contraste com esses resultados, uma série de outros estudos epidemiológicos não encontrou associação significativa entre poluição aérea relacionada ao tráfego e rinite alérgica (Mygind e Dahl, 1996; Aberg *et al.*, 1996; Wyler *et al.*, 2000), embora inúmeros relatos demonstrem que gases da exaustão de motores de veículos possam interagir com pólenes ou outras partículas alergênicas, aumentando sua alergenicidade (Weiland *et al.*, 1994; Duhme *et al.*, 1996; de Marco *et al.*, 2001).

Baixas temperaturas podem ter efeito direto na exacerbação da asma, a curto prazo (Piccolo *et al.*, 1988; Lecha Estrela, 1998); entretanto temperaturas mais quentes apresentam uma associação com o aumento da prevalência de asma e rinite alérgica (Hales *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 1999). Um recente estudo na Itália mostrou uma forte associação entre o clima, na região do Mediterrâneo, incluindo altas e baixas temperaturas, com sintomas de asma, porém sem relação com a prevalência de rinite alérgica (Duhme *et al.*, 1996).

O Brasil, por ser um país em desenvolvimento, já enfrenta graves problemas com a poluição ambiental. São Paulo, um grande pólo industrial do país, é um dos estados que mais sofrem com as conseqüências da poluição. Diversos estudos têm sido realizados sobre os malefícios da poluição interna e

externa. Saldiva *et al.* (1998) concluíram que o longo tempo de exposição à poluição atmosférica pode contribuir para a patogênese da doença inflamatória das vias aéreas e que os níveis urbanos de poluição têm conseqüências adversas para o trato respiratório. Em outro estudo, Martins *et al.* (2002) demonstraram a associação entre o SO<sub>2</sub> e o ozônio (O<sub>3</sub>) com a ocorrência de doença respiratória inferior crônica, em São Paulo. Os mesmos autores constataram que os veículos de São Paulo geram 70% do dióxido de enxofre emitido na cidade, enquanto os demais 30% são emitidos pelas indústrias. Os níveis de ozônio também têm aumentado, sendo esse incremento explicado, em parte, pelas constantes mudanças climáticas.

Os poluentes aéreos são derivados de uma variedade de fontes, sendo a queima de combustível a principal delas. Eles podem ser classificados como primários e secundários, internos e externos, e, gasosos e particulados. Os poluentes emitidos diretamente na atmosfera são conhecidos como primários, tais como dióxido de enxofre, alguns tipos de óxido de nitrogênio (NO<sub>x</sub>), monóxido de carbono e material particulado. Os poluentes resultantes de reações químicas com outros poluentes ou gases atmosféricos são chamados de secundários, tais como ozônio, óxido de nitrogênio e algumas partículas. Embora exista uma relação direta entre a emissão do poluente primário e sua concentração no ambiente, a redução do seu precursor não leva automaticamente a uma diminuição proporcional dos níveis do poluente secundário (Bernstein *et al.*, 2004).

O dióxido de enxofre é liberado primariamente na atmosfera como resultado da combustão industrial de óleos e carvão contendo enxofre. Fontes

comuns de  $\text{SO}_2$  são a manufaturação de papel, aço e sementes de plantas, e escapamentos de ônibus e caminhões. Ao contrário dos outros poluentes, o  $\text{SO}_2$  exerce, rapidamente, a sua ação na função pulmonar, ocorrendo uma diminuição da capacidade vital forçada superior a 60% e aumento da resistência das vias aéreas após dois minutos (Gong, 1992). Trata-se de um gás amarelado com odor característico de enxofre que, quando se associa a um átomo de oxigênio, transforma-se em ácido sulfúrico (Peden, 1997).

O dióxido de nitrogênio é emitido por fontes de energia, câmaras de combustão de motores de veículos e gás de cozinha. É derivado do óxido de nitrogênio e seu limite máximo é  $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$  por hora. É o precursor da névoa fotoquímica (raios ultravioletas + hidrocarbonetos = ozônio), portanto seu maior efeito à saúde é a formação do ozônio (Bernstein *et al.*, 2004).

O monóxido de carbono é produzido pela queima incompleta de combustíveis que contêm átomos de carbono. É classificado como asfixiante sistêmico, pois ele satura a hemoglobina, tornando-se um complexo estável (carboxihemoglobina) impedindo que a hemoglobina troque o gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) por oxigênio ( $\text{O}_2$ ).

O material particulado é primariamente formado durante a combustão de produtos de combustível fóssil. São eliminados na atmosfera pelas fábricas e veículos de motor a diesel, sendo 80% do material particulado resultante da fuligem (fumaça negra) dos escapamentos desses veículos. Os materiais particulados podem ser classificados de acordo com seu diâmetro aerodinâmico: PM10 bruto (menor que  $10 \mu\text{m}$ ), PM2,5 fino (menor que  $2,5 \mu\text{m}$ ) e nanopartículas ou ultrafinos (menor que  $1 \mu\text{m}$ ). Eles penetram no trato

respiratório, sendo capazes de passar através da barreira sanguínea (Seaton *et al.*,1995). O material particulado não é composto por uma substância, mas sim por um complexo de elementos que se agregam em partículas, sendo constituídos em sua maior parte de carvão. Ao penetrarem no sistema respiratório, levam junto todas as substâncias aderidas a eles, tais como poluentes irritantes, tóxicos e cancerígenos (Böhm, 1996).

O ozônio é um poluente secundário formado pelo óxido nítrico e compostos orgânicos voláteis através de uma cadeia de reações químicas, que ocorrem principalmente durante a estação do verão. Aproximadamente 40% do ozônio inalado são absorvidos pela mucosa nasal. Sua agressão celular é decorrente da capacidade de oxidar proteínas, lipídios e outras substâncias químicas das células (Böhm, 1996). É considerado o oxidante fotoquímico mais importante e irritante, segundo Schierhorn *et al.* (1997).

Os poluentes provocam irritação da mucosa nasal, gerando edema, alteração das características do muco (Saldiva *et al.*, 1992 e 1994) e diminuição da atividade ciliar (Schiffman e Nagle, 1992), ocasionando obstrução nasal crônica e infecção (Trevino, 1996). Uma das funções nasais é a filtração de partículas do ar inspirado, para proteção das vias aéreas inferiores. Essa proteção começa na região anterior das narinas com as vibrissas nasais que são responsáveis pela remoção de partículas maiores que 15 micra. As partículas menores são removidas pela membrana mucosa e muco nasal, impulsionadas contra as paredes das fossas nasais e rinofaringe por forças dielétricas, movimentos brownianos e pela inércia. Apenas 5% das partículas de tamanho de uma micra são removidos pela membrana mucosa (Nathan,

1991). Gases solúveis em água são dissolvidos rapidamente no muco nasal; assim, cerca de metade das partículas com o diâmetro entre 2 e 9  $\mu\text{m}$  fixa-se na superfície da mucosa nasal (Weiland *et al.*, 1994).

Os sintomas nasais desencadeados pela poluição atmosférica são relatados em alguns pacientes alérgicos (Weiland *et al.*, 1994; Shusterman *et al.*, 1998; Keles *et al.*, 1999) e não-alérgicos (Calderon-Garciduenas *et al.*, 1992, 1993; Chen *et al.*, 1998; Wongsurakiat *et al.*, 1999). Porém, existem poucos estudos sobre os efeitos da poluição e as alterações da celularidade da mucosa nasal, em humanos.

As células nasais são estudadas por biópsia ou citograma nasal. O citograma nasal pode ser realizado por lavado, cotonete (“swab”), cureta (“rhinoprobe”) ou escova celular (“cytobrush”), entretanto a técnica que utiliza a escova celular resulta sempre em grande quantidade de material, bem visualizado à microscopia e de boa qualidade (Lin *et al.*, 2000 e 2001).

Para estudo do citograma nasal, uma das colorações mais utilizadas é o método de *Leishman*, onde conseguimos diferenciar e quantificar os diversos tipos de células inflamatórias e epiteliais da mucosa nasal, delimitando muito bem o núcleo do citoplasma celular nas diferentes células (Vieira e Prolla, 1979; Ingels *et al.*, 1997). A coloração PAS (“Periodic Acid Schiff”) é usada para detectar se as células nasais produtoras de muco (caliciformes) estão hipersecretantes. As glândulas mucosas e as células caliciformes secretam glicoproteínas ácidas (sialomucinas e sulfomicinas), que contêm uma grande quantidade de resíduos de açúcar e coloração positiva com ácido periódico Schiff (Quraishi *et al.*, 1998).

Atualmente, existem vários marcadores que são utilizados em doenças neoplásicas para detecção precoce do tumor, ou não-neoplásicas, relacionadas com a exposição aos poluentes para medir o seu efeito agudo e crônico nocivo à saúde. Um deles utiliza a capacidade da região organizadora nucleolar (NOR) em corar-se pela prata (Ag), recebendo o nome de AgNOR. Essa técnica de coloração pela prata identifica as NORs (AgNOR) como pontos pretos dentro do nucléolo celular, que são importantes na síntese protéica. Essa técnica avalia tanto a proliferação celular quanto a quantidade de proteínas produzidas pela célula, não importando sua finalidade. Portanto, quanto maior a impregnação pela prata no nucléolo, maior é a síntese protéica produzida pela célula, sendo o contrário igualmente verdadeiro (Ruschoff *et al.*, 1993; Antonângelo *et al.*, 1994; Chern *et al.*, 1997; Tuccari *et al.*, 2000; Ray *et al.*, 2003).

## **2 OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivo Geral**

Como sabemos que os pacientes pioram com altos níveis de poluição, realizamos este estudo com o objetivo de acompanhar e comparar o citograma nasal de pacientes com rinite alérgica e indivíduos sem doença nasal, expostos à poluição ambiental na cidade de São Paulo, nas diferentes estações do ano.

## **2.2 Objetivo Específico**

Correlacionar o citograma nasal dos pacientes com rinite alérgica e indivíduos sem doença nasal nas diferentes estações do ano aos níveis de poluição atmosférica, umidade relativa do ar e temperatura ambiente, avaliando os seguintes parâmetros:

- Qualificação e quantificação dos tipos celulares;
- Presença de hipersecreção de muco pelas células caliciformes;
- Expressão de AgNOR nas células epiteliais.

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

### **3.1 Histologia Nasal**

O epitélio que reveste a cavidade nasal é do tipo pseudo-estratificado cilíndrico ciliado com células caliciformes, também chamado de epitélio respiratório. Podemos encontrar variações no tipo de epitélio nasal decorrentes da faixa etária ou agressões a que essa região é submetida como poluição, infecções, traumas, alterações de temperatura e umidade do ar. As células epiteliais são constituídas de células ciliadas, células caliciformes e células basais (Dolci *et al.*, 1998).

### **3.2 Citograma Nasal**

Em indivíduos normais, a citologia da mucosa nasal consiste de numerosas células epiteliais, tais como cilíndricas ciliadas, caliciformes e basais. Geralmente, não visibilizamos eosinófilos nem basófilos, e podemos encontrar um moderado número de neutrófilos e algumas bactérias. Em indivíduos alérgicos, ocorre um aumento significativo do número de células caliciformes, associado à eosinofilia e basofilia. Nos pacientes com deficiência de imunoglobulina A (IgA) e nas rinites irritativas ocasionadas por poluição atmosférica, ocorre um aumento de células

caliciformes (Meltzer e Jalowayski, 1991). A exposição ao ar frio não provoca mudanças na celularidade nasal (número ou tipo de células) (Gluck e Gebbers, 1996). Alguns autores descrevem a presença de até 10% de eosinófilos em indivíduos normais (Howarth *et al.*, 2005).

Pelikan e Pelikan-Filipek (1988) avaliaram o citograma nasal de 102 pacientes alérgicos, 120 minutos após terem sido submetidos à provocação alérgica. Constataram a presença de 67% de eosinófilos (aumento seguido da diminuição), 13% de basófilos (diminuição) e 40% de neutrófilos (diminuição seguida de aumento). Esse aumento de eosinófilos, logo após a provocação alérgica, também foi descrito por Pipkorn *et al.* (1989) e Klementsson *et al.* (1990).

Togias *et al.* (1988) realizaram estudo com lavado nasal após provocação com alérgeno e também confirmaram as mudanças nas células inflamatórias na resposta da fase tardia. O padrão de influxo celular variou entre os indivíduos, mas, em geral, ocorreu aumento de eosinófilos uma a duas horas após a provocação, com pico entre sete e dez horas, aumento de neutrófilos posterior aos eosinófilos, representando o maior número de células inflamatórias na fase tardia, aumento significativo dos basófilos que não excede 1% do total das células.

### **3.3 Efeitos dos Poluentes no Sistema Respiratório**

#### **3.3.1 Ozônio**

A exposição ao ozônio induz inflamação neutrofílica nas vias aéreas nasais e brônquicas em indivíduos asmáticos e em não-asmáticos. Bascom *et al.* (1990) examinaram, inicialmente, o efeito do ozônio na inflamação nasal em indivíduos com rinite alérgica e encontraram um aumento de neutrófilos e eosinófilos, após quatro horas de exposição de 0,5 ppm de ozônio. Esses achados são similares àqueles obtidos em outro laboratório, no qual foi examinado o lavado nasal de asmáticos expostos a 0,4 ppm de ozônio durante duas horas, quando o ozônio induziu o aumento de eosinófilos e da proteína catiônica eosinofílica. Nos dois estudos, o ozônio induziu o influxo de neutrófilos e eosinófilos para as vias aéreas em indivíduos atópicos.

No indivíduo alérgico, as células epiteliais das vias aéreas constituem um importante alvo para injúria do O<sub>3</sub>, que, uma vez lesadas, apresentam respostas em três fases distintas. A primeira fase, inicial ou imediata, envolve a ativação de células constitutivas, ocasionando a formação de produtos de ozonólise secundário, como hidroxihidroperóxidos (agonista potente da formação de eicosanóide bioativo), aldeídos e peróxidos de hidrogênio. Ainda na fase imediata, ocorrem ativação e inativação de enzimas presentes na superfície epitelial, como a endopeptidase neutra. Na segunda fase ou fase recente, entre duas e 24 horas, as células epiteliais sintetizam e liberam fatores quimiotáticos, incluindo quimocinas, RANTES e interleucina-8 (IL-8). Os leucócitos, ainda durante esse período, liberam elastase (importante agonista na produção de muco pela célula epitelial e na formação de quimocinas adicionais). A terceira fase, ou fase tardia, é caracterizada pela

infiltração de eosinófilos e monócitos. A expressão de citocinas resulta em alteração da síntese protéica com aumento de fibronectina. A síntese de antiproteases epiteliais, como o inibidor de protease leucocitária secretante, pode aumentar localmente nas 24 a 48 horas após as concentrações de elastase tornarem-se excessivas (Leikauf *et al.*, 1995).

Peden *et al.* (1995) demonstraram em 11 pacientes asmáticos alérgicos, submetidos à provocação com mistura de ácaros e 0,4 ppm de ozônio, um aumento do influxo de eosinófilos, dos níveis de proteína catiônica eosinofílica e de IL-8, após quatro horas.

Steerenberg *et al.* (1996) realizaram lavado nasal em 12 voluntários saudáveis, cinco a sete ocasiões, durante dois meses expostos ao ozônio, sendo encontrado um aumento do número de leucócitos, proteína mieloperoxidase, proteína catiônica eosinofílica e IL-8.

Peden *et al.* (1997) avaliaram oito indivíduos asmáticos expostos a 0,16 ppm de ozônio pela broncoscopia, constatando um aumento significativo de eosinófilos nas vias aéreas inferiores, 18 horas após a exposição.

Hiltermann *et al.* (1997) realizaram lavados nasais em 60 pacientes com asma intermitente até persistente grave a cada duas semanas, durante três meses, no período de julho a outubro, quando os níveis de ozônio, PM10 e polens estavam mais elevados. Foram medidos os níveis de O<sub>3</sub> (mais elevado), PM10 (moderadamente elevado), fumaça preta (baixo), SO<sub>2</sub> (baixo), NO<sub>2</sub> (baixo), e realizada regressão linear. Ocorreu um aumento de neutrófilos e eosinófilos um dia após a exposição ao ozônio, e de mediadores solúveis (IL-8 e proteína catiônica eosinofílica) três dias após a

exposição a ele. Houve um aumento de células epiteliais dois dias após o aumento de ozônio. Em relação ao pólen, os eosinófilos aumentaram um dia após a exposição, e os níveis de proteína catiônica eosinofílica aumentaram dois dias após a exposição. O número de linfócitos e monócitos foi muito baixo, o que impossibilitou sua contagem. O PM10 não esteve associado à mudança dos parâmetros inflamatórios, exceto por uma associação entre o número de células epiteliais e as médias semanais de PM10. Os autores demonstraram que o ozônio ambiente e a exposição ao pólen estão associados à resposta inflamatória das vias aéreas superiores em pacientes asmáticos, embora o tipo de inflamação seja qualitativamente diferente.

*In vitro*, o ozônio pode induzir inflamação. Sabe-se ainda que clinicamente pode causar congestão nasal, aumento dos níveis de histamina, neutrófilos, eosinófilos e monócitos no lavado nasal (Schierhorn *et al.*, 1997).

Morales *et al.* (1998) realizaram um estudo para observar os efeitos do ozônio no epitélio nasal através de biópsia e citologia nasal em 71 crianças, divididas em três grupos que residiam em locais com níveis de poluição diferentes. As crianças da região mais poluída apresentaram maior número de células inflamatórias e presença de células calciformes anormais no citograma nasal, e presença de metaplasia escamosa e hiperplasia pseudoepiteliomatosa no exame histopatológico, em relação às crianças que residiam em áreas de média e baixa poluição.

Bayram *et al.* (1998) cultivaram células epiteliais brônquicas de pacientes com asma leve e indivíduos não-asmáticos, e compararam a liberação de IL-8, GM-CSF, RANTES e moléculas de adesão intercelular

(ICAM-1) solúvel dessas células antes e após a exposição de partículas de combustão de diesel, *in vitro*. As células epiteliais brônquicas de pacientes asmáticos liberaram uma maior quantidade de citocinas, em relação aos indivíduos não-asmáticos. Apenas altas concentrações de partículas de combustão de diesel (50-100 µg/ml) aumentaram, significativamente, a liberação de IL-8 e GM-CSF de células epiteliais brônquicas de indivíduos não-asmáticos. Esses achados sugerem que células epiteliais brônquicas de pacientes asmáticos são mais sensíveis do que as de indivíduos não-asmáticos, em relação à produção de mediadores pró-inflamatórios.

A exposição ao ozônio causa agravamento da resposta imediata e tardia da via aérea para alérgeno inalado, sendo a tardia caracterizada por aumento da eosinofilia em secreção brônquica induzida após seis horas (Ball *et al.*, 1996). Esse efeito é mais pronunciado diante de altos níveis de exposição ao ozônio, de 0,16 a 0,25 ppm (Kehrl *et al.*, 1999). Em níveis de 0,10 a 0,4 ppm é, tradicionalmente, acompanhada de inflamação neutrofilica, uma hora após a exposição e pode persistir por mais de 24 horas (Nightingale *et al.*, 1999).

Kopp *et al.* (1999) realizaram um estudo com 170 crianças em idade escolar para avaliar o efeito do ozônio na inflamação da mucosa nasal e sua adaptação por meio do lavado nasal colhido em onze ocasiões diferentes durante o ano. Os autores observaram aumento da atividade inflamatória da mucosa nasal, após o primeiro aumento dos níveis de ozônio, com aumento significativo dos leucócitos, da proteína C catiônica (encontrada nos grânulos de eosinófilos) e possível adaptação da mucosa nasal, pois, apesar dos constantes níveis altos de ozônio na estação do verão, o número de células diminuiu.

Michelson *et al.* (1999) realizaram um estudo caracterizando a resposta da fase imediata através da medida dos mediadores inflamatórios dos mastócitos (triptase e prostaglandina D2) e do influxo celular, imediatamente após a exposição ao ozônio e a provocação alérgica subsequente. Eles analisaram o lavado nasal de indivíduos com asma leve antes e após cada exposição a 0,4 ppm de ozônio, e após a administração do alérgeno nasal. Embora o alérgeno tenha produzido um aumento na liberação de mediadores da fase imediata (derivado dos mastócitos), nenhum aumento foi verificado após a exposição ao ozônio. Neutrófilos e os mediadores inflamatórios dos eosinófilos não aumentaram após a exposição ao ozônio ou ao alérgeno, apesar de o ozônio ter aumentado o influxo de eosinófilos, após a exposição ao alérgeno. A exposição ao ozônio não promoveu uma liberação de mediadores de resposta à fase imediata, nem aumentou a resposta à provocação alérgica, na cavidade nasal de pacientes com asma extrínseca. Entretanto, o ozônio promoveu um influxo de células inflamatórias (eosinófilos) que ajudou na indução da resposta da fase tardia, nessa população.

Newson *et al.* (2000) avaliaram o lavado brônquico de sete pacientes com asma leve, expostos a 0,2 ppm de ozônio por duas horas, com exercícios intermitentes. Ocorreu uma diminuição significativa do volume expiratório forçado no primeiro segundo e da capacidade vital forçada, após a exposição ao ozônio. Seis horas após a exposição ao ozônio, houve um aumento dos neutrófilos. Vinte e quatro horas após a exposição ao poluente, ocorreu uma diminuição das células epiteliais ciliadas. Não houve diferença significativa em relação aos eosinófilos e linfócitos.

Nichols *et al.* (2001) investigaram um dos possíveis mecanismos de resposta inflamatória das vias aéreas de humanos ao ozônio inalado, através da cultura das células epiteliais nasais, obtidas por biópsia. Essas células foram cultivadas em tecido colágeno e expostas a 120, 240 ou 500 ppb de O<sub>3</sub> durante três horas. Houve uma produção de radicais livres nas células epiteliais expostas a 240 ppb de ozônio por três horas. O fator de transcrição nuclear NF-kB foi ativado e sua capacidade, subseqüentemente, aumentou nas células epiteliais nasais, após exposição a todos os níveis de ozônio. A média basal foi analisada para a presença de fator a de necrose tumoral (TNF-a) por meio do Elisa. Em culturas expostas a 120 ppb de O<sub>3</sub>, a concentração de TNF-a não foi, significativamente, diferente. No entanto, a exposição a 240 e 500 ppb de O<sub>3</sub> aumentou a expressão de TNF-a em relação aos controles, 16 horas após a exposição.

Calderon-Garciduenas *et al.* (2001) realizaram biópsia nasal de 15 crianças expostas ao ozônio, material particulado e aldeídos na cidade metropolitana do México e compararam com a biópsia nasal de 11 crianças de uma cidade com baixos níveis de poluentes. Nas crianças expostas aos altos níveis de poluentes foram detectadas alterações nas células ciliadas e caliciformes, hiperplasia de células basais, metaplasia escamosa e leves displasias, e anormalidades ciliares.

Depuydt *et al.* (2002) realizaram um estudo experimental em ratos para observar se os níveis de ozônio ambiente (100 ppb por duas horas) intensificavam a sensibilização alérgica e a inflamação das vias aéreas, através de lavado broncoalveolar com posterior coloração pelo método de

Giemsa para contagem diferencial e histologia pulmonar. Os ratos foram sensibilizados com ovalbumina e metade deles expostos ao ozônio. Subsequentemente, os ratos sensibilizados foram expostos novamente ao O<sub>3</sub> e provocados com antígenos. A exposição ao O<sub>3</sub> (primeira exposição) durante a sensibilização não influenciou a inflamação das vias aéreas após a provocação com alérgeno. Entretanto, em ratos já sensibilizados, a provocação com ovalbumina, junto com o O<sub>3</sub> (segunda exposição), resultou em intensificação da eosinofilia e linfocitose de vias aéreas.

Wagner *et al.* (2002) testaram a hipótese que o O<sub>3</sub> intensifica a resposta inflamatória e epitelial da rinite alérgica, por meio de um estudo experimental com ratos sensibilizados com ovalbumina expostos ao O<sub>3</sub> (0,5 ppm por oito horas por dia) por um dia ou três dias consecutivos. O exame histopatológico demonstrou influxo de neutrófilos e eosinófilos na submucosa nasal apenas com a exposição à ovalbumina. Com a exposição ao O<sub>3</sub>, houve aumento dos eosinófilos, mas não das outras células inflamatórias. Após três dias de exposição ao O<sub>3</sub>, houve aumento das células epiteliais, bem como o aparecimento das células produtoras de muco em áreas onde elas eram normalmente ausentes.

Polosa *et al.* (2004) avaliaram dez indivíduos saudáveis expostos a 400 ppb de O<sub>3</sub> durante duas horas, em duas ocasiões diferentes, com intervalo de duas semanas, sendo realizada biópsia nasal seis horas após a exposição ao poluente. Após a exposição ao O<sub>3</sub>, as biópsias nasais exibiram um aumento significativo do número total de neutrófilos no epitélio nasal e submucosa.

### 3.3.2 Material particulado

Mello Jr. (1998) avaliou o efeito da exposição de partículas inaláveis em ratos expostos à poluição industrial de Cubatão (São Paulo) e Ubatuba (cidade litorânea de São Paulo), sendo encontrada uma menor síntese protéica nas células epiteliais e glândulas submucosas nos ratos que permaneceram em Cubatão, cidade com altos níveis de partículas inaláveis, embora essas não tenham ultrapassado os limites estabelecidos pela Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB) da cidade de São Paulo.

Existem evidências de que os produtos da queima de combustíveis (partículas da combustão de diesel) agem como adjuvantes no sistema imune e podem liderar o aumento da inflamação alérgica. Estudos em animais (Miyabara *et al.*, 1998) e em humanos (Fujieda *et al.*, 1998) têm mostrado que partículas de combustão de diesel aumentam a produção de imunoglobulina E (IgE) por uma variedade de mecanismos. Isso inclui a produção de quimocinas e citocinas, bem como a ativação de macrófagos e outros tipos celulares, incluindo células epiteliais (Devalia *et al.*, 1999).

Doses atóxicas de partículas de combustão de diesel têm um efeito estimulante significativo da interleucina-8 e produção de GM-CSF por células nasais e epiteliais brônquicas (Ohtoshi *et al.*, 1998). Já está bem estabelecido que as células epiteliais respiratórias são as primeiras células-alvo a produzirem uma variedade de citocinas em resposta às partículas de combustão de diesel (Bayram *et al.*, 1998). Os autores demonstraram que a produção de interleucina-8, induzida por partícula de combustão de diesel, foi regulada em

nível transcripcional (Takizawa *et al.*, 1999). Recentemente, observaram, ainda, que as partículas de combustão de diesel induziram a expressão genética de eotaxina em células epiteliais brônquicas (Takizawa *et al.*, 2003), embora outros estudos discordem dessa observação (Bommel *et al.*, 2003).

Salvi *et al.* (1999) estudaram o efeito particular de combustão de diesel (300  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  em uma hora) em voluntários em atividade física continuamente, constatando um aumento significativo das células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos B, mastócitos).

Em outro estudo, Salvi *et al.* (2000) demonstraram que a exposição à partícula de combustão de diesel durante uma hora induz inflamação leucocitária nas vias aéreas em voluntários humanos saudáveis, envolvendo neutrófilos, linfócitos e mastócitos, com aumento de inúmeros mediadores inflamatórios.

As células do epitélio respiratório representam a primeira defesa contra agentes poluentes nocivos, incluindo partículas de combustão de diesel, e, por consequência disso, muitos trabalhos sobre os efeitos das partículas de combustão de diesel nas células epiteliais respiratórias têm sido realizados *in vitro* (Marano *et al.*, 2002).

Fireman *et al.* (2004) analisaram o lavado brônquico de 39 bombeiros expostos a material particulado e produtos de combustão durante e após o colapso do World Trade Center em Nova York, 10 meses após a tragédia. O grupo controle foi composto de 12 bombeiros israelenses residentes em Tel-Aviv e oito trabalhadores da saúde não expostos à poeira do World Trade Center. Nenhum dos controles fumava ou apresentava doença respiratória.

A contagem diferencial das células diferiu entre o grupo dos bombeiros do World Trade Center e os trabalhadores da saúde, mas foi semelhante entre os dois grupos de bombeiros. Foi observado um maior número de neutrófilos e eosinófilos nos bombeiros do World Trade Center. As partículas foram maiores e de formato mais irregulares nos bombeiros do World Trade Center (1 a 50 microns – zinco, mercúrio, ouro, estanho, prata) do que nos bombeiros de Tel-Aviv (1 a 10 microns – sílica, argila).

Riechelmann *et al.* (2004) analisaram o citograma nasal de 30 voluntários sadios expostos ao material particulado nas concentrações de 150 e 500  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , durante três horas. Após 24 horas de exposição de 500  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  do material particulado, os autores observaram um aumento de interleucina-1 (72,3%), interleucina-6 (42,2%) e interleucina-8 (19,7%) correlacionado com o aumento de neutrófilos nasais.

### **3.3.3 Dióxido de nitrogênio**

Sandstrom *et al.* (1991) realizaram provocação com  $\text{NO}_2$  (2-6 ppm) em 18 indivíduos fumantes e avaliaram o lavado brônquico antes e após a exposição ao  $\text{NO}_2$ . Os autores observaram um aumento de linfócitos e mastócitos após a exposição ao poluente, porém não houve aumento significativo de neutrófilos, eosinófilos e células epiteliais.

Hussain *et al.* (2004) analisaram o lavado brônquico de oito ratos expostos a 2 ppm de  $\text{NO}_2$  durante 24 horas e depois de sensibilizados com ovalbumina, e o grupo controle apenas sensibilizado com ovalbumina. Os autores utilizaram a técnica de “Periodic Acid Schiff” (PAS) para detecção da

hiperprodução de muco. Os ratos expostos ao poluente apresentaram inflamação de vias aéreas caracterizada pela presença de neutrófilos, hiperreatividade brônquica para metacolina inalada e hiperplasia de células caliciformes. Houve dano epitelial e redução da expressão de mucina. Não ocorreu aumento de eosinófilos. A redução de mucina pode ser explicada por um mecanismo de injúria seguida de longo tempo de exposição ao NO<sub>2</sub> inalado. Durante a exacerbação da asma, ocorreu um aumento da produção de muco pela célula epitelial, devido à hiperplasia e metaplasia da célula caliciforme. Apesar do aumento do dano epitelial em ratos expostos à ovalbumina, a exposição ao NO<sub>2</sub> não alterou a expressão da resposta das vias aéreas induzidas por alérgenos.

### **3.3.4 Dióxido de enxofre**

Sandström *et al.* (1989) analisaram o lavado brônquico de 22 indivíduos sadios após a exposição a 8 ppm de SO<sub>2</sub>, observando um aumento do número de linfócitos, macrófagos e mastócitos após 24 horas, retornando à normalidade após 72 horas.

Saldiva *et al.* (1992) observaram um aumento da viscosidade do muco das vias aéreas de ratos expostos, durante seis meses, a diferentes poluentes (SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, PM10 e CO) com níveis aceitáveis para a saúde humana, na cidade de São Paulo.

A respiração nasal protege contra os efeitos pulmonares de SO<sub>2</sub> porque este gás, altamente solúvel em água, é absorvido muito eficientemente pela mucosa nasal. Peden *et al.* (1995) realizaram estudo em

11 adolescentes asmáticos que foram expostos a 1400  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  de  $\text{SO}_2$  durante cinco dias consecutivos e durante esforço físico, ocorrendo uma diminuição da secreção nasal e um aumento significativo da resistência da via aérea superior.

### **3.3.5 Mistura dos poluentes**

Polat *et al.* (2002) estudaram o efeito do PM,  $\text{O}_3$ ,  $\text{NO}_x$  e  $\text{SO}_2$  em quatro locais diferentes, no período de quatro meses, na cidade de Nordrhein-Westfalen (Alemanha), na mucosa nasal de 884 indivíduos, (501 mães e 383 crianças entre seis e sete anos de idade) através de lavado. Os autores não encontraram diferenças em relação aos neutrófilos nos diferentes locais, apesar de existir uma pequena diferença dos níveis de poluentes entre eles, durante o período. Nos locais mais poluídos, eles encontraram um maior número de células epiteliais. Interessantemente, o número de células totais e níveis de interleucina-8 em crianças estavam mais altos do que nas mães, sugerindo um aumento da susceptibilidade ao efeito da poluição atmosférica.

## **4 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### **4.1 Casuística**

Trata-se de um estudo observacional longitudinal, realizado durante o ano de 2003, composto por 40 pacientes divididos em dois grupos, que foram submetidos à coleta de secreção nasal em quatro ocasiões diferentes para análise do citograma nasal. O primeiro grupo foi constituído por 20 pacientes com diagnóstico de rinite alérgica residentes na cidade de São Paulo, provenientes do Ambulatório da Divisão da Clínica de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, compondo assim o grupo alérgico. O segundo grupo foi o grupo controle formado por 20 voluntários saudáveis, sem queixas nasais, residentes nessa capital. No decorrer do ano, houve perdas de algumas coletas nasais por motivos diversos. Por essa razão, tivemos que excluir do estudo os pacientes com dados incompletos, restando 11 pacientes alérgicos e 12 indivíduos normais.

Todos os pacientes com rinite alérgica e indivíduos normais assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido explicando que participariam de um estudo científico onde foram detalhadas pelo autor todas as condições em que o trabalho seria realizado. Os critérios de inclusão e exclusão foram preenchidos, e, em seguida, os pacientes receberam uma

numeração para a identificação nos grupos de estudo e controle. Essa pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo no dia 9 de outubro de 2002, com o número de protocolo 781/02.

#### **4.1.1 Critérios de inclusão - Grupo alérgico**

a) Pacientes que após orientação adequada sobre o estudo clínico a ser realizado pelo investigador, preencheram corretamente o consentimento livre e esclarecido e receberam uma cópia do documento.

b) Pacientes com rinite alérgica comprovada pela história clínica, exame físico e teste cutâneo de hipersensibilidade imediata para inalantes positivo.

c) Pacientes entre 18 e 45 anos, de ambos os sexos e qualquer raça.

d) Pacientes em bom estado de saúde, livres de qualquer outra doença que pudesse interferir na evolução do estudo ou na avaliação da rinite (Hipertensão Arterial Sistêmica, cardiopatia ou qualquer doença que necessite do uso de medicações citadas no Anexo A).

e) Pacientes capacitados e habilitados a seguirem e aderirem ao esquema de visitas.

f) Pacientes que residiam e trabalhavam na cidade de São Paulo.

#### **4.1.2 Critérios de inclusão - Grupo controle**

a) Indivíduos que, após orientação adequada sobre o estudo clínico a ser realizado pelo investigador, preencheram corretamente o consentimento livre e esclarecido e receberam uma cópia do documento.

b) Indivíduos entre 18 e 45 anos, de ambos os sexos e qualquer raça.

c) Indivíduos saudáveis, sem queixas nasais e sem rinite comprovada pela história clínica e pelo teste cutâneo de hipersensibilidade imediata para inalantes.

d) Indivíduos em bom estado de saúde, livres de qualquer outra doença que pudesse interferir na evolução do estudo (Hipertensão Arterial Sistêmica, cardiopatia ou qualquer doença que necessite do uso de medicações citadas no Anexo A).

e) Indivíduos capacitados e habilitados a seguirem e aderirem ao esquema de visitas.

f) Indivíduos residentes na capital de São Paulo.

#### **4.1.3 Critérios de exclusão**

a) Pacientes que tenham recebido medicação para tratamento de doenças alérgicas há menos tempo que o recomendado (Anexo A) para que seu efeito farmacológico não interferisse nos estudos clínicos laboratoriais segundo literatura médica (Howarth *et al.*, 2005).

b) Pacientes que estivessem fazendo uso de medicamentos e/ou drogas que possam levar a um quadro de rinite (ex.: beta-bloqueadores)

c) Pacientes com outras doenças nasais, tais como rinites não-alérgicas, infecções de vias aéreas superiores (IVAS), sinusites e polipose.

d) Pacientes que participaram de algum estudo clínico pregresso em um prazo menor de 30 dias.

e) Pacientes que, na opinião do investigador, são dependentes de descongestionantes nasais, anti-histamínico nasal e/ou anti-inflamatórios tópicos nasais.

f) Pacientes tabagistas.

g) Os itens A, B e D foram reavaliados em todas as coletas nasais.

#### **4.1.4 Restrições que foram observadas**

a) Nenhuma pessoa envolvida diretamente com a pesquisa participou do estudo como paciente.

b) Nenhum paciente foi envolvido no estudo mais de uma vez.

c) O estudo foi conduzido pelos mesmos investigadores acordados previamente neste protocolo.

## 4.2 Métodos

Foi realizada uma anamnese otorrinolaringológica detalhada e exame físico otorrinolaringológico em todos os pacientes. Todos os pacientes foram submetidos ao teste cutâneo<sup>1</sup> de hipersensibilidade imediata (“Prick test”) com antígenos inalatórios comuns em nosso meio, para confirmação e exclusão diagnóstica da rinite alérgica (Anexos B, C e D). Em seguida foi realizada a coleta de secreção nasal para análise do citograma com três diferentes tipos de coloração celular: AgNOR, Leishman e PAS. Essa coleta foi realizada em quatro ocasiões diferentes, uma em cada estação do ano.

### 4.2.1 Técnica de coleta da secreção nasal

Neste trabalho coletamos a secreção nasal por meio de uma escova cervical uterina (“cytobrush”)<sup>2</sup> para a realização do citograma nasal. A escova foi colocada em meato médio, sob visão direta, com auxílio de espéculo nasal e foco frontal, durante 30 segundos, com movimento circular e discreta pressão sob a mucosa. Após a coleta, a escova é agitada com movimentos circulares dentro de um tubo de ensaio com 5 mL de soro fisiológico durante um minuto. Esse procedimento foi realizado pelo mesmo examinador em todos os pacientes em uma das cavidades nasais. Escolhemos o lado de melhor visualização do meato médio para coleta da secreção nasal, o que variou a cada paciente.

---

<sup>1</sup> IPI ASAC - International Pharmaceutical Immunology do Brasil Ltda.

<sup>2</sup> Kolplast<sup>®</sup> (São Paulo – Brasil)

#### **4.2.2 Técnica de preparo das lâminas**

O material do tubo de ensaio foi transferido para um tubo cônico graduado com o auxílio de uma pipeta e centrifugado a 2000 rpm por oito minutos em centrífuga<sup>3</sup>. Foi retirada parte do líquido sobrenadante e a seguir preparadas as lâminas. Foram preparadas seis lâminas (duas para cada coloração). O esfregaço foi preparado conforme o sedimento obtido para contagem diferencial das células. A suspensão do sedimento do material foi centrifugada novamente a 1500 rpm, durante três minutos, em uma citocentrífuga<sup>4</sup>. A partir daí foram preparadas seis novas lâminas com o material agora concentrado para se obter uma visão geral das células. Uma centrifugação complementa a outra. Foram totalizadas quatro lâminas para cada tipo de coloração, porém, apenas nas duas primeiras, foi realizada a contagem diferencial. O preparo das lâminas foi realizado pelo mesmo técnico do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

#### **4.2.3 Técnica de preparo da coloração**

As colorações Leishman, PAS e AgNOR foram preparadas de acordo com as técnicas padronizadas no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP e estão descritas no Anexo E.

---

<sup>3</sup> Eppendorf modelo 5810 (Hamburgo – Alemanha)

<sup>4</sup> Shandon, modelo Cytospin 3 (Maryland – EUA)

#### 4.2.4 Leitura das lâminas

A leitura de todas as lâminas foi efetuada pelo mesmo patologista que realiza todas as leituras de citologia nasal do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

##### 4.2.4.1 Análise do Leishman

Na coloração de Leishman, analisamos os tipos celulares e quantificamo-los por meio de microscópio óptico binocular<sup>5</sup>. Foi realizada uma contagem global das células epiteliais e inflamatórias totalizando 100% das células encontradas nas lâminas (Figuras 1 a 4). A seguir subdividimos os dois grupos em 100% de cada grupo, conforme ilustrado no Quadro 1.

**Quadro 1 - Exame citológico nasal pelo método de coloração de Leishman**

<b>Células Inflamatórias</b>	<b>Porcentagem n%</b>	<b>Células Epiteliais</b>	<b>Porcentagem n %</b>	<b>Total</b>
<b>Leucócitos Totais</b>	n	<b>Células Epiteliais Totais</b>	n	<b>100</b>
<b>Neutrófilos</b>	n	Planas	n	
<b>Eosinófilos</b>	n	Cilíndricas Ciliadas	n	
<b>Basófilos</b>	n	Cilíndricas Caliciformes	n	
<b>Linfócitos</b>	n			
<b>Monócitos</b>	n			
<b>Mastócitos</b>	n			
<b>Total</b>	<b>100%</b>		<b>100%</b>	

<sup>5</sup> LEICA-DMLS (Allendale – EUA)

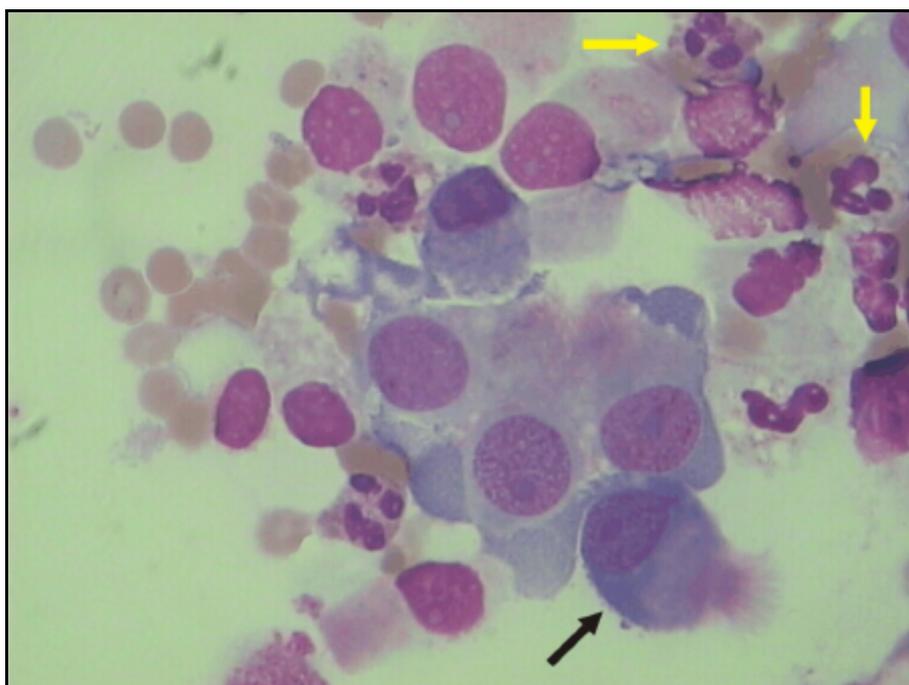


Figura 1 - Neutrófilos (seta amarela) e célula epitelial ciliada (seta preta). Coloração Leishman (aumento total 1000X)

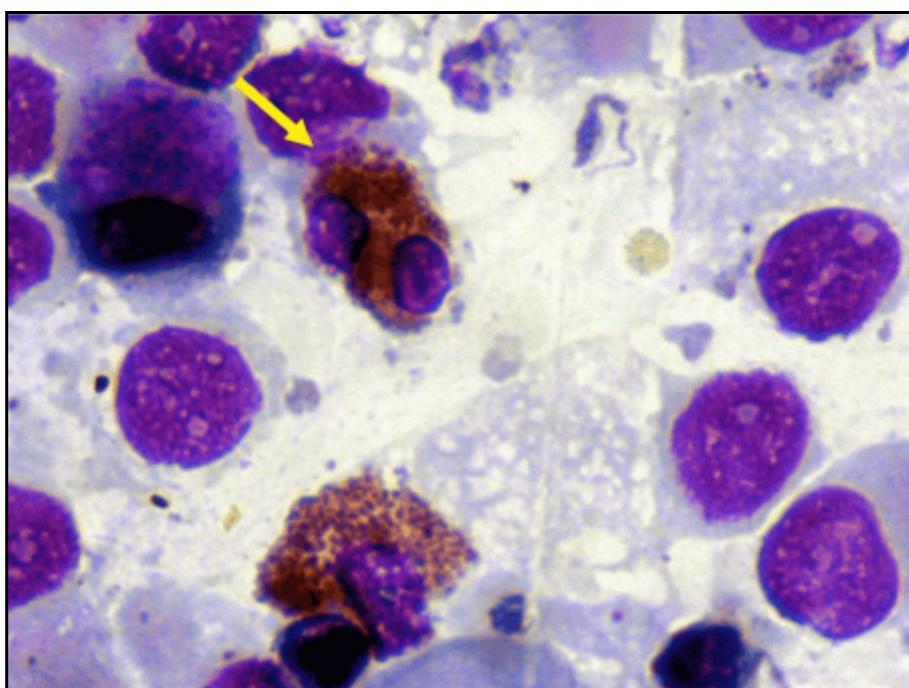


Figura 2 - Eosinófilo pela Coloração Leishman (aumento total 1000X)

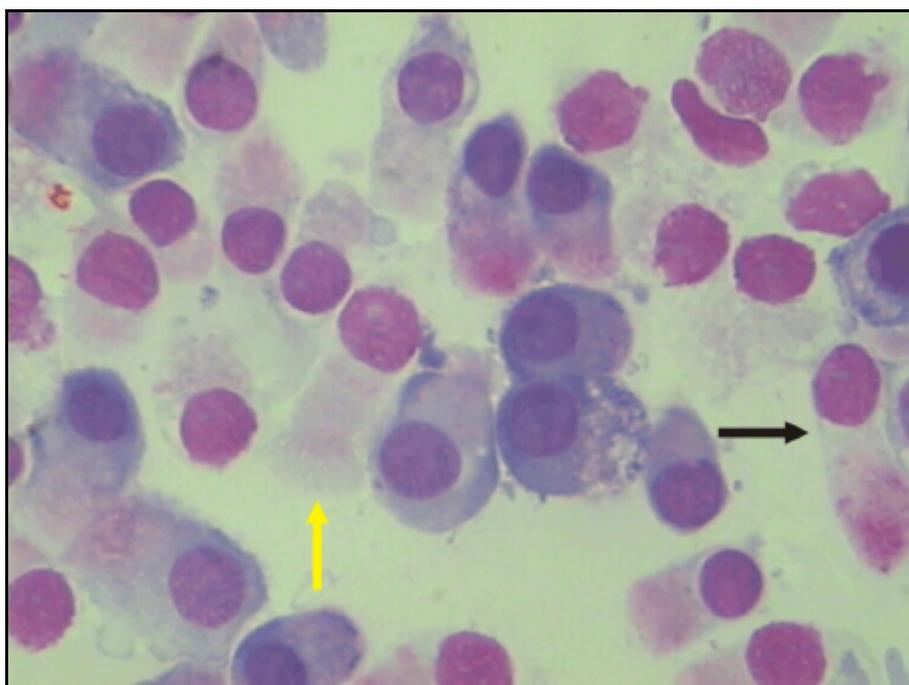


Figura 3 - Células epiteliais ciliadas (seta amarela) e caliciformes (seta preta). Coloração Leishman (aumento total 1000X)

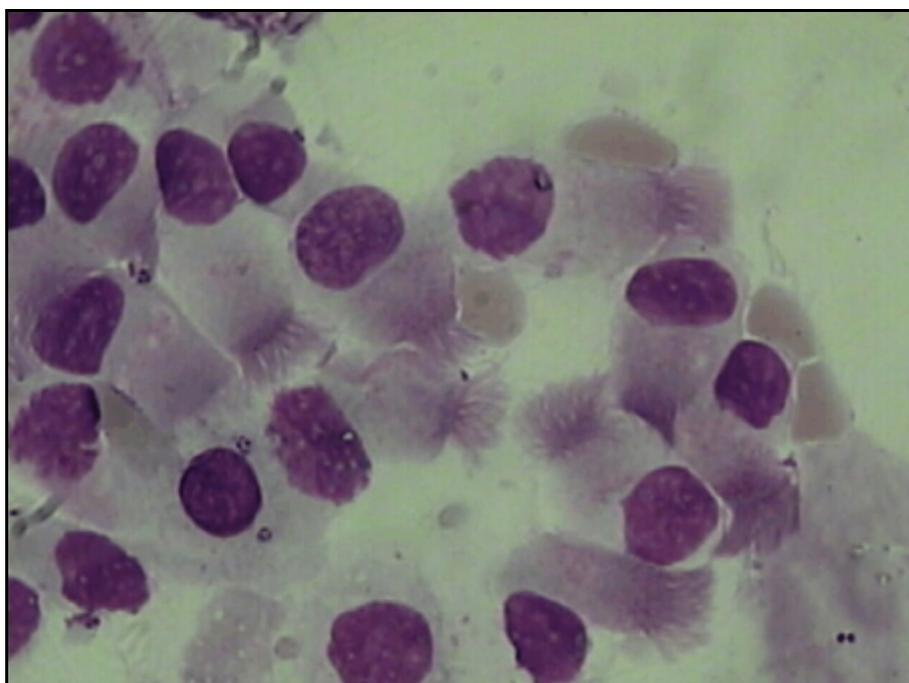


Figura 4 - Células epiteliais ciliadas pela coloração Leishman (aumento total 1000X)

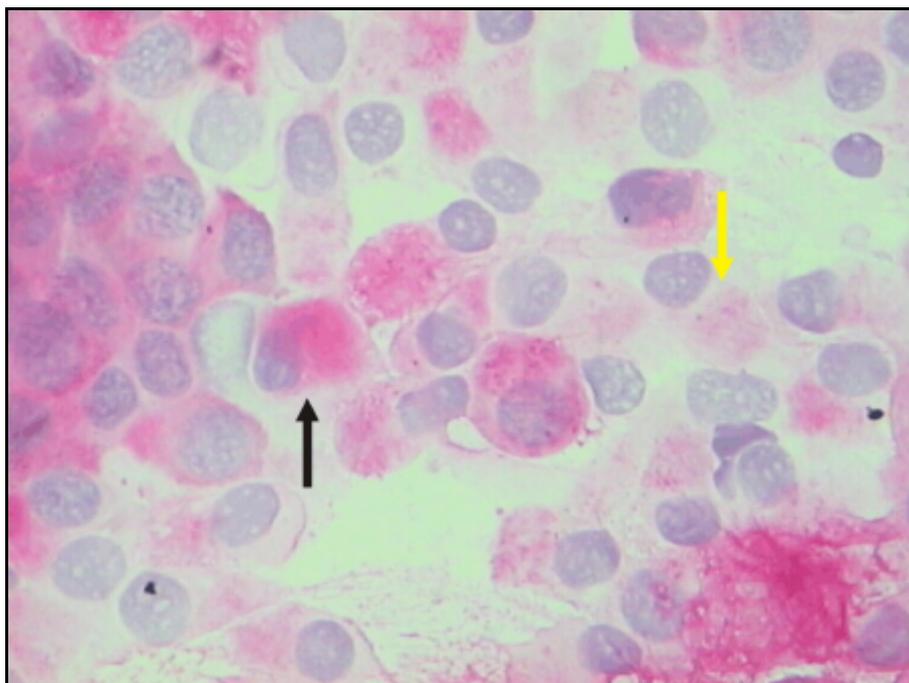
#### 4.2.4.2 Análise do “Periodic Acid Schiff”

Na coloração do PAS, analisamos a intensidade da coloração e graduamos um número correspondente às diferentes intensidades em 100 células caliciformes (secretoras) íntegras, em bom estado de conservação, por meio de microscópio óptico binocular<sup>5</sup>. Todas as células receberam um número de acordo com a intensidade de coloração, conforme visibilizado no Quadro 2. Esse número foi multiplicado pelo número de células correspondentes, e em seguida obtivemos um *score* decorrente da somatória dos resultados dessas multiplicações. Nesta técnica, quantificamos a impregnação da célula secretora, ou seja, quanto maior a impregnação, maior é a produção de muco pela célula secretora (Figuras 5 e 6).

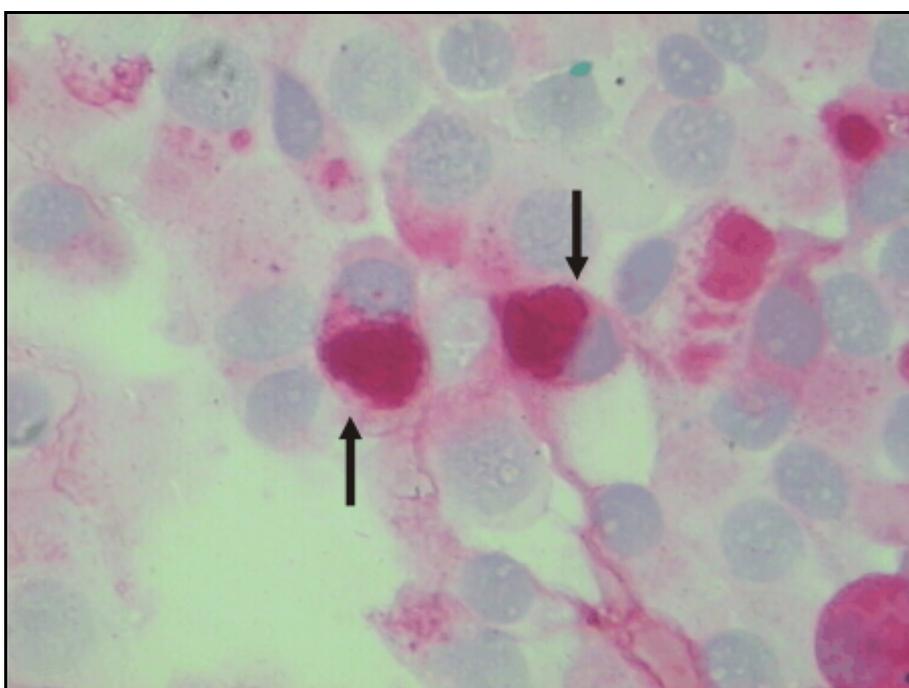
**Quadro 2 - Resultado da Técnica de coloração PAS**

Número	Intensidade de impregnação
0	ausência
1	fraca
2	moderada
3	intensa

Score = Somatória



**Figura 5 - Coloração PAS - células caliciformes com impregnações 1 (seta amarela) e 2 (seta preta) (aumento total 1000X)**



**Figura 6 - Coloração PAS - Célula caliciforme com impregnação 3 (setas pretas) (aumento total 1000X)**

#### 4.2.4.3 Sistema para análise de AgNOR

A análise quantitativa da expressão das AgNORs foi realizada por meio de análise digital de imagem, usando programa (“software”) específico<sup>6</sup>. As imagens foram geradas por microscópio binocular<sup>5</sup>, com vídeo câmera acoplada<sup>7</sup> e inseridas em um computador<sup>8</sup> (Figura 7).

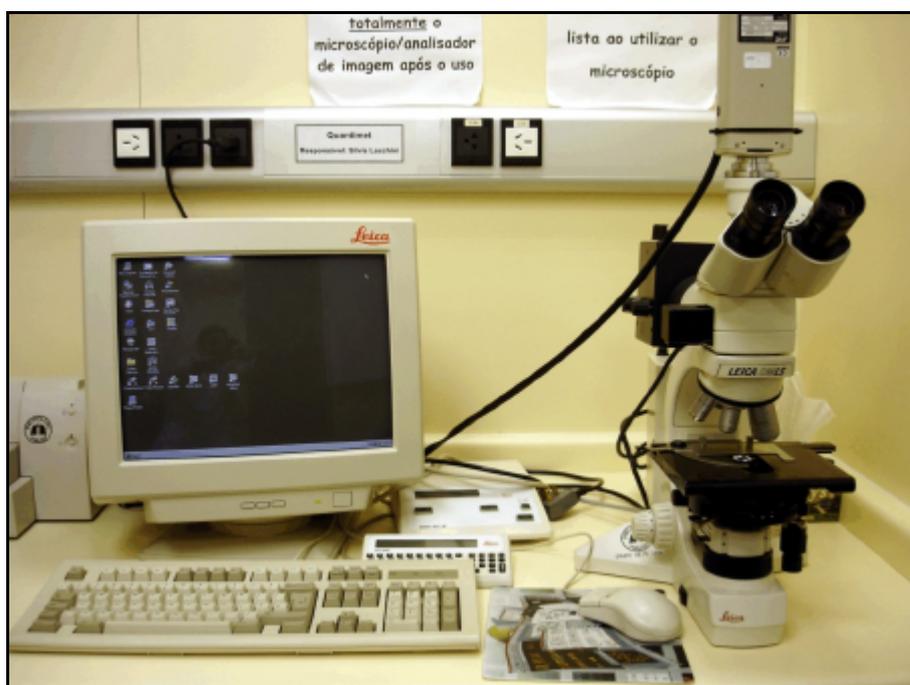


Figura 7 - Analisador de imagens

<sup>6</sup> Leica Qwin Colour – RGB (Allendale – EUA)

<sup>7</sup> JVC modelo TK-C 1380 E

<sup>8</sup> Pentium 133 Mhz

#### 4.2.4.4 Análise das áreas de AgNOR nas células ciliadas e caliciformes

Um total de 100 células por lâmina foi analisado com óptica de 10X com lente de aumento de 100X, em óleo de imersão, resultando num aumento total de 1000X. Este número, para contagem, é suficiente para obter-se um nível de confiança adequado (Antonângelo *et al.*, 1994; Cavalcanti, 1996). A avaliação foi feita em células com núcleos íntegros, onde os pontos (“dots”) de AgNOR eram facilmente identificados, sem interferência de artefatos da técnica de coloração (Crocker *et al.*, 1989; Rüschoff *et al.*, 1990). Foi então realizada a medida da área ocupada (expressa em  $\mu\text{m}^2$ ) no núcleo pelos “dots” de AgNOR, ou seja, a leitura da intensidade de sua impregnação pela prata (Figura 8). Em cada espécime foi feito o somatório total das áreas, dividindo-se por 100 para obter-se a área média de AgNOR nuclear de cada espécime e posteriormente obter-se a área média de AgNOR em cada grupo.



Figura 8 - Células epiteliais ciliada (seta preta) e caliciforme (seta vermelha) coradas com AgNOR com os “dots” no nucléolo das células (aumento total 1000X)

#### **4.2.5 Células analisadas**

Analisamos todas as células inflamatórias e epiteliais nasais, entretanto utilizamos, para este estudo, os eosinófilos, os neutrófilos, as células ciliadas e caliciformes pela relevância das mesmas na revisão de literatura.

#### **4.2.6 Análise da poluição atmosférica**

Os níveis de poluição atmosférica foram obtidos pelos dados fornecidos pela CETESB. Analisamos ainda, da mesma forma, as médias diárias de temperatura e de umidade do ar, fornecidas pelo Instituto Astronômico, Geofísico e de Ciências Atmosféricas da Universidade São Paulo (IAG).

Como os indivíduos moravam e trabalhavam em bairros distintos da capital de São Paulo, obtivemos as médias diárias gerais dos poluentes dos bairros de São Paulo e realizamos uma média geral da cidade. Os poluentes analisados foram os seguintes: PM<sub>10</sub>, SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, CO e O<sub>3</sub>.

A citologia nasal foi comparada com os níveis de poluição atmosférica medidos até sete dias antes da coleta. Cada dia anterior à coleta chamamos de “LAG”, que em português significa atraso.

#### 4.2.7 Análise estatística

Realizamos a descrição da amostra para todas as variáveis do estudo, que receberam tratamento não-paramétrico. Em toda análise estatística, adotamos o nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,050$ ). Portanto, consideram-se estatisticamente significantes: o valor de significância calculada abaixo de 5% ( $p$  menor que 0,050), e que será marcado com um asterisco (\*); o valor de significância calculada que indicar tendência forte ( $p$  entre 0,050 e 0,100) será marcado com dois asteriscos (\*\*). Foram utilizados programas específicos<sup>9</sup> para o estudo estatístico.

Aplicamos o *Teste de Mann-Whitney* para comparar os pacientes alérgicos (grupo alérgico) e os indivíduos normais (grupo controle) nas quatro estações do ano.

Aplicamos o *Teste de Friedman* (teste de análise de variância de medidas repetidas não-paramétricas) para comparar os pacientes de cada grupo entre eles mesmos nas diferentes estações. Aplicamos o *Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon* para identificar essa diferença entre as estações.

Foi realizada a análise quantitativa dos poluentes, temperatura e umidade do dia da coleta da secreção nasal e dos sete dias anteriores, relacionando-a às células em que encontramos diferença estatisticamente significativa, em cada grupo, nas diferentes estações do ano. Analisamos a relação estatisticamente significativa das diversas variáveis com a regressão linear múltipla, podendo este ter um valor negativo o que denota uma

---

<sup>9</sup> SPSS (Statistical Package for Social Science) for Windows versão 10.0, Statistica for Windows versão 5.0

relação inversa com determinada variável (ou seja, enquanto uma célula aumenta, a variável diminui e vice-versa) ou ter um valor positivo (a célula aumenta ou diminui igualmente à variável analisada). Adotamos o nível de significância de  $Z \geq 2,017$  o que corresponde a 43 graus de liberdade (44 observações - 1 = 43). Utilizou-se programa específico para este estudo<sup>10</sup>.

---

<sup>10</sup> S-Plus professional

## **5 RESULTADOS**

## 5.1 Comparação entre os grupos alérgico e controle

### 5.1.1 Método de coloração: Leishman

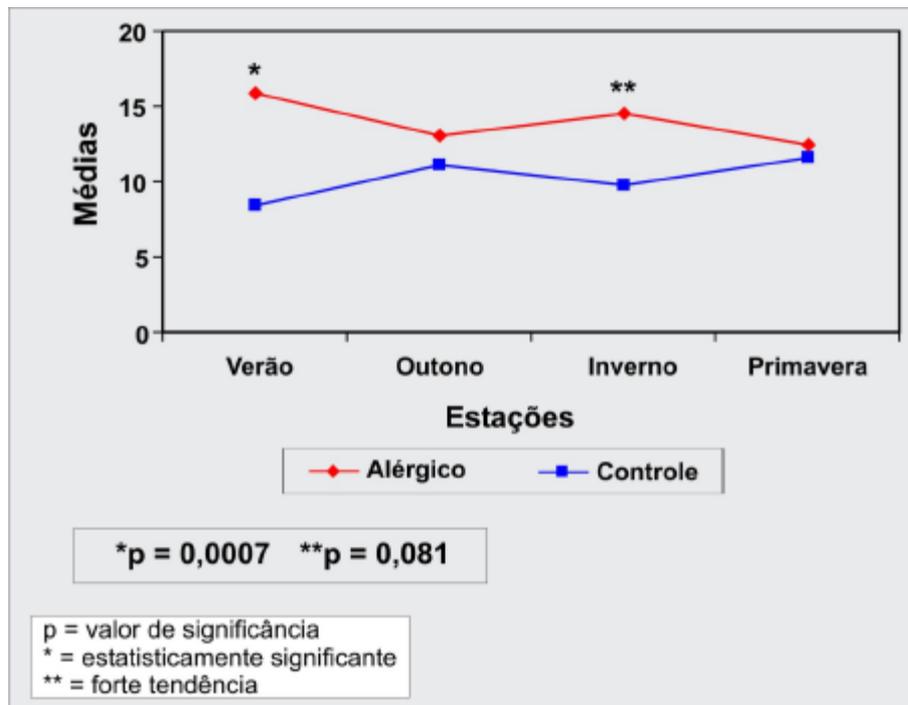
No verão, foi observado um aumento de eosinófilos no grupo alérgico ( $\mu = 15,91$ ) em relação aos indivíduos normais ( $\mu = 8,42$ ), com nível de significância de  $p = 0,007$ . Houve um predomínio de células ciliadas no grupo controle ( $\mu = 15,13$ ) em relação ao grupo alérgico ( $\mu = 8,59$ ), com  $p = 0,021$ . Esses resultados foram representados nos Gráficos 1 e 2 e Anexo F.

No outono, houve um predomínio de neutrófilos no grupo controle ( $\mu = 15,00$ ) em relação ao grupo alérgico ( $\mu = 8,73$ ), com  $p = 0,027$ . Esses resultados foram representados no Gráfico 3 e Anexo G.

No inverno, ocorreu um aumento dos neutrófilos no grupo controle ( $\mu = 15,29$ ) em relação ao grupo alérgico ( $\mu = 8,41$ ), com  $p = 0,015$ . Quanto às células caliciformes, houve um predomínio no grupo alérgico ( $\mu = 15,45$ ) em relação ao grupo controle ( $\mu = 8,83$ ), com  $p = 0,019$ . Ocorreu um aumento dos eosinófilos ( $\mu = 14,50$ ) no grupo alérgico em relação ao grupo controle ( $\mu = 9,71$ ), porém não houve diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,081$ ). Ocorreu ainda um aumento das células ciliadas no grupo controle ( $\mu = 14,42$ ) em relação ao grupo alérgico ( $\mu = 9,36$ ), porém não houve diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,074$ ). Esses resultados foram representados nos Gráficos 1 a 4 e Anexo H.

Na primavera, ocorreu um aumento dos neutrófilos com predomínio no grupo controle ( $\mu = 15,04$ ) em relação ao grupo alérgico ( $\mu = 8,68$ ), com  $p = 0,025$ . Esses resultados foram representados no Gráfico 3 e Anexo I.

**Gráfico 1 - Comparação dos eosinófilos do grupo alérgico com o grupo controle no decorrer do ano**



**Gráfico 2 - Comparação das células ciliadas do grupo alérgico com o grupo controle no decorrer do ano**

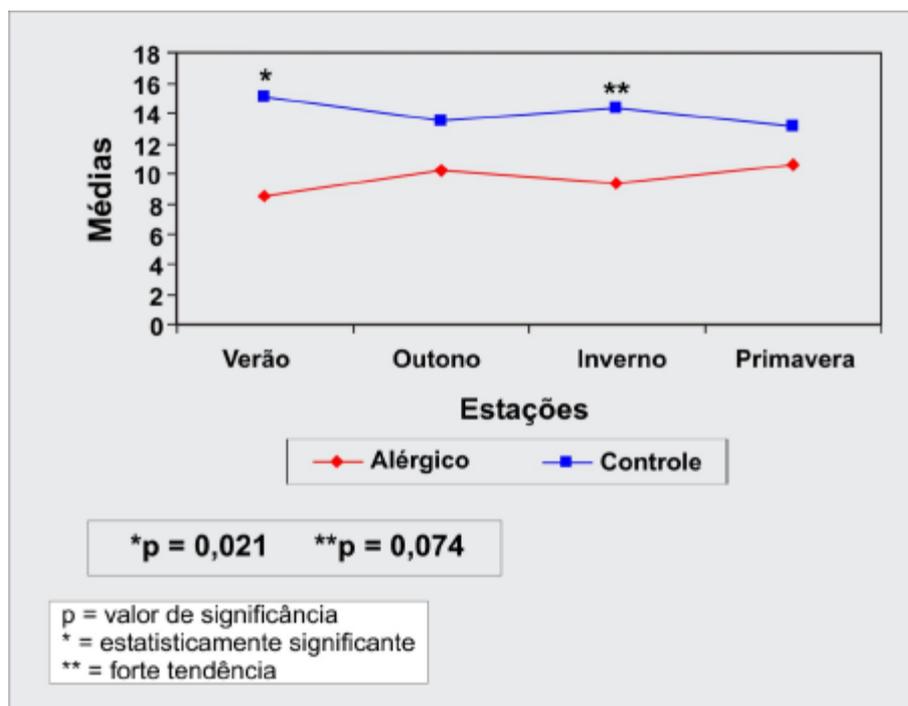


Gráfico 3 - Comparação dos neutrófilos do grupo alérgico com o grupo controle no decorrer do ano

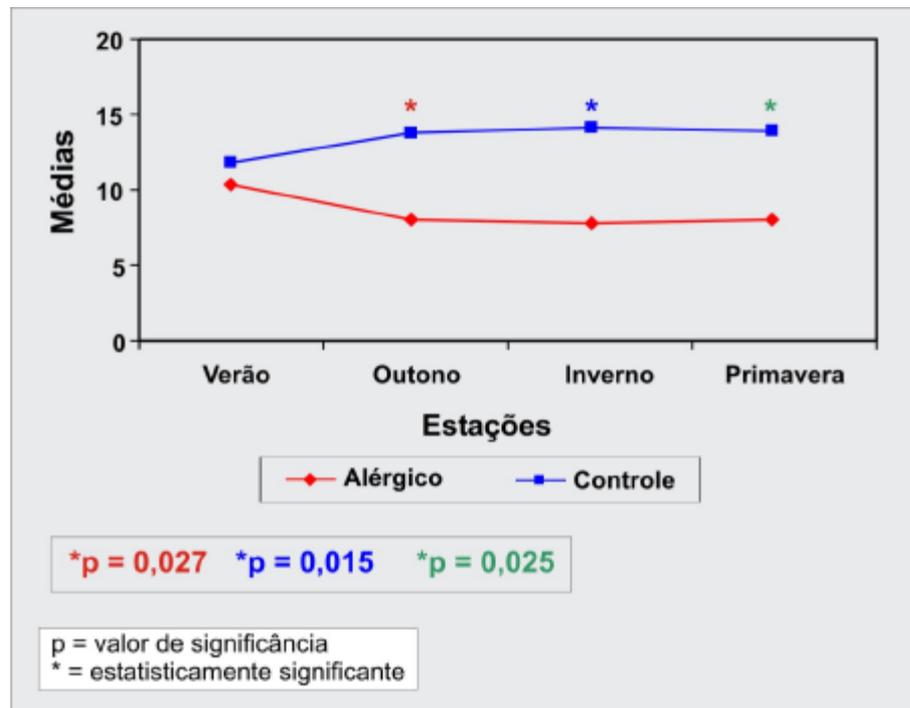
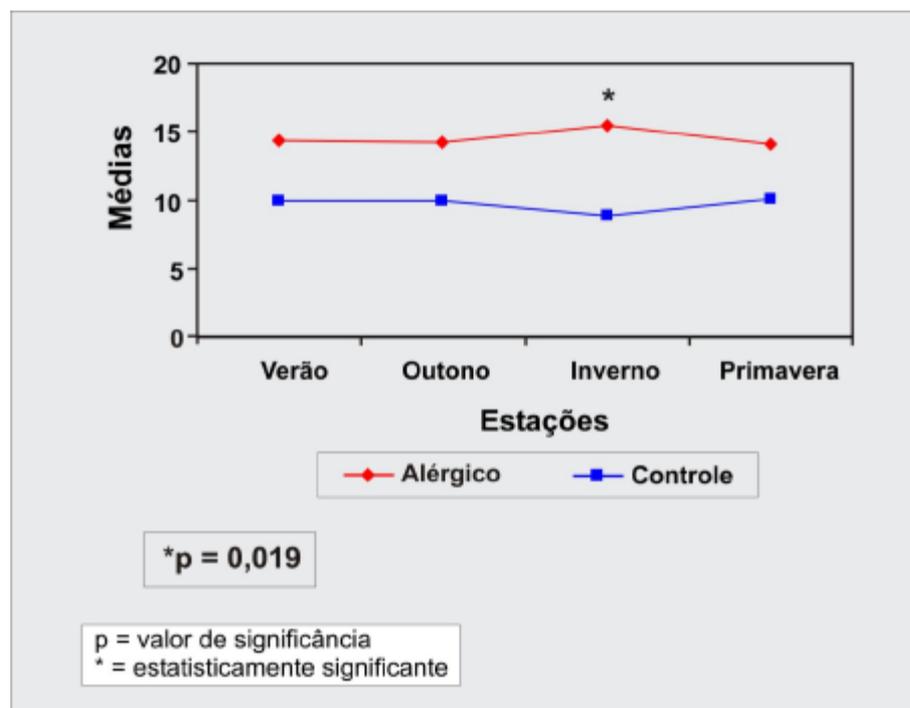


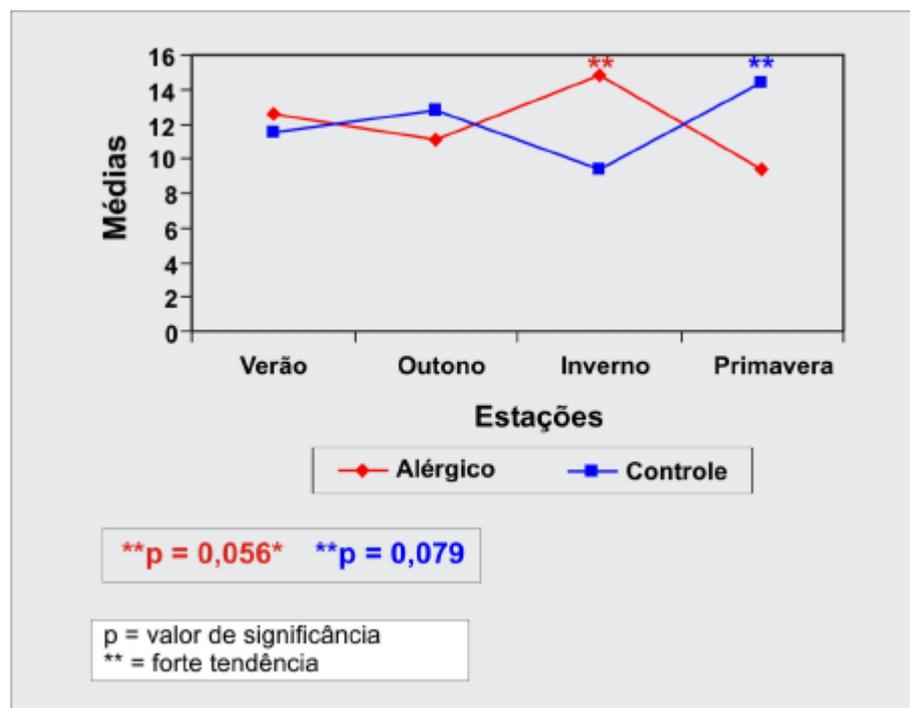
Gráfico 4 - Comparação das células caliciformes do grupo alérgico com o grupo controle no decorrer do ano



### 5.1 2 Método de coloração PAS

No inverno, ocorreu um aumento do PAS no grupo alérgico ( $\mu = 14,82$ ) em relação ao grupo controle ( $\mu = 9,42$ ), porém não houve diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,056$ ). Na primavera, ocorreu um aumento do PAS no grupo controle ( $\mu = 14,38$ ) em relação ao grupo alérgico ( $\mu = 9,41$ ), porém não houve diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,079$ ). No verão e no outono, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Esses resultados foram representados no Gráfico 5 e Anexo J.

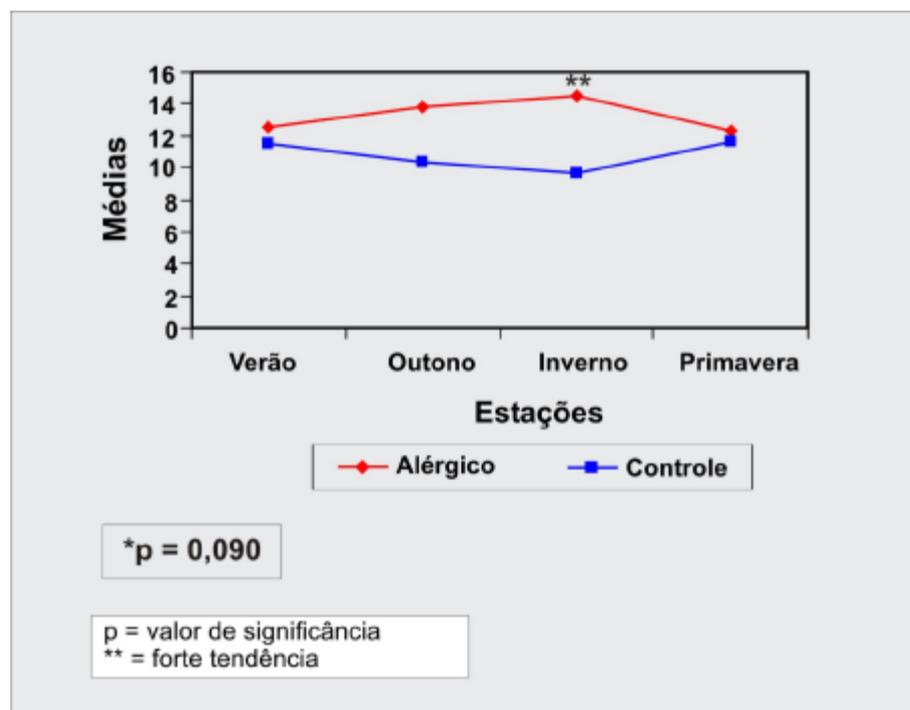
**Gráfico 5 - Comparação do PAS do grupo alérgico com o grupo controle no decorrer do ano**



### 5.1.3 Método de coloração AgNOR

No inverno, ocorreu um aumento de AgNOR no grupo alérgico ( $\mu = 14,50 \mu\text{m}^2$ ) em relação ao grupo controle ( $\mu = 9,71 \mu\text{m}^2$ ), porém não houve diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,090$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nas demais estações do ano. Esses resultados foram representados no Gráfico 6 e Anexo K.

**Gráfico 6 - Comparação do AgNOR do grupo alérgico com o grupo controle no decorrer do ano**



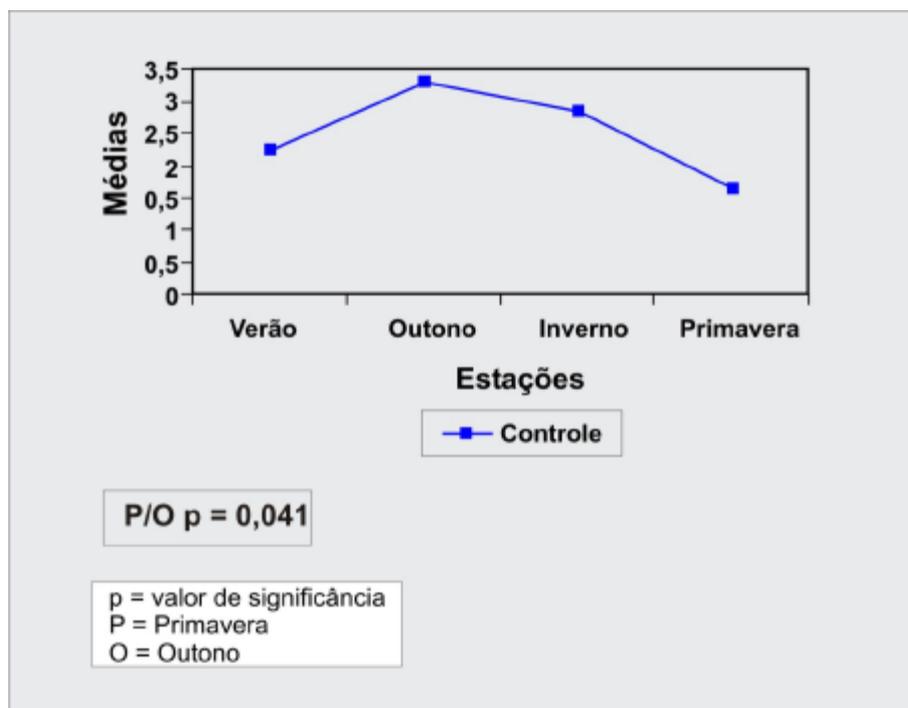
## 5.2 Comparação dos Pacientes de Cada Grupo Entre Eles Mesmos

### 5.2.1 Método de coloração Leishman

No grupo alérgico, não houve diferença significativa quando comparamos os pacientes entre eles mesmos.

No grupo controle, houve diferença estatisticamente significativa quanto às células ciliadas ( $p = 0,010$ ). Observamos diferença significativa entre a primavera e o outono ( $p = 0,041$ ). Esses resultados foram representados no Gráfico 7.

**Gráfico 7 - Comparação dos indivíduos do grupo controle entre eles mesmos no decorrer do ano sendo encontrado a célula ciliada com diferença estatisticamente significativa**

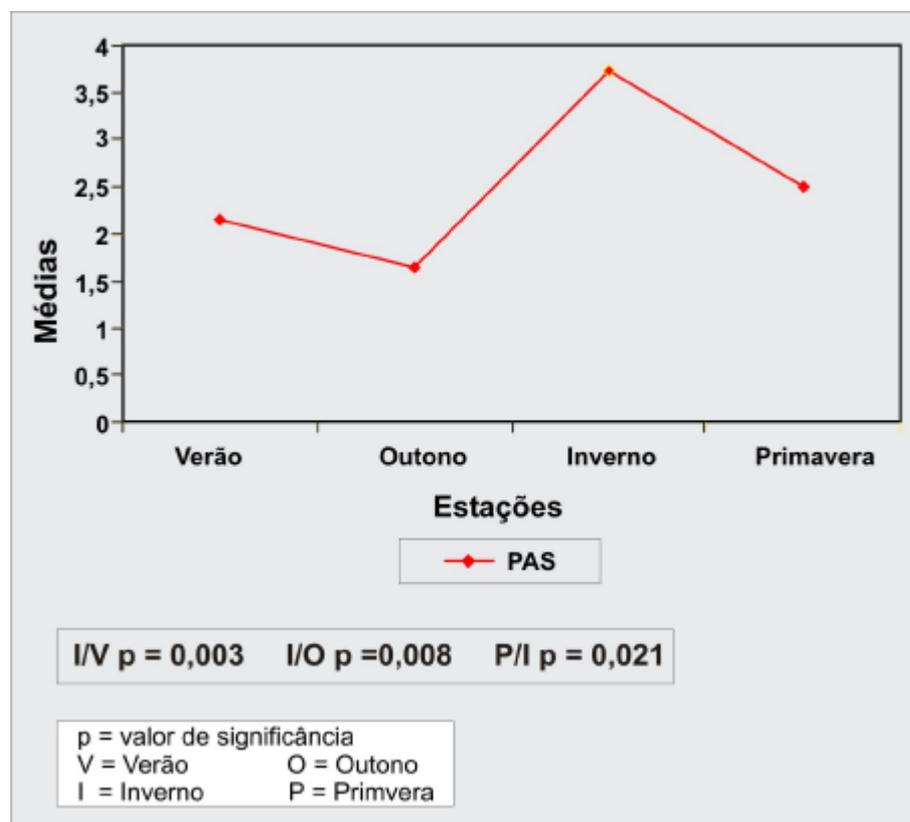


### 5.2.2 Método de coloração: PAS

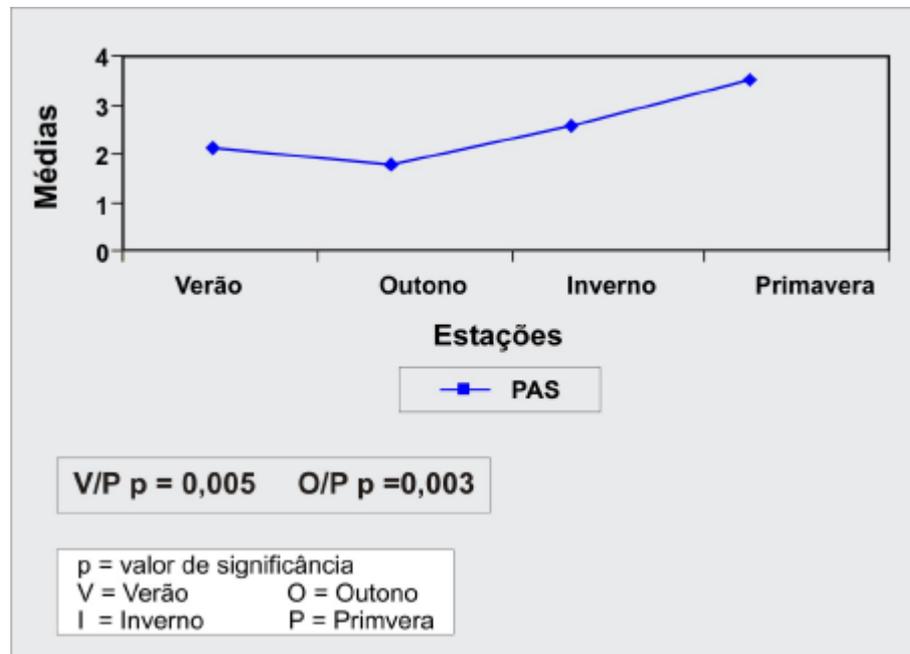
No grupo alérgico, houve diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,001$ ). Observamos diferença significativa entre o inverno e o verão ( $p = 0,003$ ); entre o inverno e o outono ( $p = 0,008$ ); e entre a primavera e o inverno ( $p = 0,021$ ). Esses resultados foram representados no Gráfico 8.

No grupo controle, houve também diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,007$ ). Observamos diferença significativa entre a primavera e o verão ( $p = 0,005$ ); e a primavera e o outono ( $p = 0,003$ ). Esses resultados foram representados no Gráfico 9.

**Gráfico 8 - Comparação dos pacientes do grupo alérgico entre eles mesmos no decorrer do ano sendo encontrado o PAS com diferença estatisticamente significativa**



**Gráfico 9 - Comparação dos pacientes do grupo controle entre eles mesmos no decorrer do ano sendo encontrado o PAS com diferença estatisticamente significativa**



### 5.2.3 Método de coloração AgNOR

Através do método AgNOR, não houve diferença significativa quando comparamos os pacientes de cada grupo entre eles mesmos.

### 5.3 Relação das Variáveis Significantes com os Dados dos Poluentes Atmosféricos, da Temperatura e da Umidade do Ar

Para compreensão dos resultados, utilizamos dois grandes grupos: Grupo a e Grupo b, descritos abaixo para simplificar as correlações utilizadas na tabela.

Associamos diversos parâmetros a serem comparados nesses dois grupos cuja diferença é a presença da umidade relativa do ar no Grupo b.

**Grupo a** = temperatura do dia + outono + inverno + primavera + poluente + célula

**Grupo b** = temperatura do dia + umidade do dia + outono + inverno + primavera + poluente + célula

**LAG** = dia anterior à coleta

**Relação positiva** = o número da célula acompanha o nível do poluente, ou seja, é diretamente proporcional.

**Relação negativa** = o número da célula é o oposto do nível do poluente, ou seja, é inversamente proporcional.

Em nenhuma das colorações observamos relação estatisticamente significativa das células com as alterações de temperatura e umidade do ar. Encontramos relação significativa ( $Z \geq 2,017$ ) apenas com os poluentes descritos a seguir.

### 5.3.1 Método de coloração Leishman

#### 5.3.1.1 Eosinófilos

No grupo alérgico, observamos que houve uma relação positiva entre os eosinófilos e o material particulado menor que 10 micras (PM10) quatro dias antes da coleta. Essa relação foi constatada quando utilizamos as duas fórmulas (a e b) descritas abaixo. Verificamos que ocorreu uma relação positiva entre os eosinófilos e o CO no dia da coleta (Tabela 1).

**Tabela 1 - Relação entre os eosinófilos de pacientes alérgicos e os poluentes significantes**

POLUENTES	EOSINÓFILOS ALÉRGICOS
	Z
PM10 LAG4-a	(+) 2,1816
PM10 LAG4-b	(+) 2,14952
CO-a	(+) 3,10596
CO-b	(+) 3,09715

Z - valor de significância

No grupo controle, observamos que houve uma relação positiva entre os eosinófilos e o ozônio de dois dias antes da coleta. Esse aumento foi constatado quando utilizamos as duas fórmulas visibilizadas na tabela abaixo. Constatamos que houve uma relação inversa entre os eosinófilos e o ozônio de três dias antes da coleta (Tabela 2).

**Tabela 2 - Relação entre os eosinófilos de indivíduos normais e os poluentes significantes**

POLUENTES	EOSINÓFILOS
	CONTROLE
	Z
O <sub>3</sub> LAG2-a	(+) 2,10041
O <sub>3</sub> LAG2-b	(+) 2,00873
O <sub>3</sub> LAG3-a	(-) 2,60950
O <sub>3</sub> LAG3-b	(-) 2,37703

Z - valor de significância

### 5.3.1.2 Neutrófilos

No grupo alérgico, observamos que houve uma relação positiva entre os neutrófilos e o ozônio do dia da coleta. Essa relação foi constatada quando utilizamos as duas fórmulas descritas abaixo (Tabela 3).

**Tabela 3 - Relação entre os neutrófilos de pacientes alérgicos e o poluente significativo**

POLUENTES	NEUTRÓFILOS
	ALÉRGICOS
	Z
O <sub>3</sub> -a	(+) 2,1174

Z - valor de significância

No grupo controle, observamos que houve uma relação positiva entre os neutrófilos e o NO<sub>2</sub> do dia da coleta, e o PM10, o SO<sub>2</sub> e o NO<sub>2</sub> dois dias antes da coleta. Houve uma relação positiva entre os neutrófilos e o O<sub>3</sub> de cinco dias antes da coleta (Tabela 4).

**Tabela 4 - Relação entre os neutrófilos de indivíduos normais e os poluentes significantes**

POLUENTES	NEUTRÓFILOS
	CONTROLE
	Z
PM10 LAG2-a	(+) 2,68101
PM10 LAG2-b	(+) 2,61289
SO <sub>2</sub> LAG2-a	(+) 2,110884
NO <sub>2</sub> -a	(+) 2,33609
NO <sub>2</sub> LAG2-a	(+) 2,179308
NO <sub>2</sub> LAG2-b	(+) 2,09636
O <sub>3</sub> LAG5-b	(+) 2,708359

Z - valor de significância

### 5.3.1.3 Células epiteliais ciliadas

No grupo alérgico, observamos uma relação inversa entre o PM10 de cinco dias antes da coleta e o CO seis dias antes da coleta, com as células ciliadas, ou seja, enquanto ocorreu um aumento significativo destes poluentes, houve uma diminuição das células ciliadas, e vice-versa. Constatamos uma relação positiva entre as células ciliadas e o O<sub>3</sub> (Tabela 5).

**Tabela 5 - Relação entre as células epiteliais ciliadas de pacientes alérgicos e os poluentes significantes**

POLUENTES	CÉLULAS EPITELIAIS CILIADAS
	ALÉRGICOS
	Z
PM10 LAG5-a	(-) 2,90454
PM10 LAG5-b	(-) 2,979496
CO LAG6-a	(-) 2,23491
O <sub>3</sub> -b	(+) 2,51227

Z - valor de significância

No grupo controle, verificamos uma relação positiva entre as células ciliadas e o SO<sub>2</sub> e o O<sub>3</sub>. Observamos uma relação inversa entre o NO<sub>2</sub> de três dias antes da coleta com as células ciliadas, ou seja, enquanto ocorreu um aumento significativo destes poluentes, houve uma diminuição das células ciliadas, e vice-versa (Tabela 6).

**Tabela 6 - Relação entre as células epiteliais ciliadas de indivíduos normais e os poluentes significantes**

POLUENTES	CÉLULAS EPITELIAIS CILIADAS
	CONTROLE
	Z
SO <sub>2</sub> -a	(+) 2,43564
NO <sub>2</sub> LAG3-a	(-) 2,19565
NO <sub>2</sub> LAG3-b	(-) 2,086588
O <sub>3</sub> -a	(+) 2,09337

Z - valor de significância

### 5.3.1.4 Células calciformes

No grupo alérgico, verificamos uma relação positiva entre as células calciformes e o PM10 e SO<sub>2</sub> de cinco dias antes da coleta (Tabela 7).

**Tabela 7 - Relação entre as células epiteliais calciformes de pacientes alérgicos e os poluentes significantes**

POLUENTES	CÉLULAS EPITELIAIS CALCIFORMES
	ALÉRGICOS
	Z
PM10 LAG5-a	(+) 2,28305
PM10 LAG5-b	(+) 2,32357
SO <sub>2</sub> LAG5-a	(+) 2,172702
SO <sub>2</sub> LAG5-b	(+) 2,12538

Z - valor de significância

No grupo normal, constatamos uma relação inversa entre o O<sub>3</sub> dois dias antes da coleta com as células calciformes, ou seja, enquanto ocorreu um aumento significativo destes poluentes, houve uma diminuição das células calciformes, e vice-versa (Tabela 8).

**Tabela 8 - Relação entre as células epiteliais calciformes de indivíduos normais e o poluente significante**

POLUENTES	CÉLULAS EPITELIAIS CALCIFORMES
	CONTROLE
	Z
O <sub>3</sub> LAG2-a	(-) 2,227219
O <sub>3</sub> LAG2-b	(-) 2,14308

Z - valor de significância

### 5.3.2 Método de coloração PAS

No grupo alérgico, observamos uma relação inversa entre PM10, NO<sub>2</sub> e CO um e dois dias antes da coleta com o PAS, ou seja, enquanto ocorreu um aumento significativo destes poluentes, houve uma diminuição do PAS, e vice-versa (Tabela 9).

**Tabela 9- Relação entre o PAS de pacientes alérgicos e os poluentes significantes**

POLUENTES	PÁS
	ALÉRGICOS
	Z
PM10 LAG1-a	(-) 2,3043
PM10 LAG1-b	(-) 2,19572
PM10 LAG2-a	(-) 2,138530
PM10 LAG2-b	(-) 2,31251
NO <sub>2</sub> LAG1-a	(-) 2,86005
NO <sub>2</sub> LAG1-b	(-) 2,71984
NO <sub>2</sub> LAG2-a	(-) 2,27111
NO <sub>2</sub> LAG2-b	(-) 2,46512
CO LAG1-a	(-) 2,6113156
CO LAG1-b	(-) 2,580798
CO LAG2-a	(-) 2,29731
CO LAG2-b	(-) 2,190658

Z - valor de significância

No grupo controle, constatamos uma relação negativa entre o O<sub>3</sub> dois dias antes da coleta e o PAS (Tabela 10).

**Tabela 10 - Relação entre o PAS de indivíduos normais e o poluente significativo**

POLUENTES	PÁS
	ALÉRGICOS Z
O <sub>3</sub> LAG2-b	(-) 2,123694

Z - valor de significância

### 5.3.3 Método de coloração AgNOR

No grupo alérgico, constatamos uma relação positiva entre a expressão de AgNOR e o NO<sub>2</sub> do dia da coleta e o O<sub>3</sub> de seis dias antes da coleta (Tabela 11).

**Tabela 11 - Relação entre o AgNOR de pacientes alérgicos e os poluentes significantes**

POLUENTES	AgNOR
	ALÉRGICOS Z
NO <sub>2</sub> -b	(+) 2,07574
O <sub>3</sub> LAG6-a	(+) 2,119143
O <sub>3</sub> LAG6-b	(+) 2,13921

Z - valor de significância

No grupo controle, verificamos uma relação inversa entre SO<sub>2</sub> cinco dias antes da coleta com a expressão de AgNOR, ou seja, enquanto ocorreu um aumento significativo destes poluentes, houve uma diminuição do AgNOR, e vice-versa (Tabela 12).

**Tabela 12 - Relação entre o AgNOR de indivíduos normais e o poluente significativo**

POLUENTES	AgNOR
	CONTROLE
	Z
SO <sub>2</sub> LAG5-a	(-) 2,13777
SO <sub>2</sub> LAG5-b	(-) 2,02331

Z - valor de significância

### 5.3.4 Resumo das relações significantes dos poluentes com as células

Para melhor visibilização dos resultados, resumimos os dados apresentados acima em uma única tabela (Tabela 13).

**Tabela 13 - Resumo da relação entre as células nasais e os poluentes atmosféricos nos dois grupos**

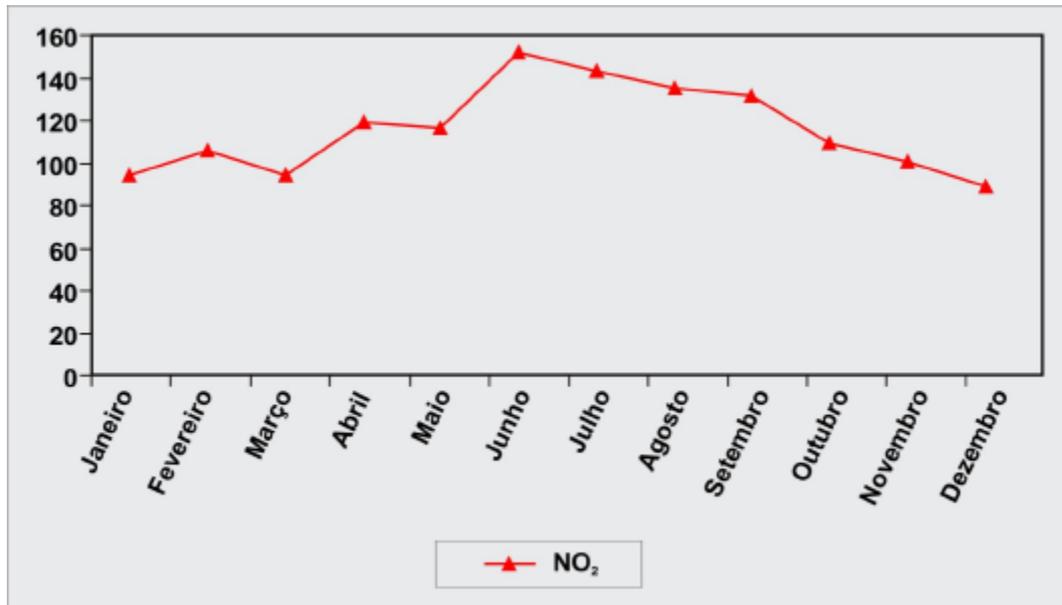
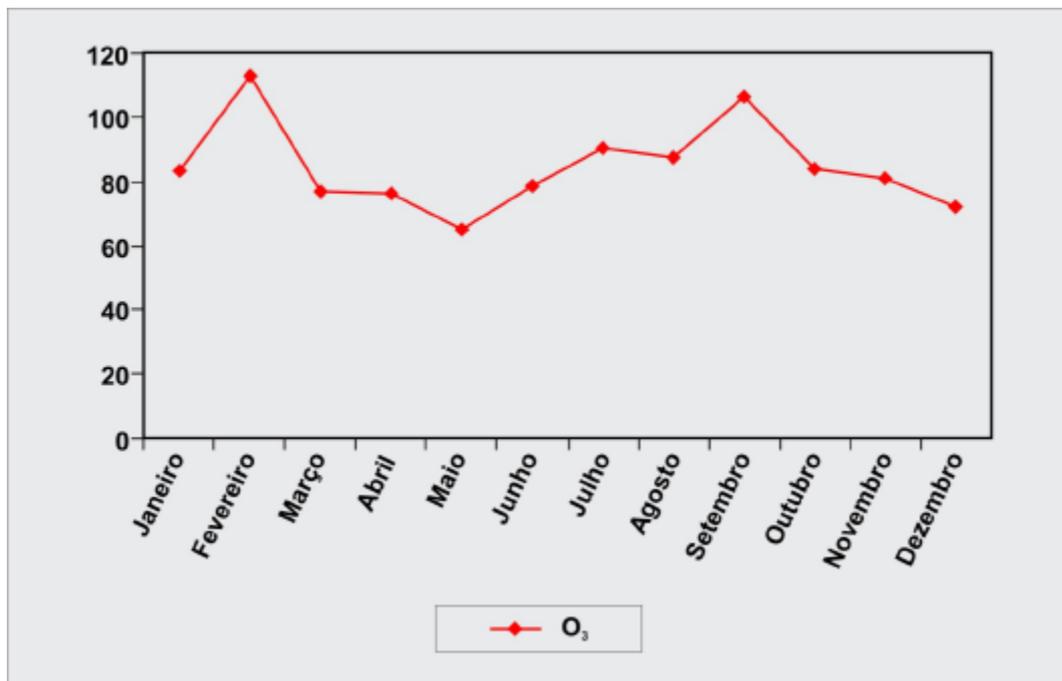
<b>Células</b>	<b>Grupo Alérgico</b>	<b>Grupo Controle</b>
<b>Eosinófilos</b>	(+) PM10 LAG4, (+) CO	(+) O <sub>3</sub> LAG2, (-) O <sub>3</sub> LAG3
<b>Neutrófilos</b>	(+) O <sub>3</sub>	(+) PM10 LAG2, (+) SO <sub>2</sub> LAG2, (+) NO <sub>2</sub> , (+) NO <sub>2</sub> LAG2, (+) O <sub>3</sub> LAG5
<b>Células ciliadas</b>	(-) PM10 LAG5, (-) CO LAG6, (+) O <sub>3</sub>	(+) SO <sub>2</sub> , (+) O <sub>3</sub> , (-) NO <sub>2</sub> LAG3
<b>Células caliciformes</b>	(+) PM10 LAG5, (+) SO <sub>2</sub> LAG5	(-) O <sub>3</sub> LAG2
<b>PAS</b>	(-) PM10 LAG1 e 2, (-) NO <sub>2</sub> LAG 1 e 2, (-) CO LAG 1 e 2	(-) O <sub>3</sub> LAG2
<b>AgNOR</b>	(+) NO <sub>2</sub> , (+) O <sub>3</sub> LAG6	(-) SO <sub>2</sub> LAG5

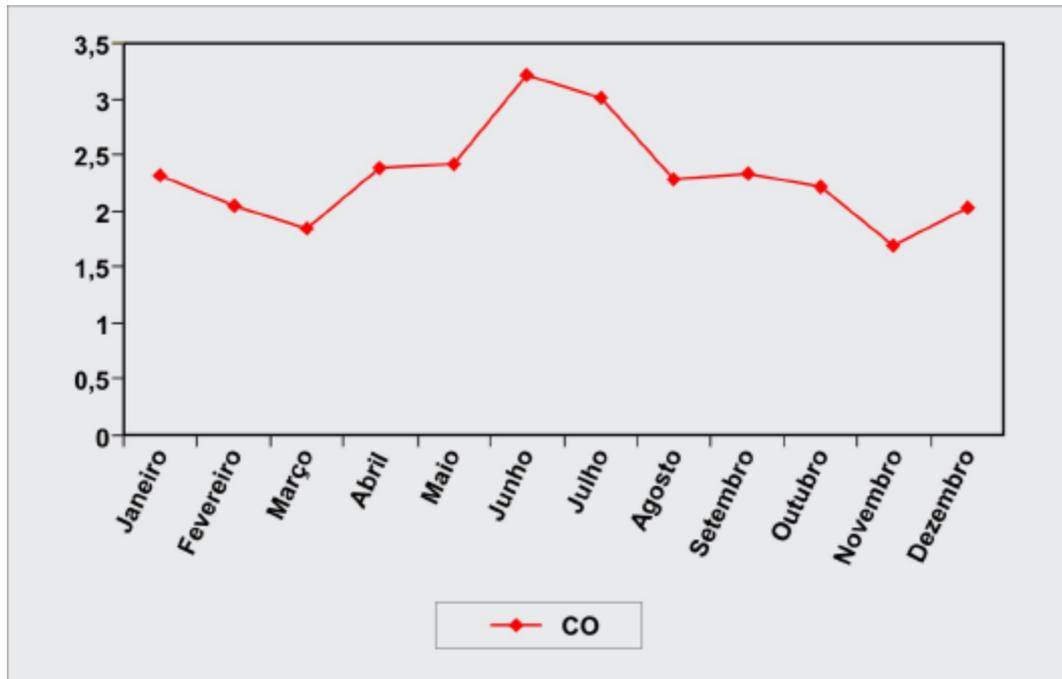
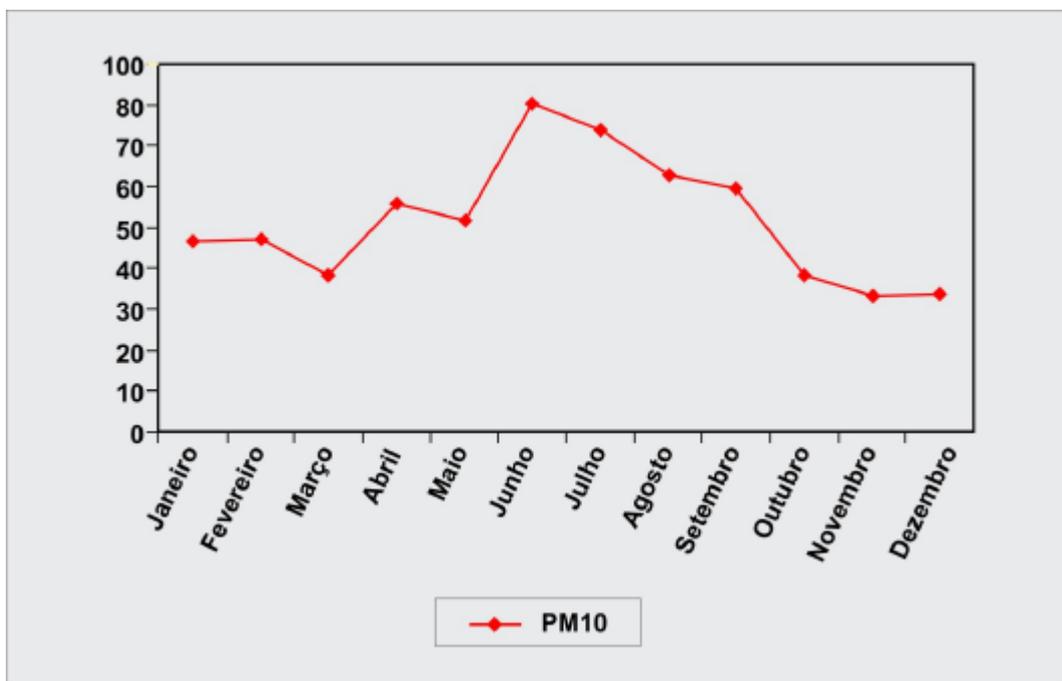
### 5.3.5 Níveis de poluição no ano de 2003

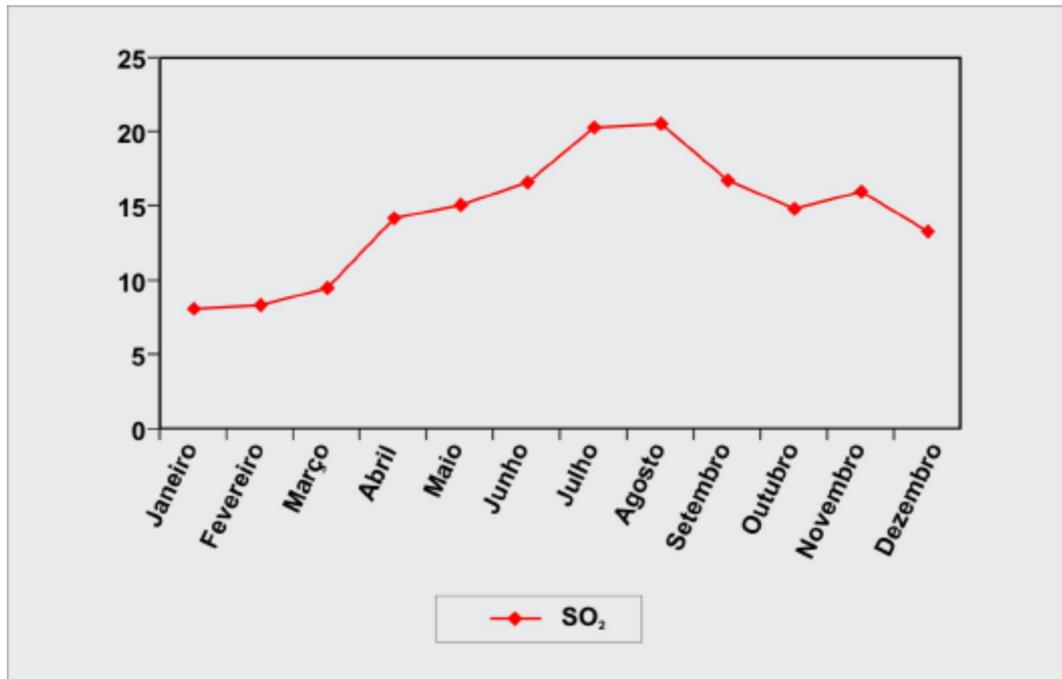
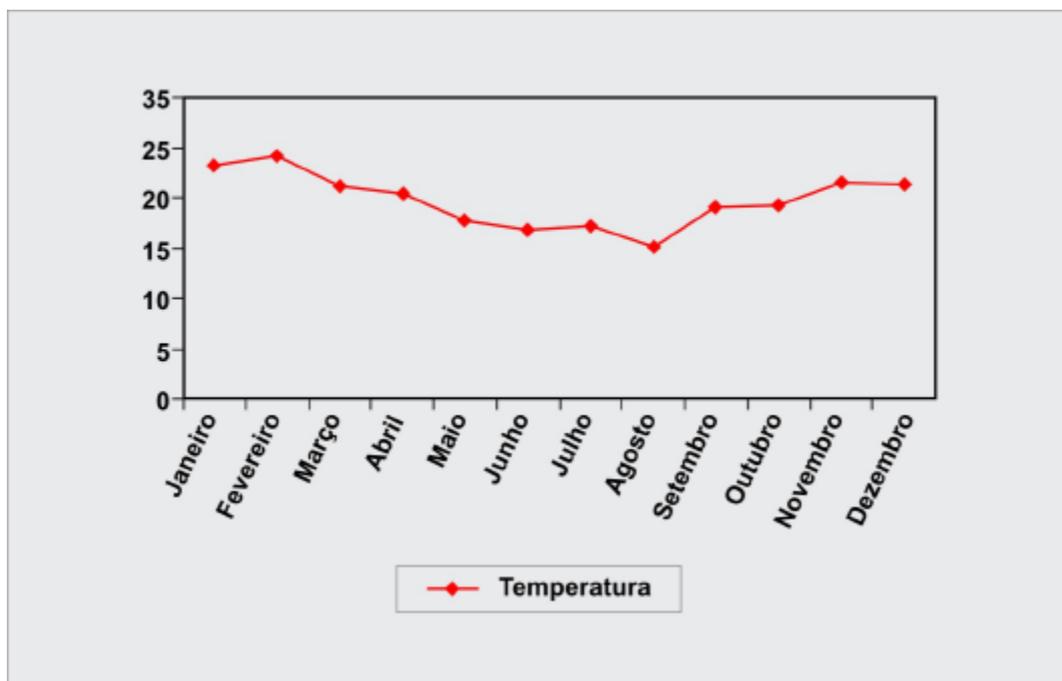
Em 2003, os níveis de poluição, temperatura e umidade do ar estão representados nos Gráficos 10 a 16. Os valores das médias mensais dos poluentes, temperatura e umidade do ar analisados estão descritos no Anexo L.

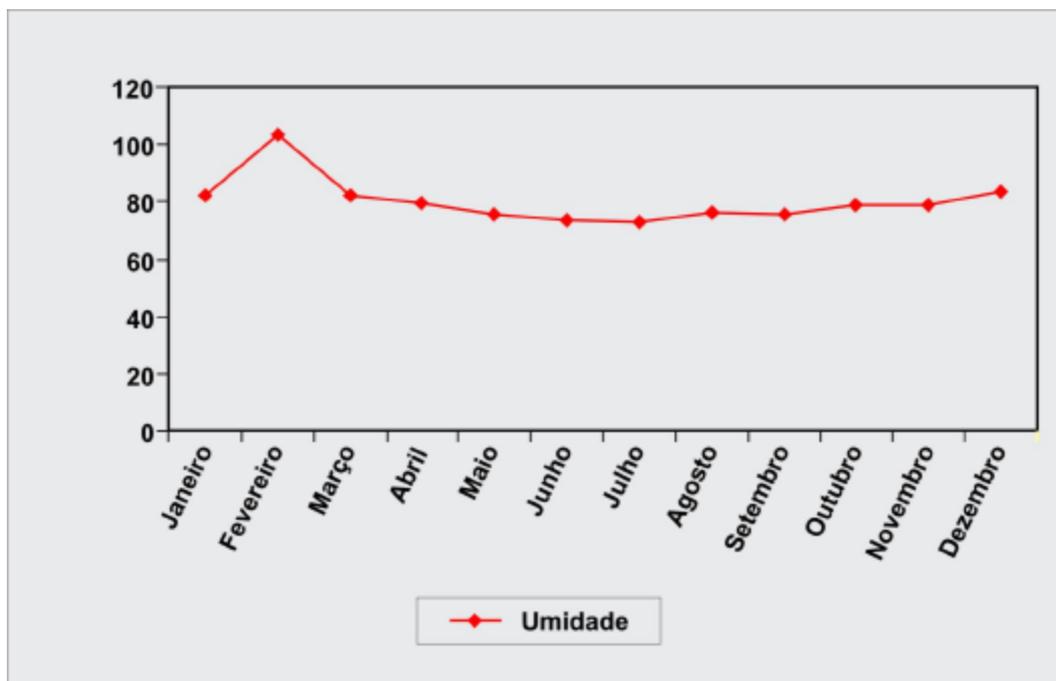
Durante o ano de 2003, os poluentes que ultrapassaram os níveis para boa qualidade do ar foram o PM10, o NO<sub>2</sub>, o O<sub>3</sub>. O PM10 ultrapassou os níveis para boa qualidade do ar em abril, maio, junho, julho, agosto e setembro, com maiores índices nos meses de junho e julho. O NO<sub>2</sub> esteve aumentado na maior parte do ano, nos meses de fevereiro, abril, maio, junho, julho, agosto, setembro, outubro e novembro, com maiores índices de junho a setembro. O O<sub>3</sub> aumentou nos meses de janeiro, fevereiro, julho, agosto, setembro, outubro e novembro, com maiores índices nos meses de janeiro e fevereiro. O SO<sub>2</sub> e o CO estiveram com bons níveis para qualidade do ar durante todo o ano. Esses dados estão representados no Anexo L.

Os níveis de poluentes atmosféricos para boa qualidade do ar da cidade de São Paulo, segundo a CETESB, estão demonstrados no Quadro 3.

**Gráfico 10 - Variação dos níveis de NO<sub>2</sub> durante o ano de 2003****Gráfico 11 - Variação dos níveis de O<sub>3</sub> durante o ano de 2003**

**Gráfico 12 - Variação dos níveis de CO durante o ano de 2003****Gráfico 13 - Variação dos níveis de PM10 durante o ano de 2003**

**Gráfico 14 - Variação dos níveis de SO<sub>2</sub> durante o ano de 2003****Gráfico 15 - Variação dos níveis de temperatura durante o ano de 2003**

**Gráfico 16 - Variação dos níveis de umidade durante o ano de 2003****Quadro 3 - Níveis Atmosféricos para boa qualidade do ar segundo a Cetesb em São Paulo**

Poluentes	Níveis atmosféricos para boa qualidade do ar
SO <sub>2</sub>	0 - 80 µg/m <sup>3</sup>
PM10	0 - 50 µg/m <sup>3</sup>
NO <sub>2</sub>	0 - 100 µg/m <sup>3</sup>
CO	0 - 4,5 ppm
O <sub>3</sub>	0 - 80 µg/m <sup>3</sup>

## **6 DISCUSSÃO**

Os resultados do presente estudo demonstram uma associação entre parâmetros inflamatórios do citológico nasal através dos métodos de coloração Leishman, PAS e AgNOR, de pacientes com rinite alérgica e indivíduos normais, com a exposição a poluentes atmosféricos, no decorrer do ano. Observamos que, no verão, houve um predomínio de eosinófilos no grupo alérgico, enquanto no grupo controle houve um aumento das células ciliadas. No outono, apenas, aumento de neutrófilos no grupo controle. No inverno, ocorreu aumento de neutrófilos no grupo controle e de células caliciformes no grupo alérgico. Na primavera, ocorreu um predomínio de neutrófilos no grupo controle. Em indivíduos normais, encontramos normalmente, no citológico nasal, a presença de células epiteliais com moderado número de neutrófilos, enquanto em indivíduos alérgicos observamos um aumento de eosinófilos (Pelikan e Pelikan-Filipek, 1988, Togias *et al.*, 1988, Pipkorn *et al.*, 1989, Klementsson *et al.*, 1990), basófilos e células caliciformes (Meltzer e Jalowayski, 1991). Por outro lado, em indivíduos com rinite irritativa ocasionada por poluição atmosférica, ocorre um aumento de células caliciformes (Meltzer e Jalowayski, 1991). No presente estudo, os indivíduos do grupo controle expostos à poluição atmosférica da cidade de São Paulo, não apresentaram aumento das células

caliciformes, e sim, das células ciliadas. Isso pode ter ocorrido, porque esses indivíduos não apresentavam clínica de rinite irritativa, decorrente da poluição atmosférica, demonstrando que eles respondem com descamação dessas células, ocasionando o aumento das células ciliadas no citograma nasal. O fato de ter ocorrido um aumento de células caliciformes nos indivíduos alérgicos no inverno pode ser considerado como um sinal de defesa, por produzirem muco para proteção do epitélio.

Nossos resultados mostraram, ainda, que, quando comparamos os pacientes entre eles mesmos, nas diferentes estações do ano, observamos uma diferença significativa das células ciliadas e do PAS no grupo controle, enquanto no grupo alérgico, apenas, do PAS. Nos pacientes alérgicos, encontramos uma importante relação do material particulado com os eosinófilos e com as células caliciformes, através dos métodos Leishman, PAS e AgNOR, sugerindo que o PM10 estaria agindo como fator de amplificação da reação inflamatória alérgica. Diferentemente dos alérgicos, os indivíduos normais apresentaram uma relação dos neutrófilos e das células ciliadas com um maior número de poluentes, destacando-se o O<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>, PM10 e o NO<sub>2</sub>. Quando avaliamos o efeito da temperatura e/ou da umidade do ar, não encontramos relação significativa com os parâmetros inflamatórios. Esses dados estão de acordo com Gluck e Gebbers (1996) que, também, não observaram mudanças na celularidade nasal decorrentes da exposição ao ar frio.

Em nossos resultados, observamos uma seqüência de alterações celulares em pacientes alérgicos, logo após a exposição do PM10,

desencadeando-se um processo inflamatório semelhante à cascata da inflamação na rinite alérgica. Ocorreria inicialmente uma agressão das células epiteliais caliciformes, representada pelo aumento das mesmas, que levaria a uma liberação de citocinas e quimocinas, promovendo a migração de eosinófilos para a mucosa nasal. Este aumento de células caliciformes ocorre, justamente, para defesa do organismo contra o agente irritante, produzindo maior quantidade de muco, diminuindo a penetração de partículas na mucosa respiratória. Neste estudo, observamos que, primeiro (dois dias após a exposição ao poluente) ocorreu uma diminuição da produção de muco, e três dias após, ela aumenta. À medida que o número de células caliciformes aumentava, para produzir mais muco, as células ciliadas diminuía, levando a uma inversão de padrão de células epiteliais do citograma nasal normal. Os indivíduos normais responderam ao agente agressor com o aumento das células ciliadas e a diminuição das células caliciformes, enquanto que no indivíduo alérgico constatamos um aumento das células caliciformes e maior produção de muco, até mesmo, por ele já possuir um maior número de células caliciformes. Os resultados de Miyabara *et al.* (1998), Fujieda *et al.* (1998) e Devalia *et al.* (1999) corroboram os nossos achados, quando afirmam que as partículas da combustão de diesel podem desencadear o aumento da inflamação alérgica devido ao aumento de células epiteliais.

Quando ocorre qualquer processo inflamatório, as células inflamatórias alérgicas (eosinófilos) circulantes necessitam de receptores no endotélio dos vasos do tecido agredido para se ligarem, que são chamados de moléculas de

adesão, destacando-se o ICAM-1 e o VCAM-1 (molécula de adesão da célula vascular). O aumento de ICAM-1, resultante da exposição ao PM10, foi relatado por Bayram *et al.* (1998). As moléculas de adesão são expressas no endotélio pela estimulação de citocinas produzidas e liberadas pelas células teciduais. Tanto a liberação de IL-8 e RANTES, do epitélio respiratório e dos mastócitos, que promovem a migração e o acúmulo de eosinófilos na mucosa nasal, quanto a produção de GM-CSF, que tem importância para eosinofilia tecidual na rinite alérgica, podem ser estimuladas por material particulado (Ohtoshi *et al.*, 1998). Takizawa *et al.* (1999) demonstraram que o PM10 induziu a produção de IL-8, regulada em nível transcripcional e, também, a expressão genética de eotaxina, liberadas pelas células epiteliais (Takizawa *et al.*, 2003), embora outros autores discordem dessa observação (Bommel *et al.*, 2003). Sabemos que as eotaxinas, produzidas e liberadas pelas células epiteliais, estão envolvidas no processo de diapedese e quimiotaxia dos eosinófilos pela mucosa nasal. Esses fatores quimiotáticos, assim como as moléculas de adesão, são proteínas que, quando elevadas, levam a um aumento da expressão de AgNOR. No entanto, não encontramos aumento de AgNOR desencadeado pelo material particulado. Imediatamente após a exposição do NO<sub>2</sub>, houve uma relação positiva com o AgNOR, ou seja, um aumento de AgNOR, que representa a capacidade de as células epiteliais sintetizarem proteínas, levando a um aumento da atividade inflamatória, como discutiremos posteriormente.

Sabemos que as células do epitélio respiratório representam a primeira defesa contra os agentes poluentes nocivos, incluindo o material particulado, do qual 50% fica retido nas fossas nasais gerando diversas alterações e sendo

ainda responsável pela liberação de citocinas como a IL-8, potente fator de atração de neutrófilos (Marano *et al.*, 2002). Em indivíduos normais, ocorreu uma relação positiva entre os neutrófilos e o PM10 LAG2; deste modo, observamos um aumento de neutrófilos dois dias após a exposição ao PM10. Nossos resultados estão em concordância com Salvi *et al.* (1999 e 2000) que também observaram um aumento de neutrófilos e mediadores inflamatórios em voluntários saudáveis, expostos ao PM10.

Nossos achados estão de acordo com Fireman *et al.* (2004) que encontraram um aumento de neutrófilos em indivíduos sem doença respiratória, após a exposição a uma grande quantidade de PM10. Entretanto encontraram também um aumento de eosinófilos, dados que contrastam com nossos resultados. Os referidos autores, talvez, tenham encontrado esse aumento de eosinófilos devido à quantidade excessiva de material particulado durante uma grande demolição, levando a um efeito agudo, enquanto nossos pacientes eram expostos, cronicamente, ao material particulado.

Em indivíduos normais, a mucosa nasal é composta por um epitélio do tipo pseudo-estratificado cilíndrico ciliado, composto, principalmente, por células epiteliais ciliadas e caliciformes (Dolci *et al.*, 1998). Em resposta às agressões como poeira ambiental, infecções, traumas e alterações da temperatura e da umidade do ar, o epitélio respiratório secreta citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  que promovem a quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos, proliferação de células epiteliais e liberação de metabólitos do ácido aracídico, com aumento da síntese protéica.

Riechelmann *et al.* (2004) observaram uma atração de neutrófilos provocada pelo aumento de IL-1, IL-6 e IL-8 após a exposição de material particulado em indivíduos saudáveis, corroborando os nossos resultados.

Polat *et al.* (2002) observaram um aumento de células epiteliais e IL-8, em lavado nasal de indivíduos normais expostos a uma mistura de poluentes. Como não encontramos trabalhos sobre a ação do CO na mucosa nasal, podemos considerar a associação de diversos poluentes como parâmetro de comparação com os nossos resultados, pois não devemos esquecer que pode haver uma interação entre os poluentes, tornando-os mais tóxicos (Trevino *et al.* 1996). Saldiva *et al.* (1992) observaram um aumento da viscosidade do muco, pelo aumento de sulfomucinas, em ratos expostos aos diversos poluentes da cidade de São Paulo, incluindo o CO. Nossos achados mostraram uma diminuição da produção de muco, expresso pelo PAS, um dia após a exposição do CO em pacientes alérgicos, diferentemente dos resultados de Saldiva *et al.*, talvez por eles não terem diferenciado seus pacientes em grupos alérgicos e normais, enquanto nós encontramos esses dados nos pacientes alérgicos que responderam diferentemente à agressão do monóxido de carbono. Além disso, encontramos uma associação positiva entre os eosinófilos e o CO no dia da coleta, ou seja, logo após a exposição ao poluente houve um aumento dos eosinófilos, no mesmo dia. Seis dias após a exposição ao CO, observamos uma relação negativa com as células ciliadas, ou seja, quando o CO aumenta, ocorre uma diminuição das células ciliadas. Sabemos que o estresse oxidativo, produzido pelos poluentes, leva a uma ativação de citocinas que podem atrair células inflamatórias para a

mucosa nasal. Acreditamos que ocorreu uma interação entre os poluentes atmosféricos e não o efeito do CO isolado, visto que o CO age competindo com a hemoglobina, causando dano tecidual apenas quando seus níveis estão altíssimos.

O SO<sub>2</sub>, por ficar 100% retido na mucosa nasal, gera inflamação aguda da mesma (Sandström *et al.*, 1989), interferindo na ação da barreira mucociliar por meio da diminuição da secreção nasal e do aumento significativo da resistência da via aérea superior (Peden *et al.* 1995). Nossos resultados demonstraram aumento de células inflamatórias (neutrófilos) em indivíduos normais dois dias após a exposição ao SO<sub>2</sub>. Dados semelhantes foram encontrados por Sandström *et al.* (1989) com pequenas particularidades, já que eles encontraram um aumento de processo inflamatório às custas de linfócitos, macrófagos e mastócitos. Observamos, ainda, um aumento das células ciliadas em indivíduos normais após a exposição ao SO<sub>2</sub>, com uma diminuição de AgNOR cinco dias após. Se considerarmos que, quando as células ciliadas aumentam, as células caliciformes diminuem, a interpretação dessa diminuição de AgNOR poderia ser devido à diminuição das células caliciformes, levando a uma menor produção de muco. Por outro lado, no grupo alérgico, observamos um aumento das células caliciformes cinco dias após a exposição de SO<sub>2</sub>, o que levaria a uma maior produção de muco, interferindo na barreira mucociliar e justificaria o padrão hipersecretor encontrado no indivíduo alérgico.

Não encontramos estudos sobre a associação de SO<sub>2</sub> com o AgNOR, entretanto Mello Jr. (1998) observou uma diminuição da síntese protéica nas

células epiteliais e nas glândulas mucosas de ratos expostos cronicamente ao material particulado, através da técnica de AgNOR. Esses resultados são semelhantes ao do nosso estudo, quando relacionamos o AgNOR com o SO<sub>2</sub>, porém não encontramos relação com o material particulado. Acreditamos que essas diferenças tenham ocorrido porque estamos avaliando indivíduos expostos às elevações agudas dos poluentes, enquanto que o referido autor observou o efeito crônico da poluição, sugerindo um fenômeno de adaptação e tolerância ao poluente.

Existem poucos estudos sobre os efeitos deletérios do NO<sub>2</sub> na mucosa nasal. Sandström *et al.* (1991) encontraram um aumento de linfócitos e mastócitos no lavado brônquico de indivíduos fumantes, após a exposição ao NO<sub>2</sub>, não constatando aumento significativo de neutrófilos e células epiteliais. Esses resultados contrastam com os nossos achados, onde observamos, primeiramente, um aumento de neutrófilos (dois dias após), e em seguida uma diminuição das células ciliadas (três dias após). Podemos supor que houve uma agressão à célula epitelial, seguida da atração de neutrófilos e que essa agressão, com o passar do tempo, produzia dano celular (célula ciliada). Essas diferenças podem ter ocorrido pelo fato de 40% do NO<sub>2</sub> ficarem retidos na cavidade nasal, o que gerou nossos achados, enquanto o estudo de Sandström *et al.* (1991) foi realizado com lavado brônquico, possivelmente, sendo absorvida uma menor quantidade do poluente, gerando uma menor resposta inflamatória. Encontramos, ainda, uma diminuição da expressão de mucina (através do PAS) após um dia do aumento do NO<sub>2</sub> no indivíduo alérgico. Esse padrão de inversão persistiu até o segundo

dia da exposição. Os achados de Hussain *et al.* (2004) corroboram os nossos resultados, quando constataram uma redução na expressão de mucina pela célula caliciforme, com a técnica de PAS (no lavado brônquico de ratos sensibilizados com ovalbumina) devido ao longo tempo de exposição ao NO<sub>2</sub>.

Em nossos resultados, o aumento de O<sub>3</sub> causou uma elevação de células ciliadas e de neutrófilos em pacientes alérgicos. Seis dias após a exposição ao ozônio, ocorreu um incremento na expressão de AgNOR. Concordamos com Bascom *et al.* (1990) quando afirmam que o ozônio induziu um aumento de neutrófilos nas vias aéreas nasais de indivíduos com rinite alérgica, entretanto, não encontramos associação entre os eosinófilos e o O<sub>3</sub> como nesse estudo. Sabemos apenas, que este aumento ocorreu nas 24 horas de exposição, visto que, nosso estudo não foi laboratorial, com uma quantidade controlada de ozônio. Não encontramos nenhum estudo a respeito dos efeitos do O<sub>3</sub> na mucosa nasal utilizando a técnica de AgNOR como marcador inflamatório, porém sabemos que o AgNOR avalia a síntese protéica da célula, seja ela para produzir muco, ou aumento de processo inflamatório. No indivíduo alérgico, podemos pressupor que haveria maior síntese protéica, demonstrada pela tendência ao aumento de AgNOR, representado por maior processo inflamatório, visto que observamos uma elevação de células ciliadas e neutrófilos.

Nichols *et al.* (2001) encontraram um aumento de citocinas, como o TNF- $\alpha$ , 16 horas após a exposição ao O<sub>3</sub>, o que levou a um aumento de atividade inflamatória das vias aéreas. Considerando que essas citocinas são proteínas, podemos afirmar que, se esses autores tivessem utilizado a

técnica de AgNOR para medir atividade inflamatória em alérgicos, possivelmente encontrariam um aumento de AgNOR, após a exposição ao O<sub>3</sub>, em concordância com os nossos resultados.

Nossos resultados contrapõem-se aos achados de Ball *et al.* (1996) e de Kehrl *et al.*(1999) que encontraram um aumento tardio de eosinófilos na secreção brônquica de pacientes alérgicos, após a exposição ao ozônio, talvez por esses autores controlarem os valores do ozônio (*in vitro*) ou porque, em nosso estudo, avaliamos a secreção nasal ao invés da brônquica, apesar do conceito de vias aéreas unidas.

Nossos resultados diferem dos de Peden *et al.* (1995 e 1997) ao descreverem uma associação entre a exposição ao ozônio e o influxo de eosinófilos em pacientes alérgicos, visto que, em nossos pacientes, essa associação existiu após a exposição com o material particulado. Questionamos se isso ocorreu apenas pelos altos níveis de ozônio controlado em laboratório, no estudo em questão, enquanto, no nosso estudo, avaliamos o paciente exposto ao ozônio atmosférico, sujeito às variações atmosféricas periódicas, o que poderia inibir esse recrutamento de eosinófilos.

Nossos achados estão em concordância com os de Hiltermann *et al.* (1997), quando referem ter encontrado um aumento de neutrófilos e de células epiteliais, após a exposição ao ozônio, poluente mais elevado em seu estudo. Entretanto são diferentes desses autores ao relatarem uma associação entre níveis altos de ozônio e aumento de eosinófilos. Em nosso estudo, encontramos o aumento de eosinófilos em associação com o

material particulado, diferente dos autores em questão, que não encontraram associação entre o PM10 e parâmetros inflamatórios, exceto pelas células epiteliais. Nightingale *et al.* (1999) também afirmam uma elevação de neutrófilos, uma hora após a exposição ao O<sub>3</sub>, contribuindo para os nossos resultados que sugerem que o O<sub>3</sub> atue como agente desencadeador da reação inflamatória nasal.

Nossos resultados são semelhantes aos de Schierhorn *et al.* (1997) ao afirmarem que o ozônio provoca aumento dos neutrófilos, porém são diferentes quando referem aumento de eosinófilos e monócitos na mucosa nasal de pacientes alérgicos. O estudo desses autores foi realizado *in vitro*, em uma situação com variáveis manipuláveis (concentração de O<sub>3</sub>), enquanto nosso estudo avaliou os níveis de O<sub>3</sub> da atmosfera com a interferência de outros fatores ambientais, às vezes até impossíveis de mensurar, mas é indiscutível seu valor, pois ele representa a análise de um fato que realmente está acontecendo.

Nossos resultados se opõem aos achados de Michelson *et al.* (1999) quando relatam que o ozônio aumenta a resposta da fase tardia para o alérgeno nasal, visto que não encontramos aumento de eosinófilos após a exposição ao ozônio, em pacientes alérgicos. Apesar de encontrarmos os maiores níveis de eosinófilos e de O<sub>3</sub> em separado, no verão, não constatamos diferença significativa entre eles. Encontramos essa associação dos eosinófilos, apenas, com o material particulado, talvez pela capacidade de agregar, em sua estrutura, outras substâncias, tais como antígenos alergênicos.

Nossos resultados estão de acordo com Newson *et al.* (2000) quando inferem um aumento de neutrófilos em pacientes alérgicos, após seis horas de exposição ao ozônio e também por não terem encontrado associação entre o O<sub>3</sub> e os eosinófilos. Entretanto, diferentemente dos nossos resultados, eles observaram uma diminuição das células ciliadas, talvez por terem estudado em lavado brônquico, enquanto nós estudamos em citológico nasal. É interessante comentarmos que, apesar do conceito atual de vias aéreas unidas, encontramos algumas diferenças na resposta inflamatória das vias aéreas superiores e inferiores. As vias aéreas inferiores estão sujeitas a danos teciduais permanentes (fenômeno de remodelamento) ocorrendo, ainda, uma correlação importante entre o aumento da hiper-reatividade brônquica e um maior número de eosinófilos, fatos que não ocorrem nas vias aéreas superiores.

Nossos achados contrapõem-se aos resultados de Depuydt *et al.* (2002) e Wagner *et al.* (2002) que constataram um aumento de eosinófilos nas vias aéreas em ratos sensibilizados com ovalbumina, após a exposição ao O<sub>3</sub>. Entretanto Wagner *et al.* (2002) observaram um aumento de células epiteliais ciliadas nasais semelhantes aos nossos resultados, demonstrando que as células epiteliais de ratos e humanos são agredidas da mesma forma, porém desencadeiam um tipo de resposta inflamatória diferente.

Em indivíduos normais, observamos que o poluente mais agressivo foi o O<sub>3</sub>. Dois dias após a exposição a esse gás, houve uma relação positiva com os eosinófilos, ou seja, um aumento de eosinófilos, e um dia após, uma relação negativa, ou seja, começavam a diminuir. Constatamos uma relação

positiva entre os neutrófilos e o O<sub>3</sub> LAG5, ou seja, um aumento de neutrófilos, cinco dias após a exposição ao O<sub>3</sub>. Logo após o aumento do O<sub>3</sub>, ocorreu relação positiva com as células ciliadas, ou seja, um aumento dessas células. Dois dias após a exposição ao O<sub>3</sub>, houve uma relação negativa com as células caliciformes, ou seja, elas diminuíram em número, juntamente com a redução da produção de muco, pela mesma, constatada pelo PAS. De acordo com a fisiopatologia da rinite, observamos que, após a exposição ao agente irritante, ocorre um aumento das células epiteliais como mecanismo de defesa. No caso de indivíduos normais, eles responderam ao agente agressor com o aumento de células ciliadas e diminuição das células caliciformes. Curiosamente, ocorreu uma atração de eosinófilos no indivíduo normal, após dois dias de exposição ao O<sub>3</sub>. No indivíduo normal, já é esperado que o neutrófilo, atraído pela IL-8, seja o marcador de qualquer processo inflamatório, incluindo nesse a exposição ao O<sub>3</sub>. Fato que pudemos comprovar com nossos resultados, quando ocorreu sua elevação, cinco dias após a exposição ao O<sub>3</sub>.

Nossos resultados estão de acordo com Leikauf *et al.* (1995), quando inferem que as células epiteliais das vias aéreas constituem um importante alvo para injúria do O<sub>3</sub>, visto que encontramos um aumento das células ciliadas e uma diminuição das células caliciformes com baixa produção de muco, após 24 horas de exposição. Entretanto, em nosso estudo, não aferimos mediadores inflamatórios dessas células. Encontramos um aumento de eosinófilos, tardiamente, em associação com a exposição do ozônio, em indivíduos normais, como os autores descrevem, o que poderia

inferir ser um sinal indireto do aumento de mediadores, suficiente para desencadear a elevação do número dessas células.

O aumento dos leucócitos, como neutrófilos e eosinófilos, nos indivíduos normais, após a exposição ao ozônio, também foi observado por Steerenberg *et al* (1996) que encontraram um aumento de mediadores inflamatórios, tais como a proteína catiônica eosinofílica, em indivíduos normais, expostos ao ozônio. Os neutrófilos são atraídos em qualquer processo inflamatório do nosso organismo, diferentemente dos eosinófilos, que são células inflamatórias, envolvidas na reação alérgica. O incremento de eosinófilos encontrados nos indivíduos do grupo controle foi inferior a 10%, considerado normal por alguns autores (Howarth *et al.*, 2005). Encontramos uma elevação de eosinófilos no grupo alérgico em relação ao grupo controle no verão e forte tendência no inverno, exceto na primavera e no outono quando seus níveis diminuíram e ficaram iguais aos dos indivíduos do grupo controle.

Nossos resultados estão de acordo com os achados de Morales *et al.* (1998) que mostraram que altos níveis de ozônio levam a um aumento de células inflamatórias nasais. No entanto, esses autores encontraram anormalidade das células caliciformes, enquanto nós observamos, apenas, uma diminuição das mesmas, pois avaliamos as células apenas quantitativamente.

Nossos achados concordam com os resultados de Kopp *et al.* (1999), nos quais encontraram um aumento da atividade inflamatória, representado pela elevação de leucócitos e eosinófilos, visto que houve um aumento da proteína C catiônica encontrada nos grânulos dos eosinófilos.

Nossos achados são semelhantes aos de Calderon-Garciduenas *et al.* (2001) que encontraram alterações nas células ciliadas e caliciformes, através de biópsia nasal, em crianças expostas ao O<sub>3</sub>, PM10 e aldeídos. Entretanto, observamos apenas alterações dessas células em relação ao número e não à forma, além disso, não realizamos um estudo histopatológico. Assim como Polosa *et al.* (2004), observamos uma elevação de neutrófilos na mucosa nasal de indivíduos saudáveis, expostos ao O<sub>3</sub>.

No presente estudo, demonstramos que a elevação aguda dos níveis de poluentes, na cidade de São Paulo, resulta em mudanças na celularidade nasal, com variações distintas, de acordo com a época do ano e com a sensibilidade de cada indivíduo. Pudemos observar que o indivíduo alérgico reage de maneira diferente do indivíduo normal, tanto em relação aos tipos celulares encontrados no citológico, quanto ao tipo de poluente. Constatamos que o PM10, foi o poluente que mais desencadeou alterações inflamatórias na mucosa nasal de pacientes alérgicos, enquanto que nos indivíduos normais, existiu um maior espectro de poluentes ocasionando inflamações, com predominância do O<sub>3</sub>. Para esclarecermos o porquê dessas diferentes respostas, entre indivíduos alérgicos e normais, decorrentes dos efeitos dos poluentes, necessitamos de estudos que demonstrem a relação entre os mediadores inflamatórios e células nasais, expostas cronicamente aos diversos poluentes nos indivíduos alérgicos e normais, comparando com os mesmos grupos de indivíduos que residam em um local sem poluição atmosférica.

## **7 CONCLUSÕES**

O acompanhamento do citograma nasal de indivíduos expostos cronicamente a poluentes atmosféricos demonstrou:

a) Nos pacientes com rinite alérgica:

- Aumento de eosinófilos no verão e de células caliciformes no inverno;
- Ausência de hipersecreção de muco pelas células caliciformes;
- A expressão de AgNOR nas células epiteliais foi indiferente.

b) Nos indivíduos sem rinite:

- Elevação de células ciliadas no verão e de neutrófilos no outono, inverno e primavera;
- Ausência de hipersecreção de muco pelas células caliciformes;
- A expressão de AgNOR nas células epiteliais foi indiferente.

c) O poluente que mais influenciou o citograma nasal, no grupo alérgico, foi o material particulado.

d) O poluente que mais influenciou o citograma nasal, no grupo controle, foi o ozônio.

e) A temperatura e umidade relativa do ar não interferiram no citograma nasal nas diferentes estações.

## **8 ANEXOS**

**ANEXO A****Tempo de restrição para uso de medicamentos**

<b>Medicação</b>	<b>Tempo sem a sua utilização antes da primeira visita</b>
Cromoglicato de sódio ou nedocromil (todas as formas)	2 semanas
Corticosteróide - nasal, ocular, inalatório, oral, intravenoso, retal	1 mês
Corticosteróide - intramuscular ou intra-articular	3 meses
Corticosteróide tópico de uso na pele	14 dias
Anti-histamínico via oral	14 dias
Cetotifeno	10 dias
Azelastina e levocabastina	2 semanas
Descongestionante ou anti-inflamatório nasal, oral ou ocular	3 dias
Atropina nasal ou brometo de ipatrópio	1 semana
Antibiótico sistêmico (qualquer forma)	15 dias
Imunoterapia	2 anos
Anti-leucotrienos: montelukast	10 dias
Drogas investigacionais	30 dias

**ANEXO B****Antígenos inalatórios testados**

Ácaros	<ul style="list-style-type: none"><li>- <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i></li><li>- <i>Dermatophagoides farinae</i></li><li>- <i>Blomia tropicalis</i></li></ul>
Fungos	<ul style="list-style-type: none"><li>- <i>Alternaria alternata</i></li><li>- <i>Cladosporium herbarum</i></li><li>- <i>Aspergillus fumigatus</i></li></ul>
Baratas	<ul style="list-style-type: none"><li>- <i>Blatella germanica</i></li><li>- <i>Periplaneta americana</i></li></ul>
Antígenos animais	<ul style="list-style-type: none"><li>- <i>Canis familiaris</i></li><li>- <i>Felis domesticus</i></li></ul>
Pólen	<ul style="list-style-type: none"><li>- <i>Phleum pratense</i></li><li>- <i>Lolium perenne</i></li><li>- <i>Dactylis glomerata</i></li><li>- <i>Festuca pratensis</i></li></ul>

**ANEXO C****Dados dos pacientes do grupo alérgico**

Paciente	idade	profissão	Teste Cutâneo
1A	28	médica	Blomia tropicalis, Dermatophagoides pteronyssinus, Felis domesticus
2A	29	médico	Dermatophagoides pteronyssinus
3A	38	secretária	Dermatophagoides pteronyssinus
4A	31	fonoaudióloga	Blomia tropicalis, Dermatophagoides pteronyssinus, Felis domesticus
5A	40	médico	Dermatophagoides pteronyssinus
6A	27	fonoaudióloga	Blomia tropicalis, Dermatophagoides pteronyssinus, Canis familiaris
7A	28	médica	Blomia tropicalis, Dermatophagoides pteronyssinus, Felis domesticus
8A	28	médica	Blomia tropicalis, Dermatophagoides pteronyssinus
9A	31	médica	Blomia tropicalis
10A	27	advogado	Blomia tropicalis, Dermatophagoides pteronyssinus
11A	25	estudante	Blomia tropicalis, Dermatophagoides pteronyssinus

**ANEXO D****Dados dos indivíduos do grupo controle**

Paciente	idade	profissão	Teste Cutâneo
1C	25	fonoaudióloga	negativo
2C	31	babá	negativo
3C	37	médica	negativo
4C	32	fonoaudióloga	negativo
5C	50	fonoaudióloga	negativo
6C	26	médica	negativo
7C	41	médica	negativo
8C	25	estudante	negativo
9C	30	secretária	negativo
10C	37	médico	negativo
11C	30	médica	negativo
12C	28	médica	negativo

## **ANEXO E**

### **Coloração LEISHMAN**

A solução de Leishman foi preparada pela mistura de 2,5g de corante de Leishman em pó com 1000 ml de álcool metílico p.a. (metanol puro ou 99,8%), seguida de uma espera de um mês para envelhecimento antes do uso.

Duas lâminas foram cobertas com o corante Leishman durante cinco minutos, diluído em água tamponada, esperando 15 a 20 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas para secar em temperatura ambiente.

### **Coloração PAS**

As lâminas foram fixadas com álcool metílico p.a. por cinco minutos, lavadas em água corrente, cobertas com ácido periódico a 1% por 15 minutos e lavadas novamente em água corrente. A seguir foram colocadas numa placa de Petri, cobertas com reativo de Schiff e colocadas numa estufa  $37^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Após a retirada da estufa, as lâminas foram mergulhadas rapidamente em água sulfurosa (1,0 g de Bissulfito de sódio, 100ml de água destilada, 1,0 ml de ácido clorídrico (HCL) concentrado), lavadas em água corrente e secas em temperatura ambiente. As lâminas foram coradas com hematoxilina por 20 minutos, lavadas em água corrente e secas em temperatura ambiente. A última etapa foi mergulhar as lâminas rapidamente em carbonato de lítio e novamente lavá-las em água corrente, deixando-as secar em temperatura ambiente.

### **Coloração AgNOR**

Utilizamos a técnica de PLOTON modificada, adotada pelo Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Ploton *et al.*, 1986). As lâminas foram fixadas em mistura ácido acético/etanol 1:3 durante 30 minutos à temperatura de  $56^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ , lavadas em água corrente e colocadas por 20 minutos em água

destilada. Em seguida, foram incubadas em mistura de gelatina a 2% + ácido fórmico a 1% com nitrato de prata a 50% num coplin por 45 minutos em ambiente escuro. Em seguida foram mergulhadas rapidamente em tiosulfato de sódio a 5% e lavadas imediatamente em água corrente, secando à temperatura ambiente.

## ANEXO F

## Análise do Método Leishman nos grupos Controle e Alérgico no verão

Variável	Grupos	Posto Médio	Significância (p)
Leucócitos Totais	Controle	12,08	0,951
	Alérgico	11,91	
Neutrófilos	Controle	12,75	0,580
	Alérgico	11,18	
Eosinófilos	Controle	8,42	<b>0,007*</b>
	Alérgico	15,91	
Basófilos	Controle	11,50	0,296
	Alérgico	12,55	
Linfócitos	Controle	10,83	0,389
	Alérgico	13,27	
Monócitos	Controle	10,63	0,292
	Alérgico	13,50	
Mastócitos	Controle	12,00	> 0,999
	Alérgico	12,00	
Células Epiteliais Totais	Controle	11,88	0,926
	Alérgico	12,14	
Células Planas	Controle	10,54	0,281
	Alérgico	13,59	
Células Ciliadas	Controle	15,13	<b>0,021*</b>
	Alérgico	8,59	
Células Caliciformes	Controle	9,88	0,116
	Alérgico	14,32	

\*estatisticamente significante; Posto médio = média artificial utilizada em testes não-paramétricos, ou a posição do número em relação ao outro

## ANEXO G

Análise do método Leishman nos grupos controle(1) e alérgicos(2) no outono

Variável	Grupos	Posto Médio	Significância (p)
Leucócitos Totais	Controle	12,63	0,643
	Alérgico	11,32	
Neutrófilos	Controle	15,00	<b>0,027*</b>
	Alérgico	8,73	
Eosinófilos	Controle	11,08	0,485
	Alérgico	13,00	
Basófilos	Controle	10,50	<b>0,058**</b>
	Alérgico	13,64	
Linfócitos	Controle	10,25	0,196
	Alérgico	13,91	
Monócitos	Controle	13,21	0,350
	Alérgico	10,68	
Mastócitos	Controle	12,00	> 0,999
	Alérgico	12,00	
Células Epiteliais Totais	Controle	11,38	0,643
	Alérgico	12,68	
Células Planas	Controle	12,54	0,687
	Alérgico	11,41	
Células Ciliadas	Controle	13,58	0,241
	Alérgico	10,27	
Células Caliciformes	Controle	9,92	0,123
	Alérgico	14,27	

\*estatisticamente significativa; \*\* forte tendência; Posto médio = média artificial utilizada em testes não-paramétricos, ou a posição do número em relação ao outro

## ANEXO H

## Análise do método Leishman nos grupos controle(1) e alérgicos(2) no inverno

Variável	Grupo	Posto Médio	Significância (p)
Leucócitos Totais	Controle	15,21	<b>0,017*</b>
	Alérgico	8,50	
Neutrófilos	Controle	15,29	<b>0,015*</b>
	Alérgico	8,41	
Eosinófilos	Controle	9,71	<b>0,081**</b>
	Alérgico	14,50	
Basófilos	Controle	12,00	> 0,999
	Alérgico	12,00	
Linfócitos	Controle	10,13	0,166
	Alérgico	14,05	
Monócitos	Controle	14,67	<b>0,022*</b>
	Alérgico	9,09	
Mastócitos	Controle	12,00	> 0,999
	Alérgico	12,00	
Células Epiteliais Totais	Controle	8,50	<b>0,009*</b>
	Alérgico	15,82	
Células Planas	Controle	10,83	0,386
	Alérgico	13,27	
Células Ciliadas	Controle	14,42	<b>0,074**</b>
	Alérgico	9,36	
Células Caliciformes	Controle	8,83	<b>0,019*</b>
	Alérgico	15,45	

\*estatisticamente significante; \*\* forte tendência; Posto médio = média artificial utilizada em testes não-paramétricos, ou a posição do número em relação ao outro

## ANEXO I

## Análise do método Leishman nos grupos controle(1) e alérgicos(2) na primavera

Variável	Grupo	Posto Médio	Significância (p)
Leucócitos Totais	Controle	14,38	<b>0,066**</b>
	Alérgico	9,41	
Neutrófilos	Controle	15,04	<b>0,025*</b>
	Alérgico	8,68	
Eosinófilos	Controle	11,58	0,739
	Alérgico	12,45	
Basófilos	Controle	11,50	0,296
	Alérgico	12,55	
Linfócitos	Controle	10,50	0,268
	Alérgico	13,64	
Monócitos	Controle	12,46	0,563
	Alérgico	11,50	
Mastócitos	Controle	12,00	> 0,999
	Alérgico	12,00	
Células Epiteliais Totais	Controle	9,38	<b>0,044*</b>
	Alérgico	14,86	
Células Planas	Controle	12,72	0,578
	Alérgico	11,18	
Células Ciliadas	Controle	13,25	0,354
	Alérgico	10,64	
Células Caliciformes	Controle	10,13	0,165
	Alérgico	14,05	

\*estatisticamente significativa; \*\* forte tendência; Posto médio = média artificial utilizada em testes não-paramétricos, ou a posição do número em relação ao outro

## ANEXO J

Análise do método PAS nos grupos controle (1) e alérgicos (2) nas quatro estações do ano

Variável	Grupos	Posto Médio	Significância (p)
PAS no verão	Controle	11,50	0,712
	Alérgico	12,55	
PAS no outono	Controle	12,79	0,558
	Alérgico	11,14	
PAS no inverno	Controle	9,42	<b>0,056**</b>
	Alérgico	14,82	
PAS na primavera	Controle	14,38	<b>0,079**</b>
	Alérgico	9,41	

**\*\*forte tendência; Posto médio = média artificial utilizada em testes não-paramétricos, ou a posição do número em relação ao outro**

## ANEXO K

**Análise do método AgNOR nos grupos controle (1) e alérgicos (2) nas quatro estações do ano**

Variável	Grupos	Posto Médio	Significância (p)
AgNOR no verão	Controle	11,50	0,712
	Alérgico	12,55	
AgNOR no outono	Controle	10,33	0,218
	Alérgico	13,82	
AgNOR no inverno	Controle	9,71	<b>0,090**</b>
	Alérgico	14,50	
AgNOR na primavera	Controle	11,67	0,806
	Alérgico	12,36	

**\*\*forte tendência; Posto médio = média artificial utilizada em testes não-paramétricos, ou a posição do número em relação ao outro**

**ANEXO L**  
**Valores mensais dos poluentes durante o ano de 2003**

Poluentes	Meses do ano											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>SO<sub>2</sub></b>	8,06	8,32	9,5	14,22	15,03	16,55	20,3	20,59	16,77	14,74	15,97	13,25
<b>PM10</b>	46,73	47,18	38,27	56,03	51,69	80,28	74,03	62,55	59,69	38,11	33,06	33,89
<b>NO<sub>2</sub></b>	93,95	105,49	94,41	119,31	116,27	152,04	143,09	135,33	131,54	109,15	100,35	88,88
<b>CO</b>	2,31	2,04	1,85	2,38	2,42	3,21	3,01	2,28	2,34	2,22	1,69	2,03
<b>O<sub>3</sub></b>	112,91	112,91	76,63	76,34	64,99	78,76	90,52	87,66	106,69	83,77	80,73	72,35
<b>Temperatura</b>	23,15	24,16	21,16	20,29	17,73	16,88	17,26	15,11	19,12	19,29	21,51	21,36
<b>Umidade</b>	82,02	103,68	82,3	79,38	75,75	73,79	72,82	76	75,68	78,94	78,9	83,23

## **9 REFERÊNCIAS**

Aberg N, Sundell J, Eriksson B, Hesselmar B, Aberg B. Prevalence of allergic diseases in schoolchildren in relation to family history, upper respiratory infections, and residential characteristics. *Allergy*. 1996; 51:232-7.

Antonângelo L, Saldiva PHN, Amaro Júnior E, Capelozzi VL. Utility of computerized combined with AgNOR staining in distinguishing benign from malignant pleural effusions. *Analyt Quant Cytol Histol*. 1994; 16:247-52.

Ball BA, Folinsbee LJ, Peden DB, Kehrl HR. Allegen bronchoprovocation of patients with mild allergic asthma after ozone exposure. *J Allergy Clin Immunol*. 1996; 98:563-72.

Bascom R, Naclerio RM, Fitzgerald TK, Kagey-Sobotka A, Proud D. Effect of ozone inhalation on the response to nasal challenge with antigen of allergic subjects. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 142:594-601.

Bayram H, Devalia JL, Khair OA, Abdelaziz MM, Sapsford RJ, Sagai M, Davies RJ. Comparison of ciliary activity and inflammatory mediator release from bronchial epithelial cells of nonatopic nonasthmatic subjects and atopic asthmatic patients and the effect of diesel exhaust particles in vitro. *J Allergy Clin Immunol.* 1998; 102:771-82.

Becker S, Soukup JM, Gilmore MI, Devlin RB. Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates effects on oxidant radical generation and cytokine production. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996; 141:637-48.

Bernstein JA, Alexis N, Barnes C, Bernstein IL, Bernstein JA, Nel A, Peden D, Diaz-Sanchez D, Tarlo SM, Williams PB. Health effect of air pollution. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114:1116-23.

Böhm GM. Patogenia da poluição. [periódico online]. 1996 [citado nov 1996]: [12 telas], 1996. Disponível em: <<http://www.saudetotal.com/saúde/doencpol/doencpol.htm>>.

Bommel H, Haake M, Luft P, Horejs-Hoeck J, Hein H, Bartels J, Schauer C, Poschl U, Kracht M, Duschl A. The diesel exhaust component pyrene induces expression of IL-8 but not of eotaxin. *Int Immunopharmacol.* 2003; 3:1371-9.

Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N; Aria Workshop Group; World Health Organization. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 108(5 Suppl):S147-334.

Braun-Fahrländer C, Ackermann-Liebrich U, Schwartz J, Gnehm HP, Rutishauser M, Wanner HU. Air pollution and respiratory symptoms in preschool children. *Am Rev Respir Dis.* 1992; 145:42-7. não tem no texto

Calderon-Garciduenas L, Osorno-Velasquez A, Bravo-Alvarez H, Delgado-Chavez R, Barrios-Marquez R. Histopathologic changes of the nasal mucosa in southwest Metropolitan Mexico City inhabitants. *Am J Pathol.* 1992; 140:225-32.

Calderon-Garciduenas L, Rodriguez-Alcaraz A, Garcia R, Sanchez G, Barragan G, Camacho R, Ramirez L. Human nasal mucosal changes after exposure to urban pollution. *Environ Health Perspect.* 1994; 102:1074-80. não tem no texto

Calderon-Garciduenas L, Roy-Ocotla G. Nasal cytology in southwest metropolitan Mexico City inhabitants: a pilot intervention study. *Environ Health Perspect.* 1993; 101:138-44.

Calderon-Garciduenas L, Valencia-Salazar G, Rodriuez-Alcaraz A, Gambling TM, Garcia R, Osnaya N, Villarreal-Calderon A, Devlin RB, Carson JL. Ultrastructural nasal pathology in children chronically and sequentially exposed to air pollutants. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001; 24(2):132-8.

Cavalcanti CEO. Estudo da morfometria e expressão de AgNOR no epitélio do trato aerodigestivo superior e respiratório no fumo passivo em ratos. Um modelo experimental para a análise do campo de cancerização [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1996.

Charpin D, Sibbald B, Weeke E, Wuthrich B. Epidemiologic identification of allergic rhinitis. *Allergy*. 1996; 51:293-8. não tem no texto

Chen PC, Lai YM, Wang JD, Yang CY, Hwang JS, Kuo HW, Huang SL, Chan CC. Adverse effect of air pollution on respiratory health of primary school children in Taiwan. *Environ Health Perspect*. 1998; 106:331-5.

Chern JH, Lee YC, Yang MH, Chang SC, Perng RP. Usefulness of argyrophilic nucleolar organizer regions score to differentiate suspicious malignancy in pulmonary cytology. *Chest*. 1997; 111(6):1591-6.

Cicccone G, Forastiere F, Agabiti N, Biggeri A, Bisanti L, Chellini E, Corbo G, Dell'Orco V, Dalmaso P, Volante TF, Galassi C, Piffer S, Renzoni E, Rusconi F, Sestini P, Viegi G. Road traffic and adverse respiratory effects in children. SIDRIA Collaborative Group. *Occup Environ Med*. 1998; 55(11):771-8.

Corbo GM, Forastiere F, Dell'Orco V, Pistelli R, Agabiti N, De Stefanis B, et al. Effects of environment on atopic status and respiratory disorders in children. *J Allergy Clin Immunol*. 1993; 92:616-23. não tem no texto

Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ. How should we count AgNORs? Proposal for a standardized approach. *J Pathol* .1989; 158: 85-8.

Crockett AJ, Cranston JM, Alpers JH. The changing prevalence of asthma-like respiratory symptoms in South Australian rural schoolchildren. *J Paediatr Child Health*. 1995; 31:213-7. não tem no texto

De Marco R, Poli A, Ferrari M, Accordini S, Giammanco G, Bugiani M, Villani S, Ponzio M, Bono R, Carrozzi L, Cavallini R, Cazzoletti L, Dallari R, Ginesu F, Lauriola P, Mandrioli P, Perfetti L, Pignato S, Pirina P, Struzzo P; ISAYA study group. Italian Study on Asthma in Young Adults. The impact of climate and traffic-related NO<sub>2</sub> on the prevalence of asthma and allergic rhinitis in Italy. *Clin Exp Allergy* .2002; 32:1405-12.

Depuydt PO, Lambrecht BN, Joos GF, Pauwels RÄ. Effect of ozone exposure on allergic sensitization and airway inflammation induced by dendritic cells. *Clin Exp Allergy*. 2002; 32(3):391-6.

Devalia JL, Bayram H, Abdelaziz MM, Sapsford RJ, Davies RJ. Differences between cytokine release from bronchial epithelial cells os asthmatic patients and non-asthmatics subjects: effect of exposure to diesel exhaust particles. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999; 118:437-9.

Diaz-Sanchez D, Penichet-Garcia M, Saxon A. Diesel exhaust particles directly induce activated mast cells to degranulate and increase histamine levels and symptom severity. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106:1140-6.

Dolci JEL, Bussoloti Filho I, Lopes Filho O. Histologia e ultra-estrutura das cavidades nasais e dos seios paranasais. In: Lopes Filho O, Bussoloti Filho I. *Anatomofisiologia clínica e cirúrgica do nariz e das cavidades paranasais.* São Paulo: Editora BYK; 1998. p.19-30.

Duhme H, Weiland SK, Keil U, Kraemer B, Schmid M, Stender M, Chambless L. The association between self-reported symptoms of asthma and allergic rhinitis and self-reported traffic density on street of residence in adolescents. *Epidemiology.* 1996; 7:578-82.

Fireman EM, Lerman Y, Ganor E, Greif J, Fireman-Shoresh S, Liou PJ, Banauch GI, Weiden M, Kelly KJ, Prezant DJ. Induced sputum assessment in New York City firefighters exposed to World Trade Center dust. *Environ Health Perspect.* 2004; 112(15):1564-9.

Fujieda S, Diaz-Sanchez D, Saxon A. Combined nasal challenge with diesel exhaust particles and allergen induces in vivo IgE isotype switching. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998; 19:507-12.

Gergen PJ, Turkeltaub PC. The association of individual allergen reactivity with respiratory disease in a national sample: data from the second National Health and Nutrition Examination Survey, 1976-80. *J Allergy Clin Immunol.* 1992; 90:579-88. não tem no texto

Gluck U, Gebbers JO. Cytopathology of the nasal mucosa in smokers: a possible biomarker of air pollution? *Am J Rhinol.* 1996; 1(10):55-7.

Gong H Jr. Health effects of air pollution. A review of clinical studies. *Clin Chest Med.* 1992; 13:201-14.

Guo YL, Lin YC, Sung FC, Huang SL, Ko YC, Lai JS, Su HJ, Shaw CK, Lin RS, Dockery DW. Climate, traffic-related air pollutants and asthma prevalence in middle-school children in Taiwan. *Environ Health Perspect.* 1999; 107:1001-6.

Hales S, Lewis S, Slater T, Crane J, Pearce N. Prevalence of adult asthma symptoms in relation to climate in New Zealand. *Environ Health Perspect.* 1998; 106:607-10.

Hiltermann TJ, de Bruijne CR, Stolk J, Zwinderman AH, Spijksma FT, Roemer W, Steerenberg PA, Fischer PH, van Bree L, Hiemstra PS. Effects of photochemical air pollution and allergen exposure on upper respiratory tract inflammation in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156(6):1765-72.

Horstman DH, Folinsbee LJ. Sulfur dioxide-induced bronchoconstriction in asthmatics exposed for short durations under controlled conditions: a selected review. In: Utell MJ, Frank R, editors. *Susceptibility to inhaled pollutants*. Philadelphia: American Society for Testing and Materials; 1989. não tem no texto

Howarth PH, Persson CGA, Meltzer EO, Jacobson MR, Durham SR, Silkoff PE. Objective monitoring of nasal airway inflammation in rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(3): S414-S441.

Hussain I, Jain VV, O'Shaughnessy P, Businga TR, Kline J. Effect of nitrogen dioxide exposure on allergic asthma in a murine model. *Chest*. 2004; 126(1):198-204.

Ingels K, Durdurez J, Cuvelier C, Van Cauwenberge P. Nasal biopsy is superior to nasal smear for finding eosinophils in nonallergic rhinitis. *Allergy*. 1997; 52(3):338-41.

Kehrl HR, Peden DB, Ball B, Folinsbee LJ, Horstman D. Increased specific airway reactivity of persons with mild allergic asthma after 7.6 hours to exposure to 0,16 ppm ozone. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 104:198-204.

Keles N, Ilicali C, Deger K. The effects of different levels of air pollution on atopy and symptoms of allergic rhinitis. *Am J Rhinology*. 1999; 3(13):185-90.

Klementsson H, Andersson M, Baumgarten CR, Venge P, Pipkorn U. Changes in non-specific nasal reactivity and eosinophil influx and activation after allergen challenge. *Clin Exp Allergy* .1990; 20:539-47.

Koken PJ, Piver WT, Ye F, Elixhauser A, Olsen LM, Portier CJ. Temperature, air pollution and hospitalization for cardiovascular diseases among elderly people in Denver. *Environ Health Perspect*. 2003; 111:1312-7. não tem no texto

Kopp MV, Ulmer C, Ihorst G, Seydewitz HH, Frischer T, Forster J, Kuehr J. Upper airway inflammation in children exposed to ambient ozone and potential signs of adaptation. *Eur Respir J*. 1999; 14:854-61.

Lecha Estela LB. Biometeorological classification of daily weather types for the humid tropics. *Int J Biometeorol*. 1998; 42 77-83.

Leikauf GD, Simpson LG, Santrock J, Zhao Q, Abbinante-Nissen J, Zhou S, Driscoll KE. Airway epithelial cell responses to ozone injury. *Environ Health Perspect*. 1995; 103(2):91-5.

Lin RY, Nahal A, Lee M, Menikoff H. Better Nasal Cytologic distinctions between clinical groups using the rhinoprobe compared to the cytobrush. *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 105(1 S Suppl 2):S196.

Lin RY, Nahal A, Lee M, Menikoff H. Cytologic distinctions between clinical groups using curette-probe compared to cytology brush. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2001; 86(2):226-31.

Lundback B. Epidemiology of rhinitis and asthma. *Clin Exp Allergy.* 1998; 28(2):3-10.

Magnus P, Jaakkola JJK. Secular trends in the occurrence of asthma among children and young adults: critical appraisal of repeated cross sectional surveys. *BMJ.* 1997; 314:1795-9.

Marano F, Boland S, Bonvallot V, Baulig A, Baeza-Squiban A. Human airway epithelial cells in culture for studying the molecular mechanisms of the inflammatory response triggered by diesel exhaust particles. *Cell Biol Toxicol.* .2002; 18:315-20.

Martins LC, Latorre Mdo R, Saldiva PH, Braga AL. Air pollution and emergency room visits due to chronic lower respiratory diseases in the elderly: an ecological time-series study in Sao Paulo, Brazil. *J Occup Environ Med.* 2002; 44(7):622-7.

Mello Jr. JF. *Avaliação da síntese protéica na mucosa nasal após exposição prolongada à poluição atmosférica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1998.

Meltzer EO, Jalowayski AA. Nasal cytology in clinical practice. In: Settupane GA. *Rhinitis second edition*. 1991. OceanSide Publications, Inc. 36, 291-8.

Michelson PH, Dailey L, Devlin RB, Peden DB. Ozone effects on the immediate-phase response to allergen in the nasal airways of allergic asthmatic subjects. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999; 120(2):225-32.

Miyabara Y, Takano H, Ichinose T, Lim HB, Sagai M. Diesel exhaust enhances allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157:1138-44.

Morales MA, Arreguin OL, Navarrete FH, Lopez JG, Medina G. Morphological features of the nasal mucosa in healthy children exposed to different concentrations of atmospheric pollution. *Revista Alergia Mexico* 1998; 45(1):22-6.

Mygind N, Dahl R. Epidemiology of allergic rhinitis. *Pediatr Allergy Immunol*. 1996; 7:57-62.

Nathan A G. Nasal anatomy and physiology. In: Settupane GA. *Rhinitis second edition*. 1991. OceanSide Publications, Inc. Chapter VIII, 79-83.

Newson EJ, Krishna MT, Lau LC, Howarth PH, Holgate ST, Frew AJ. Effects of short-term exposure to 0.2 ppm ozone on biomarkers of inflammation in sputum, exhaled nitric oxide, and lung function in subjects with mild atopic asthma. *J Occup Environ Med.* 2000; 42(3):270-7.

Nichols BG, Woods JS, Luchtel DL, Corral J, Koenig JQ. Effects of ozone exposure on nuclear factor-kB activation and necrosis factor-a expression in human nasal epithelial cells. *Toxicol Sci.* 2001; 60:356-62.

Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of inhaled ozone on exhaled nitric oxide, pulmonary function, and induced sputum in normal and asthmatic subjects. *Thorax.* 1999; 54:1061-9.

Ohtoshi T, Takizawa H, Okazaki H, Kawasaki S, Takeuchi N, Ohta K, Ito K. Diesel exhaust particles stimulate human airway epithelial cells to produce cytokines relevant to airway inflammation in vitro. *J Allergy Clin Immunol.* 1998; 101(6 Pt 1):778-85.

Omran M, Russel G. Continuing increase in respiratory symptoms and atopy in Aberdeen schoolchildren. *BMJ.* 1996; 312:34-7.

Peden DB, Boehlecke B, Horstman D, Devlin R. Prolonged acute exposure to 0.16 ppm ozone induces eosinophilic airway inflammation in asthmatic subjects with allergies. *J Allergy Clin Immunol.* 1997; 100:802-8.

Peden DB, Setzer RWJr, Devlin RB. Ozone exposure has both a priming effect on allergen-induced responses and intrinsic inflammatory action in the nasal airways of perennially allergic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 151:1336-45.

Peden DB. Mechanisms of pollution-induced airway disease: in vivo studies. Is pollution a cause or trigger for the increase in allergic disease? *Allergy.* 1997; 52(38):37-44.

Pelikan Z, Pelikan-Filipek M. Cytologic changes in the nasal secretions during the immediate nasal response. *J Allergy Clin Immunol.* 1988; 82:1103-12.

Piccolo MC, Perillo GM, Ramon CG, Di Dio V. Outbreaks of asthma attacks and meteorologic parameters in Bahia Blanca, Argentina. *Ann Allergy.* 1988; 60:107-10.

Pipkorn U, Karlsson G, Enerback L. Nasal mucosal response to repeated challenges with pollen allergen. *Am Rev Respir Dis.* 1989; 140:729-36.

Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnett JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J.* 1986; 18:5-14.

Polat D, Eberwein G, Becker A, Weishaupt C, Schins RP, Ranft U, Borm PJ. Ambient exposure and nasal inflammation in adults and children-a preliminary analysis. *Int J Hyg Environ Health*. 2002; 205(3):229-34.

Polosa R, Sapsford RJ, Dokic D, Cacciola RR, Prosperini G, Devalia JL, Holgate ST, Howarth PH, Davies DE. Induction of the epidermal growth factor receptor and its ligands in nasal epithelium by ozone [Mechanisms of Allergy]. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113(1): 120-6.

Quraishi MS, Jones N S, Mason J. The rheology of nasal mucus: a review. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1998; 23(5):403-13.

Ray JG, Chattopadhyay A, Caplan DJ. Usefulness of AgNOR counts in diagnosing epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med*. 2003; 32(2):71-6

Riechelmann H, Rettinger G, Lautebach S, Schmittinger S, Deutsche T. Short-Term Exposure to Urban Dust Alters the Mediator Release of Human Nasal Mucosa. *J Occup Environ Med*. 2004; 46(4):316-22.

Rüschoff J, Plate KH, Contractor H, Kern S, Zimmermann R, Thomas C. Evaluation of nucleolus organizer regions (NORs) by automatic image analysis: a contribution to standardization. *J Pathol*. 1990; 161:113-8.

Ruschoff J, Plate KH, Müller R, Maasberg M, Thomas C. Nucleolar organizer region-associated proteins: A diagnostic tool in cytology? *Recent Results Cancer Res.* 1993; 133:81-9.

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

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

Saldiva PHN, Souza, MB, Pope CA, Capelozzi VL. Respiratory changes due to long-term exposure to urban levels of air pollution. *Chest.* 1998; 113(5):1312-18.

Salvi S, Blomberg A, Rudell B, Kelly F, Sandstrom T, Holgate ST, Frew A. Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 159:702-9.

Salvi SS, Nordenhall C, Blomberg A, Rudell B, Pourazar J, Kelly FJ, Wilson S, Sandstrom T, Holgate ST, Frew AJ. Acute Exposure to Diesel Exhaust Increases IL-8 and GRO - Production in Healthy Human Airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161(2):550-7.

Samet JM, Dominici F, Curriero FC, Coursac I, Zeger SL. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994. *N Engl J Med.* 2003; 343:1742-9. não tem no texto

Sandström T, Stjernberg N, Andersson M, Kolmodin-Hedman B, Lundgren R, Rosenhall L, Angstrom T. Cell response in bronchoalveolar lavage fluid after exposure to sulfur dioxide: A time-response study. *Am Rev Respir Dis.* 1989; 140: 1828-31.

Sandström T, Stjernberg N, Eklund A, Ledin MC, Bjermer L, Kolmodin-Hedman B, Lindstrom K, Rosenhall L, Angstrom T. Inflammatory cell response in broncho-alveolar lavage fluid after nitrogen dioxide exposure of healthy subjects: a dose-response study. *Eur Respir J.* 1991; 4:332-9.

Sarnat JA, Schwartz J, Suh HH. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities. *N Engl J Med.* 2001; 344:1253-4. não tem no texto

Schierhorn K, Zhang M, Kacy M, Kunkel G. Ozone-induced augmentation of eicosanoid metabolism in human nasal mucosa in vitro. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997; 113:312-5.

Schiffman SS, Nagle T. Effects of environmental pollutants on taste and smell. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1992; 106:693-700.

Schlesinger RB. The impact of pollution: general considerations. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1992; 106:642-8. não tem no texto

Seaton A, MacNee W, Donaldson K, Godden D. Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet.* 1995; 345:176-8.

Shusterman DJ, Murphy MA, Balmes JR. Subjects with seasonal allergic rhinitis and nonrhinitic subjects react differentially to nasal provocation with chlorine gas. *J Allergy Clin Immunol.* 1998; 101:732-40.

Steerenberg PA, Fischer PH, Gmelig MF, Willighagen J, Geerse E, Van de Vliet H, Ameling C, Boink AB, Dormans JA, Van Bree L, Van Loveren H. Nasal lavage as tool for health effect assessment of photochemical air pollution. *Hum Exp Toxicol.* 1996; 15(2):111-9.

Takizawa H, Abe S, Okazaki H, Kohyama T, Sugawara I, Saito Y, Ohtoshi T, Kawasaki S, Desaki M, Nakahara K, Yamamoto K, Matsushima K, Tanaka M, Sagai M, Kudoh S. Diesel exhaust particles upregulate eotaxin gene expression in human bronchial epithelial cells via nuclear factor-kappa B-dependent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003; 284:L1055-62.

Takizawa H, Ohtoshi T, Kawasaki S, Kohyama T, Desaki M, Kasama T, Kobayashi K, Nakahara K, Yamamoto K, Matsushima K, Kudoh S. Diesel exhaust particles induce NF- $\kappa$ B activation in human bronchial epithelial cells in vitro: importance in cytokine transcription. *J Immunol.* 1999; 162:4705-11.

Tarlo SM, Broder I, Corey P, Chan-Yeung M, Ferguson A, Becker A et al. The role of symptomatic colds in asthma exacerbations: influence of outdoor allergens and air pollutions. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 108:52-8. não tem no texto

Togias A, Naclerio RM, Proud D et al. Studies on the allergic and non-allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 1988; 81:782-90.

Trevino RJ. Air Pollution and its effect on the upper respiratory tract and on allergic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996; 114:239-41.

Tsai SS, Goggins WB, Chiu HF, Yang CY. Evidence for an association between air pollution and daily stroke admissions in Jaohsiung, Taiwan. *Stroke* 2003; 34:1-5. não tem no texto

Tuccari G, Giuffre G, Ofner D, Ruschoff J. Standardized use of the AgNOR method. *J Oral Pathol Med.* 2000; 29(10):526-7.

Utell MJ, Frampton MW. Acute health effects of ambient air pollution: the ultrafine particle hypothesis. *J Aerosol Med* .2000; 13:355-9. não tem no texto

Vieira VG, Prolla JC. Clinical evaluation of eosinophils in the sputum. *J Clin Pathol*. 1979; 32(10):1054-7.

Wagner GJ, Hotchkiss JA, Harkema JR. Enhancement of nasal inflammatory and epithelial responses after ozone and allergen coexposure in brown norways rats. *Toxicol Sci*. 2002; 67:284-94.

Weiland SK, Mundt KA, Ruckmann A, Keil U. Selfreported wheezing and Allergic rhinitis in children and traffic density on street of residence. *Ann Epidemiol*. 1994; 4:243-7.

Wongsurakiat P, Maranetra KN, Nana A, Naruman C, Aksornint M, Chalermpanyakorn T. Respiratory symptoms and pulmonary function of traffic policemen in Thonburi. *J Med Assoc Thai*. 1999; 82:435-43.

Wright AL, Holberg CJ, Martinez FD, Halonen M, Morgan W, Taussig LM. Epidemiology of physician-diagnosed allergic rhinitis in childhood. *Pediatric.s* 1994; 94:895-901.

Wyler C, Braun-Fahrlander C, Kunzli N, Schindler C, Ackermann-Liebrich U, Perruchoud AP, Leuenberger P, Wuthrich B. Exposure to motor vehicle traffic and allergic sensitization. The Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults (SAPALDIA) Team. *Epidemiology*. 2000; 11:450-6.

---

De acordo com:  
Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.  
Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of journals Indexed in Index Medicus*.