

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Lucianna Schmitt

**Efeito da poluição do ar sobre o
comportamento alimentar de ratos nas
diferentes fases da vida e a
participação dos oxidantes nesse
processo.**

**Porto Alegre
2014**

Lucianna Schmitt

**Efeito da poluição do ar sobre o
comportamento alimentar de ratos nas
diferentes fases da vida e a
participação dos oxidantes nesse
processo.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientador: Profa. Dra. Claudia Ramos Rhoden
Co-orientadora: Dra. Ana Claudia Tedesco Zanchi

**Porto Alegre
2014**

Catálogo na Publicação

Schmitt, Lucianna

Efeito da poluição do ar sobre o comportamento alimentar de ratos nas diferentes fases da vida e a participação dos oxidantes nesse processo. / Lucianna Schmitt. -- 2014.

70 p. : il., graf. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.

Orientador(a): Claudia Ramos Rhoden ;
coorientador(a): Ana Cláudia Tedesco Zanchi.

1. Poluição Atmosférica. 2. Comportamento Alimentar.
3. Estresse Oxidativo. 4. Hipotálamo. 5. Ratos. I.
Título.

**Dedico esse
trabalho à minha família, amigos e colegas que tanto
me ajudaram para chegar até aqui.**

Agradecimentos

Agradeço a Deus e aos espíritos de luz que me ajudaram nessa caminhada.

Mãe, pai e irmão, pois sem o apoio de vocês eu também não percorreria esse caminho.

Agradeço aos meus amigos e colegas de laboratório que ajudaram em todas as etapas desse trabalho.

Agradeço à minha orientadora Cláudia, sem seu apoio e guia nada disso seria possível.

Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar o comportamento alimentar e desenvolvimento de ratos expostos à poluição do ar em longo prazo e a participação dos agentes oxidantes. Ratos Wistar machos foram divididos em dois grupos: ar filtrado (FA, n= 15) exposto desde o período intrauterino ao ar filtrado, e ar não filtrado (NFA, n= 13) exposto desde a fase intrauterina à poluição do ar em nível ambiental. O consumo de ração foi monitorado por todo o experimento. O teste de consumo do alimento palatável foi realizado nas fases: infância, puberdade e adulta. Aos 150 dias, os animais foram eutanasiados e o hipotálamo dissecado para análise de estresse oxidativo. O grupo FA reduziu o consumo de ração ao longo da vida enquanto o grupo NFA aumentou o seu consumo nas fases infância e puberdade ($p < 0,01$), na fase adulta não houve diferença para o consumo de ração entre os grupos. Houve interação entre os fatores exposição aos poluentes e fase da vida ($F(2,210) = 42,629$ $p < 0,001$). NFA apresentou menor massa corpórea em relação à FA durante todo o experimento, FA consumiu mais alimento palatável na fase adulta enquanto NFA na puberdade. NFA apresentou menor consumo de alimento palatável em todas as fases da vida em relação à FA ($p < 0,01$). A análise para estresse oxidativo não apresentou diferença entre os grupos. A poluição do ar prejudicou o desenvolvimento e interferiu no consumo alimentar, mas a ação de agentes oxidantes não parece estar envolvida nesse processo.

Palavras chave: poluição do ar, comportamento alimentar, estresse oxidativo, hipotálamo, peso.

Abstract

The aim of this study was to investigate feeding behavior after prenatal and during post natal long-term exposure to air pollution and the role of oxidants in these parameters. Male wistar rats were divided into two groups: filtered air (FA, n= 15) exposed since intrauterine life to filtered air and non-filtered air (NFA, n=13) exposed since intrauterine life to ambient levels of air pollution. Food consumption was monitored since post natal day 21, and the rats were tested for palatable food consumption in childhood, youth and adulthood. When they reached 150 days, rats were euthanized and hypothalamus was dissected for oxidative stress analysis. FA group reduced the food consumption during life ($p < 0,001$) NFA group raised the food consumption in childhood and youth ($p < 0,001$) but in adulthood there was no difference from youth and no difference when compared to FA consumption on this same life stage. There was an interaction between exposure and life stages ($F(2,210) = 42,629$ $p < 0,001$). NFA had a lower body weight than FA group during the whole experiment. FA had more palatable food in adulthood while NFA group on youth. NFA group had a significant lower consumption of palatable food in all life stages ($p < 0,001$). Oxidative stress analysis had no difference between groups. Therefore, exposure to air pollution seems to impair weight gain since birth and the pup are not able to catch up this damage during life, and also alters food consumption. The oxidative stress didn't seem to mediate these behavioral changes.

Keywords: air pollution, feeding behavior, oxidative stress, hypothalamus

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Poluição Atmosférica	9
1.2 Material Particulado	11
1.3 Estresse oxidativo e danos ao SNC.....	14
1.4 Poluição do ar e SNC	18
1.5 Poluição do ar no início da vida	22
1.6 Comportamento alimentar	25
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4. REFERÊNCIAS	32
5. ARTIGO.....	42
6. Figuras	59
.....	59
7. CONCLUSÃO.....	63
8. ANEXOS	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 Poluição Atmosférica

A poluição atmosférica é definida como uma suspensão de gases (monóxido e dióxido de carbono, óxidos de nitrogênio e enxofre, ozônio), compostos orgânicos (hidrocarbonetos, pólen e material particulado) (BLOCK; CALDERON-GARCIDUEÑAS, 2009). Sua composição varia conforme a região e depende de diversos fatores tais como: umidade do ar, clima e tipo de fontes poluidoras (BRUNEKREEF; HOLGATE, 2002)

Os poluentes do ar podem ser gerados por dois tipos de fontes: naturais ou antropogênicas. A primeira trata-se de erupções vulcânicas, incêndios florestais e poeira a partir da erosão dos solos (OMS, 2005; BRAGA ET al., 2007). Um exemplo de fonte natural foi a erupção do vulcão Tambora na Indonésia. Em 1815, esse vulcão alcançou a maior erupção dos últimos tempos deixando um somatório de 100 mil mortes diretas e indiretas associadas a ele (SCHWARTZ, 1994). As fontes antropogênicas correspondem à queima de combustíveis por indústrias e veículos automotores, queima de biomassa (ex.: queima da cana de açúcar), atividade industrial (ex: (DE MIRANDA ET al., 2012)).

A partir da Revolução Industrial (Séc. XIX), técnicas novas de produção foram adotadas e utilizavam como fonte de energia a queima de carvão, lenha, e, posteriormente, óleo. Somou-se a isso a presença cada vez maior de automóveis e indústrias. Em 1930, na Bélgica, o acúmulo de poluentes no ar resultou em 60 mortes e muitos registros de sintomas respiratórios (SCHWARTZ, 1994). Na Inglaterra, em 1952, o episódio conhecido como “*The Great Smog*” deixou quatro mil mortes diretas e mais de oito mil indiretas. A causa dessa tragédia foi a grande emissão de poluentes originados da queima de carvão e óleo associada a um fenômeno climático chamado inversão térmica (BREUNEKREEF; HOLGATE, 2002). Eventos como os que aconteceram em Londres e na Bélgica impulsionaram a preocupação de órgãos governamentais para estabelecer regulamentações na emissão de poluentes.

Os principais representantes dos poluentes atmosféricos são: monóxido de carbono (CO), dióxido de enxofre (SO₂), dióxido de nitrogênio (NO₂), ozônio (O₃) e o material particulado (MP), definidos em 1970 pela *US Environmental Protection Agency* (EPA) através do *Clean Air Act*, lei norte-americana que estabelece as emissões de poluentes por fontes fixas e móveis. Além dessa lei, foram publicados padrões de emissão de poluentes para assegurar à saúde pública e bem estar da população dos Estados Unidos (*National Ambient Air Quality Standards – NAAQS*, EPA 1970). No decorrer da década de 70, mais publicações e decretos foram feitos nos Estados Unidos reforçando a preocupação dos efeitos dos poluentes sobre a saúde.

No Brasil, foi criado em 1989 o Programa Nacional de Controle de Qualidade do Ar (PRONAR). No ano seguinte, o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) publicou a Resolução nº 03 onde foram feitas definições de conceitos de poluentes atmosféricos, e padrões de qualidade do ar. Segundo o CONAMA, poluente atmosférico é qualquer forma de matéria que exceda os padrões estabelecidos e torne o ar ofensivo à saúde, inconveniente ao bem estar público e prejudicial a segurança de atividades normais de uma comunidade. Em 2005, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou novos padrões de qualidade do ar e define novas concentrações de poluentes atmosféricos. Dentre os poluentes mencionados, o MP foi classificado como um dos mais tóxicos e com maior poder de dano à saúde.

Nos Estados Unidos, um estado criou políticas para reduzir a circulação de veículos de passeio. Pesquisadores analisaram o impacto dessas políticas sobre benefícios à saúde da população. A melhora da conectividade entre as ruas colaborou para redução da emissão dos poluentes CO, MP, e NO₂. Além disso, o aumento dos custos para veículos com apenas um passageiro (preço do combustível, taxas de estacionamento) colaborou com a redução de acidentes, com o aumento da atividade física da população e redução de poluentes (PERDUE ET al., 2012). Em São Paulo, a política de rodízio de automóveis foi implantada para dois grandes objetivos: reduzir o congestionamento e reduzir as emissões de CO. Pesquisadores comprovaram que o rodízio de veículos contribuiu para redução da maioria dos poluentes do ar e admissão hospitalar por problemas nas vias aéreas superiores (MARTINS, 2001).

Desta forma, podemos perceber que a poluição do ar é um problema grave de saúde pública e que merece atenção dos governos e cidadãos. No Brasil, pesquisas mostram de diversas maneiras que a morte, por razões cardíacas e respiratórias, tem colaboração significativa da poluição. Estima-se que a cada aumento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ na concentração de MP há entre 3% a 4% de aumento diário em mortes por doenças cardiovasculares, e 6% por respiratórias. A poluição é especialmente prejudicial às pessoas que já possuem doenças cardíacas e respiratórias e, para crianças e idosos. Em São Paulo (SP), estudo conduzido por Miraglia ET al.(2005) mostrou que em idosos com doenças respiratórias a poluição do ar reduz em quatro anos a expectativa de vida, e, em dez anos quando na presença de doença cardiovascular. Os autores ressaltam que o prejuízo pode ser ainda maior quando se trata de crianças com doenças respiratórias, pois a poluição as atinge antes mesmo de elas alcançarem a idade mais produtiva da vida. Em 2009, um estudo norte-americano, utilizando metodologia diferente, concluiu que viver em ambientes poluídos pode reduzir a expectativa de vida em até 1,6 anos. Nesse estudo, como em tantos outros, o MP recebe atenção especial em razão da amplitude de seus danos à saúde e os pesquisadores expõem que a redução na concentração de MP pode aumentar a expectativa de vida em até 9,6 meses (POPE; EZZATI; DOCKERY, 2009).

1.2 Material Particulado

O MP é uma mistura complexa de componentes que fica suspensa no ar. É composto de carbono, sulfato, metais de transição (cádmio, chumbo, ferro, níquel e silício), componentes biológicos (pólen, esporos) (AUST ET al., 2002; CRAIG ET al., 2008; GENC ET al., 2012; SEIGNEUR, 2009). As partículas de MP são divididas conforme o diâmetro aerodinâmico. As partículas grossas, MP_{10} , com diâmetro inferior a $10\mu\text{m}$ se originam de poeira, erosão do solo e rodovias e incêndios; as partículas finas, $\text{MP}_{2,5}$, tem diâmetro inferior a $2,5\mu\text{m}$ são formadas a partir de combustão de combustíveis fósseis e atividade industrial com grande produção de vapor. Por fim, as partículas ultrafinas, $\text{MP}_{0,1}$ são inferiores a $0,1\mu\text{m}$ de diâmetro, formadas também pelas

mesmas fontes das partículas finas e tem alto poder de penetração no organismo. (CRAIG et al., 2007). A composição do MP varia de acordo com as fontes emissoras de poluentes, clima e topografia do local (POPE; DOCKERY, 2006).

As partículas grossas entram pelas vias aéreas e atingem o sistema respiratório, mas não conseguem gerar uma ação sistêmica direta, sua ação tóxica ocorre localmente. As partículas finas conseguem penetrar as vias aéreas e atingir a circulação sistêmica e propagam os efeitos do MP a diversos órgãos e tecidos. (BLOCK ET al., 2012; CALDERÓN-GARCIDUEÑAS ET al., 2008A; KAISER, 2000;) Estudos apontam que as partículas ultrafinas são capazes de atingir órgãos e se depositar nos mesmos, ainda que em menor concentração (CALDERÓN-GARCIDUEÑAS ET al., 2008a; KAWANAKA ET al., 2011; LOANE ET al., 2013; LÖNDAHL ET al., 2012).

Inicialmente, altas concentrações de MP foram relacionadas a aumento da mortalidade e morbidade das pessoas expostas; desfecho que foi observado em episódios isolados. Em seguida, as concentrações maiores de MP estavam associadas a aumento de mortes por causas cardiovasculares e respiratórias (POPE; DOCKERY, 2006). Nas décadas de 70 e 80 não havia um conhecimento coeso sobre os níveis de MP que de fato representavam perigo à saúde. Alguns autores alegavam que somente níveis extremos poderiam fazer mal, e outros acreditavam que níveis mais baixos e constantes também tinham tal poder (EPA, 2009; POPE; DOCKERY, 2006). Nas décadas seguintes, vários estudos mostraram impacto dos níveis de $MP_{2,5}$ sobre a mortalidade. Recentemente, estudos multicêntricos mostram que em todo o mundo o $MP_{2,5}$ está relacionado com o aumento da mortalidade.

O $MP_{2,5}$ (fino) em especial é mais nocivo à saúde em razão da sua composição. As partículas adsorvidas na superfície do $MP_{2,5}$ são geralmente metais, sulfatos e nitratos tornando-as especialmente danosas ao organismo (WILSON; MAR; KOENIG, 2007). Laden ET al. (2006) estudaram a associação da concentração de $MP_{2,5}$ com a mortalidade em seis cidades norte-americanas. Os autores relatam que a cada aumento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ há um aumento de 1,5% na mortalidade diária. Corroborando com esses achados, O'Neil ET al., 2008 analisaram as cidades latino-americanas: Cidade do México (México), São Paulo (Brasil) e Santiago (Chile). A pesquisa revelou que a cada

aumento de 10 μ g na concentração diária de MP a mortalidade aumenta em 0,39%, 1,04% e 0,61% ,respectivamente nas cidades citadas. Nesse estudo, também foi apontado um efeito acumulativo na mortalidade para um período de seis dias, sendo os índices 0,86% para Santiago e 1,38% para São Paulo demonstrando que a exposição aos poluentes do ar tem efeito acumulativo e não apenas agudo. Posteriormente, Pope ET al.(2009) estudaram a exposição ao MP_{2,5} e a expectativa de vida nos Estados Unidos de forma que foi considerada a exposição entre as décadas de 70 e 80, através de regressão linear. Os autores relatam que a cada diminuição de 10 μ g/m³ há um aumento de 6 meses na expectativa de vida. A OMS publicou em 2011 um ranking de emissão de MP com dados coletados entre 2003 e 2010. A média anual mundial é de 71 μ g/m³, o Brasil tem média anual de 40 μ g/m³, enquanto o padrão recomendado pela OMS é de 25 μ g/m³/ano (OMS, 2011). Entretanto, os dados foram coletados apenas no estado de São Paulo, SP, em 2009. Dados do nosso laboratório constataram concentração de 55 μ g/m³ de MP durante o inverno de 2013 em Porto Alegre, RS, sendo a cidade com mais alto índice deste poluente na região metropolitana (FLECK, 2012).

Altas concentrações de MP_{2,5} estão associadas a danos a saúde da população nos mais diversos aspectos. Estudos têm comprovado que pessoas residentes próximas a rodovias têm maior risco de infarto agudo do miocárdio, exacerbação de sintomas respiratórios e incidência de asma (BECKERMAN et al., 2012; PUETT et al., 2009; SCHIKOWSKI et al., 2005). O MP_{2,5} é inalado atingindo os alvéolos no pulmão. Dessa forma, partículas que possuem compostos mais solúveis adsorvidos em sua superfície têm maior facilidade para atravessar a barreira entre ar e sangue e, assim, alcançam a circulação sanguínea periférica (NEMMAR ET al., 2001; POPE; DOCKERY, 2006). As partículas que não fazem essa ultrapassagem ficam presas nos alvéolos e, imediatamente após esse contato, os níveis de oxidantes nesse tecido começam a aumentar e o estresse oxidativo se instala gerando dano, primeiramente no pulmão (GURGUEIRA ET al., 2002). Posteriormente, o dano oxidativo se instala no coração prejudicando o funcionamento do sistema nervoso autônomo, que por sua vez dispara uma resposta que aumenta ainda mais o estresse oxidativo, culminando com arritmias cardíacas e vasoconstrição (GHELFI et al., 2010; RHODEN et al., 2005). Outro estudo

mostrou que o MP altera a coagulação sanguínea, o que também aumenta risco para eventos cardiovasculares (SEATON ET al., 1999).

Em todo o mundo pesquisadores alertam sobre a abrangência dos danos da poluição à saúde pública. O estudo conhecido como APHENA envolveu cidades dos Estados Unidos, Canadá e Europa. Os pesquisadores encontraram um aumento de 0,3% no número de mortes relacionado a cada aumento de 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ na concentração de MP (SAMOLI et al., 2008). Nessa amostra estudada, os idosos também se mostraram mais suscetíveis a esses efeitos. Já o estudo ESCALA que teve objetivo de estudar efeitos do MP e ozônio na América Latina, constatou que dependendo da cidade a faixa etária mais afetada era diferente (ROMIEU et al., 2012). Na Cidade do México, as crianças com idade entre um e quatorze anos apresentaram maior risco de morte por infecção do trato respiratório; em todas as cidades os idosos foram o grupo mais afetado. De forma geral, o aumento na concentração de MP na América Latina representou um aumento de 0,7% nas mortes por causa natural, 0,94% nas por razões respiratórias, e 1,19% nas cardiovasculares (ROMIEU, 2012). É importante ressaltar que a maioria desses estudos trata de exposição de curta-duração, e, portanto, trazem a preocupação sobre as concentrações de MP do dia-a-dia da população, e não a eventos extremos como se pensava antigamente.

Contudo, os efeitos tóxicos do MP não se limitam ao sistema cardiorrespiratório. Recentemente o sistema nervoso central (SNC) tem sido alvo de pesquisas sobre poluição do ar. Atualmente, sabe-se que o MP consegue atingir o SNC, lesar a barreira-hematoencefálica (BHE), e pode estar relacionado ao surgimento de doenças neurodegenerativas, bem como, diminuição da cognição em crianças (CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, 2008a, 2008b). Dados do nosso laboratório corroboram achados em humanos e demonstraram alterações em nível comportamental e de memória em ratos submetidos à inalação da poluição atmosférica em nível ambiental (ZANCHI ET al., 2008, 2010).

1.3 Estresse oxidativo e danos ao SNC

O oxigênio é essencial à vida e foi fundamental para a evolução na Terra. O aumento da complexidade dos organismos celulares foi registrado no

período em que a concentração de oxigênio em nosso planeta aumentou consideravelmente, de forma que os organismos aeróbios foram naturalmente selecionados pela evolução (KOCH; BRITTON, 2008).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) compreendem um grupo de radicais livres e espécies não radicais que possuem oxigênio em sua composição. As principais ERO compreendem: radical ânion superóxido, oxigênio *singlet*, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil. O radical ânion superóxido possui apenas um elétron desemparelhado em sua configuração e é gerado principalmente na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria (HALLIWELL, 2006). O oxigênio *singlet* é uma versão do oxigênio carregada com mais energia, isso o torna mais reativo, tem capacidade de danificar proteínas lipídios e proteínas (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010). O peróxido de hidrogênio não é uma espécie radical, mas é capaz de reagir com metais e formar radicais livres. Também é essencial na sinalização de macrófagos e liberação de mediadores inflamatórios. O radical hidroxil é o mais reativo de todas ERO sendo capaz de reagir com qualquer estrutura próxima, principalmente metais, danificando rapidamente proteínas e lipídios. Em função da sua instabilidade sua meia vida é curta (BLOCK, 2009).

Os radicais livres fazem parte do equilíbrio do funcionamento de organismos aeróbios. Embora se pense muito no dano que eles são capazes de gerar, eles exercem papéis importantes em nível de sinalização celular, processos inflamatórios e de fagocitose. Para que haja um equilíbrio nesse sistema de oxidação e redução contamos com defesas antioxidantes. Na presença de uma concentração maior de espécies reativas do que a capacidade de defesa ocorre o fenômeno chamado estresse oxidativo. Nessa condição, as espécies reativas permanecem por mais tempo na célula e reagem com componentes da membrana celular, enzimas e proteínas. De forma geral, os maiores efeitos gerados são a perda da seletividade da membrana celular, danos a proteínas e DNA, ruptura de lisossomos, inativação de enzimas, de canais iônicos e de receptores (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010).

Contamos com defesas enzimáticas e não enzimáticas no combate aos agentes oxidantes. Das enzimas, as mais importantes são: a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx).

A SOD é responsável pela reação de transformação do radical ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, que por sua vez será metabolizado pela CAT produzindo água e oxigênio (SALVADOR; HENRIQUES, 2005). A SOD contém manganês quando está na matriz mitocondrial ou cobre/zinco quando está na matriz extracelular.

O peróxido de hidrogênio pode ser reduzido pela CAT ou pela GPx. A família das GPx encontra-se em maior concentração no cérebro do que a CAT. Essas enzimas removem o peróxido de hidrogênio através da oxidação da glutathione reduzida (GSH) produzindo glutathione oxidada (GSSG) mais duas moléculas de água (HALLIWELL, 2006).

Espécies reativas podem reagir com estruturas não radicalares provocando uma reação em cadeia. Esse efeito é observado na lipoperoxidação onde uma cadeia de ácidos graxos ao ser fragmentada gera como produtos aldeídos e hidrocarbonetos. Essa liberação em cadeia levará eventualmente a ruptura de outras estruturas celulares, que por sua vez podem liberar metais e peróxido de hidrogênio desencadeando uma propagação descontrolada do dano oxidativo (HALLIWELL, 2006). Cabe ressaltar que alguns produtos da lipoperoxidação são tóxicos a célula e capazes de causar danos irreparáveis. A ocorrência de dano a uma cadeia de ácido graxo poliinsaturado leva a geração de hidroperóxidos e peróxidos cíclicos, além do aumento de prostaglandinas. Essa informação é relevante porque a maior concentração de prostaglandinas está relacionada com a sinalização inflamatória de macrófagos (HALLIWELL, 2006).

Outro recurso importante na redução do estresse oxidativo são as defesas antioxidantes não enzimáticas. Esses compostos são encontrados principalmente na alimentação. O ácido ascórbico, vitamina C, é encontrado em frutas cítricas e em alguns vegetais verde escuro e tem capacidade de “varrer” radicais livres devido sua estrutura facilitar a doação de elétrons. Essa vitamina é hidrossolúvel e atua melhor no plasma. O tocoferol, vitamina E, é encontrado nos vegetais verde escuro e frutos oleaginosos. Caracteriza-se por ser lipossolúvel e tem melhor desempenho antioxidante nas membranas

celulares. Também podemos mencionar os carotenoides, cujo principal representante é o β -caroteno, vitamina A, encontrados nas frutas e vegetais de cor alaranjada. Esse composto tem atuação sobre lipídeos oxidados (RAFNSSON, 2013).

O cérebro representa 20% do consumo de oxigênio do corpo de um adulto; contém grande presença de lipídios, alto consumo de energia e pouca presença de antioxidantes não enzimáticos (como o ácido ascórbico e o tocoferol). Somado a isso ele conta com uma quantidade importante de metais – ferro e cobre - no interior de suas células e baixa atividade das enzimas antioxidantes (GENC ET al., 2012). Não obstante, a injúria a uma célula pode levar a liberação de peróxidos, aldeídos e metais de forma que uma reação em cadeia acontecerá às células vizinhas. O dano causado pelo estresse oxidativo faz parte do processo normal de envelhecimento, pois após o período reprodutivo nossas defesas antioxidantes diminuem. (HALIWELL, 2006, apud Kirkwood, 2005).

Já foram constatadas algumas particularidades de certas doenças neurodegenerativas no que tange o dano oxidativo. Na doença de Parkinson, a região afetada (*substantia nigra*) apresenta menores quantidades de GSH e maiores concentrações de peróxidos lipídicos, carbonilas, além de oxidação da proteína constituinte da SOD. Na doença de Alzheimer foi demonstrado o mesmo dano a SOD, e a inativação de outras enzimas relacionadas com a síntese proteica e metabolismo energético Além disso, ambas as doenças apresentam agregados de proteínas defeituosas e modificação no metabolismo do ferro (HALLIWELL, 2006 apud Sultana ET al., 2006).

O que move a comunidade científica no estudo do envelhecimento cerebral é identificar fatores exógenos ao metabolismo natural que desencadeiam processos patológicos e provocam o envelhecimento precoce. Recentemente os estudos sobre poluição do ar caminharam nesse sentido, e apontam que a poluição é um fator prejudicial à saúde do SNC e o afeta através de diferentes modos, dentre eles a neuroinflamação e o estresse oxidativo.

1.4 Poluição do ar e SNC

As primeiras constatações do envolvimento da poluição com o dano ao SNC foram feitas em estudos que ao verificarem mortalidade de determinadas populações encontraram, além de eventos cardiovasculares e respiratórios, uma maior frequência de derrame cerebral (ÖBERDOSTER, 2004; POPE, DOCKERY; 2006). Um dos primeiros estudos sobre esse assunto encontrou um aumento no número de acidente vascular encefálico em pessoas que estavam expostas à fumaça da queima de carvão (ZHANG; YU; ZHOU, 1988). Na medida em que as pesquisas progrediram, a exposição aos poluentes do ar foi considerada um fator de risco para eventos cerebrovasculares, apesar de não se saber claramente os mecanismos envolvidos, uma vez que esse desfecho é causado por razões multifatoriais (KETTUNEN et al., 2007; LOKKEN et al., 2009; POPE; DOCKERY, 2006). Nascimento e cols., (2012) demonstraram um aumento de 12% do risco relativo para internação hospitalar, por razões cerebrovasculares, para cada aumento de 10 μ g de MP no ar. Entretanto, a literatura coloca que esse desfecho pode estar relacionado a efeitos causados pela exposição crônica a poluição como, por exemplo: inflamação sistêmica, alterações cardiovasculares e preexistência de doenças crônicas não transmissíveis como enfisema pulmonar, diabetes e hipertensão (MAHESWARAN et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2012).

A forma pela qual os poluentes atingem do SNC ainda é fonte de debates. Em 2001, Calderón-Garcidueñas ET al. analisaram o epitélio nasal, bulbo olfatório e cérebro de cães expostos a altas concentrações de poluição. Os autores encontraram no epitélio nasal e no trato respiratório alterações histológicas compatíveis com início precoce de patologias. A alteração no epitélio nasal implica em suscetibilidade a passagem de agentes tóxicos para os neurônios olfativos e diminuição da proteção da barreira que separa a via aérea superior do bulbo olfatório, permitindo o acesso de substâncias ao encéfalo. Outra constatação importante foi que esses animais tinham uma expressão maior da enzima óxido nítrico sintase nas células endoteliais e astrócitos. Esses dois tipos de células são cruciais no funcionamento da BHE. A liberação de óxido nítrico por parte delas leva a abertura da BHE, além da formação de espécies reativas de nitrogênio capazes de lesar a BHE

interrompendo de vez o funcionamento em algumas regiões. Em uma pesquisa subsequente feita com crianças e adultos jovens, foi encontrada uma alteração na regulação da enzima ciclooxigenase 2 interleucina 1 β e receptor CD14 no bulbo olfatório, nervo vago, córtex frontal, substância *nigra*, além de ruptura nas junções das veias nessas áreas (CALDERÓN-GARCIDUEÑAS 2008b). A neuroinflamação estava presente, pois a microglia encontrava-se ativada com uma maior produção de NF κ B e circulação aumentada de células imunes. A informação mais preocupante nessa pesquisa foi a presença precoce de proteína β -amilóide no bulbo olfatório e córtex frontal de crianças que ainda não haviam atingido a puberdade (CALDERÓN-GARCIDUEÑAS ET al., 2008b). Por fim, ao passo que esses mecanismos estão ativados, a BHE está ineficiente e circulação de células imunes aumentada, o MP ultrafino penetra o SNC trazendo consigo metais e lipopolissacarídeos adsorvidos em sua superfície, capazes de induzir o estresse oxidativo e propagar reações de lipoperoxidação e dano as proteínas e ao DNA (BLOCK et al., 2004; CALDERÓN-GARCIDUEÑAS ET al., 2008a, 2008b DONALDSON; STONE, 2003; OBERDORSTER et al., 2004).

Concomitante a isso, temos outra teoria em discussão que é o efeito da inflamação sistêmica gerada pela poluição. A passagem do MP para além da barreira entre o ar e o sangue desencadeia resposta inflamatória generalizada. A superprodução de citocinas pró-inflamatórias por parte dos pulmões afetados pela toxicidade do MP leva ao aumento na circulação de células imunes e mediadores inflamatórios (BLOCK et al., 2004). A presença constante de citocinas pró-inflamatórias na circulação estimula a produção de macrófagos, pois a produção desses componentes está associada a presença de agentes biológicos nocivos ao organismo ou processos infecciosos. Uma vez que essas células atravessam essa barreira, elas se diferenciam em microglia – as células de defesa do cérebro. A microglia ativada pela inflamação sistêmica desencadeia várias secreções de mediadores inflamatórios que inclui liberação de óxido nítrico, ERO, proteases, prostaglandinas, interleucinas e fatores de necrose tumoral (BLOCK; HONG, 2005). No meio desse processo inflamatório temos a ocorrência de estresse oxidativo em nível celular devido à produção de EO ser muito maior do que a capacidade das enzimas antioxidantes. Esse desequilíbrio lesa lipídios de membrana celular, inativa receptores e proteínas

que formam agregados. (MUHLFELD et al., 2008; SIMKHOVICH; KLEINMAN; KLONER, 2008).

O efeito de poluentes específicos nos ajuda a elucidar os mecanismos envolvidos mais especificamente. O MP chama a atenção devido a sua alta toxicidade e diversidade de componentes. Um estudo realizado para estudar os efeitos das nanopartículas no SNC foi realizado com carbono e concluiu que essas partículas provocaram neuroinflamação. A importância dessas nanopartículas de carbono é que elas são o material particulado sem os componentes adsorvidos em sua superfície (metais, lipopolissacarídeos, nitratos, amônia, etc.), e por essa razão pode-se afirmar que o MP é um agente pró- inflamatório por si só (BLOCK et al., 2012; CAMPBELL et al., 2012; NIWA et al., 2008; TIN TIN WIN et al., 2008). O material adsorvido no MP varia conforme as fontes emissoras deste. Muitos dos componentes na superfície do MP são tóxicos, como os metais ferro, cádmio, manganês e chumbo.

Considerando que diferentes regiões do encéfalo são afetadas, é natural a busca por alterações comportamentais associadas à poluição do ar. As doenças neurodegenerativas são foco de pesquisas para descobrir até que ponto a poluição contribui para esse surgimento. As doenças de Alzheimer (DA) e Parkinson (DP) são as mais prevalentes e a participação dos poluentes tem se demonstrado notória. Os primeiros estudos nesse âmbito foram conduzidos com cães cronicamente expostos à poluição em nível ambiental. Esses animais apresentaram deposição de proteína amilóide mesmo com idade inferior a um ano de vida. Os cães mais velhos tinham apoptose de células da glia, rupturas das barreiras da mucosa nasal e olfativa; além de placas de proteína amiloide uma década antes dos animais que viviam em áreas menos poluídas (CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, 2001, 2002, 2008b). Um estudo com partículas de diesel encontrou um aumento de TNF α no sangue e cérebro e ativação da microglia em ratos. Os autores ressaltam que a exposição ao diesel ativa a microglia e aumenta a sensibilidade dessas células a mediadores inflamatórios, além de provocar uma inflamação sistêmica e neuroinflamação local nas áreas cerebrais relacionadas à DA e DP. O modelo utilizado nesse estudo foi de exposição aguda através de instilação intratraqueal e o efeito observado após vinte e quatro horas. A instilação intratraqueal de *residual oil fly ash* (ROFA), partículas liberadas pela atividade

industrial, promoveu lipoperoxidação do tecido estriado, hipocampo e cerebelo e alterações comportamentais motoras (ZANCHI ET al., 2008, 2010).

As pesquisas envolvendo poluição atmosférica e SNC têm buscado estudar os mecanismos envolvidos no efeito tóxico sobre este tecido, correlacionando com àqueles envolvidos na gênese das doenças neurodegenerativas. . Estudo realizado com crianças com idade média de 10 anos apontou que as que viviam em ambiente poluído apresentavam também menor desempenho cognitivo (CALDERÓN-GARCIDUEÑAS ET al., 2008a). Em um estudo prospectivo, a exposição a partículas de carbono foi apontada como fator para redução na função cognitiva verbal e não verbal de crianças com idade média de nove anos (SUGLIA ET al., 2008). Outras pesquisas que tangenciam o assunto se referem à exposição ao cigarro e são consistentes na afirmação que é um fator que contribui para um menor desempenho cognitivo e escolar (CLIFFORD; LANG; CHEN, 2012).

Para estudar efeitos da poluição em nível ambiental *in vivo* foram desenvolvidos diferentes modelos de exposição. A instilação intratraqueal e intranasal consiste na deposição de partículas de poluentes direto nas vias aéreas e exemplifica um modelo de exposição aguda (GARDNER, 2000). O concentrador de partículas também permite utilizar partículas presentes no ambiente e em concentrações altas para averiguar efeitos de curta duração (RHODEN, 2004). Nesses modelos, foram encontradas informações importantes para compreender os efeitos da poluição do ar, como danos cardíacos, lipoperoxidação em regiões do encéfalo e efeitos pulmonares (ZANCHI, 2008; 2010; ARANTES-COSTA, 2008; DAMIANI, 2012). O modelo de estudo *in vivo* através de exposição crônica a poluição em nível ambiental tem vantagens metodológicas por representar os efeitos em longo prazo dos poluentes do sobre a saúde, pois mimetiza a exposição que as pessoas de centros urbanos vivem todos os dias. Estudos realizados em nosso laboratório apontam que a poluição de Porto Alegre danifica a memória espacial de ratos idosos e o estresse oxidativo nesses animais pode ter gerado também um comportamento ansiogênico (CICCONE, 2012). A poluição crônica também provoca alteração na memória discriminativa de curta duração de ratos. É importante considerar que os efeitos dos poluentes do ar não se limitam ao SNC, tampouco à vida adulta. O baixo desempenho cognitivo e

comportamental tem origem calcada também em outras questões toxicológicas como exposição a agentes tóxicos no período intrauterino, baixo peso ao nascer e exposição neonatal a agentes adversos (NEGRATO; GOMES, 2013). Fatores que se somam ao longo da vida e culminam em prejuízos diversos ao SNC.

1.5 Poluição do ar no início da vida

A infância tem como característica principal o crescimento rápido, intensa renovação celular e desenvolvimento de órgãos. Para verificar se o desenvolvimento do bebê está de acordo com o esperado para a idade gestacional, são utilizados parâmetros como peso ao nascer (PN), perímetro cefálico (PC), braquial e de tórax. Dentre esses, o baixo peso ao nascer (BPN) – classificado como inferior a 2500g - tem grande importância, pois reflete a condição de nutrição e desenvolvimento na vida intrauterina (BERNSTEIN et al., 2000; BRYANT et al., 2006; NEGRATO; GOMES, 2013). Para compreender a extensão dos danos que a poluição do ar pode causar na vida intrauterina, é necessário entender o grau de comprometimento que deficiências nessa fase da vida podem acarretar. Crianças nascidas prematuramente (ou pré-termo, antes de 37 semanas) podem ser classificadas como BPN porque o peso alcançado até o nascimento é inferior a 2.500g, mas não necessariamente são crianças pequenas para a idade gestacional (PIG). Um nascimento PIG implica obrigatoriamente na restrição no crescimento intrauterino (RCUI) seja por razões nutricionais ou toxicológicas. Por exemplo, crianças que nascem dentro do tempo esperado, mas sofreram privações no período na gestação nascem PIG em função da RCUI culminando em BPN pela restrição que sofreram. Ao passo que um bebê prematuro nasce BPN, mas porque nasceu antes do esperado e provavelmente se tivesse completado toda a gestação nasceria com peso e tamanho adequados para a idade gestacional, pois não sofreu RCUI (NEGRATO; GOMES, 2013).

Estudos alertam que a gravidez em ambiente poluído é fator de risco para BPN, prematuridade, bebês PIG e abortos (HANSEN ET al. 2008; PERERA ET al., 2004; SAPKOTA ET al., 2012; SHAH, 2011). Desde 1980 existe a discussão na literatura pediátrica sobre até que ponto os prejuízos intrauterinos são capazes de afetar a vida adulta. As respostas que surgem são

preocupantes, pois o BPN e RCUI estão associados a maior risco de diabetes tipo 2 hipertensão arterial sistêmica, doenças cardiovasculares e obesidade (BARKER; OSMOND, 1986; BERNSTEIN et al., 2000; HALES; BARKER, 1992)). Desta forma, embora as metodologias nos estudos epidemiológicos sobre a poluição do ar e nascimentos sejam diferentes e muitas vezes incomparáveis entre si, a OMS classificou a poluição do ar como nociva e prejudicial à saúde fetal (OMS, 2007).

Pesquisas na área da epigenética colocam que existem alterações de transcrição de genes em bebês que sofreram RCUI (NEGRATO; GOMES, 2013). Janssen ET al. (2012) analisaram alterações moleculares no DNA mitocondrial de placenta e cordão umbilical de mulheres participantes de um estudo de coorte sobre poluição. Foi concluído que a cada aumento de $10\mu\text{g}/\text{m}^3$ de MP no último mês de gravidez estava associado a uma diminuição 16% no conteúdo de DNA mitocondrial, mas não houve diferenças importantes para o cordão umbilical. Esse efeito observado do MP é semelhante ao encontrados em estudos com cigarro, e o resultado encontrado está associado a um aumento do estresse oxidativo (JANSSEN ET al., 2012). A transcrição de genes está modificada em crianças que sofreram RCUI, uma das características de problemas nesse mecanismo é através da detecção de acetilação e metilação (NEGRATO; GOMES, 2013). Em 2013, foi analisada a metilação do DNA placentário de mulheres que vivem em ambiente poluído, e foi encontrada hipometilação em diferentes fases gestacionais associada à variação na concentração de MP, resultados semelhantes aos encontrados em estudos feitos com tabaco (JANSSEN ET al., 2013). Há também relatos de marcadores inflamatórios, presença de estresse oxidativo e diminuição da função endotelial da placenta (SLAMA ET al., 2008; YORIFUJI ET al., 2012).

Diversos estudos encontraram resultados sobre peso da placenta e funcionalidade, baixo peso ao nascer, prematuridade em populações expostas aos poluentes do ar. Contudo, os autores dessas pesquisas colocam as dificuldades de controle sobre algumas variáveis como: dispersão dos poluentes na área acessa a hospitais públicos e privados, fatores comportamentais das mães (CHOI et al., 2012; VAN DEN HOOVEN et al., 2012; YORIFUJI et al., 2011).

Segundo meta-análise publicada por Shaw ET al. (2011), o dióxido de nitrogênio teve efeito de causa para o BPN, nascimento prematuro e tamanho pequeno do bebê para a idade gestacional, mas também houve estudos inconclusivos sobre este poluente. Estudos com dióxido de enxofre foram inconclusivos a respeito do baixo peso ao nascer, mas há indícios de associação com nascimento prematuro (LIU ET al., 2003; SAGIV ET al., 2005). O monóxido de carbono pareceu ter menos participação sobre efeitos adversos de desenvolvimento fetal, embora seja um dos poluentes cujo possível mecanismo de dano ao feto esteja mais bem descrito. Esse poluente liga-se a hemoglobina, diminuindo o oxigênio circulante e, como o feto tem menor capacidade de excretar esse componente, a oxigenação de seus tecidos é prejudicada causando retardo do crescimento intrauterino (RITZ; YU, 1999; SARTIANI et al., 2010).

Assim, ainda resta a dúvida sobre qual período gestacional é o mais suscetível a consequências causadas pela poluição. Diferentes períodos gestacionais foram avaliados em diferentes pesquisas, o que prejudica conclusões a respeito da participação dos poluentes (INIGUEZ ET al., 2012; SHAH, 2011). Sabe-se, por exemplo, que o primeiro trimestre é extremamente delicado por se tratar da formação do tubo neural e insultos nessa fase acarretam alterações no metabolismo lipídico; enquanto, o terceiro trimestre é marcado principalmente pelo ganho de peso e cumprimento fetal as privações nesse período causam RCUI, BPN e alteração no metabolismo da glicose (ARNOLD et al., 1991; KRAMER, 1987; RAVELLI et al., 1998). Além disso, a necessidade de conhecimento sobre os poluentes específicos é necessária para promover medidas de controle ambiental e cuidados a saúde. Nesse sentido, os estudos experimentais são de grande valia para poder mimetizar condições ambientais e controlar fatores como alimentação, estresse, exposição a outros químicos; além de permitirem aprofundar o conhecimento nos períodos gestacionais específicos.

Estudo feito com ratas em São Paulo aponta a primeira semana de gestação como a de maior suscetibilidade aos efeitos dos poluentes do ar por terem encontrado menor peso dos fetos e peso da placenta (ROCHA, 2008). Uma placenta com sua funcionalidade prejudicada acarreta menor fluxo sanguíneo para o feto e por consequência, RCUI e BPN. Dados na literatura

apontam que a poluição do ar em nível ambiental no nosso país prejudica a viabilidade fetal e a implantação embrionária no início da gestação (MOHALLEM et al., 2005). Em 2008, pesquisadores de São Paulo expuseram camundongos a poluição em nível ambiental e encontraram um aumento na difusão da placenta nas fêmeas expostas a poluição, e diferenças que sugerem que o ambiente com ar filtrado ofereceu menor estresse ambiental para esses animais (VERAS ET al., 2008). Posteriormente, os autores encontraram alterações no ciclo estral, folículos ovarianos além de diminuição da fertilidade, maior tempo para acasalamento e menor número de nascimentos em relação aos animais que viveram em ambiente de ar filtrado (VERAS ET al., 2009). Nesse mesmo estudo, foi encontrada a presença de metais pesados que estão adsorvidos na superfície do MP, sugerindo que esse poluente pode ter contribuído para o desfecho encontrado.

A literatura, embora ainda inconclusiva, mostra que a poluição afeta o desenvolvimento fetal e traz efeitos deletérios no nascimento. As limitações metodológicas em estudos de epidemiologia parecem ser alguns dos fatores que fazem os resultados serem divergentes (SHAH, 2010). Estudos experimentais são necessários no âmbito de investigação de mecanismos, período de maior susceptibilidade embrionária, poluentes envolvidos.

1.6 Comportamento alimentar

O ato de se alimentar e cessar o consumo de alimento envolve uma série de etapas e processos que se estendem desde a sinalização interna do organismo até aos estímulos externos que podem ativar o interesse pela comida. Exemplos de estímulo interno envolvem redução da glicose, aumento na produção de insulina, peristalse, condição de estresse, ciclo circadiano, etc. Além destes estímulos, existem também os ofertados pelo ambiente externo, tal como cheiro, palatabilidade, memória relacionada ao alimento, dentre outros (BENOIT e TRACY, 2009).

Inicialmente, o comportamento alimentar era entendido como um mecanismo muito bem regulado por algumas estruturas do hipotálamo (HT). O núcleo lateral e paraventricular eram responsáveis por induzir a ingestão de alimentos, e, os núcleos ventromedial e arqueado se encarregavam da

saciedade (ELMQUIST, 1999). Hoje, a literatura demonstra que esse comportamento se trata de um complexo mecanismo integrado por sinalizações oriundas do sistema digestório, homeostase energética, tecido adiposo e neurotransmissores (SCHWARTZ, 2000).

Assim como os humanos, os ratos consomem o seu alimento várias vezes ao longo de um dia. Um estudo que controlou a quantidade ingerida de comida e a frequência de ingestão revelou que a quantidade de ração consumida por refeição era variável, mas que quanto maior a quantidade ingerida maior o intervalo de tempo entre as refeições (SQUIRE, 2008). O volume gástrico também é um fator controlador do tamanho da refeição. Quando o estômago distende em razão do volume de alimento, receptores emitem sinal para o núcleo do trato solitário e *area postrema*, esses sinais chegam ao HT e, posteriormente, ao córtex quando a distensão gástrica é registrada (SQUIRE, 2008). Outro recurso utilizado para controlar a ingestão alimentar é a liberação do peptídeo colecistoquinina (CCK) que age nos receptores do nervo vago. Estudo realizado com antagonista da CCK demonstrou a incapacidade de cessar o consumo mesmo quando o estômago está distendido pelo alimento (GIBBS, 1973; SQUIRE, 2008). Além da CCK, a grelina exerce papel importante na regulação da ingestão de alimentos, porém seu efeito é voltado para o aumento do consumo alimentar. Esse hormônio é liberado pelo estômago e é um forte desencadeador na produção do hormônio do crescimento. Quando atravessa a BHE, a grelina atua nos centros hipotalâmicos e está em maior concentração em momentos de jejum. Os efeitos dela são a diminuição na oxidação de lipídeos, aumento na ingestão de alimentos e a diminuição no gasto energético (GIBBS, 1973; SQUIRE, 2008).

A homeostase energética também exerce papel fundamental no controle da ingestão de alimentos. O primeiro sinalizador hormonal relacionado ao controle alimentar foi a insulina. Quando liberada na circulação sanguínea, ela transmite a informação para cessação do consumo (SCHWARTZ, 2000). Está relacionada com o metabolismo energético, pois é a chave de entrada da glicose nas células. Um exemplo claro do seu envolvimento no controle do peso é o diabetes, situação em que a glicose não consegue entrar nas células e, mesmo assim, o indivíduo apresenta hiperfagia como mecanismo compensatório a essa disfunção energética. Não raramente o diabético

apresenta emagrecimento, em razão da energia consumida não estar sendo armazenada nos adipócitos (SQUIRE, 2008).

Os adipócitos têm se mostrado importantes na questão metabólica, e são células com funções muito mais complexas do que armazenar energia. São eles os responsáveis pela produção parcial da leptina, um hormônio que reduz a ingestão alimentar e aumenta o gasto energético através de sinalização hipotalâmica (TRACY, 2001). O receptor para este hormônio no cérebro é o ObRb, expresso no HT e também na BHE, e outras isoformas dele tem sido encontradas em diferentes tecidos. No momento da descoberta da leptina, a ideia que se tinha era que ela seria um hormônio capaz de prevenir a obesidade. Hoje se sabe que, assim como no diabetes, indivíduos com grande adiposidade desenvolvem resistência a leptina. A ação desse hormônio no HT promove a redução da ingestão de alimento e aumento do gasto energético, porém o SNC também exerce poder sobre a expressão de leptina, pois se sabe que uma redução de 10% do peso corporal provoca redução de apenas 53% na produção da molécula. Além disso, a concentração sofre influência de fatores como estresse metabólico, inflamação, inanição e privação de sono reforçando a ideia de que a homeostase da leptina é uma via de mão dupla entre SNC e tecido adiposo (van DJIK, 1997; SCHWARTZ, 2000).

No HT, a leptina liga-se ao receptor ObRb inibe a produção do neuropeptídeo Y (de efeito orexigênico) e aumenta a expressão dos neuropeptídeos anorexigênicos como o hormônio estimulante de alfa-melanócito e hormônio liberador de corticotropina (SQUIRE, 2008).

Outros neurotransmissores estão envolvidos na regulação do comportamento alimentar. A noradrenalina está relacionada ao estímulo do consumo de alimento quando atua no núcleo paraventricular do HT. Alguns estudos reportam que na deficiência ou depleção de dopamina, o indivíduo reduz drasticamente o consumo alimentar, e, esse sintoma estaria relacionado ao mau funcionamento do núcleo de recompensa no encéfalo (SCHWARTZ, 2000).

Apesar de hoje sabermos que a execução desse comportamento não está relacionada apenas a núcleos hipotalâmicos, eles ainda são principais envolvidos no recebimento de informações sobre o estado alimentar. Estudos clássicos demonstraram através de estimulação elétrica que os núcleos

paraventricular e lateral do HT eram os centros da fome, enquanto o núcleo arqueado e o ventromedial eram centros de saciedade. Atualmente, sabe-se que há envolvimento de outros centros cerebrais como o de motivação e recompensa, memória e estruturas como o hipocampo e amígdala medial (TRACY, 2001; SOHN, 2013). Contudo, os núcleos hipotalâmicos representam a maior parte de receptores relacionados a efeitos orexigênicos e anorexigênicos. Os neurônios chamados de NPY/AGP produzem o neurotransmissor *agouti related protein* (AGP) e estão localizados principalmente no núcleo arqueado e ventromedial do HT. Seu efeito principal é o aumento no consumo alimentar e redução do gasto energético. Outros neurônios expressam o neuropeptídeo pro opiomelanocortina (POMC) responsável por efeito anorexigênico (SCHWARTZ, 2000; SOHN, ELMQUIST, 2013).

Como visto até o momento, o comportamento alimentar envolve rotas neuroquímicas complexas e de funcionamento ainda não totalmente compreendido. Ainda assim, a literatura revela que lesões no hipotálamo e alterações nos neurotransmissores comprometem de forma substancial o bom funcionamento desse comportamento.

Fei ET al.(2013) induziram obesidade em ratos através de dieta hiperlipídica. Após alcançar a obesidade, alguns animais tiveram estimulação elétrica no núcleo arqueado do HT. Como resultado, os animais diminuíram o consumo alimentar, perderam peso e tiveram um aumento na expressão de dois peptídeos de efeito anorexigênico. Quando provocada uma lesão no mesmo núcleo, os autores não encontraram essas diferenças de controle alimentar. Eles concluíram que estimulações elétricas podem modular a neuroquímica envolvida nessa estrutura específica.

Em outro estudo, autores provocaram lesões no núcleo paraventricular do HT e injetaram neuropeptídeo Y ou grelina. Eles constataram que mediante lesão nesse núcleo, o primeiro perde seu efeito orexigênico, enquanto a grelina continua a agir e tem seu efeito otimizado em relação aos animais controle (WIATER, 2011; FEI, 2013).

Uma pesquisa feita com ratas grávidas desnutridas demonstrou que a prole teve menor peso ao nascer, e maior expressão de receptores para serotonina e leptina no núcleo arqueado do HT, indicando uma programação fetal para

maior consumo alimentar ao longo da vida (MANUEL-APOLINAR, 2010). Existem relatos de obesidade hipotalâmica, um efeito observado em pessoas vítimas de lesões nessa estrutura (EFFERS, 2012). Frequentemente as pessoas que desenvolvem essa doença são do sexo feminino, e um estudo observou que as mulheres com essa enfermidade apresentam volumes reduzidos de HT (TAYLOR, 2012; HA, 2013).

2. JUSTIFICATIVA

A poluição do ar é um problema de saúde pública e, conforme o relatório da OMS de 2013 é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de pulmão e contribui para o aparecimento do câncer de bexiga. Seus malefícios são relatados em diversos sistemas do organismo e se estendem desde danos teciduais locais até danos sistêmicos.

Dados da literatura apontam para o fato de que o SNC é também suscetível aos efeitos dos poluentes do ar, podendo sofrer danos irreversíveis. Possivelmente, a poluição atmosférica seja um dos fatores de causa do surgimento de muitas doenças, especialmente as neurodegenerativas. Hoje, contamos com estudos que demonstram prejuízos em estruturas encefálicas e nas suas execuções de função. Entretanto, o hipotálamo não se encontra nessas pesquisas, e pouco é conhecido sobre os possíveis efeitos dos poluentes do ar sobre esta estrutura cerebral.

Desta forma, esse estudo trata da investigação da exposição crônica aos poluentes atmosféricos em nível ambiental e influência sobre o comportamento alimentar de ratos e geração de estresse oxidativo no hipotálamo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da exposição crônica à poluição atmosférica em nível ambiental na cidade de Porto Alegre sobre o comportamento alimentar de ratos em diferentes fases da vida, verificando a participação dos oxidantes neste processo.

3.2 Objetivos específicos

a) Avaliar a lipoperoxidação no hipotálamo de ratos expostos cronicamente à poluição atmosférica em nível ambiental na cidade de Porto Alegre através da técnica das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;

b) Avaliar a atividade da enzima catalase em hipotálamo de ratos expostos cronicamente, à poluição atmosférica em nível ambiental na cidade de Porto Alegre;

c) Avaliar a atividade da enzima superóxido dismutase em hipotálamo de ratos expostos cronicamente, à poluição atmosférica em nível ambiental na cidade de Porto Alegre;

d) Avaliar consumo de alimento palatável dos ratos expostos cronicamente, à poluição atmosférica em nível ambiental na cidade de Porto Alegre nas fases da vida: infância, puberdade e adulto;

e) Avaliar consumo de alimento padrão dos ratos expostos cronicamente, à poluição atmosférica em nível ambiental na cidade de Porto Alegre nas fases da vida: infância, puberdade e adulto;

f) Avaliar ganho de peso dos ratos expostos cronicamente, à poluição atmosférica em nível ambiental na cidade de Porto Alegre nas fases da vida: infância, puberdade e adulto.

4. REFERÊNCIAS

Air Quality and Health: Fact sheet N° 313, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/en/> Acesso em: Out 2013.

Air Quality Guidelines: Global Update 2005. Disponível em: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/78638/E90038.pdf Acesso em Nov. 2013.

Arantes-Costa, F. M., F. D. Lopes, A. C. Toledo, P. A. Magliarelli-Filho, H. T. Moriya, R. Carvalho-Oliveira, T. Mauad, P. H. Saldiva and M. A. Martins (2008). "Effects of residual oil fly ash (ROFA) in mice with chronic allergic pulmonary inflammation." *Toxicol Pathol* 36(5): 680-686.

ARNOLD, C. C. Et al. Very low birth weight: a problematic cohort for epidemiologic studies of very small or immature neonates. *Am J Epidemiol*, v. 134, n. 6, p. 604-13, Sep 15 1991.

AUST, A. E. Et al. Particle characteristics responsible for effects on human lung epithelial cells. *Res Rep Health Eff Inst*, n. 110, p. 1-65; discussion 67-76, Dec 2002.

BARKER, D. J.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*, v. 1, n. 8489, p. 1077-81, May 10 1986.

BECKERMAN, B. S. et al. The association between chronic exposure to traffic-related air pollution and ischemic heart disease. *J Toxicol Environ Health A*, v. 75, n. 7, p. 402-11, 2012.

BELL, M. L. et al. The avoidable health effects of air pollution in three Latin American cities: Santiago, Sao Paulo, and Mexico City. *Environ Res*, v. 100, n. 3, p. 431-40, Mar 2006.

BENOIT, C. B.; TRACY, A. L. Behavioral controls of food intake. **Peptides**, v. 29, n. 1, p. 139-47, Jan 2009.

Benoit, S. C. and A. L. Tracy (2008). "Behavioral controls of food intake." *Peptides* 29(1): 139-147.

Benoit, S. C., A. L. Tracy, E. L. Air, K. Kinzig, R. J. Seeley and T. L. Davidson (2001). "The role of the hypothalamic melanocortin system in behavioral appetitive processes." *Pharmacol Biochem Behav* 69(3-4): 603-609.

BERNSTEIN, I. M. et al. Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network. *Am J Obstet Gynecol*, v. 182, n. 1 Pt 1, p. 198-206, Jan 2000.

BLOCK, M. L. et al. Nanometer size diesel exhaust particles are selectively toxic to dopaminergic neurons: the role of microglia, phagocytosis, and NADPH oxidase. *FASEB J*, v. 18, n. 13, p. 1618-20, Oct 2004.

BLOCK, M. L. et al. The outdoor air pollution and brain health workshop. *Neurotoxicology*, v. 33, n. 5, p. 972-84, Oct 2012.

BLOCK, M. L.; CALDERON-GARCIDUENAS, L. Air pollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease. *Trends Neurosci*, v. 32, n. 9, p. 506-16, Sep 2009.

BLOCK, M. L.; HONG, J. S. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol*, v. 76, n. 2, p. 77-98, Jun 2005.

BRAGA, A. L. et al. [Association between air pollution and respiratory and cardiovascular diseases in Itabira, Minas Gerais State, Brazil]. *Cad Saude Publica*, v. 23 Suppl 4, p. S570-8, 2007.

BRUNEKREEF, B.; HOLGATE, S. T. Air pollution and health. *Lancet*, v. 360, n. 9341, p. 1233-42, Oct 19 2002.

BRYANT, W. K. et al. Period and birth-cohort effects on age of first phencyclidine (PCP) use among drug users in New York City, 1960 to 2000. *Ann Epidemiol*, v. 16, n. 4, p. 266-72, Apr 2006.

CALDERON-GARCIDUENAS, L. et al. Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: a pilot study with children and dogs. *Brain Cogn*, v. 68, n. 2, p. 117-27, Nov 2008.

CALDERON-GARCIDUENAS, L. et al. Canines as sentinel species for assessing chronic exposures to air pollutants: part 2. Cardiac pathology. *Toxicol Sci*, v. 61, n. 2, p. 356-67, Jun 2001.

CALDERON-GARCIDUENAS, L. et al. Long-term air pollution exposure is associated with neuroinflammation, an altered innate immune response, disruption of the blood-brain barrier, ultrafine particulate deposition, and accumulation of amyloid beta-42 and alpha-synuclein in children and young adults. *Toxicol Pathol*, v. 36, n. 2, p. 289-310, Feb 2008.

CALDERON-GARCIDUENAS, L. et al. Pediatric respiratory and systemic effects of chronic air pollution exposure: nose, lung, heart, and brain pathology. *Toxicol Pathol*, v. 35, n. 1, p. 154-62, Jan 2007.

Calderon-Garciduenas, L., B. Azzarelli, H. Acuna, R. Garcia, T. M. Gambling, N. Osnaya, S. Monroy, D. E. L. T. MR, J. L. Carson, A. Villarreal-Calderon and B. Rewcastle (2002). "Air pollution and brain damage." *Toxicol Pathol* 30(3): 373-389.

CAMPBELL, A. et al. Particulate matter in polluted air may increase biomarkers of inflammation in mouse brain. *Neurotoxicology*, v. 26, n. 1, p. 133-40, Jan 2005.

CHOI, H. et al. Fetal window of vulnerability to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons on proportional intrauterine growth restriction. *PLoS One*, v. 7, n. 4, p. e35464, 2012.

CICCONE, A. C. Avaliação Comportamental e de Estresse Oxidativo de ratos Expostos à Poluição do Ar na Cidade de Porto Alegre – RS. 74 p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Porto Alegre, 2012

CLIFFORD, A.; LANG, L.; CHEN, R. Effects of maternal cigarette smoking during pregnancy on cognitive parameters of children and young adults: a literature review. *Neurotoxicol Teratol*, v. 34, n. 6, p. 560-70, Nov-Dec 2012.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Resolução n. 03, de 28 de junho de 1990. Diário Oficial da União de 22/08/90, Seção I, Págs. 15.937 a 15.939.

CRAIG, L. et al. Air pollution and public health: a guidance document for risk managers. *J Toxicol Environ Health A*, v. 71, n. 9-10, p. 588-698, 2008.

CRAIG, L. et al. Strategies for clean air and health. *J Toxicol Environ Health A*, v. 70, n. 3-4, p. 187-90, Feb 1 2007.

Damiani, R. M., M. O. Piva, M. R. Petry, P. H. Saldiva, A. Tavares Duarte de Oliveira and C. R. Rhoden (2012). "Is cardiac tissue more susceptible than lung to oxidative effects induced by chronic nasotropic instillation of residual oil fly ash (ROFA)?" *Toxicol Mech Methods* 22(7): 533-539.

DE MIRANDA, R. M. et al. Urban air pollution: a representative survey of PM(2.5) mass concentrations in six Brazilian cities. *Air Qual Atmos Health*, v. 5, n. 1, p. 63-77, Mar 2012.

DONALDSON, K.; STONE, V. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann Ist Super Sanita*, v. 39, n. 3, p. 405-10, 2003.

EFFERS, C. Studies of different female rat models of hypothalamic obesity. *J. Pediatr*. v. 161, n. 5, p. 855-63, Jun 2012.

ELMQUIST, J. K. From lesions to leptin: Hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*. v. 22, p. 221-32, 1999.

Elmqvist, J. K., C. F. Elias and C. B. Saper (1999). "From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight." *Neuron* 22(2): 221-232.

FLECK, A. S. Avaliação da qualidade do ar na região metropolitana de Porto Alegre por meio de biomonitoramento e monitoramento passivo. 58 p. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Porto Alegre, 2012.

FREITAS, C. et al. [Hospital admissions and mortality: association with air pollution in Sao Paulo, Brazil, 1993 to 1997]. *Rev Saude Publica*, v. 38, n. 6, p. 751-7, Dec 2004.

Gardner, S. Y., J. R. Lehmann and D. L. Costa (2000). "Oil fly ash-induced elevation of plasma fibrinogen levels in rats." *Toxicol Sci* 56(1): 175-180.

GENC, S. et al. The adverse effects of air pollution on the nervous system. *J Toxicol*, v. 2012, p. 782462, 2012.

GHELFI, E. et al. Cardiac oxidative stress and dysfunction by fine concentrated ambient particles (CAPs) are mediated by angiotensin-II. *Inhal Toxicol*, v. 22, n. 11, p. 963-72, Sep 2010.

GIBBS, J. Cholecystokinin decreases food intake in rats. **J. Comp. Physiol. Psychol** v. 84, p. 488-95, 1973.

Gibbs, J., R. C. Young and G. P. Smith (1973). "Cholecystokinin elicits satiety in rats with open gastric fistulas." *Nature* 245(5424): 323-325.

GURGUEIRA, S. A. et al. Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environ Health Perspect*, v. 110, n. 8, p. 749-55, Aug 2002.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 393, n. 4, p. 561-4, Mar 19 2010.

HA, J. Association of obesity-mediated insulin resistance and hypothalamic volumes: possible sex differences. **Dis Markers**. v. 35, n. 4, 249-59, 2013

HALES, C. N.; BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, v. 35, n. 7, p. 595-601, Jul 1992.

HANSEN, C. A.; BARNETT, A. G.; PRITCHARD, G. The effect of ambient air pollution during early pregnancy on fetal ultrasonic measurements during mid-pregnancy. *Environ Health Perspect*, v. 116, n. 3, p. 362-9, Mar 2008.

Indoor air pollution from solid fuels and risk of low birth weight and stillbirth: Report from a symposium held at the Annual Conference of the International Society for Environmental Epidemiology (ISEE), 2007. Disponível em: www.who.int Acesso em: 01 Out. 2013

INIGUEZ, C. et al. Prenatal exposure to traffic-related air pollution and fetal growth in a cohort of pregnant women. *Occup Environ Med*, v. 69, n. 10, p. 736-44, Oct 2012.

JANSSEN, B. G. et al. Placental DNA hypomethylation in association with particulate air pollution in early life. *Part Fibre Toxicol*, v. 10, n. 1, p. 22, Jun 7 2013.

JANSSEN, B. G. et al. Placental mitochondrial DNA content and particulate air pollution during in utero life. *Environ Health Perspect*, v. 120, n. 9, p. 1346-52, Sep 2012.

KAISER, J. Air pollution. Evidence mounts that tiny particles can kill. *Science*, v. 289, n. 5476, p. 22-3, Jul 7 2000.

KAWANAKA, Y. et al. Estimation of the contribution of ultrafine particles to lung deposition of particle-bound mutagens in the atmosphere. *Sci Total Environ*, v. 409, n. 6, p. 1033-8, Feb 15 2011.

KETTUNEN, J. et al. Associations of fine and ultrafine particulate air pollution with stroke mortality in an area of low air pollution levels. *Stroke*, v. 38, n. 3, p. 918-22, Mar 2007.

KOCH, L. G.; BRITTON, S. L. Aerobic metabolism underlies complexity and capacity. *J Physiol*, v. 586, n. 1, p. 83-95, Jan 1 2008.

KRAMER, M. S. Intrauterine growth and gestational duration determinants. *Pediatrics*, v. 80, n. 4, p. 502-11, Oct 1987.

LADEN, F. et al. Reduction in fine particulate air pollution and mortality: Extended follow-up of the Harvard Six Cities study. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 173, n. 6, p. 667-72, Mar 15 2006.

LIU, S. et al. Association between gaseous ambient air pollutants and adverse pregnancy outcomes in Vancouver, Canada. *Environ Health Perspect*, v. 111, n. 14, p. 1773-8, Nov 2003.

LOANE, C. et al. Ambient particulate matter and its potential neurological consequences. *Rev Neurosci*, v. 24, n. 3, p. 323-35, 2013.

LOCKIE, S. H. The hormonal signature of energy deficit: Increasing the value of food reward. **Mol. Metab.** v. 2, p. 329-36, Aug 2013.

LOKKEN, R. P. et al. Air pollution and risk of stroke: underestimation of effect due to misclassification of time of event onset. *Epidemiology*, v. 20, n. 1, p. 137-42, Jan 2009.

LONDAHL, J. et al. Experimental determination of the respiratory tract deposition of diesel combustion particles in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Part Fibre Toxicol*, v. 9, p. 30, 2012.

MAHESWARAN, R. et al. Impact of outdoor air pollution on survival after stroke: population-based cohort study. *Stroke*, v. 41, n. 5, p. 869-77, May 2010.

MANUEL-APOLINAR, L. Role of prenatal undernutrition in the expression of serotonin, dopamine, and leptin receptors in adult mice: implications of food intake. **Mol Med Rep**. v. 301, n. 5, p. 1569-83, Nov 2011.

Manuel-Apolinar, L., A. Zarate, L. Rocha and M. Hernandez (2010). "Fetal malnutrition affects hypothalamic leptin receptor expression after birth in male mice." *Arch Med Res* 41(4): 240-245.

MARTINS, L.C. Relação entre poluição e atendimentos por infecção das vias aéreas superiores no município de São Paulo: avaliação do rodízio de veículos. *Rev Bras Epidemiol*. v. 4, n.3, p. 220-230, 2001.

MIRAGLIA, S. G.; SALDIVA, P. H.; BOHM, G. M. An evaluation of air pollution health impacts and costs in Sao Paulo, Brazil. *Environ Manage*, v. 35, n. 5, p. 667-76, May 2005.

MOHALLEM, S. V. et al. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of Sao Paulo. *Environ Res*, v. 98, n. 2, p. 196-202, Jun 2005.

MUHLFELD, C. et al. Interactions of nanoparticles with pulmonary structures and cellular responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 294, n. 5, p. L817-29, May 2008.

NASCIMENTO, L. F. et al. Environmental pollutants and stroke-related hospital admissions. *Cad Saude Publica*, v. 28, n. 7, p. 1319-24, Jul 2012.

NEGRATO, C.; GOMES, M. Low birth weight: causes and consequences. *Diabetol Metab Syndr*, v. 5, n. 1, p. 49, Sep 2 2013.

NEMMAR, A. et al. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 164, n. 9, p. 1665-8, Nov 1 2001.

NIWA, Y. et al. Inhalation exposure to carbon black induces inflammatory response in rats. *Circ J*, v. 72, n. 1, p. 144-9, Jan 2008.

OBERDORSTER, G. et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*, v. 16, n. 6-7, p. 437-45, Jun 2004.

O'NEILL, M. S. et al. Air pollution and mortality in Latin America: the role of education. *Epidemiology*, v. 19, n. 6, p. 810-9, Nov 2008.

PERDUE, L. A. et al. Rapid health impact assessment of policies to reduce vehicle miles traveled in Oregon. *Public Health*, v. 126, n. 12, p. 1063-71, Dec 2012.

PERERA, F. P. et al. Molecular evidence of an interaction between prenatal environmental exposures and birth outcomes in a multiethnic population. **Environ Health Perspect**, v. 112, n. 5, p. 626-30, Apr 2004.

PERERA, F. P. et al. Molecular evidence of an interaction between prenatal environmental exposures and birth outcomes in a multiethnic population. *Environ Health Perspect*, v. 112, n. 5, p. 626-30, Apr 2004.

PERERA, F. P. et al. Prenatal exposure to air pollution, maternal psychological distress, and child behavior. *Pediatrics*, v. 132, n. 5, p. e1284-94, Nov 2013.

POPE, C. A., 3RD; DOCKERY, D. W. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J Air Waste Manag Assoc*, v. 56, n. 6, p. 709-42, Jun 2006.

POPE, C. A., 3RD; EZZATI, M.; DOCKERY, D. W. Fine-particulate air pollution and life expectancy in the United States. *N Engl J Med*, v. 360, n. 4, p. 376-86, Jan 22 2009.

PUETT, R. C. et al. Chronic fine and coarse particulate exposure, mortality, and coronary heart disease in the Nurses' Health Study. *Environ Health Perspect*, v. 117, n. 11, p. 1697-701, Nov 2009.

Rafnsson, S. B., V. Dilis and A. Trichopoulou (2013). "Antioxidant nutrients and age-related cognitive decline: a systematic review of population-based cohort studies." *Eur J Nutr* 52(6): 1553-1567.

RAVELLI, A. C. et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet*, v. 351, n. 9097, p. 173-7, Jan 17 1998.

RHODEN, C. R. et al. PM-induced cardiac oxidative stress and dysfunction are mediated by autonomic stimulation. *Biochim Biophys Acta*, v. 1725, n. 3, p. 305-13, Oct 10 2005.

RITZ, B.; YU, F. The effect of ambient carbon monoxide on low birth weight among children born in southern California between 1989 and 1993. *Environ Health Perspect*, v. 107, n. 1, p. 17-25, Jan 1999.

Rocha, E. S. I. R., A. J. Lichtenfels, L. A. Amador Pereira and P. H. Saldiva (2008). "Effects of ambient levels of air pollution generated by traffic on birth and placental weights in mice." *Fertil Steril* 90(5): 1921-1924.

ROMERO, C. E. M. O papel dps hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade, **Rev. Nut.**, v. 19, n. 1, p. 85-91, jan/fev. 2006.

- ROMIEU, I. et al. Multicity study of air pollution and mortality in Latin America (the ESCALA study). *Res Rep Health Eff Inst*, n. 171, p. 5-86, Oct 2012.
- SAGIV, S. K. et al. A time-series analysis of air pollution and preterm birth in Pennsylvania, 1997-2001. *Environ Health Perspect*, v. 113, n. 5, p. 602-6, May 2005.
- SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. *Radicais Livres e a resposta celular ao estresse oxidativo*. Editora da Ulbra, 2005.
- SAMOLI, E. et al. Acute effects of ambient particulate matter on mortality in Europe and North America: results from the APHENA study. *Environ Health Perspect*, v. 116, n. 11, p. 1480-6, Nov 2008.
- SAPKOTA, A. et al. Exposure to particulate matter and adverse birth outcomes: a comprehensive review and meta-analysis. *Air Qual Atmos Health* . v. 5, p. 369-381, 2012.
- SARTIANI, L. et al. Prenatal exposure to carbon monoxide delays postnatal cardiac maturation. *Lab Invest*, v. 90, n. 11, p. 1582-93, Nov 2010.
- SCHIKOWSKI, T. et al. Long-term air pollution exposure and living close to busy roads are associated with COPD in women. *Respir Res*, v. 6, p. 152, 2005.
- SCHWARTZ, J. What are people dying of on high air pollution days? *Environ Res*, v. 64, n. 1, p. 26-35, Jan 1994.
- SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n.6, p. 661-71, 2000.
- SEATON, A. et al. Particulate air pollution and the blood. *Thorax*, v. 54, n. 11, p. 1027-32, Nov 1999.
- SEIGNEUR, C. Current understanding of ultrafine particulate matter emitted from mobile sources. *J Air Waste Manag Assoc*, v. 59, n. 1, p. 3-17, Jan 2009.
- SHAH, P. S.; BALKHAIR, T.; KNOWLEDGE SYNTHESIS GROUP ON DETERMINANTS OF PRETERM, L. B. W. B. Air pollution and birth outcomes: a systematic review. *Environ Int*, v. 37, n. 2, p. 498-516, Feb 2011.
- SIMKHOVICH, B. Z.; KLEINMAN, M. T.; KLONER, R. A. Air pollution and cardiovascular injury epidemiology, toxicology, and mechanisms. *J Am Coll Cardiol*, v. 52, n. 9, p. 719-26, Aug 26 2008.
- SLAMA, R. et al. Meeting report: atmospheric pollution and human reproduction. *Environ Health Perspect*, v. 116, n. 6, p. 791-8, Jun 2008.

SOHN, J. Neuronal circuits that regulate feeding behavior and metabolism. **Trend. Neurosc**, v.36, n. 9, p. 504-12, Sep 2013.

Sohn, J. W., J. K. Elmquist and K. W. Williams (2013). "Neuronal circuits that regulate feeding behavior and metabolism." *Trends Neurosci* 36(9): 504-512.

SQUIRE, L. *Fundamental Neuroscience*. 3^a ed.: Elsevier, 2008. Burlington, EUA. 1.277p.

STELLAR, E. The physiology of motivation. **Psychol.** v. 61, n. 5, 1964.

SUGLIA, S. F. et al. Association of black carbon with cognition among children in a prospective birth cohort study. *Am J Epidemiol*, v. 167, n. 3, p. 280-6, Feb 1 2008.

TAYLOR, M. Hypothalamic-pituitary lesions in pediatric patients: endocrine symptoms often precede neuro-ophthalmic presenting symptoms. **J Pediatr.** v. 161, n. 5, p. 855-863, 2012.

TIN TIN WIN, S. et al. Changes in neurotransmitter levels and proinflammatory cytokine mRNA expressions in the mice olfactory bulb following nanoparticle exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 226, n. 2, p. 192-8, Jan 15 2008.

U. S. Environmental Protection Agency – EPA . National Ambient Air Quality Standards (NAAQS). Disponível em: <http://www.epa.gov/air/caa/peg/> Acesso em: Out 2013.

U. S. Environmental Protection Agency – EPA. Disponível em: <http://www.epa.gov/air/criteria.html> Acesso em: Out 2013.

U.S. Environmental Protection Agency – EPA . Air Quality Index: A Guide to Air Quality and your health. Ago 2009.

VAN DEN HOOVEN, E. H. et al. Air pollution exposure estimation using dispersion modelling and continuous monitoring data in a prospective birth cohort study in The Netherlands. *Environ Health*, v. 11, p. 9, 2012.

van Dijk, G., J. C. Donahey, T. E. Thiele, A. J. Scheurink, A. B. Steffens, C. W. Wilkinson, R. Tenenbaum, L. A. Campfield, P. Burn, R. J. Seeley and S. C. Woods (1997). "Central leptin stimulates corticosterone secretion at the onset of the dark phase." *Diabetes* 46(11): 1911-1914.

VERAS, M. M. et al. Chronic exposure to fine particulate matter emitted by traffic affects reproductive and fetal outcomes in mice. *Environ Res*, v. 109, n. 5, p. 536-43, Jul 2009.

VERAS, M. M. et al. Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. *Biol Reprod*, v. 79, n. 3, p. 578-84, Sep 2008.

WANG, F. Arcuate nucleus of hypothalamus is involved in mediating the satiety effect of electroacupuncture in obese rats. **Pep.** v. 32, p. 2394-99, 2011.

WANG, J. Neuropeptide Y loses its orexigenic effect in rats with lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus. **End Res.** v. 38, n. 1, p. 8-14, 2013.

WIATER, M. F. Circadian integration of sleep-wake and feeding requires NPY receptor-expressing neurons in the mediobasal hypothalamus. **J Pediatr Endocrinol Metab.** v. 24, n. 3, p. 131-37, 2011.

Wiater, M. F., S. Mukherjee, A. J. Li, T. T. Dinh, E. M. Rooney, S. M. Simasko and S. Ritter (2011). "Circadian integration of sleep-wake and feeding requires NPY receptor-expressing neurons in the mediobasal hypothalamus." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301(5): R1569-1583.

WILSON, W. E.; MAR, T. F.; KOENIG, J. Q. Influence of exposure error and effect modification by socioeconomic status on the association of acute cardiovascular mortality with particulate matter in Phoenix. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, v. 17 Suppl 2, p. S11-9, Dec 2007.

YORIFUJI, T. et al. Residential proximity to major roads and placenta/birth weight ratio. *Sci Total Environ*, v. 414, p. 98-102, Jan 1 2012.

YORIFUJI, T. et al. Residential proximity to major roads and preterm births. *Epidemiology*, v. 22, n. 1, p. 74-80, Jan 2011.

ZANCHI, A. C. et al. Chronic nasal instillation of residual-oil fly ash (ROFA) induces brain lipid peroxidation and behavioral changes in rats. *Inhal Toxicol*, v. 20, n. 9, p. 795-800, Jul 2008.

ZANCHI, A. C. et al. Hippocampus lipid peroxidation induced by residual oil fly ash intranasal instillation versus habituation to the open field. *Inhal Toxicol*, v. 22, n. 1, p. 84-8, Jan 2010.

ZANCHI, A. C. et al. Pre and post-natal exposure to ambient level of air pollution impairs memory of rats: the role of oxidative stress. *Inhal Toxicol*, v. 22, n. 11, p. 910-8, Sep 2010.

ZHANG, Z. F.; YU, S. Z.; ZHOU, G. D. Indoor air pollution of coal fumes as a risk factor of stroke, Shanghai. *Am J Public Health*, v. 78, n. 8, p. 975-7, Aug 1988.

5. ARTIGO

Periódico internacional: Inhalation Toxicology

Fator	de	Impacto	2012:	1.894
Quatorze edições publicadas por ano.				
ISSN:	0895-8378	(print),	1091-7691	(electronic)

A exposição à poluição do ar em nível ambiental, durante o período pré e pós natal, altera o ganho de peso e comportamento alimentar de ratos, mas não causa lipoperoxidação.

Lucianna Schmitt

Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica, Universidade de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rio Grande do Sul, Brasil.

Ana Claudia Tedesco Zanchi

Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica, Universidade de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rio Grande do Sul, Brasil.

Cláudia Ramos Rhoden

Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde,, Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica, Universidade de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rio Grande do Sul, Brasil.

Endereço para correspondência

Lucianna Schmitt

Av. Senador Salgado Filho, 320, apto 1201 – Centro – Porto Alegre- Brazil

CEP: 90010-220

Email: luciannatt@yahoo.com.br

Tel: +55(51)3093-1819

A exposição à poluição do ar em nível ambiental, durante o período pré e pós natal, altera o ganho de peso e comportamento alimentar de ratos, mas não causa lipoperoxidação.

Lucianna Schmitt¹, Ana C.T. Zanchi¹, Claudia Ramos Rhoden¹

¹ Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica, Universidade de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rio Grande do Sul, Brasil.

Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar o comportamento alimentar e desenvolvimento de ratos expostos a poluição do ar em longo prazo e a participação dos agentes oxidantes. Ratos Wistar machos foram divididos em dois grupos: ar filtrado (FA, n= 15) exposto desde o período intrauterino ao ar filtrado, e ar não filtrado (NFA, n= 13) exposto desde a fase intrauterina à poluição do ar em nível ambiental. O consumo de ração foi monitorado por todo o experimento. O teste de consumo do alimento palatável foi realizado nas fases: infância, puberdade e adulta. Aos 150 dias, os animais foram eutanasiados e o hipotálamo dissecado para análise de estresse oxidativo. O grupo FA reduziu o consumo de ração ao longo da vida enquanto o grupo NFA aumentou o seu consumo nas fases infância e puberdade ($p < 0,01$), na fase adulta não houve diferença para o consumo de ração entre os grupos. Houve interação entre os fatores exposição aos poluentes e fase da vida ($F(2,210)=42,629$ $p < 0,001$). NFA apresentou menor massa corpórea em relação a FA durante todo o experimento, FA consumiu mais alimento palatável na fase adulta enquanto NFA na puberdade. NFA apresentou menor consumo de alimento palatável em todas as fases da vida em relação à FA ($p < 0,01$). A análise para estresse oxidativo não apresentou diferença entre os grupos. A poluição do ar prejudicou o desenvolvimento e interferiu no consumo alimentar, mas a ação de agentes oxidantes não parece estar envolvida nesse processo.

Palavras chave: poluição do ar, comportamento alimentar, estresse oxidativo, hipotálamo, peso.

Abstract

The aim of this study was to investigate feeding behavior after prenatal and during post natal long-term exposure to air pollution and the role of oxidants in these parameters. Male wistar rats were divided into two groups: filtered air (FA, n= 15) exposed since intrauterine life to filtered air and non-filtered air (NFA, n=13) exposed since intrauterine life to ambient levels of air pollution. Food consumption was monitored since post natal day 21, and the rats were tested for palatable food consumption in childhood, youth and adulthood. When they reached 150 days, rats were euthanized and hypothalamus was dissected for oxidative stress analysis. FA group reduced the food consumption during life ($p < 0,001$) NFA group raised the food consumption in childhood and youth ($p < 0,001$) but in adulthood there was no difference from youth and no difference when compared to FA consumption on this same life stage. There was an interaction between exposure and life stages ($F(2,210)=42,629$ $p < 0,001$). NFA had a lower body weight than FA group during the whole experiment. FA had more palatable food in adulthood while NFA group on youth. NFA group had a significant lower consumption of palatable food in all life stages ($p < 0,001$). Oxidative stress analysis had no difference between groups. Therefore, exposure to air pollution seems to impair weight gain since birth and the pup are not able to catch up this damage during life, and also alters food consumption. The oxidative stress didn't seem to mediate these behavioral changes.

Keywords: air pollution, feeding behavior, oxidative stress, hypothalamus

Introdução

A poluição do ar é uma mistura de gases, componentes orgânicos e material particulado (MP) que representa um sério problema ambiental. Estudos epidemiológicos mostram a associação entre a exposição a altas concentrações de poluentes atmosféricos e o aumento no número de admissões hospitalares por causas respiratórias, infarto e acidente vascular encefálico (Saldiva PH et al. 1995; Pope & Dockery, 2006; Forastiere F & Agabiti N.2013). O MP alcança a circulação sanguínea periférica, sendo capaz de atingir vários órgãos, inclusive o sistema nervoso central (SNC) onde causa inflamação (Shimada et al. 2006; Calderon-Garcidueñas et al.2008; Oberdorster et al. 2004; Peters et al.2006). A Inflamação está envolvida na etiologia de diferentes doenças, principalmente neurodegenerativas.

O SNC corresponde a um órgão alvo ao estresse oxidativo em função do seu alto consumo de energia e conteúdo celular rico em proteínas e lipídios. Zanchi et al. 2008 relataram presença de lipoperoxidação no tecido estriado e cerebelo de ratos cronicamente expostos a instilação intranasal de *residual oil fly ash* (ROFA), associado a uma diminuição na atividade motora. Em outro estudo, o mesmo grupo de pesquisadores observou que a exposição à poluição do ar desde a fase intrauterina até os 150 dias de vida produziu estresse oxidativo no córtex e menor desempenho no teste de memória discriminativa de curto prazo (Zanchi et al.2010A exposição crônica aos poluentes causa danos desde a fase pré-natal e tem como desfecho o baixo peso ao nascer e danos no funcionamento placentário mediado por estresse oxidativo tanto em animais, quanto em humanos (Veras et al. 2008; van den Hooven et al. 2012; Janssen et al. 2013, Laurent O et al. 2013).). Estes achados corroboram dados da literatura que demonstram que o estresse oxidativo é um mediador dos efeitos adversos causados pela poluição do ar.

Até o momento, a poluição do ar foi associada a danos em diferentes fases da vida e em diferentes órgãos. Os danos que os poluentes podem causar no SNC representam uma importante área de estudo, porém, poucas pesquisas relacionaram reflexos comportamentais às áreas afetadas no cérebro.

O objetivo desse estudo foi investigar o comportamento alimentar de ratos após a exposição pré e pós natal à poluição do ar e verificar o papel dos agentes oxidantes nesse processo.

Métodos

Cuidados Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (CEP 1093/10). O presente estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes nacionais e internacionais de bem estar animal.

Desenho Experimental

Ratas grávidas oriundas das câmaras FAC e NFAC tiveram seu estado clínico monitorado até a data do parto. Cada ninhada teve seu peso aferido semanalmente até que completasse 21 dias. O grupo de ratos machos nascidos no ar filtrado compôs o grupo FA (n = 15); enquanto, os ratos do ambiente de ar não filtrado compôs o grupo NFA (n = 13). Os animais foram alocados em caixas moradia com 4 animais por caixa, e permaneceram em seus ambientes desde o nascimento até que se completasse 150 dias. Esse desenho experimental foi utilizado para avaliar as variáveis: consumo alimentar padrão, teste de alimento palatável e ganho de peso nas fases da vida infância, puberdade e adulto.

Câmaras de Exposição

As câmaras de exposição à poluição ambiental são constituídas de uma estrutura metálica com térreo e mezanino, revestida com filme plástico de proteção ultravioleta. No mezanino estão localizadas duas salas que correspondem à câmara de ar não filtrado (NFAC) e à câmara de ar filtrado (FAC). NFAC temo fluxo de ar com um filtro mecânico para impedir a passagem de poeira, insetos e folhas. A câmara de ar filtrado (FAC) recebe o ar que passa pelo mesmo filtro mecânico, e também por mais cinco filtros: filtro para partículas grossas; filtro de carvão ativado com capacidade de neutralizar os gases H₂S, SO₂, Cl₂ em 20%, 5% e *% respectivamente; filtro químico de

permanganato de potássio (*Purafil Chemi Select*®) capaz de neutralizar 14%, 7% e 4,9% dos gases H₂S, SO₂ e NO; filtro de alta eficiência para MP com capacidade de retenção de 99,97% de poeira e MP com diâmetro de até 0,3µm (*HEPA High Efficiency Particulate Air* – Borges e Katayama, Brasil). A pressão dentro de ambas as câmaras não excede a pressão atmosférica. Os ratos Wistar matrizes que deram origem aos animais utilizados nesse estudo foram mantidos dentro de cada câmara desde o período de espermatogênese e previamente à gestação.

Determinação do consumo alimentar, monitoramento do ganho de peso e teste do alimento palatável

O consumo de ração por rato foi medido desde o dia do desmame (21º dia de idade) até o final do experimento, com exceção dos dias em que era realizado o teste de alimento palatável. O consumo de ração foi obtido através da diferença entre a ração fornecida (300g) e o restante após 24h, dividido pelo número de animais em cada caixa moradia.

O peso dos animais foi determinado semanalmente através da utilização de balança digital com 5g de precisão. O resultado está exibido em ganho de peso durante as fases da vida.

O teste de consumo de alimento palatável foi aplicado conforme o protocolo estabelecido por Ely et al. (1997), disposto no Quadro 1, nas fases: infância, puberdade e adulto. Essas fases foram divididas em: 21º ao 45º dia corresponde à infância, do 46º dia ao 90º dia corresponde à puberdade e do 91º dia aos 150º dia corresponde à fase adulta (Quinn RDMV, 2005; Andreollo, 2012). Na fase de adaptação, cada animal foi submetido ao teste de três minutos por cinco dias consecutivos. O rato era colocado em uma caixa retangular de madeira branca (40x15x20 cm) com tampa de acrílico que permitisse a circulação de ar. Dentro da caixa estavam dispostos 10 unidades de cereal de milho doce (Kellogs - *Froot Loops*®). Durante os cinco dias de adaptação, os animais receberam 80% da quantidade de ração. No sexto dia, os animais ficaram em privação de ração por 12 horas antes do teste (teste em jejum). Após completar o teste no 6º dia, os animais receberam ração e água

ad libitum e realizaram novamente a tarefa no sétimo dia (teste alimentado). Para mensurar a quantidade ingerida, foi considerado a unidade de fração do *Froot Loops*® (Ely et al., 1997; Gamaro et al., 2003; Pettenuzzo, 2008).

Quando os animais completaram 150 dias de vida, foram eutanasiados por decapitação, o cérebro foi retirado e o hipotálamo (HT) dissecado e congelado rapidamente em nitrogênio líquido, e posteriormente em biogreezer-80°C para determinação de parâmetros de estresse oxidativo.

Análise de Estresse Oxidativo

Preparação do tecido

O HT foi homogeneizado em nove partes de 120 mM de cloreto de potássio, 30 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7.2) acrescido de inibidor de protease (1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml inibidor de tripsina, 1 µg/ml pepstatina, e 0,5 mM PMSF). O homogeneizado foi centrifugado a 600 G durante dez minutos em temperatura entre 0° e 4°C, e o sobrenadante foi coletado e utilizado para determinação da lipoperoxidação e atividade das enzimas antioxidantes (Neves, 1997).

Determinação da lipoperoxidação

A determinação da lipoperoxidação (LP) foi realizada através do protocolo de Buege e Aust, 1978, determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O homogeneizado foi precipitado com 10% de ácido tricloroacético, centrifugado a 200 rpm durante dez minutos, e incubado com TBA (Sigma Chem.Co., St. Louis, MO, USA) por quinze minutos a 100°C. TBARS foram extraídas usando butanol (1:1; v/v). Depois da centrifugação, a absorbância da camada de butanol foi mensurada em espectrofotômetro a 535nm. A concentração de TBARS foi expressa em nmol de malonodialdeído (MDA) por mg de proteína total (Buege & Aust, 1978; Neves, 1997). MDA padrão foi preparado usando 1.1.3.3-tetrametoxipropano. A concentração de proteína foi determinada através do ensaio de proteína de Bradford, considerando albumina sérica bovina (1mg/ml) como padrão (Schleicher & Wieland, 1978).

Determinação da atividade da superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi medida conforme o protocolo estabelecido por Marklund e Marklund, 1974. A reação consiste em inibir a

autoxidação do pirogalol através da SOD. Em uma cubeta, foi adicionado 930 μ l de 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3diol (TRIS), tampão TRIS 50 mM, ácido ethilenodiaminotetraacético 1mM, pH 8,2), 4 μ l de catalase (CAT, 30 μ M) e 50 μ l de homogeneizado. Posteriormente, foi acrescentado pirogalol (24 mM em HCl 10 mM) para verificação da atividade enzimática a 25°C, com a leitura feita em 420 nm nos tempos 60 e 120 segundos. Uma unidade de SOD corresponde à quantidade necessária de enzima pra inibir 50% da reação. Os resultados foram expressos em unidade de SOD/mg de proteína total.

Determinação da catalase

A atividade de catalase (CAT) foi executada conforme protocolo definido por Aebi, 1984. Em uma cubeta de quartzo, misturou-se 30 μ l de homogeneizado e 2,865 μ l de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4). Em seguida, acrescentou-se 105 μ l de peróxido de hidrogênio (0,01 mM). A leitura da atividade enzimática foi feita pela decomposição do peróxido de hidrogênio, lido em 240 nm a 25°C após 120 segundos. Os resultados foram expressos em pmol/mg de proteínas totais.

Análise estatística

Os resultados estão apresentados em média \pm erro padrão. Foi utilizada a análise de variância de duas vias de medidas repetidas (*Two Way ANOVA*) para comparar o ganho de peso ao longo das fases da vida, teste de consumo de alimento palatável e consumo de ração. Teste t de Student foi utilizado para comparar os valores de SOD, CAT e MDA dos dois grupos. Foi utilizado o programa Sigma Plot® versão 12.1. Para execução destes testes, foi utilizado o Sigma Plot 12.1.

Resultados

Conforme mostra a Figura 1, o grupo NFA apresentou menor peso desde o nascimento quando comparado com o grupo FA; essa diferença permaneceu ao longo de todo o experimento ($P= 0,025$).

Com relação ao consumo de ração, o grupo FA apresentou uma diminuição significativa deste na transição da infância para a puberdade, mas não na fase adulta ($F_{(2,210)}=14,464$; $P <0,001$). Já o grupo NFA aumentou o seu consumo da infância para a puberdade e, embora, tenha apresentado esse aumento, o seu consumo absoluto foi menor nessas fases quando comparado ao FA

($F_{(1,210)}=114,585$, $P < 0,001$). Na fase adulta, não houve diferença no consumo de ração entre os grupos ($P = 0,32$). Houve interação entre os fatores exposição à poluição e idade ($F_{(2,210)}=42,629$; $P < 0,001$).

Na Figura 2, podemos observar os resultados para o teste de consumo do alimento palatável. NFA teve consumo significativamente menor que FA em todas as fases da vida, independente de estado alimentado ou em jejum ($F_{(954,965)}=109,7$; $P < 0,001$). Quando observamos NFA isoladamente, não houve diferença de consumo do teste em jejum para o alimentado em nenhum momento do experimento. No entanto, quando observa-se o consumo total de alimento palatável, a puberdade teve o maior consumo absoluto ($F_{(2, 38,12)} = P < 0,001$). Já o grupo FA, quando analisado separadamente, apresentou diferença entre jejum e alimentado apenas na fase adulta, sendo que seu maior consumo foi no estado alimentado ($F_{(6, 132)}= 7,50$; $P < 0,001$).

Os parâmetros de lipoperoxidação e atividade enzimática da SOD e CAT não sofreram modificações pela exposição à poluição, conforme demonstrado na Figura 3.

Discussão

Os resultados obtidos revelaram que NFA apresenta menor peso que FA durante todo o experimento. O consumo de ração de NFA também se mostra menor nas fases da infância e puberdade. Já se observarmos o padrão de consumo de ração em cada grupo, percebemos que mesmo que NFA aumente a ingestão de ração da infância para a puberdade, seu consumo absoluto ainda é menor que FA; o qual diminui a ingestão de ração da infância para a puberdade. Quanto ao teste de alimento palatável, NFA consumiu menos que FA em todas as fases da vida. No mesmo parâmetro, quando observamos os grupos separadamente, notou-se que o consumo de alimento doce por NFA é maior na puberdade do que nas outras fases; o grupo FA apresenta uma diferença de ingestão entre o estado jejum e alimentado na fase adulta.

Baixo peso nos recém-nascidos tem sido relatado, tanto por estudos experimentais quanto epidemiológicos, como um dos efeitos que o ambiente de ar poluído pode causar (Hansen et al. 2008; Jansen 2013; Stieb et al. 2012; Gehring U et al. 2013). Nossos resultados sugerem que com a exposição crônica à poluição do ar, esse prejuízo seja levado para durante toda a vida. Auten et al. (2009) expuseram ratas grávidas a insuflação orotraqueal com MP ou solução fisiológica. Após o nascimento, as ninhadas foram expostas ao MP, ozônio ou ar ambiente. As ninhadas não apresentaram diferença no peso ao nascer, no entanto, ao final do experimento aqueles que haviam sido expostos ao MP na fase intrauterina e ao ozônio após o nascimento apresentaram menor peso ao final do tratamento, sugerindo que a exposição contínua aos poluentes do ar pode afetar a velocidade de ganho de peso. Em outro estudo, ratas grávidas foram expostas às partículas da combustão de diesel ($2\text{mg}/\text{m}^3$) ou ao ar filtrado durante toda gravidez (Bolton et al. 2012). Controversamente, os animais expostos ao diesel nasceram com maior peso que os expostos ao ar limpo, e essa diferença também permaneceu ao longo do experimento. Embora esses resultados de peso ao nascer, inicialmente, não corroborem com os dados do presente estudo, a maneira com que os animais expostos aos poluentes do ar ganharam peso após o nascimento, concorda com nossos achados: existe uma alteração que vem do período intrauterino e se perdura durante toda a vida.

Mesmo que o grupo NFA tenha aumentado seu consumo alimentar em relação à FA isso não foi suficiente para compensar o prejuízo ponderal. No mesmo estudo citado, Bolton et al. encontraram diferenças no consumo alimentar entre os grupos. Os animais expostos ao diesel apresentaram maior consumo da dieta hiperlipídica quando comparado ao grupo que respirava ar filtrado, a ração padrão não foi mensurada nesse estudo. Por outro lado, Meng et al. (2005) expuseram ratos a diferentes concentrações de dióxido de enxofre pelo tempo de uma semana; os autores não encontraram diferença no ganho de peso ou consumo alimentar, apesar de constatarem que o DNA em áreas do cérebro estava danificado.

O grupo NFA claramente apresentou um padrão de consumo de alimento palatável diferente de FA, ao passo que FA na fase adulta apresentou seu maior consumo e com uma ingestão significativamente maior no estado alimentado do que em jejum. No estudo mencionado anteriormente, os ratos expostos ao diesel na fase pré-natal tiveram maior consumo de dieta rica em gordura, uma dieta mais palatável que a dieta padrão. O estudo dos efeitos dos poluentes do ar no comportamento em geral apresenta uma série de limitações que devem ser consideradas, como por exemplo, a concentração dos poluentes, métodos de exposição e duração da mesma. Existem poucos estudos que tratem especificamente de comportamento alimentar e poluição do ar e, até o momento, foi constatada interação entre os poluentes e alterações no peso corporal e consumo alimentar. Embora os resultados ainda sejam, por vezes, conflitantes em alguns pontos, nossos achados fortalecem a ideia de que a exposição à poluição na fase pré-natal acarreta em consequências que são levadas para toda a vida, e possivelmente, irreversíveis em termos de desenvolvimento.

Outras alterações comportamentais têm sido atribuídas à poluição do ar. Ratos cronicamente expostos ao ROFA demonstraram uma diminuição na atividade motora atrelado a lipoperoxidação no tecido estriado e cerebelo (Zanchi et al. 2008). Posteriormente, os autores desse mesmo estudo relacionaram o estresse oxidativo como mediador no processo de diminuição da memória discriminativa por parte da poluição.

Em nosso estudo, a exposição crônica aos poluentes do ar em nível ambiental não mostrou causar lipoperoxidação no HT. Todavia, outros estudos de nosso

laboratório constataram estresse oxidativo em outras regiões encefálicas, tais como estriado, cerebelo, córtex e hipocampo; algumas dessas associadas a prejuízo em funções comportamentais. Auten et al. (2009; 2011) encontraram o resultado que mais se aproxima ao nosso, no que tange a diferença na exposição pós-natal sobre o ganho de peso. Não obstante, uma hipótese a ser investigada em estudos futuros é a alteração no bulbo olfatório e tecidos olfativos influenciar no consumo de alimento, visto que há uma grande interação entre olfato e paladar.

Em suma, NFA apresentou menor peso durante todo o experimento e maior consumo de ração na infância e puberdade, enquanto FA comportava-se de maneira oposta no mesmo período. Esse padrão alimentar não se replicou para o alimento palatável, cujo consumo também foi menor que FA. Em nosso estudo, o estresse oxidativo não pareceu mediar essas alterações no padrão alimentar e desenvolvimento.

Alterações no SNC têm encenado um importante papel em consequências à saúde e representam uma área emergente que necessita de mais pesquisas para que possamos estimar o dano que a poluição do ar tem causado a diversas gerações. Outros estudos devem ser feitos com modelos que se aproximem mais da realidade e mimetizem a exposição crônica que vivenciamos no dia a dia, para que se possa elucidar com mais clareza os mecanismos envolvidos.

Referências

Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 105:121-126.

Andreollo, N. A., E. F. Santos, M. R. Araujo and L. R. Lopes (2012). "Rat's age versus human's age: what is the relationship?" *Arq Bras Cir Dig* **25**(1): 49-51.

Pettenuzzo, L. F., C. Noschang, E. von Pozzer Toigo, A. Fachin, D. Vendite and C. Dalmaz (2008). "Effects of chronic administration of caffeine and stress on feeding behavior of rats." *Physiol Behav* **95**(3): 295-301.

Auten RL, Gilmour MI, Krantz QT, Potts EN, Mason SN, Foster WM. 2011. Maternal diesel inhalation increases airway hyperreactivity in ozone-exposed offspring. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46(4):454-460.

Auten RL, Potts EN, Mason N, Fischer B, Huang Y, Foster M. 2009. Maternal exposure to particulate matter increases postnatal ozone-induced airway hyperreactivity in juvenile mice. *Am J Crit Care Med* 180:1219-1226.

Block ML, Elder A, Auten RL, Bilbo SD, Chen H, Chen JC, Cory-Slechta DA, Costa D, Diaz-Sanchez D, Dorman DC, Gold DR, Gray K, Jeng HA, Kaufman JD, Kleinman MT, Kirshner A, Lawler C, Miller DS, Nadadur SS, Ritz B, Semmens EO, Tonelli LH, Veronesi B, Wright RO, Wright RJ. The outdoor air pollution and brain health workshop. 2012. *Neurotoxicology* 33(5):972-984.

Bolton JL, Huff NC, Smith SH, mason SN, Foster WM, Auten RL, Bilbo SD. 2013. Maternal stress and effects of prenatal air pollution on offspring mental health outcomes in mice. *Environ Health Perspect* ehp.1306560.

Bolton JL, Smith SH, Huff NC, Gilmour MI, Foster WM, Auten RL, Bilbo SD. 2012.

Prenatal air pollution exposure induces neuroinflammation and predisposes offspring to weight gain in adulthood in a sex-specific manner. *FASEB J* 26(11):4743-54.

Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Meth Enzymol* 52:302-309.

Calderón-Garcidueñas L, Maronpot RR, Torres-Jardon R, Henríquez-Roldán C, Schoonhoven R, Acuña-Ayala H, Villarreal-Calderón A, Nakamura J, Fernando R, Reed W, Azzarelli B, Swenberg JA. 2003. *Toxicol Pathol* 31(5):524538.

Calderón-Garcidueñas L, Solt AC, Henríquez-Roldán C, Torres-Jardón R, Nuse B, Herritt L, Villarreal-Calderón R, Osnaya N, Stone I, García R, Brooks DM, González-Maciel A, Reynoso-Robles R, Delgado-Chávez R, Reed W. 2008. Long-term air pollution exposure is associated with neuroinflammation, an

altered innate immune response, disruption of the blood-brain barrier, ultrafine particulate deposition, and accumulation of amyloid beta-42 and alpha-synuclein in children and young adults. *Toxicol Pathol* 36(2):289-310

Campbell A, Smith MA, Sayre LM, Bondy SC, Perry G. 2001. Mechanisms by which metals promote events connected to neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull* 55(2):125-132.

Ely DR, Dapper V, Marasca J, Corrêa JB, Gamaro GD, Xavier MH, Michalwoski MB, Catelli D, Rosat R, Ferreira MBC, Dalmaz C. 1997. Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiol & Behav* 61(3):935-938.

Foratiere F and Agabiti N. 2013. Assessing the link between air pollution and heart failure. *Lancet*.13: 61167-8.

Gamaro GD, Prediger ME, Lopes J, Bassani MG, Dalmaz C. 2003. Fluoxetine alters feeding behavior and leptina levels in chronically-stressed rats. *Pharmacol, Biochem and Behav* 90:321-317.

Gehring U, Casas M, Brunekreef B, Bergström A, Bonde JP, Botton J, Chévrier C, Cordier S, Heinrich J, Hohmann C, Keil T, Sunyer J, Tischer CG, Toft G, Wickman M, Vrijheid M, Nieuwenhuijsen M. 2013. Environmental exposure assessment in European birth cohorts: results from ENRIECO project. *Environ Health* 23(12):8.

Hansen CA, Barnett AG, Pitchard G. 2008. The Effect of Ambient Air Pollution during Early Pregnancy on Fetal Ultrasonic Measurements during Mid-Pregnancy. *Environ Health Perspec* 116(3):362-369.

Janssen BG, Godderis L, Pieters N, Poels K, Kici Ski M, Cuypers A, Fierens F, Penders J, Plusquin M, Gyselaers W, Nawrot TS. 2013. Placental DNA hypomethylation in association with particulate air pollution in early life. *Part Fibre Toxicol*. Jun 7;10(1):22

Laurent O, Wu J, Li L, Chung J, Bartell S. 2013. Investigating the association between birth weight and complementary air pollution metrics: a cohort study. *Environ Health*. 17;12(1):18.

Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47(3):469-474.

Meng Z, Qin G, Zhang B. 2005. DNA damage in mice treated with sulfur dioxide by inhalation. *Eviron Mol Mut* 46:150-155.

Neves CMM. 1997. Lipoperoxidação noencéfalo de ratos submetido à isquemia global transitória. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1-78.

Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, KreylingW, et al. 2004. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 16(6–7):437–445.

Pettenuzzo, L. F., C. Noschang, E. von Pozzer Toigo, A. Fachin, D. Vendite and C. Dalmaz (2008). "Effects of chronic administration of caffeine and stress on feeding behavior of rats." *Physiol Behav* **95**(3): 295-301.

Peters A, Veronesi B, Calderón-Garcidueñas L, Gehr P, Chi Chen L, Geiser M, Reed W, Rothen-Rutishauser B, Schürch S, Schulz H. 2006. Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. Part *Fibre Toxicol*. 3:1-13.

Pope CA III, Dockery WD. 2006. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J Air & Waste Manag Ass*, 56(6):709-742.

Quinn RDVM. 2005. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years?. *Nutrition* 21(6):775-777.

Saldiva PH, Pope AC, Schwartz J, Dockery DW, Lichtenfels AJ, Salge JM, Barone IA, Bohm GM. 1995. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. *Arch Environ Health* 50(2):159-163.

Schleicher E, Wieland OH. 1978. Evaluation of Bradford method for protein determination in body fluids. *J Clin Chem Clin Bichem* 16(9):533-534.

Shimada A, Kawamura N, Okajima M, Kaewamatawong T, Inoue H, Morita T. 2006. Translocation pathway of the intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the blood circulation in the mouse. *Toxicol Pathol* 7:949-57

Stieb DM, Chen L, Eshoul M, Judek S. 2012. Ambient air pollution, birth weight and preterm birth: A systematic review and meta-analysis. *Environ Res* 100-111.

Van den Hooven EH, Pierik FH, de Kluizenaar Y, Hofman A, van Ratingen SW, Zandveld PY, Russcher H, Lindemans J, Miedema HM, Steegers EA, Jaddoe VW. 2012. Air pollution exposure and markers of placental growth and function: the generation R study. *Environ Health Perspect*. 2012 Dec;120(12):1753-9

Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Maciel Ribeiro AA, Mayhew TM, Saldiva PH, Dolhnikoff M. 2008. Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. *Biol Reprod*. Sep;79(3):578-84.

World Health Organization, Regional Office for Europe (2007) Health relevance of particulate matter from various sources Report on a WHO Workshop, Bonn Germany, Available at: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0007/78658/E90672.pdf

Zanchi AC, Fagundes LS, Barbosa F Jr, Bernardi R, Rhoden CR, Saldiva PH, do Valle AC. 2010. Pre and post-natal exposure to ambient level of air pollution impairs memory of rats: the role of oxidative stress. *Inhal Toxicol* 22(11):910-918.

Zanchi AC, Venturini CD, Saiki M, Nascimento Saldiva PH, Tannhauser Barros HM, Rhoden CR. 2008. Chronic nasal instillation of residual-oil fly ash (ROFA) induces brain lipid peroxidation and behavioral changes in rats. *Inhal Toxicol* 20(9):795-800.

6. Figuras

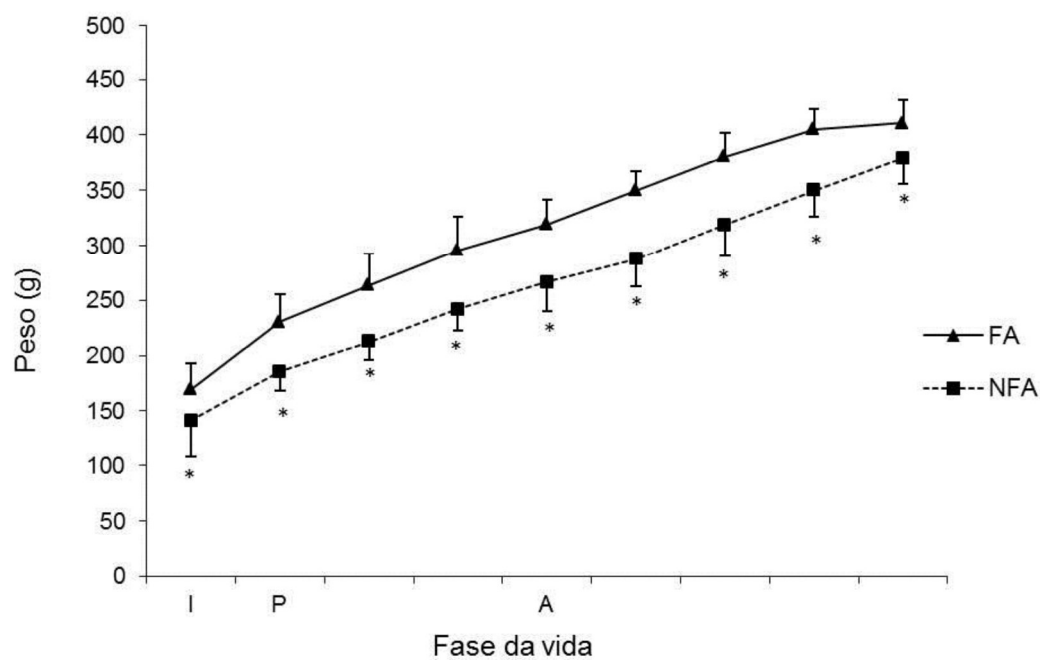


Figura 1. Peso quinzenal nas fases da vida de ratos expostos à poluição do ar em nível ambiental. Grupos: FA (ar filtrado; $n = 15$) exposição pré e pós natal ao ar filtrado; NFA (ar não filtrado; $n = 13$) exposição pré e pós natal aos poluentes do ar em nível ambiental. Valores apresentados como média do grupo \pm erro padrão. (I) infância (21° dia ao 45° dia) (P) puberdade (46° dia ao 90° dia) (A) adulto (91° dia ao 150° dia). Análise de variância de duas vias de medidas repetidas (*Two way ANOVA*) * $P = 0,025$; $F(8,88) = 2,337$ diferença em relação ao grupo FA.

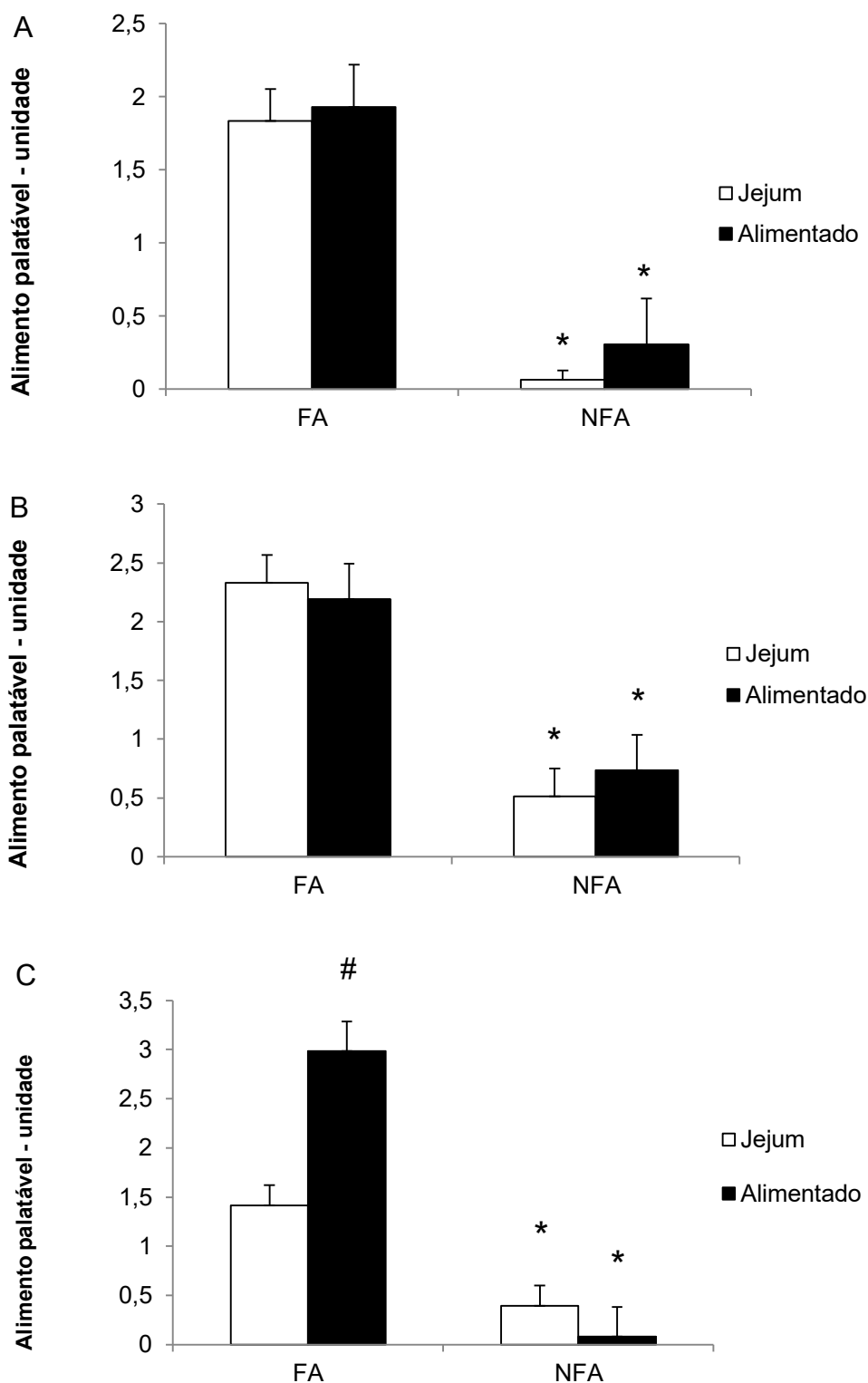


Figura 2. Consumo de alimento palatável de ratos expostos à poluição do ar em nível ambiental. Grupos: FA (ar filtrado; n = 15) exposição pré e pós natal ao ar filtrado; NFA (ar não filtrado; n = 13) exposição pré e pós natal aos poluentes do ar em nível ambiental. Valores apresentados como média do grupo \pm erro padrão. (A) infância (21° dia ao 45° dia) (B) puberdade (46° dia ao 90° dia) (C) adulto (91° dia ao 150° dia). Análise de variância de duas vias de medidas repetidas (*Two way ANOVA*) * $P < 0,001$ $F(954,965) = 109,7$ diferença em relação a FA; # $P < 0,001$ $F(6,132) = 7,50$ diferença de FA no dia do teste em jejum em relação ao teste ao alimentado na fase adulta.

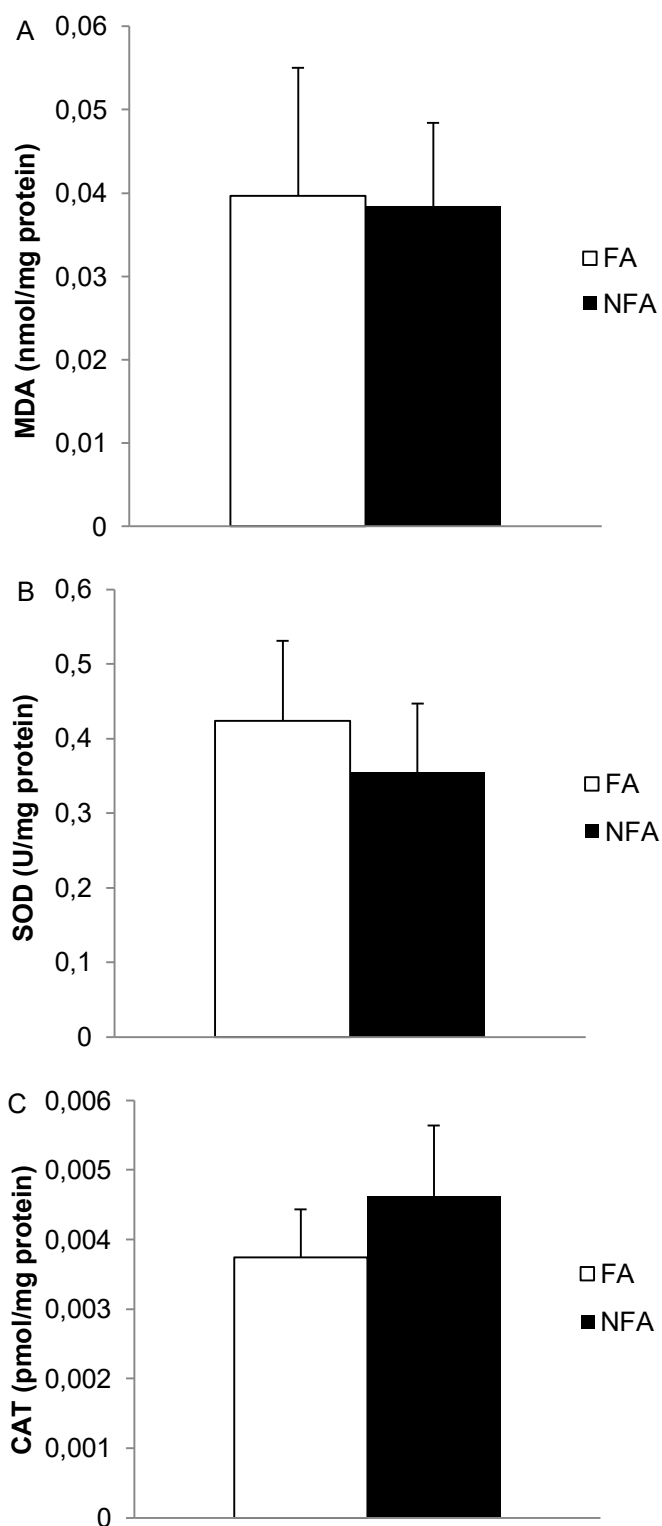
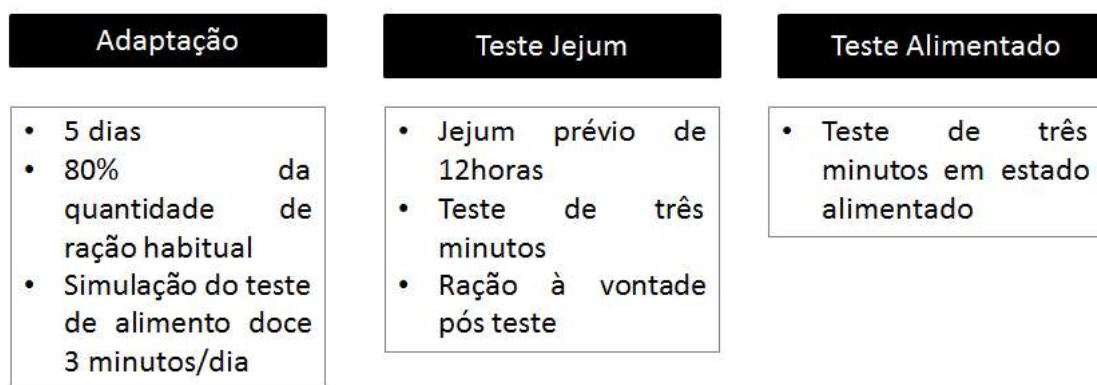


Figura 3. Análise dos parâmetros de estresse oxidativo. Grupos: FA (ar filtrado; n = 15) exposição pré e pós natal ao ar filtrado; NFA (ar não filtrado; n = 13) exposição pré e pós natal aos poluentes do ar em nível ambiental. Valores apresentados como média do grupo \pm erro padrão. Análise de variância de duas vias de medidas repetidas (*Two way ANOVA*). (A) malonaldeído (MDA) nmol/mg proteína total, $P = 0,86$; (B) superóxido dismutase unidade de SOD/mg proteína total $P = 0,19$; (C) catalase (CAT) pmol CAT/ mg proteína total $P = 0,052$.



Quadro 1. Representação esquemática do teste de comportamento alimentar para consumo de alimento palatável. Fase de habituação durou cinco dias, onde os animais recebiam 80% do alimento padrão e passavam pela simulação do teste de consumo de alimento palatável uma vez ao dia. Teste em jejum realizado com 12 horas de jejum prévio. Teste Alimentado realizado vinte e quatro horas após o teste de jejum com os animais alimentados à vontade.

7. CONCLUSÃO

- a) A poluição do ar em nível ambiental não provocou lipoperoxidação no hipotálamo e alterações nos parâmetros enzimáticos.
- b) O peso dos animais expostos à poluição do ar foi prejudicado no início da vida e esse prejuízo permaneceu ao longo do estudo.
- c) O comportamento alimentar para alimento palatável parece sofrer influência dos poluentes do ar e pode ter influência da faixa etária.
- d) O consumo de alimento padrão teve padrões opostos entre os grupos e a poluição do ar pode ter mediado esse comportamento.

Nosso estudo observou que existe uma diferença no consumo alimentar de alimento padrão e também no de alimento palatável. O peso sofreu prejuízos que não puderam ser compensados ao longo da vida. Os agentes oxidantes não parecem mediar esses processos e mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos.

8. ANEXOS

8.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Exposição crônica à poluição do ar em nível ambiental na cidade de Porto Alegre pode afetar a ingestão alimentar de ratos via estresse oxidativo hipotalâmico?

Pesquisador Responsável Cláudia Rhoden Parecer 1093/10

Data da Versão 13/05/2010 Cadastro 549/09 Data do Parecer 13/05/2010

Grupo e Área Temática Classificação utilizada pela CONEP

Objetivos do Projeto

Verificar se a exposição a poluição ambiental modifica o comportamento alimentar ou ganho de peso de ratos e o papel da lipoperoxidação no hipotálamo para as alterações comportamentais

Sumário do Projeto

Ratos serão expostos a ambiente poluído ou não poluído na infância e na adultez terão ganho ponderal, comportamentos alimentares avaliados in vivo e alterações de estresse oxidativo avaliados ex-vivo, logo após.

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Ausentes
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não informado
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação

Introdução	Adequada
Comentários sobre a Introdução	

Objetivos	Comentário
Comentários sobre os Objetivos	

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 60 Local bioté
Cálculo do tamanho da amostra	Não informado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Crterios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Adequado
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Adequado
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	
Data de término prevista	
Orçamento	Adequado

Fonte de financiamento externa	Não
Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento	

Referências Bibliográficas	Adequadas
Comentários sobre as Referências Bibliográficas	

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

Houve encaminhamento satisfatório de resposta.

8.2 Normas do Periódico Inhalation Toxicology:

Inhalation Toxicology

Instructions for Authors

About the Journal

Aims and Scope

Editor-in-Chief

Manuscript Submission

Manuscript Preparation

File preparation and types

Title Page

Abstract

Main Text

Acknowledgments and Declaration of Interest statements

References

Tables

Illustrations

Notes on Style

Editorial Policies

Authorship

Redundant publications and plagiarism

Peer Review

Ethics and Consent

Copyright and Permissions

Declaration of Interest

NIH and Public Access Policy

Additional Information

Proofs

Reprints

Color figure charges

Contact the Publisher

About the Journal

Aims and Scope

Inhalation Toxicology is a peer-reviewed monthly publication providing a key forum for the latest accomplishments and advancements in concepts, approaches, and procedures presently being used to evaluate the health risk associated with airborne chemicals.

The journal publishes original research, reviews, symposia, and workshop topics involving the respiratory system's functions in health and disease, the pathogenesis and mechanism of injury, the extrapolation of animal data to humans, the effects of inhaled substances on extra-pulmonary systems, as well as reliable and innovative models for predicting human disease.

Editor-in-Chief

Donald E. Gardner, PhD Savannah, GA USA

Manuscript Submission

All submissions should be made online at ***Inhalation Toxicology's*** **ScholarOne** Manuscripts site. New users should first create an account. Once a user is logged onto the site, submissions should be made via the Author Center. If you experience any problems with your submission or with the site, please contact ScholarOne support through the „get help now“ link.

All submissions to the journal must include full disclosure of all relationships that could be viewed as presenting a potential conflict of interest. If there are no conflicts of interest, authors should state that there are none. This must be stated at the point of submission (within the manuscript, after the main text under a subheading "Declaration of interest").

We also request that all authors complete an International Committee of Medical Journals Editors' conflict of interest form in advance of submission; the submitting author must upload each author's form as supplemental files along with the manuscript.

Please see our full Declaration of Interest Policy for further information.

Manuscript Preparation

File preparation and types

Manuscripts are preferred in Microsoft Word format (.doc files). Documents must be double-spaced, with margins of one inch on all sides. Tables and figures should not appear in the main text, but should be submitted as separate digital files and designated with the appropriate file type on ScholarOne

Manuscripts. References should be given in Harvard style (see References section for example).

Manuscripts should be compiled in the following order: title page; abstract; main text; acknowledgments; Declaration of Interest statement; appendices (as appropriate); references; tables with captions (on separate pages); figures; figure captions (as a list).

Inhalation Toxicology publishes the following manuscript types:

Original papers

Reviews

Measurement technology

Modelling/symmetry

Letters to the Editor

Title Page

A title page should be provided comprising the manuscript title plus the full names and affiliations of all authors involved in the preparation of the manuscript. One author should be clearly designated as the corresponding author and full contact information, including phone number and email address, provided for this person.

Abstract

All original articles and reviews should start with an abstract of 250 or fewer words, summarising the central core of knowledge that is the focus of the paper. The recommended format is as a structured abstract, with the following headings for an original article: context, objective, materials and methods, results, discussion and conclusion. For a review article, it should be structured as follows: context, objective, methods (including data sources, study selection and data extraction), results and conclusion. It should be written in an informative style permitting its use, without revision, by abstracting services, give essential details of

research findings without further reference to the text, and avoid generalisations and nonessential information.

Main Text

Original articles

The body of the article should include the following sections: introduction; methods; results; discussion; conclusions.

Introduction: This section should state the relevance and background to the study, and its rationale and purpose.

Methods: This section should include only information that was available at the time the plan or protocol for the study was being written. You should describe your selection of the observational or experimental participants, identify the methods, apparatus and procedures in sufficient detail to allow others to reproduce the results, and describe statistical methods with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. ***Inhalation Toxicology*** requires that studies involving humans, both volunteers and patients, or animals be approved by an institutional review board, in accordance with approved published guidelines, prior to actually performing the research and publishing the data. Details including clinical trial registration number must be provided in the methods section if research includes studies conducted on human volunteers.

Results: Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations.

Discussion: This should include implications of the findings and their limitations, with reference to all other relevant studies and the possibilities these suggest for future research.

Conclusions: This must summarize the main paper. Ensure that extrapolations are reasonable and that conclusions are justified by the data presented, and indicate if the study design can be generalized to a broader study population.

Please also include an additional paragraph describing:

What is new/novel about this research

What critical issues this research addresses

Relevance of the research to humans

Reviews

The body of a review article should be a comprehensive, scholarly evidence-based review of the literature, accompanied by critical analysis and leading to reasonable conclusions. Wherever appropriate details of the literature search methodology should be provided, i.e. the databases searched (normally Medline and at least one or two other databases), the search terms and inclusive dates, and any selectivity criteria imposed.

Wherever possible, use primary resources, avoiding “Data on File”, “Poster” or other unpublished references.

Acknowledgments and Declaration of Interest sections

Acknowledgments and Declaration of interest sections are different, and each has a specific purpose. The Acknowledgments section details special thanks, personal assistance, and dedications. Contributions from individuals who do not qualify for authorship should also be acknowledged here.

Declarations of interest, however, refer to statements of financial support and/or statements of potential conflict of interest. Within this section also belongs disclosure of scientific writing assistance (use of an agency or agency/freelance writer), grant support and numbers, and statements of employment, if applicable. For a more detailed list of points to include, please see “Declaration of Interest section” below.

Acknowledgments section

Any acknowledgments authors wish to make should be included in a separate headed section at the end of the manuscript preceding any appendices, and before the references section. Please do not incorporate acknowledgments into notes or biographical notes.

Declaration of Interest section

All declarations of interest must be outlined under the subheading „Declaration of interest“. If authors have no declarations of interest to report, this must be explicitly stated. The suggested, but not mandatory, wording in such an instance is: *The authors report no declarations of interest.* When submitting a paper via ScholarOne Manuscripts, the „Declaration of interest“ field is compulsory (authors must either state the disclosures or report that there are none). If this section is left empty authors will not be able to progress with the submission.

Please see our full Declaration of Interest Policy for further information.

Please note: for NIH/Wellcome-funded papers, the grant number(s) must be included in the Declaration of Interest statement.

References

References should be given in the Harvard style. Citation in the text is by author and date (Smith, 2001). The list of references appears alphabetically by primary author's last name. Examples:

Journal: Iyengar BS, Dorr RT, Remers WA. 2004. Chemical basis for the biological activity of imexon and related cyanaziridines. *J Med Chem* 47:218–223.

Book: Vyas SP, Khar RK. 2001. Targeted and Controlled Drug Delivery. New Delhi, India: CBS Publisher and Distributor.

Contribution to a Book: Chandrasekaran SK, Benson H, Urquhart J. 1978. Methods to achieve controlled drug delivery: The biochemical engineering approach. In: Robinson JR, ed. Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems. New York: Marcel Dekker, 557–593.

Electronic Resources: Lin A-S, Shibano M, Nakagawa-Goto K, Tokuda H, Ito K, Ito K, Morris-Natschke, SL, Lee K-H, (2007). Cancer Preventive Agents. 7. Antitumor-Promoting Effects of Seven Active Flavonolignans from Milk Thistle (*Silybum marianum*) on Epstein-Barr Virus Activation. *Pharm Biol* [Online] Available at: <http://www.informapharmascience.com/doi/abs/10.1080/13880200701585592>. Accessed on 12 April 2009

Periodical abbreviations should follow the style given by Index Medicus.

Tables

Tables should be used only when they can present information more efficiently than running text. Care should be taken to avoid any arrangement that unduly increases the depth of a table, and the column heads should be made as brief as possible, using abbreviations liberally. Lines of data should not be numbered nor run numbers given unless those numbers are needed for reference in the text. Columns should not contain only one or two entries, nor should the same entry be repeated numerous times consecutively. Tables should be grouped at the end of the manuscript on separate pages.

Illustrations

Illustrations (line drawings, halftones, photos, photomicrographs, etc.) should be submitted as digital files for highest quality reproduction and should follow these guidelines:

300 dpi or higher

Sized to fit on journal page

EPS, JPG, TIFF, or PSD format only

Submitted as separate files, not embedded in the text

Legends or captions for figures should be listed on a separate page, double spaced

For information on submitting animations, movie files and sound files or any additional information including indexes and calendars please click [here](#).

For information on color figures and charges please click [here](#).

Notes on Style

General Style

Authors are asked to take into account the diverse audience of the journal. Please avoid the use of terms that might be meaningful only to a local or national audience, or provide a clear explanation where this is unavoidable. However, papers that reflect the particularities of a social and cultural system are acceptable. Some specific points on style follow:

1. Authors should write in clear, concise US English. Language and grammar should be consistent with *Fowler's English Usage*; spelling and meaning of words should conform to *Webster's Dictionary*. If English is not your native language please ensure the manuscript has been reviewed by a native speaker. Please note: extensive rewriting of the text will not be undertaken by the editorial staff.
2. Latin terminology, including microbiological and species nomenclature, should be italicized.
3. Use standard convention for human and animal genes and proteins: italics for genes and regular font for proteins, and upper case for human products and lower case for animal products.
4. "US" is preferred to "American", "USA" to "United States", and "UK" to "United Kingdom".

5. Double quotation marks rather than single are used unless the “quotation is „within“ another”.
6. Punctuation of common abbreviations should adhere to the following conventions: “e.g.”; “i.e.”; “cf.”. Note that such abbreviations should not generally be followed by a comma or a (double) point/period.
7. Upper case characters in headings and references should be used sparingly, e.g. only the first word of paper titles, subheadings and any proper nouns begin upper case; similarly for the titles of papers from journals in the references and elsewhere.
8. Apostrophes should be used sparingly. Thus, decades should be referred to as follows: “The 1980s [not the 1980“s] saw ...”. Possessives associated with acronyms (e.g. APU), should be written as follows: “The APU“s findings that ...” but note that the plural is “APUs”.
9. All acronyms for national agencies, examinations, etc., should be spelled out the first time they are introduced in text or references. Thereafter the acronym can be used if appropriate, e.g. “The work of the Assessment of Performance Unit (APU) in the early 1980s ...” and subsequently, “The APU studies of achievement ...”, in a reference “(Department of Education and Science [DES] 1989a)”.
10. Brief biographical details of significant national figures should be outlined in the text unless it is quite clear that the person concerned would be known internationally. Some suggested editorial comments in a typical text are indicated in the following with square brackets: “From the time of H. E. Armstrong [in the 19th century] to the curriculum development work associated with the Nuffield Foundation [in the 1960s], there has been a shift from constructivism to heurism in the design of [British] science courses”.
11. The preferred local (national) usage for ethnic and other minorities should be used in all papers. For the USA, “African-American”, “Hispanic” and “Native American” are used, e.g. “The African-American presidential candidate, Jesse Jackson ...”; for the UK, “Afro-Caribbean” (not “West Indian”), etc.
12. Material to be emphasised by italicisation in the printed version should be italicized in the typescript rather than underlined. Please use such emphasis sparingly.

13. Numbers in text should take the following forms: 300, 3000, 30 000 (not 30,000). Spell out numbers under 10 unless used with a unit of measure, e.g. nine pupils but 9 mm (do not use full stops (periods) within units). For decimals, use the form 0.05 (not .05, × 05 or 0× 05). “%” (not “per cent”) should be used in typescripts.

14. Appendices should appear before the references section and after any acknowledgments section. The style of the title is shown by the following example:

“Appendix C: The random network generator”.

Figures and tables within appendices should continue the sequence of numbering from the main body of the text. Sections within appendices should be numbered, for example, C.1, C.2. Equations in appendices should be numbered, for example, (C 1), (C 2). If there is only one appendix, it is referred to as “the appendix” and not called “Appendix A”.

Abbreviations and nomenclature

For abbreviations and nomenclature, authors should consult the latest edition of the *CSE Style Manual* available from the Council of Science Editors, 60 Revue Drive, Suite 500 Northbrook, IL, 60062, USA.

Mathematics

Please click here for more information on the presentation of mathematical text.

Footnotes

Footnotes are not to be used except for designation of the corresponding author of the paper or current address information for an author (if different from that shown in the affiliation). Information concerning grant support of research should appear in a separate Declaration of interest section at the end of the paper. Acknowledgments of the assistance of colleagues or similar notes of appreciation belong in a separate Acknowledgments section.

Footnotes to tables should be typed directly below the table and are indicated by the following symbols: * (asterisk or star), † (dagger), ‡ (double dagger), ¶ (paragraph mark), § (section mark), || (parallels), # (number sign). Reinitialize symbol sequence within tables.

Editorial Policies

Authorship

According to the International Committee on Medical Journal Ethics (ICMJE), an author is defined as one who has made substantial contributions to the conception and development of a manuscript. Informa Healthcare adheres to the ICMJE guidelines (<http://www.icmje.org/#author>), which state that “authorship credit should be based on all of the following: 1) substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or advising it critically for important intellectual content; and 3) final approval of the version to be published”¹. All other contributors should be listed in the Acknowledgements section.

1 Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication. Available at: <http://www.icmje.org/>

All submissions are expected to comply with the above definition. Changes to the authorship list after submission will result in a query from the publisher requesting written explanation.

Redundant publications and plagiarism

Inhalation Toxicology considers all manuscripts on the strict condition that they have not been published already, nor are they under consideration for publication or in press elsewhere.

Inhalation Toxicology will not consider, in general, redundant publications, i.e. “publication of a paper that overlaps substantially with one already published in print or electronic media” (International Committee on Publication Ethics: http://www.icmje.org/publishing_4overlap.html). This rule applies whether the overlapping papers are from the same authors or not.

In addition, Informa has a strict policy against plagiarism. We define plagiarism as the use of extracts from another person's work that are not placed in quotation marks, without the permission of that person, and without acknowledgement to that person (using the appropriate reference style), with the result that your article presents these extracts as original to you. By submitting your work to an Informa Healthcare journal, you warrant that it is your original work, and that you have secured the necessary written permission from the appropriate copyright owner or authority for the reproduction of any illustration or other material.

Paraphrasing, defined as “taking portions of text from one or more sources, crediting the author/s, but only changing one or two words or simply rearranging the order, voice (i.e., active vs. passive) and/or tense of the sentences” by the US Office on Research Integrity (<http://ori.dhhs.gov/education/products/plagiarism/7.shtml>), will not be accepted if found to be used extensively and to make up large sections of the manuscript. Extensive paraphrasing will not be deemed original work and will be viewed as redundant publication and/or plagiarism.

Informa Healthcare adheres to the Code of Conduct and Best Practice Guidelines set forth by the Committee on Publication Ethics (COPE). As per these guidelines, failure to adhere to the above conditions will result in the editor and Informa publishing an appropriate correction, a statement of retraction, or enacting a withdrawal of the article. In extreme cases (e.g. when an article is retracted), offending authors will be reported to their institution's Ethics committee and may be banned from submitting to Informa Healthcare journals in the future. Please refer to the COPE website for the detailed workflows for handling allegations of plagiarism or redundant publication (<http://www.publicationethics.org/resources/flowcharts>).

Peer Review

All manuscripts will be subjected to confidential peer review by experts in the field and, on the basis of reviewers' feedback, papers will be accepted unconditionally, accepted subject to revision or rejected.

Ethics and Consent

Do not use patients' names, initials, or hospital numbers, especially in illustrative material. Identifying information should not be published in written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that the patient be shown the manuscript to be published.

Papers including animal experiments or clinical trials must be conducted with approval by the local animal care or human subject committees, respectively (see below).

To comply with FDAAA legislation, Informa Pharmaceutical Science requires trial registration as a condition of publication for all studies involving clinical

trials. Trial registration numbers should be included in the abstract, with full details provided in the methods section.

All manuscripts, except reviews, must include a statement in the Introduction or Methods section that the study was approved by an Investigational Review Board (Human Studies Committee or Ethics Committee or Animal Care and Use Committee), if applicable. Authors who do not have formal ethics review committees should include a statement that their study followed principles in the Declaration of Helsinki (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>).

When a product has not yet been approved by an appropriate regulatory body for the use described in the manuscript, the author must specify that the product is not approved for the use under discussion or that the product is still under investigation.

Further information on Ethics and Consent can be found by clicking here

Copyright and Permissions

It is a condition of publication that authors assign copyright or license the publication rights in their articles, including abstracts, to Informa UK Ltd. This enables us to ensure full copyright protection and to disseminate the article, and the Journal, to the widest possible readership in print and electronic formats as appropriate. Authors may, of course, use the article elsewhere after publication without prior permission from Informa UK Ltd., provided that acknowledgement is given to the Journal as the original source of publication, and that Informa Pharmaceutical Science is notified so that our records show that its use is properly authorised. Authors retain a number of other rights under the Informa UK Ltd. rights policies documents.

Authors are required to sign an agreement for the transfer of copyright to the publisher. All accepted manuscripts, artwork, and photographs become the property of the publisher. A copyright agreement form can be downloaded by corresponding authors of accepted manuscripts with proofs. This should be signed and returned to Informa Pharmaceutical Science.

Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources.

Further information on Permissions can be found by clicking here.

Declaration of Interest

It is the policy of all Informa Pharmaceutical Science, to adhere in principle to the Conflict of Interest policy recommended by the ICMJE. All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. It is the sole responsibility of authors to disclose any affiliation with any organization with a financial interest, direct or indirect, in the subject matter or materials discussed in the manuscript (such as consultancies, employment, paid expert testimony, honoraria, speakers bureaus, retainers, stock options or ownership, patents or patent applications or travel grants) that may affect the conduct or reporting of the work submitted.

To avoid any doubt as to what must be disclosed, Inhalation Toxicology requests that all authors complete and submit the conflict of interest form developed by ICMJE. The forms must be uploaded to the journal's ScholarOne Manuscript site along with the manuscript files during the submission process.

In addition, all potential conflicts of interest must be stated within the manuscript, after the main text, under a subheading "Declaration of interest". If there are no declarations, authors should explicitly state that there are none. Manuscript submission cannot be completed unless a declaration of interest statement (either stating the disclosures or reporting that there are none) is included and the ICMJE forms are uploaded.

The completed ICMJE forms will be made available to reviewers and, if the article is accepted, published online as supplementary material for transparency. The Declaration of interest statement will appear in the published article. If any potential conflicts of interest are found to have been withheld following publication, the journal will proceed according to COPE guidance.

The intent of this policy is not to prevent authors with any particular relationships or interest from publishing their work, but rather to adopt transparency such that reviewers, editors, the publisher, and most importantly, readers can make objective judgements concerning the work product.

NIH/Wellcome Public and Open Access Policies

In consideration of the National Institutes of Health (NIH) and Wellcome Public and Open Access Policies, Informa Pharmaceutical Science acknowledges that the broad and open dissemination of NIH/Wellcome-funded research results may benefit future scientific and medical research. Because we value the current and future contributions our journals make to the scientific body of knowledge, we have made certain that our policies accommodate those authors who wish to submit to PubMed Central.

As part of our author services program, Informa Pharmaceutical Science will deposit to PubMed Central (PMC) and UK PubMed Central (UKPMC) author manuscripts reporting NIH or Wellcome Trust funded research.

This service will help authors to comply with the NIH and Wellcome Trust revised 'Public Access Policy' and „Open Access Policy“, respectively.

NIH policy

NIH-funded authors must submit to PMC, or have submitted on their behalf, at the point of acceptance, their peer-reviewed author manuscripts, to appear on PMC no later than 12 months after final publication.

Click here for more information.

Wellcome Trust policy

Wellcome-funded authors must submit to UKPMC, or have submitted on their behalf, at the point of acceptance, their peer-reviewed author manuscripts, to appear on UKPMC no later than 6 months after final publication.

Click here for more information.

Informa Pharmaceutical Science will deliver to PMC/UKPMC the final peer-reviewed manuscript, which was accepted for publication and that reflects any author-agreed changes made in response to the peer review. We will also authorise the author manuscript's public access posting 12 months (NIH) or 6 months (Wellcome Trust) after final publication in print or electronic form (whichever is the sooner). Following the deposit, authors will receive further communications from the NIH Manuscript Submission System/UK Manuscript Submission System with respect to the submission.

Under our Author Rights policy, authors also have the right to post their version of the submitted author manuscript (pre-print), or their version of the final published article (post-print) on their personal or institutional web site. Post-print

web postings are subject to an embargo of 12 months. Please note that authors should not post manuscripts directly to PMC/UKPMC or other third party sites for any systematic external distribution by a third party (e.g., to a listserv or database connected to a public access server).

Additional Information

Proofs

Usual practice will involve corresponding authors receiving email notification with a password and web address from which to download a PDF. Hard copies of proofs will not be mailed. To avoid delays in publication, corrections to proofs must be returned within 48 hours, by electronic transmittal, fax or mail. Authors will be charged for excessive correction at this stage of production. If authors do not return page proofs promptly, the Publisher reserves the choice to either delay publication to a subsequent issue or to proceed to press without author corrections. The Publisher reserves the right to proceed to press without submitting page proofs to the author.

Reprints

Each corresponding author will receive a PDF file of the final version of their article. Reprints of individual articles are available for order at the time authors review page proofs. A discount on reprints is available to authors who order before print publication. Copies of the journal can be purchased at the author's preferential rate of \$25/£15 per copy.

Further information on Reprints can be found by clicking [here](#).

Color figure charges

Any figure submitted as a color original will appear in color in the Journal's online edition free of charge. Print copy color reproduction will only be considered on condition that authors bear the associated costs. The charge for the first page with color is US \$1000/£500, each subsequent page is charged at US \$500/£250. There are no charges for non-color pages.

Contact the publisher

Click [here](#) for contact details for the Publisher.