

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

Caroline Gamalho da Silveira

**A INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA DE *RESIDUAL OIL FLY ASH* (ROFA)
SOBRE O COMPORTAMENTO ALIMENTAR, PARÂMETROS DO PERFIL LIPÍDICO E
DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS.**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2017**

Caroline Gamalho da Silveira

**A INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA DE *RESIDUAL OIL FLY ASH* (ROFA)
SOBRE O COMPORTAMENTO ALIMENTAR, PARÂMETROS DO PERFIL LIPÍDICO E
DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS.**

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

Orientador(a): Cláudia Ramos Rhoden

**Porto Alegre
2017**

Catlogação na Publicação

Gamalho da Silveira, Caroline

A INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA DE RESIDUAL OIL FLY ASH (ROFA) SOBRE O COMPORTAMENTO ALIMENTAR, PARÂMETROS DO PERFIL LIPÍDICO E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS. / Caroline Gamalho da Silveira. -- 2017.

85 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2017.

Orientador(a): Cláudia Ramos Rhoden.

1. Poluição do ar. 2. Material particulado. 3. ROFA. 4. Estresse oxidativo. 5. Alimento altamente palatável. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedicatória

Aos meus pais Paulo Roberto e Ana Luiza que dignamente me apresentaram a importância da família e o caminho da honestidade e persistência.

A minha irmã Natálie por todas as palavras de incentivo e conforto.

A meu namorado Jéferson pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comum para quem tenta trilhar novos caminhos.

À minha amada avó Maria Francisca (*in memoriam*) que onde quer que esteja nunca deixou de me amar, de acreditar e confiar em mim. Foi uma grande incentivadora nos momentos de medo e dúvida.

Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena.

Agradecimentos

Sempre achei esta parte da dissertação um tanto difícil de escrever, porque resumir em poucas palavras a nossa gratidão não é algo tão simples.

Primeiro de tudo, agradeço a Deus pelo dom da vida e da sabedoria. Por me guiar, iluminar e a cada dia me dar tranquilidade e a oportunidade de seguir em frente na realização dos meus objetivos e, principalmente, me dar força e coragem nos momentos de dificuldades para que eu continuasse a trilhar meu caminho. Obrigada, Senhor!

Agradeço aos meus pais Paulo e Ana que sempre me motivaram para a realização dos meus sonhos. Deram-me a melhor educação que eu poderia ter e me ensinaram que para possuir algo, temos que correr atrás, que nada cai do céu! Obrigada por me incentivarem a estudar sempre e me apoiarem em todas as minhas decisões. Pai e Mãe não existem palavras no mundo que possam expressar todo o meu amor por vocês! Obrigada por, na maioria das vezes, anularem os seus sonhos e seus desejos para que eu pudesse realizar o meu! Obrigada por todos esses anos de dedicação e doação! Vocês são os melhores Pais que Deus poderia ter me dado!

Agradeço a minha irmã Natálie por todo o apoio e incentivo nestes anos de estudo. Ter uma irmã é saber que podemos contar com alguém nos momentos mais difíceis, obrigada por cumprir tão bem este papel! Eu te amo muito, mesmo que em uma retrospectiva diriam que não (kkkkkkkk), coisas que só irmãos entendem!

Agradeço ao meu namorado Jéferson que nesses nove anos de caminhada sempre me apoiou em todas as decisões e me incentivou na realização dos meus objetivos. Obrigada por ser este parceiro sempre! Obrigada por ser generoso, atencioso, amoroso, compreensivo e ser meu alicerce nos momentos de dificuldade! O meu melhor amigo é o meu amor! Que possamos celebrar muitas coisas boas juntos! Te amo!

Agradeço imensamente a todos os meus familiares e amigos. Gostaria de lembrar também daqueles que não estão mais presentes em vida mas contribuíram muito para minha educação: Vó Wilma e Vô Almiro. Um agradecimento especial para aquela foi minha maior incentivadora para a realização deste mestrado, minha segunda mãe, minha Vó Chiquinha (*in memoriam*). Tua partida ainda dói, mas teu exemplo de fé, amor, persistência, generosidade e bondade é o maior bem que poderias ter deixado de exemplo para mim. Te amarei para sempre!

Minha eterna gratidão a meu colega de profissão e primo Alan, que por intermédio dele tive o prazer e a oportunidade de conhecer o Laboratório de Poluição Atmosférica e

posteriormente fazer parte desta grande equipe. Obrigada pela ajuda que me deu e tens me dado. Você é um ótimo primo, amigo e um excelente profissional naquilo que faz! Todo sucesso do mundo para você!

Agradeço a minha prima Paloma, por toda paciência em dividir o “teto” comigo, por aguentar minhas manias e por todas as conversas jogadas fora na madrugada. Obrigada por discutir biologia comigo mesmo quando você me diz “eu sou de humanas” e ainda assim, gentilmente, me escuta. Agradeço também pelo tempo que dedicou em ler meu trabalho (mesmo não entendendo do assunto). Vou sentir saudade da frase “cadê o tema, quero o tema de casa”. Prima, você fez minha rotina diária aqui se tornar mais leve e divertida. Continue sendo esta menina inteligente e dedicada que és.

Obrigada Fê também pela paciência em dividir o “teto” comigo (chegando agora mais no finalzinho) e aguentando minhas crises existenciais. Obrigada pelo “eu não vim até aqui pra desistir agora” que você canta quando a “deprê” surge. Esses momentos tornam a caminhada mais alegre.

Agradeço imensamente a você Marlise por toda a contribuição neste trabalho. Você, deste o início da idealização do projeto, esteve comigo auxiliando no que fosse necessário e contribuindo com muito conhecimento. Sou muito grata a você. Aprendi muito contigo, guria! A você todo o meu carinho!

A Professora Cláudia, minha orientadora, não tem palavras que possam expressar minha gratidão! Obrigada por ter me acolhido em seu laboratório e poder fazer parte da família do Laboratório de Poluição Atmosférica, permitido assim, que meu sonho de continuar buscando conhecimento fosse possível. E foi, aprendi muito! Obrigada pela oportunidade de vivenciar esta etapa, pelo conhecimento, pela atenção, por aquele abraço gostoso, pela compreensão, pela confiança, amizade e carinho. Toda minha admiração é para você, Prof!

Muito obrigada a todos os colegas do Laboratório de Poluição Atmosférica que fizeram parte desta caminhada auxiliando e contribuindo no que fosse necessário. Adoro vocês!

Á Camila meu agradecimento especial pelo auxílio em todas as técnicas e pela ajuda na compreensão dos cálculos, além, é claro, da amizade que compartilhamos neste período.

Á Elô, pela amizade e auxílio nos procedimentos práticos naqueles domingos frios e chuvosos!

Um agradecimento especial as minhas colegas Roseana e Bruna que nestes dois anos compartilharam comigo as mesmas angústias, o mesmo medo e as mesmas alegrias. Muito obrigada meninas por todo conhecimento e experiências compartilhadas.

Muito obrigada a toda equipe do Biotério da UFCSPA, em especial Ignês, Dona Dina e a Veterinária Joana. Sempre dispostas a ajudar e auxiliando sempre que era necessário! Foi ótimo trabalhar com vocês.

Por fim, gostaria de agradecer a todos os professores da UFCSPA que contribuíram para o meu crescimento, à secretária do PPG – CS Cristiane por ser sempre muito atenciosa, querida e prestativa me auxiliando nos momentos de dúvidas e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e a Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

Residual oil fly ash (ROFA) é o resultado de uma oxidação incompleta de materiais carbonados comum em áreas em que há queima de óleo e, sua composição, é rica em metais de transição. O ROFA apresenta partículas de diferentes diâmetros que são inaladas pelos seres humanos e podem causar danos principalmente ao sistema respiratório, porém, sabe-se que sua ação não está restrita somente a este órgão. A exposição à poluição atmosférica associada ao consumo de uma dieta altamente palatável pode atuar por diferentes mecanismos e contribuir para o desenvolvimento de doenças metabólicas. O objetivo deste estudo foi investigar se a exposição subcrônica ao ROFA promoveria alterações sobre o consumo e preferência alimentar e as interferências sobre parâmetros do perfil lipídico e de estresse oxidativo no pulmão, no coração, no pâncreas e no hipotálamo em ratos. Para isto, quarenta e quatro ratos *Wistar* machos foram distribuídos nos seguintes grupos: Controle (Salina + ração padrão, n=11), ROFA (ROFA + ração padrão, n=10), Chocolate (Salina + ração padrão + chocolate, n=11) ROFA + Choco (ROFA + ração padrão + chocolate, n=11). Os ratos foram expostos ao ROFA e a salina por instilação intranasal durante 18 semanas concomitantemente ao alimento palatável e/ou ração padrão durante os últimos trinta dias consecutivos. Os animais foram pesados uma vez por semana durante todo o experimento. O consumo e a preferência alimentar, ingestão calórica e eficiência calórica, ganho de massa corporal, deposição de gordura abdominal, glicose e perfil lipídico foram mensurados. Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) foram avaliadas no pulmão, coração, pâncreas e hipotálamo. Durante o experimento, na primeira e segunda semana, a ingestão de chocolate foi maior nos animais expostos ao ROFA ($P=0,006$ e $P=0,010$, respectivamente) e a ingestão de ração padrão diminuiu na segunda e terceira semana ($P=0,037$ e $P<0,001$, respectivamente). Na primeira semana todos os animais consumiram alta quantidade de alimento. Entretanto, a quantidade de kilocalorias derivadas do chocolate foi maior nos animais expostos ao ROFA do que o grupo controle em todas as semanas ($P<0,001$). A ingestão calórica e o ganho de massa corporal não foram diferentes entre os grupos ($P=0,515$ e $P=0,434$, respectivamente). A deposição de gordura abdominal foi menor nos animais do grupo ROFA quando comparados aos demais grupos ($P=0,007$). Os níveis de triglicerídeos, colesterol total e HDL colesterol foram mais altos nos animais expostos ao chocolate ($P<0,001$,

respectivamente). Não existiu diferença nos níveis de glicose sanguínea ($P=0,525$) e LDL colesterol ($P=0,194$). Os níveis de TBARS foram maiores no pulmão e coração do grupo ROFA quando comparado aos demais grupos ($P<0,001$, respectivamente), e no hipotálamo os níveis de TBARS foi maior no grupo ROFA + chocolate ($P=0,002$). Não existiu diferença significativa na atividade antioxidante das enzimas SOD e CAT. Estes achados indicam que a exposição subcrônica ao ROFA aumenta o consumo e a preferência alimentar para alimentos altamente palatáveis, como o chocolate, e é capaz de promover lipoperoxidação no hipotálamo.

Palavras-chave: Poluição do ar. Material particulado. ROFA. Estresse oxidativo. Antioxidantes. Alimento altamente palatável.

ABSTRACT

Residual oil fly ash (ROFA) is the result of an incomplete oxidation of carbonaceous materials common in areas where there is oil burning and its composition is rich in transition metals. ROFA presents particles of different sizes that are inhaled and may induce damage mainly in the respiratory tract; however, it is known that the adverse effects of these particles may reach other organs. Air pollution exposure is associated to highly palatable food intake, may act in several mechanisms and contributes to metabolic diseases. The aim of this study was to investigate the effects of subchronic ROFA exposure on highly palatable food consumption and its effects on lipid profile and oxidative stress parameters in lung, heart, pancreas and hypothalamus in rats. For this, forty four male *Wistar* rats were divided into four groups according to exposure status and dietary intake: Control (Saline + standard lab chow, n=11), ROFA (ROFA + standard lab chow, n=10), Chocolate (Saline + standard lab chow + chocolate, n=11), ROFA + Chocolate (ROFA + standard lab chow + chocolate, n=11). The animals were exposed to ROFA (50 µg/µl) and saline by intranasal instillation during 18 weeks concomitantly to palatable food and/or standard lab chow during the last 30 consecutive days. The animals were weighed once a week. The parameters measured were food consumption and preference, caloric intake and caloric efficiency, gain of body mass, abdominal fat deposition, as well as glucose and plasma lipids. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activity were assessed in lungs, heart, pancreas and hypothalamus. During the experiment, in the first and second weeks, the chocolate intake was higher in animals exposed to ROFA ($P=0.006$ and $p=0.010$, respectively) and the standard chow intake was smaller in the second and third weeks ($P=0.037$ and $P<0.001$, respectively). In the first week all animals consumed higher amounts of food. However, the amount of kilocalories derived from chocolate was higher in the animals exposed to ROFA than control group in all weeks ($P<0.001$). The caloric intake and body mass gain were not different among groups ($P=0.515$ and $P=0.434$, respectively). Abdominal fat deposition was lower in the animals of the ROFA group when compared to the other groups ($P=0.007$). Triglycerides, total cholesterol and HDL were higher in chocolate exposed rats ($P<0.001$, respectively). There were no significant differences in glucose ($P=0.525$) and LDL levels ($P=0.194$) in all groups. TBARS levels were higher in the lung and heart of ROFA group ($P<0.001$, respectively). In the hypothalamus, TBARS levels were higher in ROFA + chocolate group ($P=0.002$). There

were no significant differences in SOD and CAT activities. These findings indicate that subchronic ROFA exposure increases the consumption and food preference for highly palatable food, such as chocolate, and is able to promote lipoperoxidation in hypothalamus.

Keywords: Air pollution. Particulate matter. ROFA. Oxidative stress. Antioxidants. Highly palatable food.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Efeitos da poluição atmosférica em diferentes órgãos	18
Figura 2 – Representação dos estágios de suscetibilidade humana a exposição à poluição atmosférica	19
Figura 3 – Representação do tamanho do material particulado e sua comparação com fio de cabelo humano	21
Figura 4 - Representação esquemática do comportamento alimentar através da via gustativa e a relação com sistemas neurais da regulação alimentar.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxil
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlet
CAT	Catalase
CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HOMA IR	<i>Homeostatic Model Assessment</i>
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
IARC	<i>International Agency For Research on Cancer</i>
IL-6	Interleucina – 6
IMC	Índice de massa corporal
Kg	Quilogramas
Kg/m ²	Quilogramas por metro cúbico
MP	Material particulado
MP _{0,1}	Partículas de diâmetro menor que 0,1µm
MP ₁₀	Partículas de diâmetro 10µm ou menor
MP _{2,5}	Partículas de diâmetro 2,5µm ou menor
NADPH	Fosfato de dinucleotído de nicotinamida e adenina
NF-κB	Fator de transcrição nuclear Kappa B
NO [•]	Óxido nítrico
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
NO _x	Óxidos de nitrogênio
NRAP	<i>Near – roadway air pollution</i>
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Ânion radical superóxido
O ₃	Ozônio

OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
RNA	Ácido ribonucleico
ROFA	<i>Residual oil fly ash</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TNF- α	Fator de necrose tumoral
US EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>

SUMÁRIO

1 Introdução.....	16
1.1. Poluição Atmosférica.....	16
1.1.1 Material particulado.....	19
1.1.2 Dados epidemiológicos	24
1.1.3 Mecanismos fisiopatológicos	25
1.2 Comportamento alimentar.....	29
1.3 Distúrbios metabólicos e poluição atmosférica	31
2. Justificativa.....	33
3. Objetivos	34
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos	34
4. Referências Bibliográficas	35
5. Artigo Científico.....	43
6. Conclusão	75
7. Anexos	76
7.1 Normas da revista <i>Inhalation toxicology</i>	76
7.2 Carta de aprovação do CEUA.	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 Poluição atmosférica

A Revolução Industrial teve seu início no século XX e, desde então, tem alterado hábitos e sistemas em meio à população. Dentre as consequências desta revolução destaca-se, negativamente, a poluição do ar, tornando-se um assunto explorado e debatido por pesquisadores devido a episódios e catástrofes ambientais significativos que causaram inúmeros prejuízos à saúde humana.

Dentro de um contexto histórico podemos citar o *“The Meuse Valley fog of December, 1930”* como sendo um dos primeiros relatos de desastres ambientais envolvendo a poluição atmosférica, ocorrido ao leste da Bélgica. O Vale acomodou um conjunto industrial com diversas fontes de poluição do ar. A combinação de baixa temperatura, presença de nevoeiro e pouca movimentação do vento resultaram em uma baixa dispersão atmosférica devido ao grande acúmulo de poluentes gasosos e particulados, gerando inúmeras mortes e danos à saúde da população (1).

Da mesma forma, o evento conhecido como “Nevoeiro de Londres”, em 1952, é considerado o acontecimento mais severo envolvendo a poluição atmosférica, tornando-se precursor de estudos epidemiológicos sobre poluição do ar. Nesta região as condições meteorológicas estavam atipicamente intensas — ar frio, estagnado e com denso nevoeiro — e, além disso, o ambiente apresentava fuligem devido ao processo incompleto de inversão térmica. Este episódio ficou amplamente conhecido por ter ocasionado altos índices de mortalidade e promover o agravamento de diversas doenças pré-existentes, sendo associado às altas taxas de poluição nas quais a população foi exposta. Por esta razão, a compreensão destes eventos tornou-se mundialmente notável, caracterizando a poluição atmosférica como um grande problema de saúde pública (2, 3).

A poluição do ar é definida como uma mistura química e física de diversos compostos e pode ser proveniente de fontes naturais (atividades vulcânicas, incêndios florestais espontâneos, erosão do solo) ou antropogênicas (veículos envolvidos com a combustão de compostos fósseis e fontes industriais). Os poluentes atmosféricos são constituídos por carbono elementar e orgânico, sulfatos, nitratos, carbonatos, peróxidos, aldeídos, quartzo, silicatos e gases como ozônio (O₃), óxidos de nitrogênio (NO_x), óxidos de enxofre e voláteis orgânicos. Podem ser constituídos ainda por compostos orgânicos

e biológicos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), além de material particulado (MP) e metais (1, 4-6).

Os poluentes também podem diferir quanto à forma como são emitidos de suas fontes para a atmosfera. Os poluentes primários como o monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂) e dióxido de nitrogênio (NO₂), são emitidos diretamente para o ar pela queima de combustíveis fósseis, enquanto que os poluentes secundários como O₃, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ácido sulfúrico (H₂SO₄), são formados na atmosfera a partir de reações químicas com poluentes primários (5).

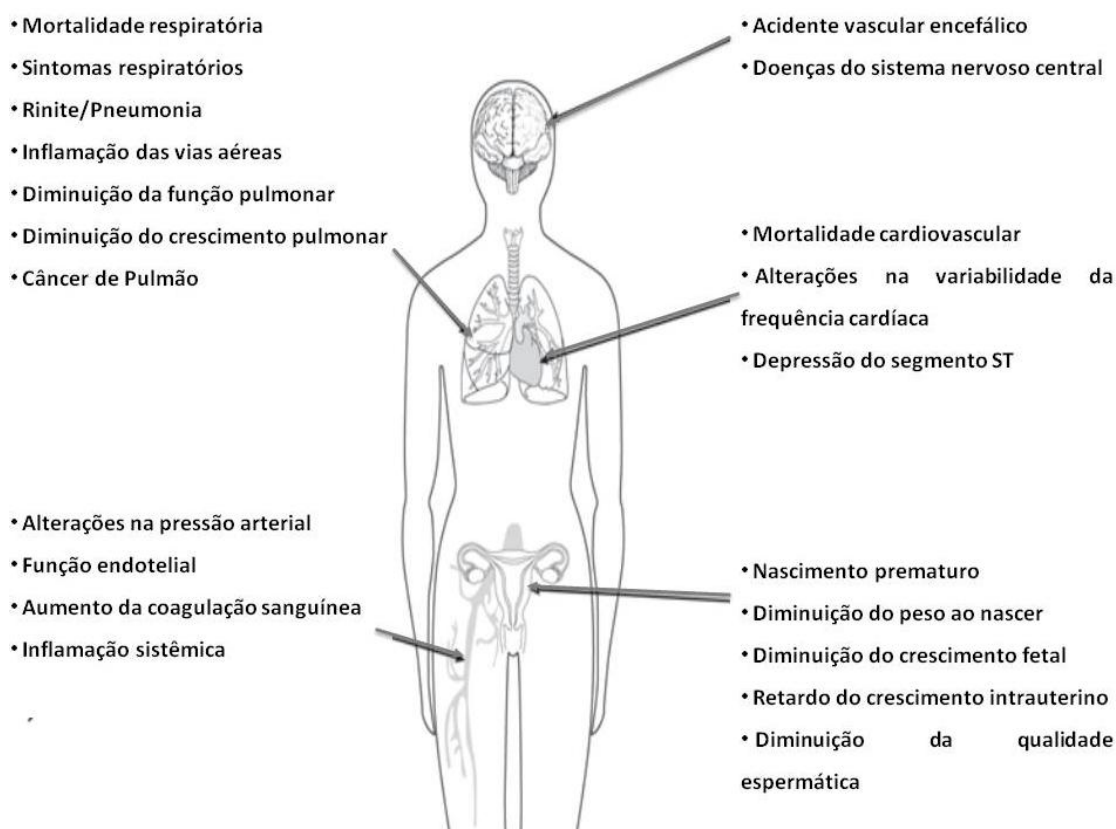
Os poluentes do ar podem variar de acordo com a localização geográfica e a sazonalidade. As concentrações e a toxicidade dos poluentes também estão intimamente relacionadas com as variações climáticas, principalmente nas áreas urbanizadas em que os padrões de circulação atmosférica encontram-se estagnados. Devido às diversas características que as partículas apresentam, elas podem representar diferentes graus de toxicidade e de riscos para a saúde. Nos centros urbanos, o tipo de poluição que prevalece é aquela oriunda, principalmente, dos veículos automotores, os quais são responsáveis pela queima de combustíveis fósseis e da biomassa, sendo esta fonte associada com maior efeito toxicológico e, conseqüentemente, eventos mais graves à saúde (7)

Atualmente, é crescente o interesse da comunidade científica global sobre o impacto da poluição do ar na saúde dos indivíduos. Tendo em vista que esta problemática está amplamente relacionada com o desencadeamento de efeitos deletérios sobre a saúde (8), sabe-se que diversos órgãos podem ser afetados pela exposição à poluição do ar. (Figura 1). Diversos estudos epidemiológicos têm demonstrado que a exposição à poluição atmosférica, tanto em curto quanto em longo prazo, está associada à morbidade e à mortalidade por várias doenças. A associação mais consistente está ligada às doenças cardiovasculares e respiratórias, incluindo insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, acidentes cerebrovasculares, doença pulmonar obstrutiva crônica, infecções no trato respiratório e asma, principalmente em populações suscetíveis (5, 7, 9-11).

O impacto da poluição do ar sobre as doenças respiratórias crônicas ainda inclui a interrupção da via epitelial das vias aéreas e das vias de sinalização celular, destruição do parênquima, estresse oxidativo, comprometimento da fagocitose por células fagocíticas, infiltração celular inflamatória, além de modificações na imunidade celular regulada, na epigenética e na autofagia (12-15).

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency For Research On Cancer – IARC*) classificou a poluição atmosférica e o MP como carcinogênicos para seres humanos (IARC, tipo 1). Esta classificação tem sido fundamentada por meio de diversos estudos epidemiológicos, os quais demonstram associação entre a exposição à poluição do ar e a incidência de câncer de pulmão (16-18). A poluição atmosférica também está sendo largamente associada a desfechos neurológicos adversos, síndrome metabólica, efeitos reprodutivos, inflamação sistêmica, mudanças na função endotelial, entre outros (7, 19-22).

Figura 1 – Efeitos da poluição atmosférica em diferentes órgãos.



Fonte: adaptado de Rückerl *et al.*, 2011.

Os problemas envolvendo a poluição do ar representam um desafio significativo para a sociedade, especialmente devido à crescente população urbana mundial. Apesar de existir grande preocupação com o desenvolvimento sustentável com a redução das concentrações de emissões de poluentes, regiões densamente povoadas, principalmente as grandes cidades e países em desenvolvimento, ainda emitem altas

concentrações de poluentes (23, 24). Desta forma, todos os indivíduos estão expostos à poluição atmosférica diariamente e em todas as etapas da vida, podendo variar a intensidade e a extensão as quais estão sendo submetidos (Figura 2).

Figura 2 - Representação dos estágios de susceptibilidade humana à exposição à poluição atmosférica.



Fonte: adaptado de Rückerl *et al.*, 2011.

Tendo em vista o contexto histórico no qual a poluição atmosférica está inserida, e diante da complexidade deste tema e a sua abrangência em termos de efeitos prejudiciais à saúde — considerando a insuficiência do monitoramento da poluição e dos danos à saúde — se torna evidente que ainda existam diversas lacunas na literatura a serem esclarecidas. Dentre estas necessidades, é fundamental a condução de estudos sobre os mecanismos de ação dos poluentes atmosféricos, bem como, sua contribuição para o surgimento de enfermidades e de agravos de doenças pré-existentes.

1.1.1 Material Particulado

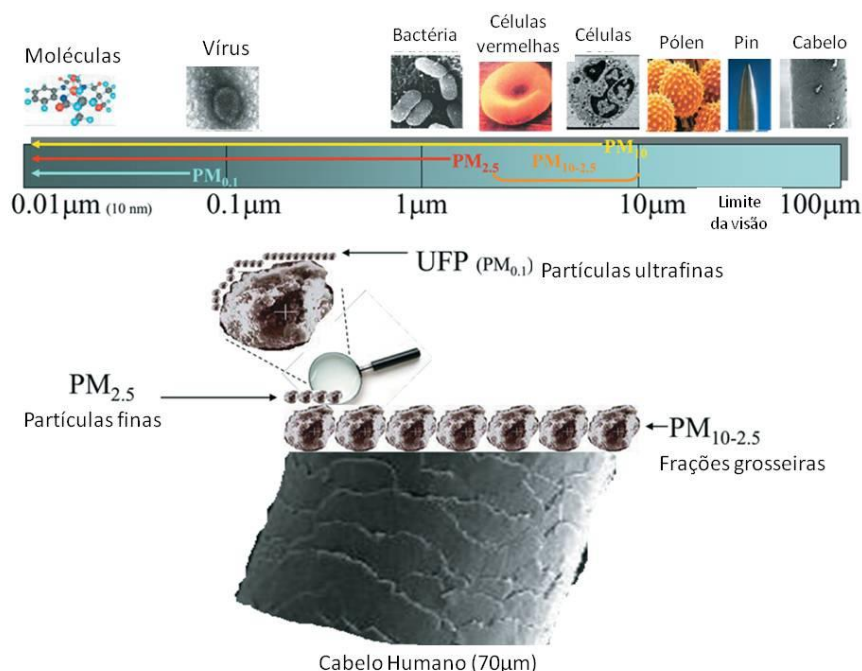
Dentre os constituintes da poluição do ar, o MP é o poluente que tem sido mais largamente investigado devido a seu impacto sobre a saúde (25).

O MP, de acordo com a *United States Environmental Protection Agency* (US EPA), é caracterizado como uma mistura microscópica de partículas sólidas e líquidas suspensas no ar (26). Esses poluentes são gerados principalmente por meio de processos industriais, emissões veiculares, atividades domésticas e de fontes naturais. A sua emissão pode persistir no ambiente por longo período de tempo (27).

O MP possui diferentes características físicas (tamanho e número de partículas, área superficial total e propriedades eletrostáticas), biológicas (mistura de microorganismos como endotoxinas, bactérias e vírus) e químicas (espécies orgânicas voláteis e semi-voláteis como HPA; metais de transição como ferro, níquel e cobre; íons como sulfatos e nitratos; gases reativos como O_3 , peróxidos e aldeídos; material carbonado, biológicos e minerais). A composição química é a característica mais suscetível a variações que são dependentes de diversos fatores, como a fonte onde são emitidos, o clima e a estação do ano (27, 28).

A principal característica física do MP está relacionada ao seu tamanho aerodinâmico, que está inversamente associado à toxicidade que ele exercerá no organismo (Figura 3). O MP_{10} refere-se às partículas inferiores ou equivalentes a 10 μm de diâmetro; o $MP_{2,5}$ refere-se às partículas menores ou iguais a 2,5 μm de diâmetro, e as partículas ultrafinas referem-se às partículas com menos de 0,1 μm de diâmetro. Partículas grossas (MP_{10}) permanecem retidas nas vias aéreas superiores, enquanto que as partículas finas ($MP_{2,5}$) tendem a se depositar nas vias aéreas inferiores, especialmente nos alvéolos e, como consequência, podem atingir a circulação sistêmica. Partículas ultrafinas ($MP_{0,1}$) são diretamente depositadas nos alvéolos, e são translocadas, pelo sangue, do pulmão para outros órgãos como fígado, coração e cérebro (1, 11, 29).

Figura 3 - Representação do tamanho do material particulado e sua comparação com fio de cabelo humano.



Fonte: adaptado de Brook *et al.*, 2008.

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em sua diretriz sobre qualidade do ar, estabelece uma média anual e diária de exposição humana ao MP (25). Para o MP_{2,5} a média anual de exposição é 10 µg/m³ e a média diária é 25 µg/m³, já para o MP₁₀ a média anual e a média diária de exposição são 20 µg/m³ e 50 µg/m³, respectivamente. A preocupação mais alarmante é de que grande parte da população vive em cidades que excedem os níveis de MP estabelecidos pela OMS, além de existirem poucas evidências para sugerir um limiar de concentração de exposição seguro à população (25).

A exposição ao MP tem sido correlacionada a vários tipos de danos ao organismo conforme descrito anteriormente. Diferentes tipos de metodologias de exposição têm sido utilizados para comprovar tais efeitos. As evidências mais consolidadas na literatura apontam para o desenvolvimento de doenças respiratórias crônicas — como asma e doenças alérgicas (30) —, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e câncer de pulmão (12). Brook *et al.* (2010) reuniu uma série de estudos em modelos experimentais e clínicos de exposição ao MP demonstrando, também, haver uma consistente relação causal entre esta e a morbidade e mortalidade cardiovascular (31). Do mesmo modo, estudos recentes na literatura evidenciam que a exposição crônica ao MP está

relacionada com a patogênese e fisiopatologia de doenças neurodegenerativas e neuroinflamatórias (32), atuando também sobre o sistema reprodutivo (33), entre outros.

Além disso, é crescente o aumento das investigações sobre o impacto da exposição ao MP no desenvolvimento de obesidade e suas consequências. A exposição a poluentes ambientais é considerada como fator “obesogênico”, que contribui para o aumento da obesidade (34). Bolton *et al.* (2012), em seu trabalho experimental, demonstraram que camundongos expostos durante o período gestacional a partículas de diesel tiveram um aumento de citocinas inflamatórias no cérebro fetal e, um consequente aumento, quando adultos, da ativação da microglia e da ansiedade induzida por uma dieta rica em gordura. Ademais, os camundongos expostos ganharam mais peso durante o início da vida e a exposição precoce às partículas de diesel sensibilizou os animais ao ganho de peso quando colocados em uma dieta rica em gordura na fase adulta (35). McConnell *et al.* (2016) reuniram em seu trabalho uma série de estudos experimentais evidenciando que a exposição precoce ao MP causa dano mitocondrial e acúmulo de tecido adiposo branco em relação ao tecido adiposo marrom metabolicamente ativo, distorcendo o equilíbrio metabólico (36).

Ainda, outros trabalhos em modelos animais evidenciam que a exposição ao MP desencadeia acentuado aumento da inflamação e da adiposidade visceral, sendo ambos determinantes no desenvolvimento de resistência insulínica associadas a anormalidades metabólicas (37).

Um estudo recente realizado por Wolf *et al.* (2016) mostra que a exposição em longo prazo à poluição atmosférica está relacionada com a resistência à insulina na população em geral. Ainda, evidenciou que a cada aumento de $7,9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de MP está associado a um aumento do índice HOMA IR (Modelo de avaliação da Homeostase – Resistência insulínica) e níveis de insulina, principalmente em indivíduos pré-diabéticos. Os achados indicam que a exposição ao MP é um fator de risco para diabetes mellitus tipo 2, sobretudo em indivíduos pré-diabéticos (38). Já Fonken *et al.* (2011) evidenciaram que a exposição ao MP leva à depressão e à deficiência cognitiva e, além disso, leva a uma suprarregulação de marcadores inflamatórios e alterações estruturais no hipocampo (39). Do mesmo modo, Pun *et al.* (2016) com o objetivo de avaliar a associação entre a exposição ao MP 2,5 com o desenvolvimento e/ou agravamento de depressão e ansiedade, estudaram uma coorte de idosos dos Estados Unidos e evidenciaram uma associação positiva entre a exposição a estas partículas e sintomas de depressão e ansiedade. Ainda, os autores sugeriram que indivíduos com situação

socioeconômica mais vulnerável ou que possuíam alguma história de doença prévia podem ser mais suscetíveis ao desenvolvimento de transtornos mentais (40).

Existem diferentes tipos de MP, dependendo da sua fonte de origem e composição. O *residual oil fly ash* (ROFA) é um tipo de MP substituto às partículas ambientais urbanas para estudar os efeitos biológicos da poluição do ar. Muito embora ele não mimetize uma exposição real, são encontrados em sua composição poluentes presentes na constituição da poluição atmosférica. O ROFA é derivado da queima de combustível fóssil e em sua composição podem ser encontrados compostos orgânicos e inorgânicos. Os compostos inorgânicos são o resultado de uma incompleta oxidação de materiais carbonados (41). Apresenta ainda, na sua composição química, sulfatos e silicatos, além de ser rico em metais de transição solúveis, como ferro, vanádio e níquel (41-43). Além disso, as partículas do ROFA apresentam, frequentemente, diâmetro aerodinâmico $\leq 2,5\mu\text{m}$, tamanho este que está mais estreitamente associado aos efeitos adversos à saúde do que as partículas maiores (43).

Muitos estudos experimentais têm sido conduzidos para elucidar os efeitos do ROFA em diferentes órgãos e sua relação com diferentes doenças, além de avaliar a contribuição de metais na toxicidade da exposição à poluição atmosférica. Já está bem estabelecido na literatura que o ROFA é capaz de alterar os mecanismos de defesa pulmonar, diminuindo a produção de importantes mediadores inflamatórios, como os envolvidos na resposta pulmonar a infecções oportunistas (44). Carvalho *et al.* (2014) demonstraram que a instilação intranasal aguda a uma baixa dose de ROFA em camundongos nas primeiras 6, 24, 48, 72 e 96 horas comprometeu a mecânica pulmonar, desencadeando grande influxo de células polimorfonucleares no pulmão e aumentou o número de células inflamatórias no sangue, sendo que estes desfechos retornaram a valores normais após 120 horas da exposição ao ROFA (45). Watkinson *et al.* (1998) demonstraram que há efeitos da exposição ao ROFA na função cardíaca, uma vez que animais saudáveis expostos ao composto apresentam uma resposta bradicárdica e esta resposta persistiu até 48 horas após a instilação (46). Zanchi *et al.* (2008) investigaram a administração de diferentes frações de ROFA por instilação intranasal com o intuito de avaliar se esta exposição poderia gerar peroxidação lipídica e alterações comportamentais em ratos expostos a este poluente. Os autores observaram que a administração repetida de ROFA induziu mudança comportamental e lipoperoxidação no estriado e cerebelo dos ratos expostos, ratificando o conceito de que

o sistema nervoso central pode ser afetado negativamente por este tipo de partícula (47).

Diante disso, sugere-se que a exposição ao ROFA é capaz de promover diversos efeitos deletérios à saúde, e que estes efeitos podem variar dependendo das propriedades que o composto apresenta. No entanto, ainda são escassos na literatura estudos que demonstram a influência do ROFA isolado sobre a obesidade e parâmetros metabólicos. Estas lacunas necessitam ser esclarecidas para uma melhor compreensão dos efeitos deste poluente sobre o metabolismo.

1.1.2 Dados epidemiológicos

A exposição a poluentes atmosféricos pode afetar a saúde humana de várias formas, levando a um aumento da mortalidade e da morbidade (25). Evidências epidemiológicas dos efeitos sobre a saúde provocados pela poluição atmosférica estão crescendo e evoluindo rapidamente. Hoje, a poluição do ar é o maior fator de risco ambiental (48).

Segundo a OMS, 92% da população mundial vivem em lugares onde os níveis da qualidade do ar excedem os índices recomendados de exposição à poluição atmosférica de sua diretriz (25). Em 2012, uma estimativa de 7 milhões de mortes (correspondente a 11,6% de todas as mortes globais) foram associadas à exposição da poluição do ar *outdoor* e *indoor*. Aproximadamente, 90% das mortes relacionadas à poluição atmosférica ocorrem em países de baixa e média renda e quase 94% são devido às doenças não transmissíveis em adultos, como doenças cardiovasculares, acidentes vasculares cerebrais, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e câncer de pulmão. As mortes remanescentes ocorrem em crianças menores de cinco anos de idade devido às infecções respiratórias agudas no trato respiratório inferior (49, 50).

Diversos estudos na literatura relatam sobre a exposição à poluição do ar como causa de admissões hospitalares. Zheng *et al.* (2015) evidenciaram em um trabalho de revisão sistemática e meta-análise que a exposição a curto prazo aos poluentes atmosféricos confere um risco aumentado de visitas a salas de emergência e internações hospitalares relacionados com asma (51). Outros estudos também evidenciam que existe um risco aumentado de hospitalização após exposições a poluentes atmosféricos devido ao aumento de casos de DPOC (52), aumento da hospitalização e mortalidade por doenças cardiovasculares (53, 54) e aumento das admissões hospitalares devido a doenças circulatórias e respiratórias (55).

De acordo com a OMS, em 2012 no Brasil, a exposição à poluição do ar ambiental em ambos os sexos resultou em 26.241 mortes. Destas, 198 estão relacionadas a infecções respiratórias agudas no trato respiratório inferior, 539 a DPOC, 2.901 a câncer de pulmão, 12.987 a doença isquêmica do coração e 9.616 a acidente vascular cerebral (49). No estudo realizado no Brasil por Ferreira *et al.* (2016) foi evidenciado uma associação entre doenças respiratórias e exposição ao MP 10 μ m e MP 2,5 μ m, em que o risco de hospitalização é aumentado em 23,5% e 12,8% a cada aumento de 10 μ g/m³, respectivamente. A exposição ao MP 2,5 μ m também foi associado a doenças do sistema circulatório com o risco de hospitalização aumentado em 19,6% por cada aumento de 10 μ g/m³ (55).

Diante dos dados epidemiológicos apresentados, são visíveis os efeitos maléficos relacionados às altas taxas de poluentes atmosféricos. Por isso, existe uma necessidade crescente de programas e ações que sejam destinados a monitorar e reduzir os níveis de poluição do ar, para que estes retornem a padrões aceitáveis a fim de minimizar os danos e as doenças por eles causados à população.

1.1.3 Mecanismos fisiopatológicos

Diversos estudos têm sido realizados para compreender os mecanismos de ação pelos quais os constituintes da poluição do ar atuam de forma a gerar danos à saúde humana. Dentre os principais meios envolvidos no dano celular que os compostos atuam estão o estresse oxidativo, a inflamação, o dano ao DNA e os mecanismos metabólicos.

O estresse oxidativo está amplamente consolidado na literatura como um dos principais meios pelo qual a poluição do ar pode agir sobre sistemas biológicos. Diversas reações químicas ocorrem constantemente dentro de nossas células, como as reações de oxi-redução (reações redox), as quais desempenham um papel fundamental na manutenção das funções celulares, incluindo ciclos metabólicos e eliminação de substâncias. As reações redox envolvem a transferência de elétrons de uma substância (redutora) para outra substância (oxidante) e podem iniciar uma cascata de transferência de elétrons, e a redução e/ou oxidação de vários elementos chave (56). Por meio destas reações, as células devem manter um equilíbrio elétrico entre as macromoléculas, conhecido como estado redox. Em condições normais, as espécies reativas são produzidas como subproduto do metabolismo e são necessárias para cumprir funções biológicas como, alguns eventos celulares, incluindo transdução de sinais, ativação enzimática, expressão gênica, etc (57, 58).

As defesas antioxidantes são capazes de retardar, impedir ou prevenir contra os danos oxidativos promovidos pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), impedindo sua ocorrência (59). Quando o equilíbrio entre as espécies reativas e a defesa antioxidante é interrompido por excesso ou deficiência de qualquer um dos dois fatores, o corpo sofre uma forte modulação de seu estado redox, a favor das substâncias pró-oxidantes e redução das substâncias antioxidantes, chamado de estresse oxidativo (57, 59). O estado de estresse oxidativo é capaz de exercer muitos efeitos biológicos adversos, como oxidação de lipídeos e de proteínas, do ácido desoxirribonucleico (DNA) e do ácido ribonucleico (RNA), além de desencadear cascatas pró-inflamatórias (31, 57). Estas alterações significativas dentro da célula podem culminar em mecanismos de morte celular (60).

Entre as ERO e ERN destacam-se o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlet (1O_2), o radical hidroxil ($\cdot OH$), o óxido nítrico ($NO^{\cdot}$), o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), entre outros. Tanto as ERO quanto as ERN apresentam ações distintas e propriedades que se sobrepõem. Estas espécies reativas podem atuar separadamente, no entanto, as próprias moléculas acabam interagindo e afetando ainda mais as células alvo (60, 61). As principais fontes endógenas onde as ERO são produzidas incluem a cadeia respiratória mitocondrial, o retículo endoplasmático, a NADPH oxidase, as enzimas do citocromo P-450, as ciclooxigenases, entre outras. Dentre as fontes exógenas geradoras dessas espécies, a poluição do ar é a que está em maior evidência (61).

As células também possuem um sistema de defesa antioxidante endógeno capaz de protegê-las contra as ERO e ERN, neutralizando estes compostos e diminuindo sua reatividade. Podemos citar como principais antioxidantes endógenos a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e o sistema redox da glutathiona (61). A SOD catalisa a transição de $O_2^{\cdot-}$ em oxigênio e H_2O_2 . A CAT, uma heme enzima, catalisa a reação que converte duas moléculas de H_2O_2 em duas moléculas de água e oxigênio (O_2). O sistema redox da glutathiona desempenha papel crítico em vários processos celulares através da manutenção e regulação do estado tiol-redox e, principalmente, catalisa a redução de H_2O_2 ou hidroperóxidos orgânicos em água ou seus correspondentes alcoóis (56, 59, 62). Estes antioxidantes atuam de forma a prevenir a peroxidação lipídica, a modificação de proteínas, o dano ao DNA, inibindo enzimas geradoras das espécies reativas e ativando íons metálicos quelantes (58, 63).

Os estudos de exposição aos diferentes constituintes da poluição atmosférica têm relacionado principalmente o estresse oxidativo e a inflamação como a primeira linha de resposta adversa à exposição. O estresse oxidativo é muitas vezes induzido e desencadeado por processos inflamatórios, sendo assim, acredita-se que os dois processos estão biologicamente ligados. Então, nenhuma das duas vias supracitadas pode funcionar exclusivamente, e a extensão em que elas se sobrepõem ainda é desconhecida (7, 31, 64).

A inflamação é considerada um mecanismo central para o desenvolvimento de doenças por exposição à poluição atmosférica. A inflamação pulmonar também é proposta como sendo um possível fator causal envolvido nos efeitos cardiovasculares da exposição ao MP. As respostas inflamatórias nas vias aéreas podem resultar na liberação de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios ou pró-trombóticos na circulação, levando a um remodelamento arterial ou afetando a estabilidade das placas nas paredes arteriais. Ainda assim, o estresse oxidativo pode acarretar em uma ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios centrais, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B), que leva à regulação de genes pró-inflamatórios, incluindo várias citocinas e quimiocinas (64). Damiani *et al.* (2012) após avaliarem a exposição de ratos *Wistar* a diferentes doses de ROFA, por noventa dias, verificaram que ocorreu alterações oxidativas cardiopulmonares e que o tecido cardíaco parece ser mais suscetível ao dano oxidativo do que o pulmão. Os resultados encontrados sugerem ainda que o dano oxidativo mediado por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser um dos mecanismos envolvidos na toxicidade cardíaca após a exposição ao ROFA (65).

Em um trabalho de revisão realizado por Bai *et al.* (2016), os autores demonstraram que o estresse oxidativo e a inflamação são os principais mecanismos para o desenvolvimento de aterosclerose após a exposição ao MP 2,5. O estresse oxidativo pode iniciar o desenvolvimento de ateroma, promovendo uma disfunção endotelial e a via da inflamação é ativada após a liberação por macrófagos alveolares de citocinas pró-inflamatórias como, fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), induzindo um processo inflamatório sistêmico e a ativação, em outros órgãos, de mais citocinas pró-inflamatórias (66).

Do mesmo modo, Adar *et al.* (2013) também demonstraram que a exposição ao MP 2,5 está relacionada às doenças cardiovasculares através da formação de aterosclerose, tendo a inflamação e a disfunção endotelial como mecanismos importantes para desencadear o desenvolvimento da doença (67). Ações

cardiopulmonares, pelos quais os poluentes atuam sobre o organismo, não são as únicas vias prejudicadas por tais substâncias. O Sistema Nervoso Central (SNC) também é afetado pela poluição do ar, uma vez que o cérebro é rico em lipídios, tem um alto fornecimento de oxigênio, e, além disso, possui pouca defesa antioxidante endógena, tornando-se, portanto, propenso ao estresse oxidativo (68).

Costa *et al.* (2015), com o intuito de investigar a neurotoxicidade da poluição atmosférica, avaliaram os efeitos neurotóxicos da exposição a partículas de exaustão de diesel em camundongos adultos. Os animais foram expostos a estas partículas por seis horas. Ao final da exposição, foi observado que os animais expostos possuíam níveis elevados de peroxidação lipídica e da citocina pró-inflamatória TNF- α nas regiões cerebrais avaliadas. Estes achados indicam que a exposição a estas determinadas partículas causa neuroinflamação e estresse oxidativo no cérebro (69, 70).

Outros estudos também evidenciam que um componente chave da exposição à poluição atmosférica é a neuroinflamação, e que a expressão contínua de potentes mediadores inflamatórios no SNC e a formação de ERO leva ao desenvolvimento de doenças cognitivas, neuroinflamatórias e neurodegenerativas (71, 72). Existem evidências consolidadas que um dano oxidativo em estruturas cerebrais (como a peroxidação lipídica) leva a uma diminuição da atividade motora em ratos (47), após a exposição à poluição do ar, e também pode induzir o desenvolvimento de comportamento ansiogênico e depressivo em animais geneticamente suscetíveis (68).

Outro potencial mecanismo que pode ocorrer derivado de um grande processo inflamatório e da geração de ERO após a exposição a poluentes atmosféricos é a alterações metabólicas. Com intuito de verificar se a exposição ao MP 2,5 piora o quadro de resistência à insulina, inflamação e aumenta a adiposidade visceral, Sun *et al.* (2009) realizaram um estudo onde camundongos foram alimentados com ração com alto teor de gordura durante dez semanas e, após, expostos à câmara de ar poluído (MP 2,5) e ao ar filtrado por vinte e quatro semanas. Ao final, os pesquisadores concluíram que a exposição ao MP 2,5 promove uma piora da resistência à insulina, da inflamação e da adiposidade visceral, sendo a inflamação um mecanismo crítico responsável em parte pelas anormalidades observadas em resposta à dieta com alto teor de gordura e a obesidade (73).

Com o intuito de avaliar a associação entre a poluição do ar e a prevalência de diabetes, foi realizada uma análise transversal com 6392 participantes entre 29 e 73 anos de idade, em coorte da Suíça sobre poluição atmosférica e doenças pulmonares e

cardíacas (SAPALDIA). A associação entre as estimativas das exposições médias de MP 10 e NO₂ ao longo de dez anos anteriores à pesquisa foram reportadas. Verificou-se, então, que ambos os poluentes foram significativamente associados com a prevalência de diabetes por aumento de 10µg / m³ na média de exposição. A associação com MP 10 foi mais forte do que com NO₂, evidenciando que a exposição em longo prazo à poluição do ar está associada com diabetes mellitus (74).

1.2 Comportamento alimentar

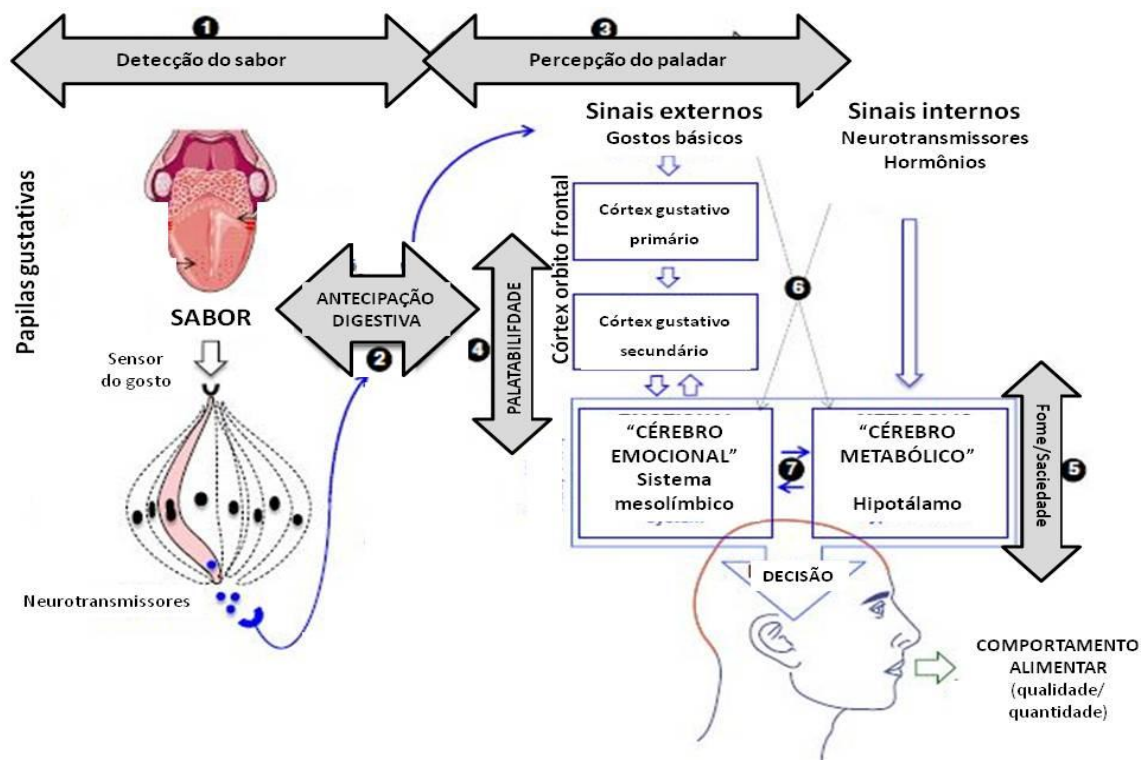
Os parâmetros alimentares têm mudado drasticamente com o passar do tempo, e isto, tem gradualmente, influenciado o comportamento alimentar para selecionar preferencialmente alimentos ricos em energia. Estes alimentos provêm da indústria alimentar preparados para serem altamente palatáveis e atraentes. Acredita-se ainda que, o fácil acesso a este tipo de alimento contribui significativamente para o aumento de obesidade e principalmente para as comorbidades associadas ao excesso de peso, como por exemplo, hipertensão, hipertrigliceridemia e resistência à insulina. Esta mudança do perfil comportamental alimentar conduz a um círculo vicioso obesogênico que ainda não está completamente compreendido (75, 76).

Em suma, o processo de funcionamento do comportamento alimentar inicia-se com o sentido do paladar, que desempenha um papel importante na decisão de consumir ou evitar alimentos e, este comportamento alimentar seletivo, necessita de duas etapas sucessivas: a detecção periférica do sabor através das papilas gustativas e a percepção central de estímulos gerados pelo sabor, por estruturas específicas do SNC (75).

Após a detecção periférica do sabor (1), ocorre a ativação de um circuito reflexo desencadeado pelo gosto, que conduz a um processo de antecipação digestiva (2) e a percepção do paladar por circuitos gustativos centrais (3). Estes circuitos envolvem o córtex orbito frontal, que recebe informações sensoriais relacionadas à palatabilidade alimentar (4) e faz uma transferência destas informações com a via de recompensa (sistema mesolímbico ou “cérebro emocional”). Os sinais reguladores após a ingestão (neurotransmissores, hormônios) fornecem ao hipotálamo (denominado “cérebro metabólico”), conhecido por controlar a ingestão de alimentos e o gasto energético, informações sobre o status da alimentação (5). Em seguida, ocorre uma regulação cruzada do sistema mesolímbico por sinalização interna e do hipotálamo por sinalização

externa (6) e, também, interligações anatômicas diretas entre os dois sistemas (7). Portanto, esta regulação depende de um sutil equilíbrio entre estes sistemas (Figura 4).

Figura 4 – Representação esquemática do comportamento alimentar através da via gustativa e a relação com sistemas neurais da regulação alimentar.



Fonte: adaptado de Besnard, 2016.

Modelos de comportamento alimentar também são muito utilizados para a avaliação do alívio do estresse por recompensa alimentar saborosa. Em humanos, a ingestão de alimentos palatáveis e/ou com alto teor de carboidrato está associada com a melhora do humor, diminuição do estresse e da concentração de cortisol no plasma (77). Para testar o comportamento alimentar de ratos durante período de estresse, é oferecido a estes animais um alimento altamente palatável (rico em açúcar ou gordura) e um menos palatável (por exemplo, ração padrão). Ao final do teste, os animais demonstram escolher em grande porção o alimento altamente palatável ao alimento padrão, ratificando que a forma como se determina o comportamento alimentar frente à dieta é capaz de reduzir índices de estresse (77-79).

Estudos dos distúrbios compulsivos alimentares também utilizam a avaliação do comportamento alimentar para auxiliar na compreensão dos fatores que motivam e que, poderiam ajudar para a melhora do comportamento compulsivo (76). Da mesma forma, Benetti *et al.* (2007) utilizaram a avaliação de comportamento alimentar para analisar o

comportamento de ratos que tiveram intervenção de randomização neonatal frente a exposição a uma dieta altamente palatável e assim, verificaram o comportamento alimentar destes animais frente a estas intervenções (80, 81). Intervenções em modelos animais com dieta de cafeteria têm sido utilizadas para analisar o consumo e a preferência alimentar, bem como, avaliar as alterações metabólicas que a ingestão de alimentos ricos em açúcar e gordura podem promover (82-84).

1.3 Distúrbios metabólicos e poluição atmosférica

Os padrões do comportamento alimentar têm mudado drasticamente, onde, a disponibilidade e a procura de alimentos ricos em energia, contendo elevadas quantidades de açúcares e gordura que podem causar distúrbios no metabolismo, têm aumentado consideravelmente. O estilo de vida moderno também colabora para este aumento, já que a oferta destes tipos de alimentos é grande e são facilmente obtidos. Porém, existem outros fatores externos, além das mudanças comportamentais, que podem estar contribuindo para este cenário.

Foi Baillie-Hamilton (2002) um dos pesquisadores a hipotetizar que somente as mudanças comportamentais e dietéticas não seriam sozinhas as responsáveis por causar vários efeitos metabólicos. À vista disso, levantou-se a hipótese de que certas substâncias orgânicas e inorgânicas no ambiente estavam coincidindo com a crescente incidência de obesidade e de distúrbios metabólicos, sugerindo-se então, que as causas ambientais poderiam estar envolvidas nesta mudança (85).

A exposição ambiental ao MP 2,5 induz a uma série de doenças metabólicas como, por exemplo, distúrbios termogênicos na atividade do tecido adiposo marrom, órgão crucial para o metabolismo energético. Estas partículas atuam inibindo a função deste tecido adiposo ou, até mesmo, induzindo processos inflamatórios nele, o que pode agravar ainda mais as doenças metabólicas. Mas, ainda é necessário um melhor conhecimento dessas anormalidades metabólicas adiposas e dos mecanismos envolvidos na disfunção termogênica (86). Além disso, a exposição à poluição do ar está associada à síndrome metabólica e ao desenvolvimento de diabetes (21, 74, 87).

Sabe-se que a exposição à poluição atmosférica está amplamente associada à geração de ERO e, conseqüentemente, a um quadro de estresse oxidativo. O consumo de uma dieta rica em gordura e calorias pode gerar um excesso de pró-oxidantes e, por conseguinte, agravar o estado oxidativo. Com isso, acredita-se que a poluição do ar

conduz a um dano oxidativo que pode ser potencializado por uma dieta inadequada, tendo efeitos sobre a obesidade (88).

As evidências mais recentes indicam que a nutrição pode exercer um papel muito importante na modulação dos efeitos tóxicos que a exposição a poluentes atmosféricos podem causar sobre a saúde humana. O consumo em excesso de uma dieta rica em gordura, por exemplo, possui atividade pró-inflamatória e tende a contribuir para a toxicidade dos poluentes, os quais intensificam os efeitos prejudiciais dessa dieta rica em gordura. A exposição à poluição atmosférica também está relacionada ao aumento da adiposidade e ao ganho de peso (89).

2 JUSTIFICATIVA

A poluição atmosférica e mais especificadamente o MP podem causar diversos efeitos deletérios sobre a saúde humana, causando prejuízo ao organismo tanto centrais quanto periféricos. Atualmente, os padrões do comportamento alimentar estão sendo modificados por mudanças no estilo de vida ou por fatores externos que poderiam estar contribuindo para estas alterações. A grande disponibilidade e consumo de alimentos com altas quantidades de açúcares e gorduras, também poderiam colaborar para estas mudanças. Entretanto, são escassos na literatura os trabalhos que abordam a influência da exposição à poluição do ar sobre o consumo e a preferência alimentar, bem como, os efeitos a nível metabólico que estes dois fatores em conjunto poderiam desencadear. Sendo assim, faz-se necessário estudar os efeitos do MP sobre o comportamento alimentar e possíveis mecanismos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar os efeitos da exposição subcrônica de *Residual oil fly ash* (ROFA) sobre o consumo e a preferência alimentar e suas interferências sobre o perfil lipídico e de estresse oxidativo no pulmão, no coração, no pâncreas e no hipotálamo em ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar o consumo de alimento altamente palatável e de ração padrão dos ratos expostos ao ROFA;
- Determinar a preferência alimentar entre alimento altamente palatável e ração padrão dos ratos expostos ao ROFA;
- Determinar a ingestão calórica e a eficiência calórica dos ratos expostos ao ROFA;
- Determinar a variação de massa corporal dos ratos expostos ao ROFA;
- Determinar a gordura abdominal dos ratos expostos ao ROFA;
- Determinar as concentrações colesterol total (CT), de lipoproteína de alta densidade (HDL), de lipoproteína de baixa densidade (LDL), de triglicerídeos (TG) e de glicose sanguínea dos ratos expostos ao ROFA;
- Determinar a lipoperoxidação no pulmão, no coração, no pâncreas e no hipotálamo de ratos expostos ao ROFA, através da determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS);
- Determinar atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) do pulmão, do coração, do pâncreas e do hipotálamo dos ratos expostos ao ROFA.

4 REFERÊNCIAS

1. Falcon-Rodriguez CI, Osornio-Vargas AR, Sada-Ovalle I, Segura-Medina P. Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases. *Front Immunol*. 2016;7:3.
2. Bell ML, Davis DL. Reassessment of the lethal London fog of 1952: novel indicators of acute and chronic consequences of acute exposure to air pollution. *Environ Health Perspect*. 2001;109 Suppl 3:389-94.
3. Nemery B, Hoet PH, Nemmar A. The Meuse Valley fog of 1930: an air pollution disaster. *Lancet*. 2001;357(9257):704-8.
4. Akimoto H. Global air quality and pollution. *Science*. 2003;302(5651):1716-9.
5. Mannucci PM, Harari S, Martinelli I, Franchini M. Effects on health of air pollution: a narrative review. *Internal and Emergency Medicine*. 2015;10(6):657-62.
6. Ghio AJ, Carraway MS, Madden MC. Composition of air pollution particles and oxidative stress in cells, tissues, and living systems. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2012;15(1):1-21.
7. Rückerl R, Schneider A, Breitner S, Cyrys J, Peters A. Health effects of particulate air pollution: A review of epidemiological evidence. *Inhal Toxicol*. 2011;23(10):555-92.
8. Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet*. 2002;360(9341):1233-42.
9. Shah ASV, Langrish JP, Nair H, McAllister DA, Hunter AL, Donaldson K, et al. Global association of air pollution and heart failure: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2013;382(9897):1039-48.
10. Gehring U, Wijga AH, Hoek G, Bellander T, Berdel D, Brüske I, et al. Exposure to air pollution and development of asthma and rhinoconjunctivitis throughout childhood and adolescence: a population-based birth cohort study. *Lancet Respir Med*. 2015;3(12):933-42.
11. Brook RD. Cardiovascular effects of air pollution. *Clinical Science*. 2008;115(5-6):175-87.
12. Guan WJ, Zheng XY, Chung KF, Zhong NS. Impact of air pollution on the burden of chronic respiratory diseases in China: time for urgent action. *Lancet*. 2016;388(10054):1939-51.
13. Wang ZL. Association between chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: the missing link. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(1):154-65.
14. Kampa M, Castanas E. Human health effects of air pollution. *Environ Pollut*. 2008;151(2):362-7.

15. Xing YF, Xu YH, Shi MH, Lian YX. The impact of PM_{2.5} on the human respiratory system. *J Thorac Dis.* 2016;8(1):E69-74.
16. Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, et al. The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol.* 2013;14(13):1262-3.
17. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol.* 2013;14(9):813-22.
18. Pope CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA.* 2002;287(9):1132-41.
19. Xu X, Ha SU, Basnet R. A Review of Epidemiological Research on Adverse Neurological Effects of Exposure to Ambient Air Pollution. *Front Public Health.* 2016;4:157.
20. Liu R, Young MT, Chen JC, Kaufman JD, Chen H. Ambient Air Pollution Exposures and Risk of Parkinson Disease. *Environ Health Perspect.* 2016.
21. Eze IC, Schaffner E, Foraster M, Imboden M, von Eckardstein A, Gerbase MW, et al. Long-Term Exposure to Ambient Air Pollution and Metabolic Syndrome in Adults. *PLoS One.* 2015;10(6):e0130337.
22. Stieb DM, Chen L, Eshoul M, Judek S. Ambient air pollution, birth weight and preterm birth: a systematic review and meta-analysis. *Environ Res.* 2012;117:100-11.
23. Abe KC, Miraglia SG. Health Impact Assessment of Air Pollution in São Paulo, Brazil. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(7).
24. Fajersztajn L, Veras M, Barrozo LV, Saldiva P. Air pollution: a potentially modifiable risk factor for lung cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(9):674-8.
25. World Health Organization. Air quality guidelines: Global update 2005. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe 2005.
26. United States Environmental Protection Agency. Integrated Science Assessment for Particulate Matter. 2009. p. 1071.
27. Morakinyo OM, Mokgobu MI, Mukhola MS, Hunter RP. Health Outcomes of Exposure to Biological and Chemical Components of Inhalable and Respirable Particulate Matter. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(6).
28. Valavanidis A, Fiotakis K, Vlachogianni T. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of

- particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2008;26(4):339-62.
29. Kastury F, Smith E, Juhasz AL. A critical review of approaches and limitations of inhalation bioavailability and bioaccessibility of metal(loid)s from ambient particulate matter or dust. *Sci Total Environ.* 2017;574:1054-74.
 30. Huang SK, Zhang Q, Qiu Z, Chung KF. Mechanistic impact of outdoor air pollution on asthma and allergic diseases. *J Thorac Dis.* 2015;7(1):23-33.
 31. Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, et al. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2010;121(21):2331-78.
 32. Heusinkveld HJ, Wahle T, Campbell A, Westerink RH, Tran L, Johnston H, et al. Neurodegenerative and neurological disorders by small inhaled particles. *Neurotoxicology.* 2016;56:94-106.
 33. Nachman RM, Mao G, Zhang X, Hong X, Chen Z, Soria CS, et al. Intrauterine Inflammation and Maternal Exposure to Ambient PM_{2.5} during Preconception and Specific Periods of Pregnancy: The Boston Birth Cohort. *Environ Health Perspect.* 2016;124(10):1608-15.
 34. Nappi F, Barrea L, Di Somma C, Savanelli MC, Muscogiuri G, Orio F, et al. Endocrine Aspects of Environmental "Obesogen" Pollutants. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(8).
 35. Bolton JL, Smith SH, Huff NC, Gilmour MI, Foster WM, Auten RL, et al. Prenatal air pollution exposure induces neuroinflammation and predisposes offspring to weight gain in adulthood in a sex-specific manner. *FASEB J.* 2012;26(11):4743-54.
 36. McConnell R, Gilliland FD, Goran M, Allayee H, Hricko A, Mittelman S. Does near-roadway air pollution contribute to childhood obesity? *Pediatr Obes.* 2016;11(1):1-3.
 37. Sun QH, Wang AX, Jin XM, Natanzon A, Duquaine D, Brook RD, et al. Long-term air pollution exposure and acceleration of atherosclerosis and vascular inflammation in an animal model. *Jama-Journal of the American Medical Association.* 2005;294(23):3003-10.
 38. Wolf K, Popp A, Schneider A, Breitner S, Hampel R, Rathmann W, et al. Association Between Long-Term Exposure to Air Pollution and Biomarkers Related to Insulin Resistance, Subclinical Inflammation and Adipokines. *Diabetes.* 2016.
 39. Fonken LK, Xu X, Weil ZM, Chen G, Sun Q, Rajagopalan S, et al. Air pollution impairs cognition, provokes depressive-like behaviors and alters hippocampal cytokine expression and morphology. *Mol Psychiatry.* 2011;16(10):987-95, 73.

40. Pun VC, Manjourides J, Suh H. Association of Ambient Air Pollution with Depressive and Anxiety Symptoms in Older Adults: Results from the NSHAP Study. *Environ Health Perspect.* 2016.
41. Magnani ND, Marchini T, Tasat DR, Alvarez S, Evelson PA. Lung oxidative metabolism after exposure to ambient particles. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;412(4):667-72.
42. Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, et al. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(12):1610-7.
43. Marchini T, Magnani ND, Paz ML, Vanasco V, Tasat D, González Maglio DH, et al. Time course of systemic oxidative stress and inflammatory response induced by an acute exposure to Residual Oil Fly Ash. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;274(2):274-82.
44. Delfosse VC, Tasat DR, Gioffré AK. In vivo short-term exposure to residual oil fly ash impairs pulmonary innate immune response against environmental mycobacterium infection. *Environ Toxicol.* 2015;30(5):589-96.
45. Carvalho GM, Nagato LK, Fagundes SaS, Dos Santos FB, Calheiros AS, Malm O, et al. Time course of pulmonary burden in mice exposed to residual oil fly ash. *Front Physiol.* 2014;5:366.
46. Watkinson WP, Campen MJ, Costa DL. Cardiac arrhythmia induction after exposure to residual oil fly ash particles in a rodent model of pulmonary hypertension. *Toxicol Sci.* 1998;41(2):209-16.
47. Zanchi AC, Venturini CD, Saiki M, Nascimento Saldiva PH, Tannhauser Barros HM, Rhoden CR. Chronic nasal instillation of residual-oil fly ash (ROFA) induces brain lipid peroxidation and behavioral changes in rats. *Inhal Toxicol.* 2008;20(9):795-800.
48. World Health Organization. Methods for burden of disease attributable to ambient air pollution for the year 2012. Geneva.2014.
49. World Health Organization. Ambient air pollution: a global assessment of exposure and burden of disease. Geneva2016.
50. World Health Organization. Releases country estimates on air pollution exposure and health impact. Geneva.2016.
51. Zheng XY, Ding H, Jiang LN, Chen SW, Zheng JP, Qiu M, et al. Association between Air Pollutants and Asthma Emergency Room Visits and Hospital Admissions in Time Series Studies: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015;10(9):e0138146.

52. Zhang S, Li G, Tian L, Guo Q, Pan X. Short-term exposure to air pollution and morbidity of COPD and asthma in East Asian area: A systematic review and meta-analysis. *Environ Res.* 2016;148:15-23.
53. Zhang L-w, Chen X, Xue X-d, Sun M, Han B, Li C-p, et al. Long-term exposure to high particulate matter pollution and cardiovascular mortality: A 12-year cohort study in four cities in northern China. *Environment International.* 2014;62:41-7.
54. Hsu WH, Hwang SA, Kinney PL, Lin S. Seasonal and temperature modifications of the association between fine particulate air pollution and cardiovascular hospitalization in New York state. *Sci Total Environ.* 2017;578:626-32.
55. Ferreira TM, Forti MC, de Freitas CU, Nascimento FP, Junger WL, Gouveia N. Effects of Particulate Matter and Its Chemical Constituents on Elderly Hospital Admissions Due to Circulatory and Respiratory Diseases. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(10).
56. Wang X, Hai C. Novel insights into redox system and the mechanism of redox regulation. *Mol Biol Rep.* 2016;43(7):607-28.
57. Fraunberger EA, Scola G, Laliberté VL, Duong A, Andreazza AC. Redox Modulations, Antioxidants, and Neuropsychiatric Disorders. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:4729192.
58. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loridas S. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(9):3886-907.
59. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015;97:55-74.
60. Traboulsi H, Guerrina N, Iu M, Maysinger D, Ariya P, Baglolle CJ. Inhaled Pollutants: The Molecular Scene behind Respiratory and Systemic Diseases Associated with Ultrafine Particulate Matter. *Int J Mol Sci.* 2017;18(2).
61. Nathan C, Cunningham-Bussel A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(5):349-61.
62. Marengo B, Nitti M, Furfaro AL, Colla R, Ciucis CD, Marinari UM, et al. Redox Homeostasis and Cellular Antioxidant Systems: Crucial Players in Cancer Growth and Therapy. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:6235641.
63. Lawal AO, Davids LM, Marnewick JL. Diesel exhaust particles and endothelial cells dysfunction: An update. *Toxicol In Vitro.* 2016;32:92-104.
64. Øvrevik J, Refsnes M, Låg M, Holme JA, Schwarze PE. Activation of Proinflammatory Responses in Cells of the Airway Mucosa by Particulate Matter: Oxidant- and Non-Oxidant-Mediated Triggering Mechanisms. *Biomolecules.* 2015;5(3):1399-440.

65. Damiani RM, Piva MO, Petry MR, Saldiva PH, Tavares Duarte de Oliveira A, Rhoden CR. Is cardiac tissue more susceptible than lung to oxidative effects induced by chronic nasotropic instillation of residual oil fly ash (ROFA)? *Toxicol Mech Methods*. 2012;22(7):533-9.
66. Bai Y, Sun Q. Fine particulate matter air pollution and atherosclerosis: Mechanistic insights. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1860(12):2863-8.
67. Adar SD, Sheppard L, Vedal S, Polak JF, Sampson PD, Diez Roux AV, et al. Fine particulate air pollution and the progression of carotid intima-medial thickness: a prospective cohort study from the multi-ethnic study of atherosclerosis and air pollution. *PLoS Med*. 2013;10(4):e1001430.
68. Mokoena ML, Harvey BH, Viljoen F, Ellis SM, Brink CB. Ozone exposure of Flinders Sensitive Line rats is a rodent translational model of neurobiological oxidative stress with relevance for depression and antidepressant response. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015;232(16):2921-38.
69. Cole TB, Coburn J, Dao K, Roqué P, Chang YC, Kalia V, et al. Sex and genetic differences in the effects of acute diesel exhaust exposure on inflammation and oxidative stress in mouse brain. *Toxicology*. 2016.
70. Costa LG, Cole TB, Coburn J, Chang YC, Dao K, Roqué PJ. Neurotoxicity of traffic-related air pollution. *Neurotoxicology*. 2015.
71. Calderón-Garcidueñas L, Leray E, Heydarpour P, Torres-Jardón R, Reis J. Air pollution, a rising environmental risk factor for cognition, neuroinflammation and neurodegeneration: The clinical impact on children and beyond. *Rev Neurol (Paris)*. 2016;172(1):69-80.
72. Calderón-Garcidueñas L, Calderón-Garcidueñas A, Torres-Jardón R, Avila-Ramírez J, Kulesza RJ, Angiulli AD. Air pollution and your brain: what do you need to know right now. *Prim Health Care Res Dev*. 2015;16(4):329-45.
73. Sun Q, Yue P, Deiluiis JA, Lumeng CN, Kampfrath T, Mikolaj MB, et al. Ambient air pollution exaggerates adipose inflammation and insulin resistance in a mouse model of diet-induced obesity. *Circulation*. 2009;119(4):538-46.
74. Eze IC, Schaffner E, Fischer E, Schikowski T, Adam M, Imboden M, et al. Long-term air pollution exposure and diabetes in a population-based Swiss cohort. *Environ Int*. 2014;70:95-105.
75. Besnard P. Lipids and obesity: Also a matter of taste? *Rev Endocr Metab Disord*. 2016;17(2):159-70.
76. Murray SM, Tulloch AJ, Chen EY, Avena NM. Insights revealed by rodent models of sugar binge eating. *CNS Spectr*. 2015;20(6):530-6.

77. Ulrich-Lai YM, Fulton S, Wilson M, Petrovich G, Rinaman L. Stress exposure, food intake and emotional state. *Stress*. 2015;18(4):381-99.
78. la Fleur SE, Luijendijk MC, van der Zwaal EM, Brans MA, Adan RA. The snacking rat as model of human obesity: effects of a free-choice high-fat high-sugar diet on meal patterns. *Int J Obes (Lond)*. 2014;38(5):643-9.
79. Zeeni N, Daher C, Fromentin G, Tome D, Darcel N, Chaumontet C. A cafeteria diet modifies the response to chronic variable stress in rats. *Stress*. 2013;16(2):211-9.
80. da S Benetti C, Silveira PP, Portella AK, Diehl LA, Nunes E, de Oliveira VS, et al. Could preference for palatable foods in neonatally handled rats alter metabolic patterns in adult life? *Pediatr Res*. 2007;62(4):405-11.
81. da Silva Benetti C, Silveira PP, Wyse AT, Scherer EB, Ferreira AG, Dalmaz C, et al. Neonatal environmental intervention alters the vulnerability to the metabolic effects of chronic palatable diet exposure in adulthood. *Nutr Neurosci*. 2014;17(3):127-37.
82. Zeeni N, Dagher-Hamalian C, Dimassi H, Faour WH. Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation. *Inflamm Res*. 2015;64(7):501-12.
83. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(6):1109-17.
84. Teegarden SL, Scott AN, Bale TL. Early life exposure to a high fat diet promotes long-term changes in dietary preferences and central reward signaling. *Neuroscience*. 2009;162(4):924-32.
85. Baillie-Hamilton PF. Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. *J Altern Complement Med*. 2002;8(2):185-92.
86. Zhang G, Sun Q, Liu C. Influencing Factors of Thermogenic Adipose Tissue Activity. *Front Physiol*. 2016;7:29.
87. Thiering E, Heinrich J. Epidemiology of air pollution and diabetes. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2015;26(7):384-94.
88. Ponticiello BG, Capozzella A, Di Giorgio V, Casale T, Giubilati R, Tomei G, et al. Overweight and urban pollution: preliminary results. *Sci Total Environ*. 2015;518-519:61-4.
89. Hoffman JB, Petriello MC, Hennig B. Impact of nutrition on pollutant toxicity: an update with new insights into epigenetic regulation. *Rev Environ Health*. 2017.

90. Allan JL, Johnston M, Campbell N. Unintentional eating. What determines goal-incongruent chocolate consumption? *Appetite*. 2010;54(2):422-5.
91. Tordoff MG. Obesity by choice: the powerful influence of nutrient availability on nutrient intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;282(5):R1536-9.

5 Artigo

O presente artigo foi elaborado em língua estrangeira e está formatado conforme as normas da revista *Inhalation Toxicology* (Fator de impacto 2015: 2.012).

Subchronic *Residual Oil Fly Ash* (ROFA) exposure increases the consumption and preference of highly palatable food, modulates the caloric efficiency and induces lipoperoxidation in hypothalamus.

Caroline Gamalho da Silveira¹, Marlise Di Domenico^{1, 2}, Paulo Hilário Nascimento Saldiva², Cláudia Ramos Rhoden¹

¹Laboratório de Poluição Atmosférica Universidade, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre;

²Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, Universidade de São Paulo, Brasil.

Endereço para correspondência

Cláudia Ramos Rhoden

Laboratório de Poluição Atmosférica

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre,

Rua Sarmiento Leite, 245, CEP 900500-170, Porto Agre, RS, Brasil.

Telefone: (51) 3303 – 9000.

E-mail: crhoden@ufcspa.edu.br

Subchronic *Residual Oil Fly Ash* (ROFA) exposure increases the consumption and preference of highly palatable food, modulates the caloric efficiency and induces lipoperoxidation in hypothalamus.

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of subchronic ROFA exposure on consumption and preference for highly palatable food and its interference on biochemical parameters of lipid profile and oxidative stress in rats. Male Wistar rats (n=44) were divided into four groups: Control (Saline + standard lab chow, n=11), ROFA (ROFA + standard lab chow, n=10), Chocolate (Saline + standard lab chow + chocolate, n=11), ROFA + Chocolate (ROFA + standard lab chow + chocolate, n=11). The animals were exposed to ROFA during 18 weeks concomitantly to palatable food during the last 30 days. Food consumption and preference, caloric intake and caloric efficiency, body mass gain, abdominal fat deposition, glucose and lipid profile were measured. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activity were assessed in lungs, heart, pancreas and hypothalamus. In the first and second weeks, chocolate intake was higher in animals exposed to ROFA ($P=0.006$ and $P=0.010$, respectively) and the standard chow intake was smaller in second and third weeks ($P=0.037$ and $P<0.001$, respectively). The amount of kilocalories derived from chocolate was higher in the animals exposed to ROFA in all weeks ($P<0.001$). The caloric intake and body mass gain were not different among groups ($P=0.515$ and $P=0.434$, respectively). Abdominal fat deposition was lower in animals of the ROFA group when compared to the other groups ($P=0.007$). Triglycerides, total cholesterol and HDL were higher in chocolate exposed rats ($P<0.001$, respectively). There were no significant differences in glucose ($P=0.525$) and LDL levels ($P=0.194$). The TBARS levels were higher in lung and heart of the ROFA group ($P<0.001$, respectively) and in hypothalamus the TBARS levels were higher in ROFA + chocolate group ($P=0.002$). There were no significant differences in SOD and CAT activities. Air pollution exposure increases consumption and preference for highly palatable food and promotes lipid peroxidation in hypothalamus.

Keywords: Air pollution. Particulate matter. ROFA. Oxidative stress. Antioxidants. Highly palatable food.

Introduction

It is increasingly evident that air pollution exposure cause widespread and negative effects on human health and has become a public health problem¹. In this context, particulate matter (PM) exposure is associated with increased cardiovascular and respiratory diseases and some cancers and these effects are related to increased emergency rooms visits, hospitalizations and mortality²⁻¹⁴.

Nowadays, investigate the relationship between air pollution and obesity has captured the interest of researchers, leading us to a broader understanding of the effects of air pollution and the importance of toxicology in the development of obesity. Pollutants are known as obesogenic, substances that influence obesity and weight gain through a variety of potential mechanisms and pathways¹⁵⁻¹⁷. Thus, the abundant consumption of highly palatable foods that lead to an increase in energy and possibly related to obesity is able to accentuate the obesogenic effects of atmospheric pollutants¹⁸. Study has reported that workers exposed to air pollution have an additional risk of developing metabolic diseases in relation to non-exposed workers¹⁹. When measurements of adiposity and biomarkers of oxidative stress were evaluated in police officers exposed to atmospheric pollution, it was verified that the exposed workers in greater measures of adiposity were correlated with increased levels of oxidative stress and decrease of antioxidant defense²⁰.

The role of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress formation in the mechanisms by which PM promotes their toxicity is well described in the literature²¹⁻²⁴. However, the mechanism remains unclear regarding the association to air pollution exposure and metabolic diseases and obesity. It is supposed that air pollution leads to oxidative damage that can be potentiated by an inadequate diet, and have effects on metabolic diseases¹⁹.

The aim of this study was to investigate whether subchronic exposure to residual oil fly ash (ROFA) promotes changes on consumption and food preference with the use of highly palatable food and its interferences on biochemical parameters of lipid profile and oxidative stress in rats.

Materials and methods

Experimental animals

Male Wistar rats, one month of age, weighing 130g on average, obtained from the animal facilities of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre were used in this study. Animals were housed in plastic cages (2-3 animals for cages) and maintained on a 12-h day light cycle. Food and water were provided *ad libitum*. The experimental procedure of this study was approved by the Universidade Federal de Ciências da Saúde Ethical Committee for Research (15/160). All animals received humane care in compliance with the “Principles of Laboratory

Animal Care” formulated by the National Society for Medical Research and the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” prepared by the National Academy of Sciences, USA ²⁵.

Composition of the particles

ROFA was employed as a recognized standard surrogate of ambient PM and has aerodynamic size ≤ 2.5 micrometers. It was obtained from a steel industry placed in Sao Paulo, Brazil. The ROFA sample was suspended in saline with 0,05% of Tween 80 and sonicated during 30 min at 25 °C. The particle elements were analyzed in inductively coupled plasma mass spectrometer and presented the followed composition: Pb, $3.1 \pm 0.09\mu\text{g/g}$; Al, $789.9 \pm 23.28\mu\text{g/g}$; Zn, $20.3 \pm 0.04\mu\text{g/g}$; Cd, $0.04 \pm 0.002\mu\text{g/g}$; Ba, $30.2 \pm 0.31\mu\text{g/g}$; Cu, $9.7 \pm 0.15\mu\text{g/g}$; Ni, $287.0 \pm 10.8\mu\text{g/g}$; As, $4.1 \pm 0.05\mu\text{g/g}$; Se, $7.5 \pm 0.20\mu\text{g/g}$; Mn $48.3 \pm 0.98\mu\text{g/g}$; Sr, $8.4 \pm 0.16\mu\text{g/g}$; Sb, $2.3 \pm 0.57\mu\text{g/g}$; Fe, $20,397.2 \pm 283.3\mu\text{g/g}$; Mg, $372.5 \pm 1.93\mu\text{g/g}$; P, $388.5 \pm 255.8\mu\text{g/g}$; Cr, $7.6 \pm 0.23\mu\text{g/g}$.

Study design

Rats were randomized in ROFA (ROFA; n=22) and Control (saline; n=22) groups. The animals were daily exposed to saline or ROFA by intranasal instillation to $50\mu\text{g}/\mu\text{l}$ solution. The volumes administered varied according to rat age in order to go along lung growth of the animal, 5 days per week during 90 days. Due to the presence of fluid in the mouse nasal cavity, a respiratory reflex is triggered which ensures that the maximum delivered volume reaches the lung ²⁶⁻³⁰. After this period, the animals were distributed into four groups: Control (Saline + standard lab chow, n=11), ROFA (ROFA + standard lab chow, n=10), Chocolate (Saline + standard lab chow + chocolate, n=11), ROFA + Chocolate (ROFA + standard lab chow + chocolate, n=11) and the animals that received chocolate were habituated this food and exposed to highly palatable food during 30 days. The chocolate used in this study was milk chocolate (Nestlé®, Brazil). The animals were weighed once a week. Figure 1 shows the experimental procedures.

Palatable food habituation

During the 91st to 96th experimental days, male rats of Chocolate and ROFA + chocolate group were habituated to the new food ^{31,32}. Briefly, during the first five days the animals were exposed to chocolate under food restriction (receiving about 80% of habitual ingestion of standard lab chow). In the 6th day, rats were tested for palatable food consumption receiving lab chow *ad libitum* in the previous 24 hours. All procedures were performed in the same period and after this experiment the animals received standard lab chow *ad libitum* ^{32,33}.

Long-term exposure to palatable food

The animals were continuously exposed to ROFA once a day and received highly palatable food *ad libitum* in their home cage (2-3 animals for cages) during 30 days after the habituation period. For this, previously weighed amounts of chocolate and/or standard lab chow were offered *ad libitum* and the remaining amount was measured to evaluate the daily consumption and food preference. Food consumption was measured per cage and it was determine the mean consumption per animal. To estimate the preference for chocolate over standard lab chow, the amount of kilocalories derived from chocolate was divided by the total caloric intake^{32,33}. Table 1 describes the nutritional composition of the diets used in the study.

Caloric efficiency

To determine the amount of body mass gained as a result of caloric intake, the body mass gain was divided by the total kilocalories consumed over the experiment period^{32,33}.

Blood collection and organs dissection

Rats were euthanized under 80% food restriction. Euthanasia was conducted in the morning period, by anesthesia with isoflurane 4%, and abdomen was opened for blood collection of caudal vena cava and, after, collection of organs. Blood samples were stored into heparinized and not heparinized tubes for evaluation of glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL) and triglycerides. Plasma and serum was separated and frozen at -20°C until analysis. Major portions of abdominal fat (gonadal and retroperitoneal adipose tissue) were dissected and weighed. Lung, heart, pancreas and hypothalamus were dissected and immediately frozen in liquid nitrogen and kept at – 80°C until analysis.

Biochemical analyses

Biochemical analyses were performed using turbidimetric assay. Glucose was measured by glucose oxidase method (Bioclin®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). Total cholesterol, triglycerides, HDL and LDL were measured with commercial kits (Bioclin®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). All the tests were done in the BS 120 Mindray®.

Oxidative stress parameters

Tissue preparation

Tissue samples were homogenized in 5 volumes (lung), 7 volumes (heart), 9 volumes (hypothalamus) and 11 volumes (pancreas) in 30mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 120mM KCl and protein inhibitors (1µg/mL pepstatin, 1µg/mL aprotinin, 1µg/mL leupeptin, and 0.5mM PMSF) with a Potter-Elvehjem glass homogenizer on ice-cold. The suspension was centrifuged at $600 \times g$ for 10 min at 0–4°C to remove nuclei and cell debris. The pellets were discarded and the supernatants were used as homogenates. Protein concentration were measured by Bradford's method (mg/mL) ³⁴ using bovine serum albumin as standard.

Thiobarbituric acid reactive substances assay

Lipid peroxidation was determined as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) using a fluorometric assay ³⁵. Briefly, homogenates were mixed with 10% (w/v) trichloroacetic acid and centrifuged to precipitate proteins. The supernatants were added to thiobarbituric acid 0.67% (w/v) and incubated for 30 min at 100°C and measured at 535nm. The amount of TBARS was expressed in nmol/mg protein.

Superoxide dismutase activity

The superoxide dismutase (SOD) activity assay is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize ³⁶. The pyrogallol autoxidation is inhibited in presence of SOD, whose activity can be measured using a double-beam spectrophotometer at 420nm. One unit of SOD is defined as the enzyme quantity capable of inhibiting 50% of the reaction. The results were expressed as units per milligram protein (U/mg protein).

Catalase activity

The catalase (CAT) activity was performed according to Aebi (1984) ³⁷. The reaction mixture contained 33mM H₂O₂ in 50mM phosphate buffer (pH 7.0) and lung, heart, hypothalamus and pancreas homogenized. The decomposition of hydrogen peroxide by CAT was determined at 25°C at 240nm for 120 sec. The results were expressed in pmol/mg protein.

Statistical analyses

Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) and standard error (SE). All analyses were performed using Sigma-Plot 12.0 Software and graphs were done in Prisma, version 7. One-way analyses of variance (ANOVA), two-way ANOVA or repeated-measures ANOVA or data on rank were used according with normality Shapiro-Wilk test. Tukey's test was used to compare data among the different groups. The level of significance was set at 5%.

Results

Palatable food habituation

During the chocolate habituation, there was an increase in the consumption of chocolate over time ($P < 0.001$). In ROFA + Chocolate group, chocolate consumption was higher in section test, 6th day, when compared to 1st ($P < 0.001$) and 3rd ($P = 0.001$) habituation days. There was no difference in chocolate intake in Chocolate group over the time ($P > 0.005$). In the section test, there was an increase in chocolate consumption in ROFA + Chocolate group when compared to Chocolate group ($P < 0.001$) (Fig 2). There was no difference among groups in other days of habituation ($P > 0.005$).

Long-term exposure to palatable food

The amount of standard chow consumed was different between the groups ($P < 0.001$) and also over time ($P < 0.001$). Over the time, the consumption of standard chow in the Chocolate group was lower in the third week when compared to first week ($P = 0.016$). In the ROFA + chocolate group the consumption of standard chow was lower in 2nd ($P = 0.005$), 3rd ($P = 0.006$) and 4th ($P = 0.004$) weeks when compared to first week. Regarding to Control group, the consumption was lower in the fourth week when compared to first week ($P = 0.005$) and in the ROFA group the consumption was lower in 2nd ($P < 0.001$), 3rd ($P = 0.024$) and 4th ($P < 0.001$) weeks when compared to 1st week. Related to treatments, it was observed a lower consumption of standard chow in the 2nd ($P = 0.037$), 3rd ($P < 0.001$) and 4th ($P < 0.001$) weeks in ROFA + chocolate group when compared to Chocolate group. In all weeks, it was seen a different standard chow consumption between animals that received chocolate from that did not receive ($P < 0.001$) (Fig 3A).

The chocolate consumption was different over time ($P < 0.001$). In Chocolate group, the chocolate consumption was lower in the 2nd ($P = 0.001$) and 3rd ($P = 0.040$) and 4th ($P = 0.012$) weeks when compared to first week. In ROFA + chocolate group, the chocolate consumption was lower in the 2nd, 3rd and 4th weeks ($P < 0.001$) when compared to 1st week. The ROFA + chocolate group increased chocolate intake when compared to Chocolate group in the 1st ($P = 0.006$) and 2nd ($P = 0.010$) weeks (Fig 3B).

Long-term food preference

There was no significant difference in chocolate preference over the time of experiment ($P = 0.656$). However, there was significant difference among groups ($P < 0.001$). The ROFA + chocolate group showed higher preference to chocolate than Chocolate group in 1st ($P = 0.033$), 2nd

($P < 0.001$) 3rd ($P = 0.008$) and 4th ($P < 0.001$) weeks (Fig 4). The results were expressed in kilocalories (Kcal).

Caloric intake and caloric efficiency

There was no significant difference in caloric intake among the experimental groups ($P = 0.515$) (Fig. 5A). It was observed a significant difference in caloric efficiency between the groups ($P = 0.015$). The Chocolate group shown a higher caloric efficiency than Control group ($P = 0.017$) and ROFA group ($P = 0.031$). There is no significant difference among others groups ($P > 0.05$) (Fig. 5B).

Body mass gain

As shown in Figure 6, there was no significant difference in body mass among experimental groups ($P = 0.434$) however all animals gained mass over the weeks in the experiment ($P < 0.001$). The Chocolate group presented body mass higher in 4th week when compared to 1st ($P < 0.001$), 2nd ($P < 0.001$) and 3rd ($P = 0.003$) weeks. In ROFA + chocolate group, it was observed a higher body mass in the 3rd week when compared to 1st ($P < 0.001$) and 2nd ($P < 0.001$) weeks. Also, the body mass was higher in the 4th week when compared to 1st ($P < 0.001$) and 2nd ($P < 0.001$) weeks.

In Control group the body mass in the 3rd and 4th weeks were higher when compared to 1st and 2nd weeks ($P < 0.001$, respectively). And regarding to ROFA group, it was observed the body mass was higher in 3rd week when compared to 1st ($P = 0.001$) and 2nd ($P = 0.003$) weeks. Besides, the body mass was higher in 4th week when compared to 1st and 2nd ($P < 0.001$, respectively) weeks.

Abdominal fat deposition

Abdominal fat deposition is expressed in relation to the body weight of each rat. As shown in figure 7, it was observed a significant difference in abdominal fat between groups ($P = 0.007$). The ROFA group presented lower abdominal fat deposition when compared to Chocolate ($P = 0.005$) and ROFA + chocolate ($P = 0.044$) groups.

Lipids and glucose levels

The results from biochemical measurements are shown in Table 2. There was no significant difference in glucose levels among treatment groups ($P = 0.525$). The triglycerides levels, it was observed the chocolate increase the levels ($P < 0.001$). The Chocolate group showed higher triglycerides levels than Control and ROFA groups ($P = 0.041$ and $P = 0.046$, respectively)

and the ROFA + chocolate group presented higher triglycerides levels than Control and ROFA groups ($P<0.001$ and $P=0.001$, respectively). Regarding to the levels of total cholesterol there was a significant difference between the groups that received chocolate from those do not received ($P<0.001$). The Chocolate group showed higher total cholesterol levels than Control and ROFA groups ($P<0.001$ and $P=0.011$, respectively). The ROFA + chocolate group also presented higher total cholesterol levels than Control and ROFA groups ($P<0.001$ and $P=0.006$, respectively). The same profile was observed in HDL ($P<0.001$). The Chocolate group showed higher HDL levels than Control and ROFA groups ($P<0.001$ and $P=0.003$, respectively) and also the ROFA + chocolate group presented higher HDL levels than Control and ROFA groups ($P<0.001$, respectively). There was no difference in the LDL levels between the groups ($P=0.194$).

Oxidative stress parameters

The results from oxidative stress parameters are shown in Table 3. There was a significant increased in lipid peroxidation on lung among treatment groups ($P<0.001$). The ROFA group demonstrated an increase in TBARS concentration when compared to Chocolate, ROFA + chocolate and Control groups ($P=0.002$; $P=0.006$ and $P=0.003$, respectively). In heart, also the ROFA group demonstrated an increase in TBARS concentration when compared to Chocolate ($P=0.005$), ROFA + chocolate ($P=0.001$) and Control ($P=0.003$) groups. There was no significant difference in the TBARS concentration in pancreas ($P=0.581$). In hypothalamus, the levels of TBARS were higher in Chocolate group when compared to Control group ($P=0.014$) and the ROFA + chocolate group also presented higher levels of TBARS when compared to Control group ($P=0.010$) and ROFA group ($P=0.046$).

Related to antioxidant enzymes, there was no significant difference in the SOD ($P=0.771$) and CAT ($P=0.898$) activities in lungs, in the SOD ($P=0.746$) and CAT ($P=0.723$) activities in heart, in the SOD ($P=0.980$) and CAT ($P=0.227$) activities in pancreas and also in hypothalamus SOD ($P=0.936$) and CAT ($P=0.693$) activities among treatment groups.

Discussion

The main findings of this study showed that subchronic exposure to ROFA (also known as $PM_{2.5}$) can modulate metabolic effects of subacute exposure to chocolate in adulthood. In addition, the ROFA exposure animals exhibited higher chocolate intake which was higher in first week and minimize over the experiment, but the preference to highly palatable food persists along the weeks. Chocolate consumption also increased the lipid concentrations and the exposure to air

pollution decreased abdominal fat deposition and promoted increased of TBARS in lung, heart and hypothalamus.

Previous reports in the literature shown that long-term exposure to palatable diet in neonatal handled animals increased the chocolate consumption in adulthood in the first day and this consumption decreased over time ^{31,32}. The same profile was observed in our study suggesting an adaptive behavioral. The reduction of the palatable food consumption is expected once it evokes physiological responses which adjust caloric intake over the days when molecular biomarkers related to energy consumption and ingestion are changed and may be involved in countering hypercaloric intake ³⁸. Besides chocolate, the standard chow intake consumption also decreases over time. Eventually, the animals exposed to PM_{2.5} and to highly palatable food reduced the standard chow consumption due the chocolate preference. Therefore, it could be suggested that subchronic PM_{2.5} exposed animals prefer the palatable food although chocolate consumption decrease over time. In the same direction of our findings, Benetti *et al.* (2014) showed chocolate preference tends to decrease over time ³¹. The air pollution may be lead to some biological mechanism related to highly palatable food whereas animals exposed to PM_{2.5} showed higher chocolate preference. Other studies done with cafeteria diet also shown palatable food preference over standard diets ^{39,40}.

The highly palatable food promotes a more attractive taste than standard food and influences the regular homeostatic mechanism that regulates energy balance, possibly activating the brain's reward circuitry. Due acting in this system, the consumption of highly palatable food may be compared to drug addiction, inducing neuroadaptive changes which alters reward thresholds ⁴¹⁻⁴⁴.

Regarding to groups that did not receive chocolate, PM_{2.5} exposure did not interfere in standard chow consumption. So, the air pollution does not interfere in standard chow consumption whether palatable food is not offered. However, the total amount of standard chow consumed by these rats was higher than the animals exposed to standard chow and chocolate. Nevertheless, the caloric intake, which reflects the amount of kilocalories intake, was uniform among groups. We suggest the palatable food is quickly converted into energy and it is needed a lower intake of grams to achieve the energy required. Interestingly, the animals that had access to chocolate reduced the standard chow consumption suggesting a possible compensation effect over calories intake. In general, the rats consume food to meet its energy requirement⁴⁵, resembling human beings.

Studies have demonstrated that exposure to palatable food increase abdominal and retroperitoneal fat deposition without affecting weight gain ^{31,32,46}. Besides, studies have

demonstrated that increased circulating leptin levels by palatable food access are associated with increased fat deposit^{47,48}. In the present study, we verified that chocolate consumption did not modify the abdominal fat deposition. However, the animals that received PM_{2.5} presented decreased abdominal fat. When analyzed ROFA + chocolate group, the PM_{2.5} exposure was not able to decrease the increase of abdominal fat deposition promoted by the highly palatable food. We suggest that consumption of highly palatable food may lead a change in body mass composition. In our study, the Chocolate group presented higher efficiency caloric than groups that did not receive chocolate and the ROFA + chocolate group was not different. Thus, it is suggested that air pollution exposure tends to modulate the caloric efficiency induced by the consumption of chocolate, that is, it has a tendency to decrease the energetic utilization induced by the highly palatable food. Therefore, we suggest the body mass is not a good predictive to evaluate highly palatable food intake once the slight changes in energy efficiency may not be detected through this variable. However, when the caloric efficiency is evaluated, the result of how much of body mass gain was due by caloric intake is more specific.

It is well known that adipose tissue is considered a highly active endocrine and metabolic structure that reacts against the overnutrition. Adipose tissue serves as source of energy-rich fatty acids during periods of negative energy balance, reducing its lipid store and releasing fatty acids to target tissues that require energy. In contrast, the uptake, esterification and storage of fat in adipocytes in the form of triglycerides allow the expansion of adipose tissue which is a beneficial and adaptive response to overnutrition that can prevent the fat deposition in other cell types^{49,50}. Excess fat accumulations is associated with metabolic risk once high levels of free fat acids may trigger the metabolic syndrome consequently promote insulin resistance, increasing triglyceride production and release inflammatory cytokines which change the proinflammatory, prothrombotic and prohypertensive state^{50,51}. The excessive consumption of food with low nutritional value associated to exposure to environmental pollutants is related to an increasing in adiposity. The pollutants which invoke this physiologic effect are known as obesogens and may promote a long-term imbalance in the dynamics of lipid storage or adipose depot adipocyte hyperplasia⁵².

Biochemical measurements indicate that the consumed chocolate increased levels of triglycerides and total cholesterol, and the PM_{2.5} exposure does not influence these lipid levels. The chocolate is characterized as a solid dispersion of cocoa mass which contains sugars, additives, cocoa butter and lecithin that varie depending on the type in which it is presented. Besides these components, the milk chocolate has fat, milk proteins, and lactose in its formulation⁵³. The increase in triglyceride levels was also evidenced in studies that used chocolate in the diet^{31,32}. This increase may be associated to deposition of abdominal fat since the energy excess from

lipolysis of the abdominal adipose tissue releases to liver large amounts of free fatty acids and this stimulates liver to produce triglycerides ⁵⁰. Taken together, the hypercholesterolemic effect evidenced in our study may be linked to the presence of saturated fat in the milk chocolate consumed. Interestingly, the chocolate consumption increased the HDL cholesterol levels and there was no difference in LDL cholesterol levels. In our study, we suggested the HDL differences are related to the fact the chocolate should have at least 25% of cocoa in its formulation ⁵⁴. Previous studies reported that the dark chocolate consumption increase the HDL cholesterol levels ^{55,56}. More studies have to be conducted to help understand the relation among milk chocolate consumption and changes in lipid parameters once the studies in the literature are controversial ^{31,32,57}. Despite the differences in lipid levels, the blood glucose levels did not was affected to chocolate intake.

Regarding to oxidative stress parameters, PM_{2.5} exposure induces lipid peroxidation in lung and heart and we did not check changes in the activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT. Wang *et al.* (2017) shown that intratracheal instillation to PM_{2.5} induced pulmonary toxicity by disrupted oxidant and antioxidant balance ⁵⁸. Acute exposure to ROFA by intranasal instillation also induce oxidative damage in the lung ⁵⁹. The PM that accumulates due to long-term exposure is associated to inflammatory disease as chronic obstructive pulmonary disease and epigenetic changes that may lead to cancer ⁶⁰. The heart is susceptible to the adverse effects due the PM exposure. In a previous study we showed subchronic exposure to ROFA by intranasal instillation cause lipid peroxidation in heart ²⁹ and the oxidative stress was induced by autonomic stimulation, production of reactive oxygen species and release of inflammatory mediators that access the systemic circulation or directly by heart interaction ^{29,61}. The short and long-term PM exposure is associated to ischemia, myocardial infarction, heart failure, arrhythmias and stroke ^{7,62,63}. In the other hand, chocolate act to prevent the lipid peroxidation in the lung and heart. The chocolate is known as a food that has polyphenols, mainly flavonoids. The cocoa is rich in three main types of flavonoids: procyanidins, catechins, and epicatechins, which has antioxidant activity acting in free radicals deletion and metals chelation ^{54,64,65}. Although the manufacture and manipulation of chocolate causes an 80% reduction in flavonoids, a smaller amount of these compounds are still found in milk chocolate ^{54,65}. According to Waterhouse *et al.* (1996), approximately 5.0mg of polyphenols can be found in one gram of milk chocolate ⁶⁶. Thus, in our study we suggest that daily chocolate intake may trigger protection against oxidative damage in lung and heart by others antioxidant pathways, such as the glutathione reductase pathways.

The PM_{2.5} exposure associated to chocolate intake promoted increase in MDA levels in hypothalamus and there was no difference in SOD and CAT activities. We have demonstrated in

previous studies that PM exposure causes lipid peroxidation in cortex, striatum and cerebellum^{27,28,67}. The brain uses about 20% of oxygen available by body which results susceptibility to oxidative stress⁶⁸. The chronic exposure to fat diet induced changes in hypothalamic regulation and the development of overnutrition diseases, as well as, increased the oxidative stress in the hypothalamus⁶⁹. Benani *et al.* (2007) found that the increase in triglyceride promotes an increase in the reactive oxygen species in the hypothalamus due to an increase in mitochondrial activity related to fat overload⁷⁰. Taken together, we suggest that chocolate consumption, by promoting fat gain and lipid changes, associated with PM_{2.5} exposure act on the hypothalamus increasing the reactive oxygen species and consequent oxidative conditions and these disorders could exert changes in brain reward system.

Our study has some limitations. Ideally if the animals were exposed to environmental air rather than to intranasal suspensions of ROFA more precise outcomes determined by the ambient air could be found. Furthermore, we exposed the animals to a high palatable sort of food – the chocolate. Using cafeteria diets may be more similar to human diets and the results would associate to real world. Also we did not measure levels of inflammatory cytokines and leptin levels that could have been modified by exposure to ROFA and chocolate, respectively.

Conclusion

The present study demonstrated that subchronic exposure to ROFA increases the consumption and food preference of chocolate when a choice is offered between standard food and palatable food. Furthermore, air pollution inclines to modulate caloric efficiency and induce oxidative stress in the lung and heart, and when associated with chocolate consumption, also promotes lipoperoxidation in the hypothalamus. The ROFA exposure decreases the abdominal fat deposition. High concentrations of total cholesterol and triglycerides were related just with palatable food consumption without influence of the air pollution exposure. These results may suggest exposure to air pollution associated with the consumption of highly palatable food rich in fat and sugar are a risk for the beginning of a variety metabolic modifications that can be harmful to health. Our study highlights the need for reduce or even prevent the air pollution exposure to protect from the adverse health effects.

Acknowledgments

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. This work was supported by Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Brazil. Dr. C.R. Rhoden and Dr.

P.H.N. Saldiva are supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq.

References

1. World Health Organization. Air quality guidelines: Global update 2005. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe 2005.
2. Mannucci PM, Harari S, Martinelli I, Franchini M. Effects on health of air pollution: a narrative review. *Internal and Emergency Medicine* 2015;10(6):657-662.
3. Akimoto H. Global air quality and pollution. *Science* 2003;302(5651):1716-1719.
4. Xu Q, Wang S, Guo Y, Wang C, Huang F, Li X, Gao Q, Wu L, Tao L, Guo J and others. Acute exposure to fine particulate matter and cardiovascular hospital emergency room visits in Beijing, China. *Environ Pollut* 2017;220(Pt A):317-327.
5. Vieira JL, Macedo FY, Benjo AM, Guimarães GV, Contreras JP, Bocchi EA. Systemic effects of controlled exposure to diesel exhaust: a meta-analysis from randomized controlled trials. *Ann Med* 2017;49(2):165-175.
6. Brunekreef B, Hoffmann B. Air pollution and heart disease. *Lancet* 2016;388(10045):640-2.
7. Brook RD. Cardiovascular effects of air pollution. *Clinical Science* 2008;115(5-6):175-187.
8. Gehring U, Wijga AH, Hoek G, Bellander T, Berdel D, Brüske I, Fuertes E, Gruzieva O, Heinrich J, Hoffmann B and others. Exposure to air pollution and development of asthma and rhinoconjunctivitis throughout childhood and adolescence: a population-based birth cohort study. *Lancet Respir Med* 2015;3(12):933-42.
9. Guan WJ, Zheng XY, Chung KF, Zhong NS. Impact of air pollution on the burden of chronic respiratory diseases in China: time for urgent action. *Lancet* 2016;388(10054):1939-1951.
10. Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Baan R, Mattock H, Straif K and others. The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol* 2013;14(13):1262-3.
11. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, Hoffmann B, Fischer P, Nieuwenhuijsen MJ, Brunekreef B and others. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol* 2013;14(9):813-22.
12. Falcon-Rodriguez CI, Osornio-Vargas AR, Sada-Ovalle I, Segura-Medina P. Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases. *Front Immunol* 2016;7:3.

13. Zheng XY, Ding H, Jiang LN, Chen SW, Zheng JP, Qiu M, Zhou YX, Chen Q, Guan WJ. Association between Air Pollutants and Asthma Emergency Room Visits and Hospital Admissions in Time Series Studies: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2015;10(9):e0138146.
14. Rückerl R, Schneider A, Breitner S, Cyrus J, Peters A. Health effects of particulate air pollution: A review of epidemiological evidence. *Inhal Toxicol* 2011;23(10):555-92.
15. Decherf S, Demeneix BA. The obesogen hypothesis: a shift of focus from the periphery to the hypothalamus. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2011;14(5-7):423-48.
16. Thayer KA, Heindel JJ, Bucher JR, Gallo MA. Role of environmental chemicals in diabetes and obesity: a National Toxicology Program workshop review. *Environ Health Perspect* 2012;120(6):779-89.
17. Dangi-Garimella S. Environmental pollutants: a risk factor for obesity and diabetes. *Am J Manag Care* 2014;20(10 Spec No):E8.
18. Hoffman JB, Petriello MC, Hennig B. Impact of nutrition on pollutant toxicity: an update with new insights into epigenetic regulation. *Rev Environ Health* 2017.
19. Ponticiello BG, Capozzella A, Di Giorgio V, Casale T, Giubilati R, Tomei G, Tomei F, Rosati MV, Sancini A. Overweight and urban pollution: preliminary results. *Sci Total Environ* 2015;518-519:61-4.
20. Charles LE, Burchfiel CM, Violanti JM, Fekedulegn D, Slaven JE, Browne RW, Hartley TA, Andrew ME. Adiposity measures and oxidative stress among police officers. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16(11):2489-97.
21. Øvrevik J, Refsnes M, Låg M, Holme JA, Schwarze PE. Activation of Proinflammatory Responses in Cells of the Airway Mucosa by Particulate Matter: Oxidant- and Non-Oxidant-Mediated Triggering Mechanisms. *Biomolecules* 2015;5(3):1399-440.
22. Møller P, Jacobsen NR, Folkmann JK, Danielsen PH, Mikkelsen L, Hemmingsen JG, Vesterdal LK, Forchhammer L, Wallin H, Loft S. Role of oxidative damage in toxicity of particulates. *Free Radic Res* 2010;44(1):1-46.
23. Mazzoli-Rocha F, Fernandes S, Einicker-Lamas M, Zin WA. Roles of oxidative stress in signaling and inflammation induced by particulate matter. *Cell Biol Toxicol* 2010;26(5):481-98.
24. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loridas S. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *Int J Environ Res Public Health* 2013;10(9):3886-907.

25. Sciences. NAO. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington 2011.
26. Medeiros N, Rivero DH, Kasahara DI, Saiki M, Godleski JJ, Koutrakis P, Capelozzi VL, Saldiva PH, Antonangelo L. Acute pulmonary and hematological effects of two types of particle surrogates are influenced by their elemental composition. *Environ Res* 2004;95(1):62-70.
27. Zanchi AC, Saiki M, Saldiva PH, Barros HM, Rhoden CR. Hippocampus lipid peroxidation induced by residual oil fly ash intranasal instillation versus habituation to the open field. *Inhal Toxicol* 2010;22(1):84-8.
28. Zanchi AC, Venturini CD, Saiki M, Nascimento Saldiva PH, Tannhauser Barros HM, Rhoden CR. Chronic nasal instillation of residual-oil fly ash (ROFA) induces brain lipid peroxidation and behavioral changes in rats. *Inhal Toxicol* 2008;20(9):795-800.
29. Damiani RM, Piva MO, Petry MR, Saldiva PH, Tavares Duarte de Oliveira A, Rhoden CR. Is cardiac tissue more susceptible than lung to oxidative effects induced by chronic nasotropic instillation of residual oil fly ash (ROFA)? *Toxicol Mech Methods* 2012;22(7):533-9.
30. Southam DS, Dolovich M, O'Byrne PM, Inman MD. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282(4):L833-9.
31. da Silva Benetti C, Silveira PP, Wyse AT, Scherer EB, Ferreira AG, Dalmaz C, Goldani MZ. Neonatal environmental intervention alters the vulnerability to the metabolic effects of chronic palatable diet exposure in adulthood. *Nutr Neurosci* 2014;17(3):127-37.
32. da S Benetti C, Silveira PP, Portella AK, Diehl LA, Nunes E, de Oliveira VS, Dalmaz C, Goldani MZ. Could preference for palatable foods in neonatally handled rats alter metabolic patterns in adult life? *Pediatr Res* 2007;62(4):405-11.
33. da S Benetti C, Silveira PP, Matté C, Stefanello FM, Leite MC, Gonçalves CA, Wyse AT, Dalmaz C, Goldani MZ. Effects of a chronic exposure to a highly palatable diet and its withdrawal, in adulthood, on cerebral Na⁺,K⁺-ATPase and plasma S100B in neonatally handled rats. *Int J Dev Neurosci* 2010;28(2):153-9.
34. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
35. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990;186:407-21.

36. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1974;47(3):469-74.
37. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
38. Archer ZA, Rayner DV, Duncan JS, Bell LM, Mercer JG. Introduction of a high-energy diet acutely up-regulates hypothalamic cocaine and amphetamine-regulated transcript, Mc4R and brown adipose tissue uncoupling protein-1 gene expression in male Sprague-Dawley rats. *J Neuroendocrinol* 2005;17(1):10-7.
39. Teegarden SL, Scott AN, Bale TL. Early life exposure to a high fat diet promotes long-term changes in dietary preferences and central reward signaling. *Neuroscience* 2009;162(4):924-32.
40. Zeeni N, Dagher-Hamalian C, Dimassi H, Faour WH. Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation. *Inflamm Res* 2015;64(7):501-12.
41. Leigh SJ, Morris MJ. The role of reward circuitry and food addiction in the obesity epidemic: An update. *Biol Psychol* 2016.
42. de Macedo IC, de Freitas JS, da Silva Torres IL. The Influence of Palatable Diets in Reward System Activation: A Mini Review. *Adv Pharmacol Sci* 2016;2016:7238679.
43. Erlanson-Albertsson C. How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;97(2):61-73.
44. Berthoud HR. The neurobiology of food intake in an obesogenic environment. *Proc Nutr Soc* 2012;71(4):478-87.
45. Nutrition NRCUSoLA. Nutrient Requirements of Laboratory Animals : Fourth Revised Edition , 1995 . Washington (DC): National Academies Press (US)1995.
46. Kim JY, Kim D, Park K, Lee JH, Jahng JW. Highly palatable food access during adolescence increased anxiety-/depression-like behaviors in male, but not in female, rats. *Nutr Neurosci* 2017:1-9.
47. Foster MT, Warne JP, Ginsberg AB, Horneman HF, Pecoraro NC, Akana SF, Dallman MF. Palatable foods, stress, and energy stores sculpt corticotropin-releasing factor, adrenocorticotropin, and corticosterone concentrations after restraint. *Endocrinology* 2009;150(5):2325-33.
48. Fleur SEI, Houshyar H, Roy M, Dallman MF. Choice of Lard, But Not Total Lard Calories, Damps Adrenocorticotropin Responses to Restraint. *Endocrinology* 2005. p 2193–2199.
49. Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE. The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol* 2015;208(5):501-12.

50. Ebbert JO, Jensen MD. Fat depots, free fatty acids, and dyslipidemia. *Nutrients* 2013;5(2):498-508.
51. Després JP, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, Rodés-Cabau J, Bertrand OF, Poirier P. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(6):1039-49.
52. Grün F. Obesogens. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010;17(5):453-9.
53. da Silva Medeiros N, Koslowsky Marder R, Farias Wohlenberg M, Funchal C, Dani C. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Types of Chocolate, Milk, Semisweet, Dark, and Soy, in Cerebral Cortex, Hippocampus, and Cerebellum of Wistar Rats. *Biochem Res Int* 2015;2015:294659.
54. Wollgast J, Anklaam E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. Volume 33. *Food Research International* 2000. p 423-447.
55. Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, Rissanen TH, Virtanen JK, Kaikkonen J, Nyyssönen K, Salonen JT. Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. *Free Radic Biol Med* 2004;37(9):1351-9.
56. Mellor DD, Sathyapalan T, Kilpatrick ES, Beckett S, Atkin SL. High-cocoa polyphenol-rich chocolate improves HDL cholesterol in Type 2 diabetes patients. *Diabet Med* 2010;27(11):1318-21.
57. Tokede OA, Gaziano JM, Djoussé L. Effects of cocoa products/dark chocolate on serum lipids: a meta-analysis. *Eur J Clin Nutr* 2011;65(8):879-86.
58. Wang X, Jiang S, Liu Y, Du X, Zhang W, Zhang J, Shen H. Comprehensive pulmonary metabolome responses to intratracheal instillation of airborne fine particulate matter in rats. *Sci Total Environ* 2017;592:41-50.
59. Magnani ND, Marchini T, Tasat DR, Alvarez S, Evelson PA. Lung oxidative metabolism after exposure to ambient particles. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;412(4):667-72.
60. Traboulsi H, Guerrina N, Iu M, Maysinger D, Ariya P, Bagloli CJ. Inhaled Pollutants: The Molecular Scene behind Respiratory and Systemic Diseases Associated with Ultrafine Particulate Matter. *Int J Mol Sci* 2017;18(2).
61. Rhoden CR, Wellenius GA, Ghelfi E, Lawrence J, González-Flecha B. PM-induced cardiac oxidative stress and dysfunction are mediated by autonomic stimulation. *Biochim Biophys Acta* 2005;1725(3):305-13.
62. Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA, III, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, Holguin F, Hong Y, Luepker RV, Mittleman MA and others. Particulate Matter Air

Pollution and Cardiovascular Disease An Update to the Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 2010;121(21):2331-2378.

63. Fiordelisi A, Piscitelli P, Trimarco B, Coscioni E, Iaccarino G, Sorriento D. The mechanisms of air pollution and particulate matter in cardiovascular diseases. *Heart Fail Rev* 2017.
64. Arts IC, Hollman PC, Kromhout D. Chocolate as a source of tea flavonoids. *Lancet* 1999;354(9177):488.
65. Wollgast J, Anklam E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? Volume 33. *Food Research International* 2000. p 449-459.
66. Waterhouse AL, Shirley JR, Donovan JL. Antioxidants in chocolate. *Lancet* 1996;348(9030):834.
67. Zanchi AC, Fagundes LS, Barbosa F, Bernardi R, Rhoden CR, Saldiva PH, do Valle AC. Pre and post-natal exposure to ambient level of air pollution impairs memory of rats: the role of oxidative stress. *Inhal Toxicol* 2010;22(11):910-8.
68. Williams LM. Hypothalamic dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc* 2012;71(4):521-33.
69. Viggiano E, Mollica MP, Lionetti L, Cavaliere G, Trinchese G, De Filippo C, Chieffi S, Gaita M, Barletta A, De Luca B and others. Effects of an High-Fat Diet Enriched in Lard or in Fish Oil on the Hypothalamic Amp-Activated Protein Kinase and Inflammatory Mediators. *Front Cell Neurosci* 2016;10:150.
70. Benani A, Troy S, Carmona MC, Fioramonti X, Lorsignol A, Leloup C, Casteilla L, Pénicaud L. Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake. *Diabetes* 2007;56(1):152-60.

Tables and figures

Table 1. Macronutrient composition of the diets per 100g of food.

	Kcal	CHO (g)	Protein (g)	Fat (g)
Standard chow	470	13.8	72.1	14.0
Chocolate	544	56.0	7.2	32.4

CHO, carbohydrates.

Table 2. Glucose and lipid levels of rats exposed to ROFA and highly palatable food.

	Control (n=11)	ROFA (n=10)	Chocolate (n=11)	ROFA+chocolate (n=11)
Glucose (mg/dL)	179.72 ± 28.3	206.80 ± 57.8	196.18 ± 33.7	203.73 ± 56.4
Triglycerides (mg/dL)*	110.00 ± 29.2 ^a	109.40 ± 47.1 ^a	178.91 ± 74.4 ^b	215.27 ± 70.1 ^b
Cholesterol total (mg/dL)*	58.18 ± 10.5 ^a	62.90 ± 7.6 ^a	76.45 ± 9.4 ^b	77.27 ± 9.7 ^b
HDL (mg/dL)*	26.18 ± 4.0 ^a	29.20 ± 4.5 ^a	35.18 ± 3.1 ^b	36.55 ± 2.9 ^b
LDL (mg/dL)	10.0 ± 6.9	13.4 ± 8.0	9.73 ± 5.3	7.36 ± 4.3

HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein. Data are show as mean ± SD; One-Way ANOVA, followed by Tukey's test. .^aSignificant difference. ^b Different compared to ^a (P<0.001).

Table 3. Oxidative stress parameters of rats exposed to ROFA and highly palatable food.

	Control (n=11)	ROFA (n=10)	Chocolate (n=11)	ROFA + chocolate (n=11)
Lung				
TBARS (nmol/mg protein) *	69.07 ± 25.05 ^a	129.70 ± 52.13 ^b	64.62 ± 20.186 ^a	74.31 ± 27.30 ^a
SOD (U/mg protein)	2.35 ± 0.82	2.63 ± 0.97	2.39 ± 0.71	2.64 ± 0.84
CAT (pmol/mg protein)	97.20 ± 32.89	104.40 ± 15.74	102.74 ± 15.31	101.34 ± 21.67
Heart				
TBARS (nmol/mg protein) *	138.31 ± 37.06 ^a	284.61 ± 133.49 ^b	153.16 ± 37.58 ^a	135.26 ± 41.61 ^a
SOD (U/mg protein)	2.13 ± 0.57	1.95 ± 0.56	2.185 ± 0.51	1.97 ± 0.42
CAT (pmol/mg protein)	69.83 ± 12.25	70.42 ± 8.30	65.96 ± 11.38	70.05 ± 8.5
Pancreas				
TBARS (nmol/mg protein)	102.59 ± 18.09	110.69 ± 29.38	100.60 ± 29.40	115.58 ± 30.07
SOD (U/mg protein)	2.96 ± 0.68	2.84 ± 0.79	2.90 ± 0.99	2.97 ± 0.76
CAT (pmol/mg protein)	25.63 ± 4.51	22.78 ± 9.19	27.52 ± 5.94	29.60 ± 9.77
Hypothalamus				
TBARS (nmol/mg protein) *	697.19 ± 135.52 ^a	754.64 ± 136.95 ^d	980.46 ± 273.69 ^b	1001.50 ± 150.94 ^c
SOD (U/mg protein)	8.71 ± 3.02	9.30 ± 3.00	8.90 ± 2.43	8.59 ± 2.33
CAT (pmol/mg protein)	25.52 ± 5.46	25.80 ± 3.30	28.18 ± 9.03	25.27 ± 6.08

MDA: Malondialdehyde; SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase. Data are show as mean ± SD; One-way ANOVA followed by Tukey's test. *Significant difference. ^b different compared to ^a (P<0.001). ^c different compared to ^a and ^d (P=0.002).

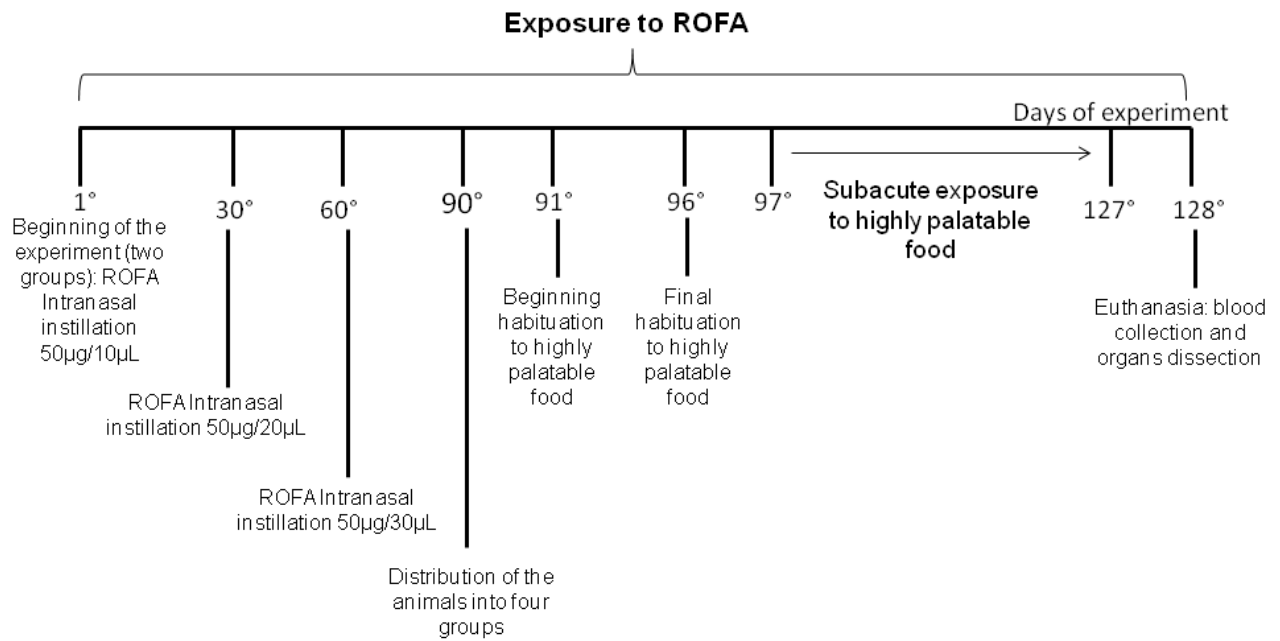
Figure 1

Figure 2

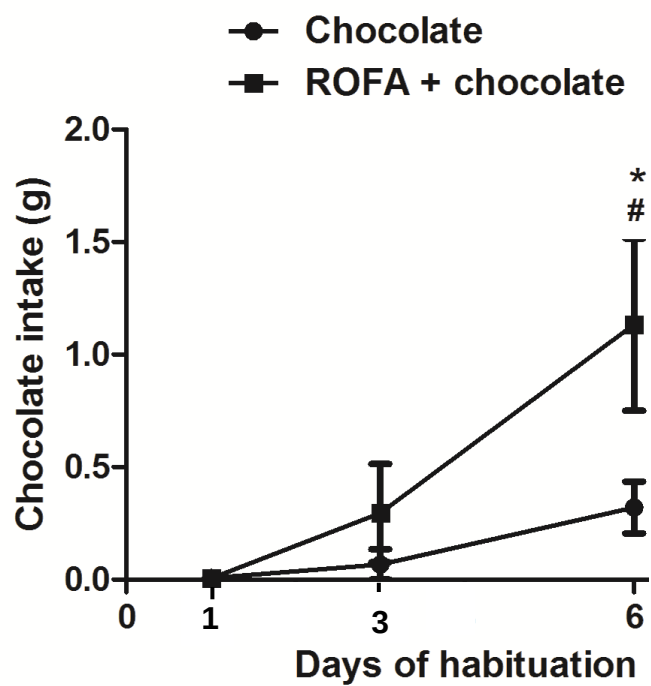
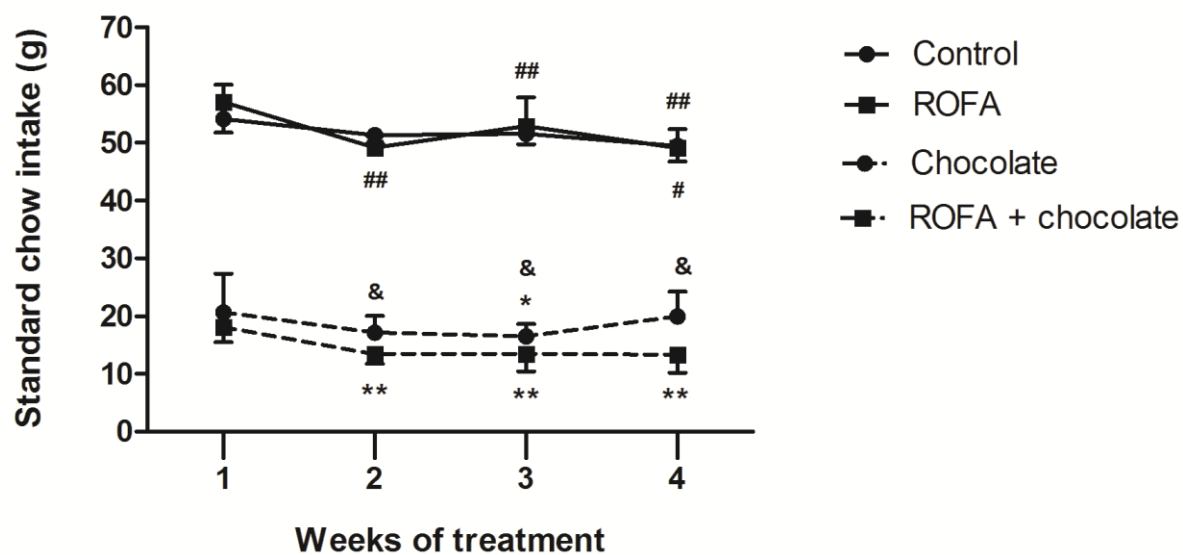


Figure 3

A)



B)

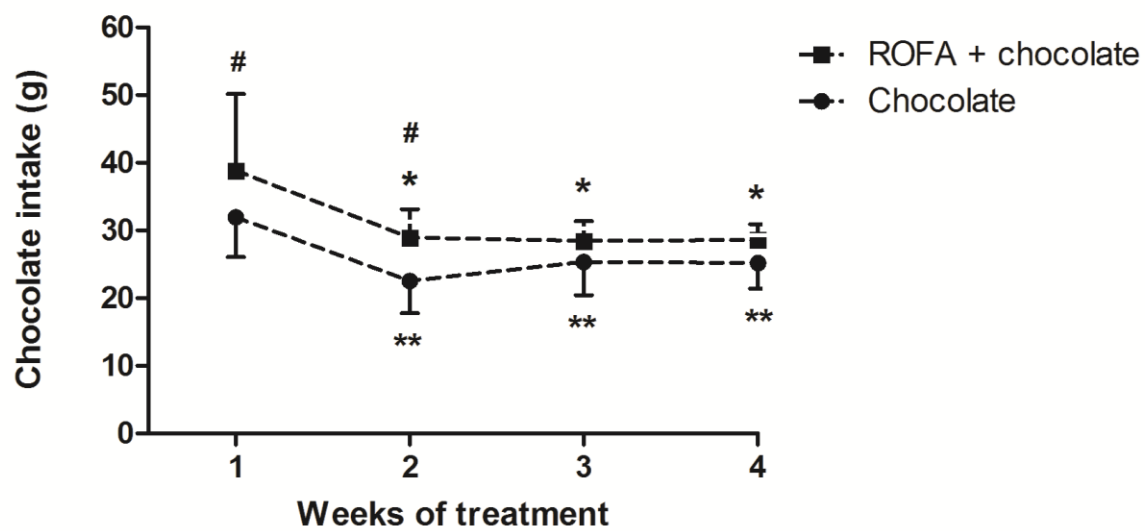


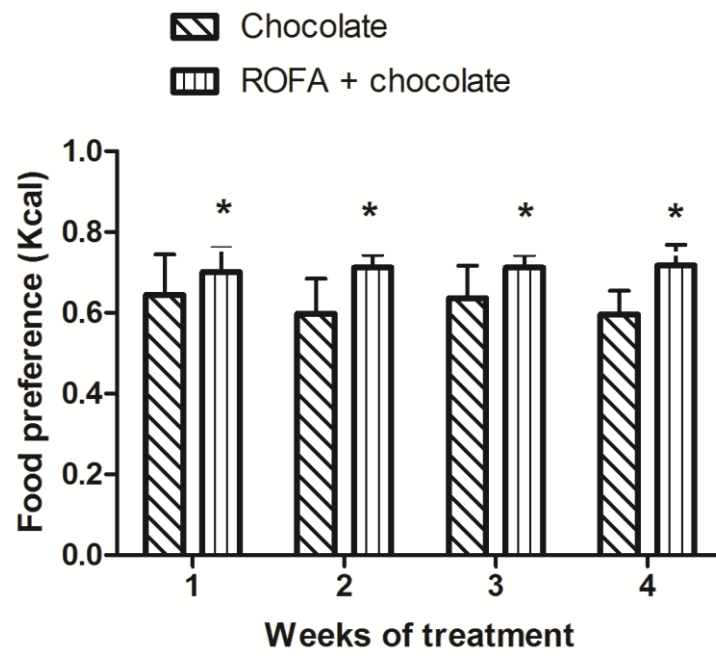
Figure 4

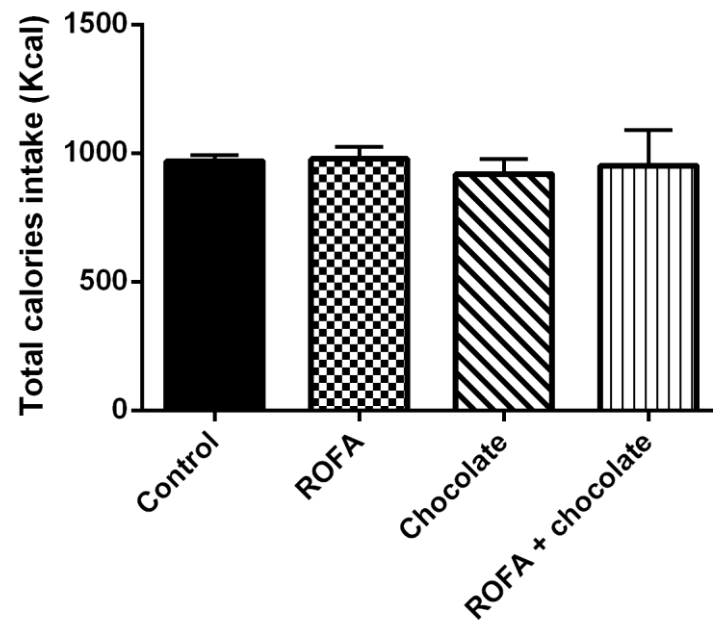
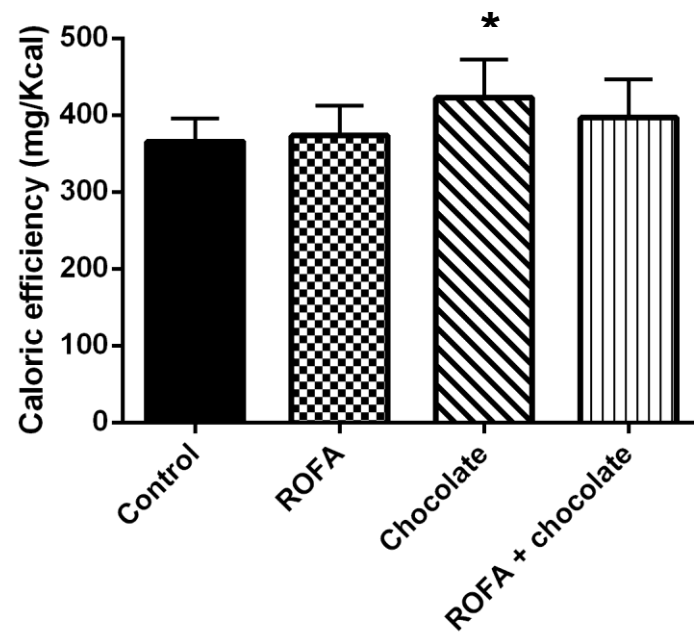
Figure 5**A)****B)**

Figure 6

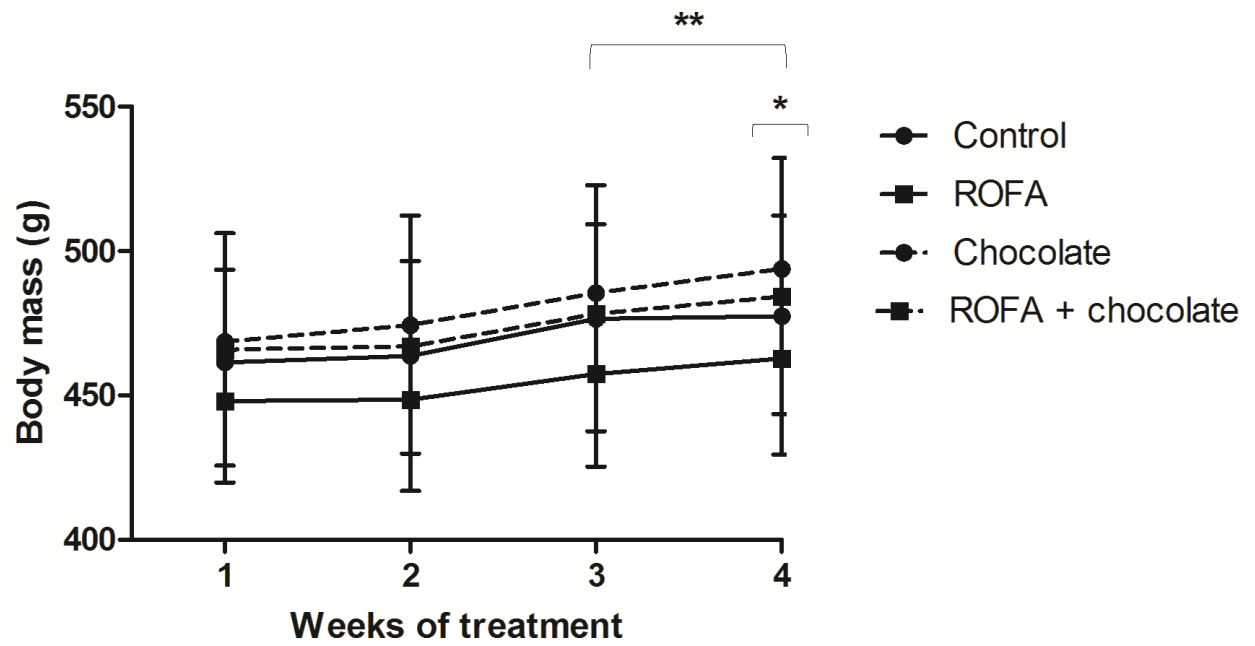


Figure 7

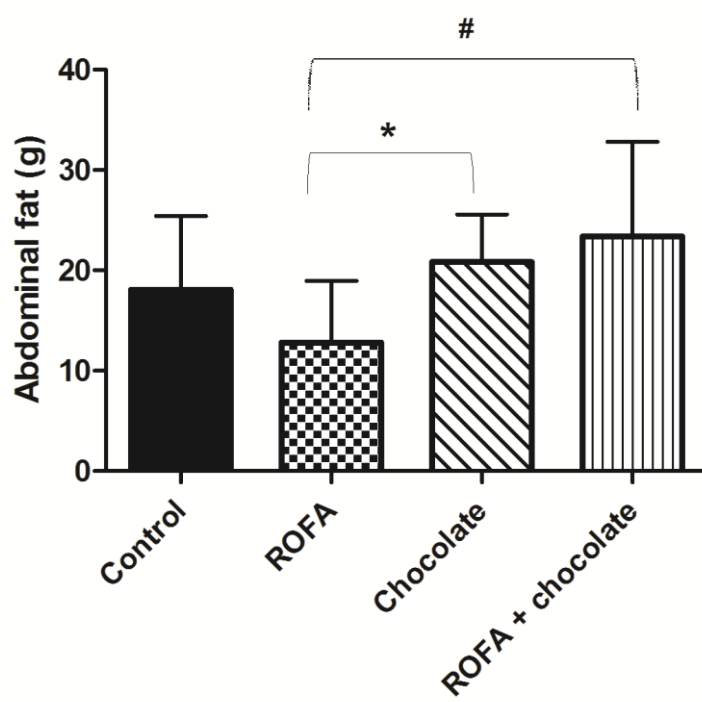


Figure legends

Figure 1. Experimental procedure.

Figure 2. Chocolate intake of rats exposed to ROFA in habituation period. # 6th vs. 1st ($P<0.001$) and 3rd ($P=0.001$) days in ROFA + chocolate group. * ROFA + chocolate group vs. Chocolate group in test session ($P<0.001$). Two-way ANOVA repeated-measures followed by Tukey's test. Data are expressed as mean $\pm$ SE.

Figure 3. Standard lab chow and chocolate consumption of rats exposed to ROFA. A) Standard lab chow intake. * 3rd week vs. 1st week ($P=0.016$) in Chocolate group. **2nd ($P=0.005$), 3rd ($P=0.006$) and 4th ($P=0.004$) weeks vs. 1st week in ROFA + chocolate group. # 4th week vs. 1st week ($P=0.005$) in Control group. ## 2nd ($P<0.001$), 3rd ($P=0.024$) and 4th ($P<0.001$) weeks vs. 1st week in ROFA group. & 2nd ($P=0.037$), 3rd ($P<0.001$) and 4th ($P<0.001$) weeks in chocolate group vs. ROFA + chocolate group B) Chocolate intake. ** 2nd ($P=0.001$) and 3rd ($P=0.040$) and 4th ($P=0.012$) weeks vs. 1st week in Chocolate group. * 2nd, 3rd and 4th ($P<0.001$) weeks vs. 1st week in ROFA + chocolate group. # ROFA + chocolate vs. Chocolate group in 1st ($P=0.006$) and 2nd ($P=0.010$) weeks. Two way ANOVA repeated-measures followed by Tukey's test. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

Figure 4. Palatable food preference of rats exposed to ROFA. * ROFA + chocolate vs. Chocolate group in 1st ($P=0.033$), 2nd ($P<0.001$) 3rd ($P=0.008$) and 4th ($P<0.001$) weeks. Two-way ANOVA followed by Tukey's test. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

Figure 5. Caloric consumption and caloric efficiency of rats exposed to ROFA and highly palatable food. A) Total calories intake. One-Way ANOVA. $P=0.515$. B) Caloric efficiency. * Chocolate vs. Control ($P=0.017$) and vs. ROFA ($P=0.032$) groups. One-Way ANOVA followed by Tuckey's test. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

Figure 6. Body mass gain in 30 days period of chocolate or standard lab chow consumption. *4th week vs. 1st ($P<0.001$), 2nd ($P<0.001$) and 3rd ($P=0.003$) weeks in Chocolate group. **3rd and 4th weeks vs. 1st and 2nd weeks ($P<0.001$, respectively) in ROFA + chocolate group, vs. 1st and 2nd weeks ($P<0.001$, respectively) in Control group and vs. 1st and 2nd weeks ($P=0.001$, $P=0.003$ and

P<0.001, respectively) in ROFA group. Two-Way ANOVA repeated-measures followed by Tukey's test. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

Figure 7. Abdominal fat deposition of rats exposed to ROFA and highly palatable food. * ROFA vs. Chocolate (P=0.005) group; # ROFA vs. ROFA + chocolate (P=0.044) group. One-Way ANOVA followed by Tukey's test. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

6 Conclusão

No presente estudo concluímos que:

- A exposição ao ROFA promoveu aumento do consumo de alimento altamente palatável;
- A exposição ao ROFA promoveu aumento da preferência alimentar por alimento altamente palatável;
- A exposição ao ROFA não modificou a ingestão calórica, mas inclinou-se a modular a eficiência calórica;
- A exposição ao ROFA não alterou a variação de massa corporal;
- A exposição ao ROFA reduziu a deposição de gordura abdominal;
- A exposição ao ROFA não alterou os níveis de glicose e do perfil lipídico. As alterações no Colesterol total, colesterol - HDL e triglicerídeos foram promovidas somente pela exposição ao alimento altamente palatável;
- A exposição ao ROFA promoveu lipoperoxidação no pulmão e coração, e, quando associado ao alimento altamente palatável, promoveu lipoperoxidação no hipotálamo;
- A exposição ao ROFA não modificou a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT.

Sugerimos então, que a poluição do ar associada ao consumo de alimentos altamente palatáveis, pode ser um risco para uma variedade de modificações metabólicas que são prejudiciais à saúde. Nosso estudo destaca a necessidade de reduzir ou mesmo evitar a exposição à poluição do ar para proteger dos efeitos adversos à saúde.

7 Anexos

7.1 Normas da revista

Instructions for authors

Thank you for choosing to submit your paper to us. These instructions will ensure we have everything required so your paper can move through peer review, production and publication smoothly. Please take the time to read and follow them as closely as possible, as doing so will ensure your paper matches the journal's requirements.



SCHOLARONE MANUSCRIPTS™

This journal uses ScholarOne Manuscripts (previously Manuscript Central) to peer review manuscript submissions. Please read the [guide for ScholarOne authors](#) before making a submission. Complete guidelines for preparing and submitting your manuscript to this journal are provided below.

About the journal

Inhalation Toxicology is an international, peer reviewed journal, publishing high-quality, original research. Please see the journal's [Aims & Scope](#) for information about its focus and peer-review policy.

Please note that this journal only publishes manuscripts in English.

This journal accepts the following article types: original papers, reviews, measurement technology, modelling/symmetry and letters to the Editor.

Peer review

Taylor & Francis is committed to peer-review integrity and upholding the highest standards of review. Once your paper has been assessed for suitability by the editor, it will then be single blind peer-reviewed by independent, anonymous expert referees. Find out more about [what to expect during peer review](#) and read our guidance on [publishing ethics](#).

Preparing your paper

All authors submitting to medicine, biomedicine, health sciences, allied and public health journals should conform to the [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](#), prepared by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE).

Structure

Your paper should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text: introduction, methods, results, discussion, conclusion; acknowledgments; declaration of interest statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list).

Word count

Please include a word count for your paper. A typical paper for this journal should not exceed 12000 words; inclusive of tables, references, figure captions.

Style guidelines

Taylor & Francis quick layout guide

Please follow any specific Instructions for Authors provided by the Editor of the journal, which are available on the journal pages at www.tandfonline.com. Please also see our guidance on [putting your article together](#), [defining authorship](#) and [anonymizing your article](#) for peer review.

We recommend that you use our [templates](#) to prepare your article, but if you prefer not to use templates this guide will help you prepare your article for review.

If your article is accepted for publication, the manuscript will be copyedited and typeset in the correct style for the journal.

Font: Times New Roman, 12 point, double-line spaced. Use margins of at least 2.5 cm (or 1 inch).

Title: Use bold for your article title, with an initial capital letter for any proper nouns.

Abstract: Indicate the abstract paragraph with a heading or by reducing the font size. Check whether the journal requires a structured abstract or graphical abstract by reading the Instructions for Authors. The Instructions for Authors may also give word limits for your abstract.

Keywords: Please provide keywords to help readers find your article. If the Instructions for Authors do not give a number of keywords to provide, please give five or six.

Headings: Please indicate the level of the section headings in your article:

1. First-level headings (e.g. Introduction, Conclusion) should be in bold, with an initial capital letter for any proper nouns.
2. Second-level headings should be in bold italics, with an initial capital letter for any proper nouns.
3. Third-level headings should be in italics, with an initial capital letter for any proper nouns.
4. Fourth-level headings should be in bold italics, at the beginning of a paragraph. The text follows immediately after a full stop (full point) or other punctuation mark.
5. Fifth-level headings should be in italics, at the beginning of a paragraph. The text follows immediately after a full stop (full point) or other punctuation mark.

Tables and figures: Indicate in the text where the tables and figures should appear, for example by inserting [Table 1 near here]. The actual tables should be supplied either at the end of the text or in a separate file. The actual figures should be supplied as separate files. The journal Editor's preference will be detailed in the Instructions for Authors or in the guidance on the submission system. Ensure you have permission to use any tables or figures you are reproducing from another source.

Running heads and **received dates** are not required when submitting a manuscript for review; they will be added during the production process.

Spelling and punctuation: Each journal will have a preference for spelling and punctuation, which is detailed in the Instructions for Authors. Please ensure whichever spelling and punctuation style you use is applied consistently.

Formatting and templates

Papers may be submitted in any standard format, including Word and LaTeX. Figures should be saved separately from the text. To assist you in preparing your paper, we provide formatting template(s).

References

Taylor & Francis Standard Reference Style: CSE citations are widely used for scientific journals and are based on international principles adopted by the National Library of Medicine. This guide is based on Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers, 7th edition, 2006. NB: examples in the CSE manual follow the citation-name system, so need to be converted for this name-year system.

Checklist: what to include

1. **Author details.** Please ensure everyone meeting the International Committee of Medical Journal Editors (ICJME) [requirements for authorship](#) is included as an author of your paper. Please include all authors' full names, affiliations, postal addresses, telephone numbers and email addresses on the cover page. Where available, please also include [ORCiDs](#) and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the article PDF (depending on the journal) and the online article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer-review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after your paper is accepted.
2. A structured abstract should cover (in the following order) .
3. A structured **abstract** of no more than 250 words. A structured abstract should cover (in the following order): its *objective*, its *materials and methods* (the experimental system and procedures used), the *results* and *discussion and conclusions*.
4. You can opt to include a **video abstract** with your article.
5. 5-10 **keywords**.
6. **Funding details.** Please supply all details required by your funding and grant-awarding bodies as follows: *For single agency grants*: This work was supported by the under Grant *For multiple agency grants*: This work was supported by the under Grant ; under Grant ; and under Grant .

7. **Disclosure statement.** This is to acknowledge any financial interest or benefit that has arisen from the direct applications of your research.
8. **Geolocation information.** Submitting a geolocation information section, as a separate paragraph before your acknowledgements, means we can index your paper's study area accurately in JournalMap's geographic literature database and make your article more discoverable to others.
9. **Supplemental online material.** Supplemental material can be a video, dataset, fileset, sound file or anything which supports (and is pertinent to) your paper. We publish supplemental material online via Figshare.
10. **Figures.** Figures should be high quality (1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour). Figures should be saved as TIFF, PostScript or EPS files.
11. **Tables.** Tables should present new information rather than duplicating what is in the text. Readers should be able to interpret the table without reference to the text.
12. **Equations.** If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable.
13. **Units.** Please use [SI units](#) (non-italicized).

Using third-party material in your paper

You must obtain the necessary permission to reuse third-party material in your article. The use of short extracts of text and some other types of material is usually permitted, on a limited basis, for the purposes of criticism and review without securing formal permission. If you wish to include any material in your paper for which you do not hold copyright, and which is not covered by this informal agreement, you will need to obtain written permission from the copyright owner prior to submission.

Disclosure statement

Please include a disclosure of interest statement, using the subheading "Disclosure of interest." If you have no interests to declare, please state this (suggested wording: *The authors report no conflicts of interest*). For all NIH/Wellcome-funded papers, the grant number(s) must be included in the disclosure of interest statement

Clinical Trials Registry

In order to be published in a Taylor & Francis journal, all clinical trials must have been registered in a public repository at the beginning of the research process (prior to patient enrolment). Trial

registration numbers should be included in the abstract, with full details in the methods section. The registry should be publicly accessible (at no charge), open to all prospective registrants, and managed by a not-for-profit organization. For a list of registries that meet these requirements, please visit the [WHO International Clinical Trials Registry Platform](#) (ICTRP). The registration of all clinical trials facilitates the sharing of information among clinicians, researchers, and patients, enhances public confidence in research, and is in accordance with the [ICMJE guidelines](#).

Complying with ethics of experimentation

Please ensure that all research reported in submitted papers has been conducted in an ethical and responsible manner, and is in full compliance with all relevant codes of experimentation and legislation. All papers which report *in vivo* experiments or clinical trials on humans or animals must include a written statement in the Methods section. This should explain that all work was conducted with the formal approval of the local human subject or animal care committees (institutional and national), and that clinical trials have been registered as legislation requires. Authors who do not have formal ethics review committees should include a statement that their study follows the principles of the [Declaration of Helsinki](#).

Consent

All authors are required to follow the [ICMJE requirements](#) on privacy and informed consent from patients and study participants. Please confirm that any patient, service user, or participant (or that person's parent or legal guardian) in any research, experiment, or clinical trial described in your paper has given written consent to the inclusion of material pertaining to themselves, that they acknowledge that they cannot be identified via the paper; and that you have fully anonymized them. Where someone is deceased, please ensure you have written consent from the family or estate. Authors may use this [Patient Consent Form](#), which should be completed, saved, and sent to the journal if requested.

Health and safety

Please confirm that all mandatory laboratory health and safety procedures have been complied with in the course of conducting any experimental work reported in your paper. Please ensure your paper contains all appropriate warnings on any hazards that may be involved in carrying out the

experiments or procedures you have described, or that may be involved in instructions, materials, or formulae.

Please include all relevant safety precautions; and cite any accepted standard or code of practice. Authors working in animal science may find it useful to consult the [International Association of Veterinary Editors' Consensus Author Guidelines on Animal Ethics and Welfare](#) and [Guidelines for the Treatment of Animals in Behavioural Research and Teaching](#). When a product has not yet been approved by an appropriate regulatory body for the use described in your paper, please specify this, or that the product is still investigational.

Submitting your paper

This journal uses ScholarOne to manage the peer-review process. If you haven't submitted a paper to this journal before, you will need to create an account in the submission centre. Please read the guidelines above and then submit your paper in the relevant Author Centre, where you will find user guides and a helpdesk.

If you are submitting in LaTeX, please convert the files to PDF beforehand (you will also need to upload your LaTeX source files with the PDF).

Please note that *Inhalation Toxicology* uses Crossref™ to screen papers for unoriginal material. By submitting your paper to *Inhalation Toxicology* you are agreeing to originality checks during the peer-review and production processes.

On acceptance, we recommend that you keep a copy of your Accepted Manuscript.

Publication charges

There are no submission fees or page charges for this journal.

Color figures will be reproduced in color in your online article free of charge. If it is necessary for the figures to be reproduced in color in the print version, a charge will apply.

Charges for color figures in print are £250 per figure (\$395 US Dollars; \$385 Australian Dollars; €315). For more than 4 color figures, figures 5 and above will be charged at £50 per figure (\$80 US Dollars; \$75 Australian Dollars; €63). Depending on your location, these charges may be subject to local taxes.

Copyright options

Copyright allows you to protect your original material, and stop others from using your work without your permission. Taylor & Francis offers a number of different license and reuse options, including Creative Commons licenses when publishing open access.

Complying with funding agencies

We will deposit all National Institutes of Health or Wellcome Trust-funded papers into PubMedCentral on behalf of authors, meeting the requirements of their respective open access (OA) policies. If this applies to you, please tell our production team when you receive your article proofs, so we can do this for you.

Open access

This journal gives authors the option to publish open access via our [Open Select publishing program](#), making it free to access online immediately on publication..

Taylor & Francis Open Select gives you, your institution or funder the option of paying an article publishing charge (APC) to make an article open access. Please contact openaccess@tandf.co.uk if you would like to find out more, or go to our [Author Services website](#).

Accepted Manuscripts Online (AMO)

This journal publishes manuscripts online as rapidly as possible, as a PDF of the final, accepted (but unedited and uncorrected) paper. This is clearly identified as an unedited manuscript and is referred to as the Accepted Manuscript Online (AMO). No changes will be made to the content of the original paper for the AMO version but, after copy-editing, typesetting, and review of the resulting proof, the final corrected version (the Version of Record [VoR]), will be published, replacing the AMO version.

The VoR is the article version that will appear in an issue of the journal. Both the AMO version and VoR can be cited using the same DOI (digital object identifier). To ensure rapid publication, we ask you to return your signed publishing agreement as quickly as possible, and return corrections within 48 hours of receiving your proofs.

My Authored Works

On publication, you will be able to view, download and check your article's metrics (downloads, citations and Altmetric data) via [My Authored Works](#) on Taylor & Francis Online. This is where you can access every article you have published with us, as well as your [free eprints link](#), so you can quickly and easily share your work with friends and colleagues.

We are committed to promoting and increasing the visibility of your article. Here are some tips and ideas on how you can work with us to [promote your research](#).

Article reprints

For enquiries about reprints, please contact the Taylor & Francis Author Services team at reprints@tandf.co.uk. To order a copy of the issue containing your article, please contact our Customer Services team at Adhoc@tandf.co.uk.

Sponsored supplements

This journal occasionally publishes sponsored supplements alongside its schedule of regular issues. Like our articles, all our supplements are expected to meet the same editorial standards as the journal and are subject to approval of the Editor prior to acceptance. They are indexed by the journal and offer targeted, cost-effective and high-impact reach. For more information and to discuss your requirements, please contact charles.whalley@tandf.co.uk.

Updated April 2016

7.2 Carta de aprovação do CEUA



COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA UFCSPA

A Comissão de Ética no uso de Animais, analisou o Projeto:

Projeto: 15-160

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

CLÁUDIA RAMOS RHODEN

CAROLINE GAMALHO DA SILVEIRA

Título: A INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AS PATÍCULAS AMBIENTAIS URBANAS SOBRE O CONSUMO E PREFERÊNCIA ALIMENTAR, O COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO E SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO, PERFIL LIPÍDICO E METABOLISMO ENERGÉTICO EM RATOS.

Este projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Todo e qualquer alteração do projeto, assim com eventos adversos graves, deverão ser comunicados a esta CEUA.

Porto Alegre, 16 de junho de 2015.

Katya V. Rygalla
Coordenadora do CEUA
UFCSPA