Paula Valença Bertacini

Material particulado fino presente no ar da cidade de São Paulo
promove alterações nas células de Purkinje:
um estudo experimental em embrião de galinha

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

Programa: Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profª Drª Elnara Márcia Negri

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bertacini, Paula Valença

Material particulado fino presente no ar da cidade de São Paulo promove alterações nas células de Purkinje : um estudo experimental em embrião de galinha / Paula Valença Bertacini. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Elnara Márcia Negri.

Descritores: 1.Poluição do ar 2.Material particulado 3.Desenvolvimento embrionário 4.Células de Purkinje 5.Embrião de galinha 6.Cerebelo

USP/FM/DBD-477/10

Esta tese é dedicada

a Wilma, minha mãe, por seu amor e
zelo em todas as etapas da minha vida e
pelos quais minha gratidão é eterna.

à minha família,
por toda a alegria que trazem consigo .

Dedico este trabalho também àqueles que
não estão prontos e que se esforçam.

Aos que não se rendem.

Aos que, se preciso, nos tomam pela mão

E, depois, são capazes de deixar-nos ir.

Dedico este trabalho aos que estão perto
e, aos de longe,

Saudades.

Agradecimentos

Desejo expressar a minha gratidão a todas pessoas que de diferentes maneiras contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Saldiva, que me recebeu em seu laboratório e que concebeu este estudo; sou grata por sua prontidão, dedicação e entusiasmo contagiante; pela coordenação geral deste trabalho e pelas preciosas contribuições durante todas as etapas deste trajeto.

Por terem orientado a realização deste trabalho, pela amizade e respeito; por serem presentes, minha maior gratidão:

À Dra. Heloisa de Siqueira Bueno por sua presença desde o início deste trabalho, interesse, dedicação e apoio incondicional em todas as etapas; por confiar que este trabalho seria possível.

À Profa. Dra. Raquel Simoni Pires pela dedicação a este trabalho e pela oportunidade de torná-lo mais rico; sou grata pelas sugestões e correções na elaboração desta tese e por sua ajuda, tempo e dedicação constantes.

À Prof^a Dr^a Elnara Márcia Negri por sua confiança desprendida e ajuda fundamental para que essa etapa da minha vida fosse concretizada.

Sou particularmente grata ao Prof. Dr. Luiz Roberto Britto por ter me recebido em seu laboratório para execução de grande parte deste trabalho; por sua excelência profissional e presença constantes, pelas preciosas sugestões durante a execução deste trabalho e no exame de qualificação.

Aos pesquisadores do LPAE em especial à Dra. Adriana Pires, Dra. Mariângela Macchioni, Dra. Heloisa Bueno, à Dra Regiani Carvalho de Oliveira e ao Dr. Paulo Afonso de André pela disponibilidade em ajudar, pela contribuição na obtenção e extração do material particulado e pela preciosa amizade.

À Profª Drª Cláudia Rhoden e ao Prof. Dr. Fernando Barbosa Jr e suas equipes por terem disponibilizado seu tempo e esforço e por viabilizarem as análises de estresse oxidativo e metais.

A todos do Laboratório de Comunicação Neuronal (ICB-USP) que, além de contribuírem de muitas maneiras para este trabalho, também tornaram os dias muito melhores com sua alegria;

Agradeço especialmente a Caroline Real, pela força de trabalho inspiradora, por ter orientado muitas etapas deste trabalho e ajuda constantes.

Agradecimento especial também para Adilson Alves por sua prontidão em colaborar, por seu conhecimento e auxílio constante e a Marina Sorrentino, pela orientação nos experimentos com DHE e amizade.

Aos colegas do LPAE e da FMUSP: motoristas, secretárias, técnicos que, por executarem seus trabalhos, colaboraram e permitiram que o meu trabalho fosse possível.

À Profa. Dra. Andréa da Silva Torrão pela utilização de seu laboratório para realização dos ensaios de *immunoblotting* e por suas contribuições no exame de qualificação.

À Profa. Dra. Marisa Dolhnikoff pelos comentários e sugestões no exame de qualificação.

Ao caríssimo colega Prof. Dr. José Luiz Guerra por sua influência decisiva e por ter me apresentado ao Professor Paulo Saldiva.

Ao Prof. Dr. Joaquim Edson Vieira por ter assumido a responsabilidade acadêmica em parte deste processo.

A todos envolvidos com o programa de pós-graduação em Fisiopatologia Experimental, de forma especial à Profa. Dra. Élia Cardini.

Agradeço com muito carinho a Aline Ueda e a Juliane Uehara pela amizade e por dividirem comigo a leitura das lâminas.

Ao Laboratório Biovet pela presteza no suprimento dos ovos.

Torno público, também, meu agradecimento à CAPES pela bolsa de estudos concedida; ao LIM05 e ao Programa de Fisiopatologia Experimental pelo apoio constante e por viabilizarem a exposição deste trabalho em eventos científicos.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	Introdução	1
1.1	Poluição atmosférica	1
1.1.1	Material particulado	2
1.1.2.	Efeitos da poluição atmosférica	5
1.1.2.1	Efeitos da poluição atmosférica no sistema nervoso	7
1.1.2.2	Susceptibilidade do sistema nervoso em desenvolvimento	9
1.2	Cerebelo	12
1.2.1	Estrutura cerebelar	12
1.2.2	Desenvolvimento embrionário do cerebelo	14
1.3	Justificativa	18
2	Objetivos	20
2.1	Objetivo geral	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	Metodologia	21
3.1	Material Particulado fino – PM _{2,5}	21
3.1.1	Caracterização da local de coleta	21
3.1.2	Coleta de PM _{2,5} e análise gravimétrica dos filtros	23
3.1.3	Extração do material particulado dos filtros	24
3.1.4	Determinação da concentração de elementos traço no PM _{2,5}	25
3.2	Animais	27
3.2.1	Desenho Experimental	27
3.2.2	Exposição ao material particulado	29
3.3	Avaliação inicial dos animais em E18	31
3.4	Concentração de elementos traço em estruturas encefálicas	32
3.5	Processamento dos encéfalos	34
3.6	Métodos de marcação do tecido cerebelar	36
3.6.1	Coloração de Giemsa	36
3.6.2	Reações de imuno-histoquímica	36

3.6.3	Reação com DHE	38
3.7	Captura de imagens e orientações de leitura	40
3.8	Análises morfométricas do cerebelo	41
3.8.1	Densidade numérica de células de Purkinje	41
3.8.2	Caracterização dos dendritos das células de Purkinje	43
3.8.2.1	Densidade de dendritos	43
3.8.2.2	Comprimento linear de dendritos	44
3.9	Determinação da expressão de BDNF	45
3.10	Caracterização de elementos relacionados ao estresse oxidativo no cerebelo	47
3.10.1	Determinação da concentração de malondialdeído (MDA)	48
3.10.2	Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)	49
3.10.3	Determinação da atividade da catalase (CAT)	49
3.11	Análise estatística	50
4	Resultados	51
4.1	Perfil de elementos traço do PM _{2,5} em suspensão	51
4.2	Caracterização inicial dos embriões de galinha	54
4.3	Perfil de elementos traço em estruturas encefálicas	57
4.4	Densidade de células de Purkinje	64
4.4.1	Densidade de células de Purkinje CB-positivas em E18	68
4.4.2	Densidade de células de Purkinje CB-positivas em E16	71
4.5	Expressão de BDNF no cerebelo	73
4.6	Densidade de células de Purkinje caspase positivas	77
4.7	Estresse oxidativo no cerebelo	79
4.8	Densidade de dendritos de células de Purkinje	85
4.8.1	Densidade dos dendritos CB-positivos	86
4.8.2	Densidade dos dendritos MAP2-positivos	89
4.8.3	Comprimento linear de dendritos de células de Purkinje	91
5	Discussão	95
6	Conclusão	110
7	Referências	111
	Apêndice	

Listas de Figuras

- FIGURA 1 - Perfil de elementos traço do material particulado fino em suspensão aquosa (PM_{2,5}) proveniente da extração do PM_{2,5} em filtros de polycarbonato em solução salina. O material particulado foi extraído por sonicação e a concentração final da suspensão de PM_{2,5} foi ajustada para 15,0µg.ml⁻¹. O perfil observado na amostra SALINA é referente à solução empregada na extração submetida a igual sonicação com filtros de polycarbonato limpos. A determinação dos elementos foi realizada pelo método de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e indica a presença de elementos traço na suspensão (PM_{2,5}). Note a escala de poder – exponencial 0,5 52
- FIGURA 2A - Perfil de elementos traço no cerebelo e teto óptico (TO) de animais submetidos a PM_{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg) e grupos controle (CI: intacto; S: salina) determinada pelo método de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). A – Elementos cobre, magnésio, manganês com variações significativas entre grupos submetidos a PM_{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg) e controles (CI: intacto e S: salina). Barra de erro ± 1DP; *p≤0,05 em relação ao grupo salina 58
- FIGURA 2B - Perfil de elementos traço no cerebelo e teto óptico (TO) de animais submetidos a PM_{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg) e grupos controle (CI: intacto; S: salina) determinada pelo método de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). (continuação de A) B – Elementos selênio, tálio e zinco com variações significativas entre grupos submetidos a PM_{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg) e controles (CI: intacto e S: salina). Barra de erro ± 1DP; *p≤0,05 em relação ao grupo salina 59
- FIGURA 2C - 40Perfil de elementos traço no cerebelo e teto óptico (TO) de animais submetidos a PM_{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg) e grupos controle (CI: intacto; S: salina) determinada pelo método de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). (continuação da figura B) C – Elementos chumbo, cobalto, platina e urânio com ausência ou pequena diferença entre grupos submetidos a PM_{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg) e controles (CI: intacto e S: salina) PM_{2,5} e controles. Barra de erro ± 1DP 60
- FIGURA 3 - Área do córtex na folha VI do cerebelo de animais em E16 e E18 avaliada em secções paramedianas submetidas à reação por imunoperoxidase com anticorpo dirigido à calbindina nos grupos expostos ao material particulado fino nas concentrações de 1,5µg e 20,0µg e nos controles intacto e salina. Observe a ausência de diferença significativa entre os grupos nos dois momentos do desenvolvimento avaliados. Barra de erro ± 2DP 65

- FIGURA 4 - Imagens digitais de secções paramedianas do cerebelo de embriões de galinha no 18º dia de desenvolvimento embrionário ilustrando a região do córtex cerebelar da folha VI (CG: camada granular; CP: camada de células de Purkinje; CM: camada molecular). O material foi submetido à coloração de Giemsa e à imuno-peroxidase dirigido à calbindina (CB). Note a equivalência existente entre os métodos, a eficiente distinção da camada de células de Purkinje na marcação com calbindina e a semelhança entre os animais dos grupos controles (CI: controle intacto; FI: falso injetado; S: salina). Barra de escala 50µm 67
- FIGURA 5 - Imagens digitais de secções paramedianas do cerebelo de embriões de galinha no 18º dia de desenvolvimento embrionário ilustrando a região do córtex cerebelar da folha VI (CG: camada granular; CP: camada de células de Purkinje; CM: camada molecular). O material foi submetido à coloração de Giemsa e à imuno-peroxidase dirigido à calbindina (CB). Note a menor densidade de células de Purkinje em nos grupos submetidos ao material particulado fino (1,5µg e 20,0µg) em comparação aos grupos controles (CI: controle intacto; S: salina). Barra de escala 50µm 69
- FIGURA 6 - Densidade de células de Purkinje no córtex cerebelar (Folha VI) de animais no 18º dia de desenvolvimento embrionário submetidos ao material particulado fino (1,5µg e 20,0 µg) e controles (intacto e salina) marcadas pela coloração de Giemsa e com anticorpo dirigido à calbindina (CB). Observe a menor densidade de células nos grupos submetidos ao material particulado em relação aos grupos controles em ambos as marcações. *p≤0,05 em relação aos controles; barra de erro ± 2DP 70
- FIGURA 7 - Densidade de células de Purkinje no córtex cerebelar (Folha VI) de animais no 16º dia de desenvolvimento embrionário submetidos ao material particulado fino (1,5µg e 20,0 µg) e controles (CI: intacto; salina) marcadas por imuno-peroxidase com anticorpo dirigido à calbindina (CB). Observe a menor densidade de células no grupo submetido ao material particulado (20,0µg) em relação aos grupos controles e ao grupo submetido a 1,5µg. *p≤0,05 em relação aos controles; barra de erro ± 2DP 71
- FIGURA 8 - Imagens digitais de secções do cerebelo de embriões de galinha no 18º dia de desenvolvimento embrionário ilustrando células de Purkinje (CP) no córtex cerebelar submetidas à co-localização por imuno-fluorescência com anticorpos dirigidos à calbindina (CB+) e ao fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF+). Ocorrência de co-localização indicada por cor laranja (seta). Barra de escala 50µm 74

- FIGURA 9 - Expressão de BDNF no cerebelo de animais submetidos a PM_{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg) e dos grupos controle (CI: controle intacto; S:salina) avaliados por *immunoblotting* e por imuno-peroxidase. A – *Immunoblots* de BDNF e controle β-actina das amostras; B – Razão entre os valores obtidos da análise densitométrica entre a expressão de BDNF e β-actina; C – Densidade de células BDNF+ na folha VI do cerebelo. *p≤0,05; Barra de erro ± 2DP 75
- FIGURA 10 - Marcação por imunoperoxidase com anticorpo dirigido à caspase 3 (CAS) na folha VI do cerebelo de animais submetidos ao PM_{2,5} nas doses de 1,5 µg e 20,0 µg e de animais dos grupos controles (CI: intacto; S: Salina) avaliados no 18º dia de desenvolvimento embrionário. A – Imagens digitais de secções para-medianas do cerebelo ilustrando células de Purkinje caspase-positivas; B – Densidade de células de Purkinje CAS+. p=0,067 e p=0,138 foram obtidos em comparação entre o grupo 20,0µg e controles intacto e salina, respectivamente. Barra de escala 50 µm; Barra de erro ± 2 DP 78
- FIGURA 11 - Representação gráfica da concentração de MDA e da atividade das enzimas SOD e catalase no cerebelo de animais submetidos ao PM_{2,5} nas doses de 1,5 µg e 20,0 µg e de animais dos grupos controle (CI: intacto e S: salina) avaliados no 18º dia de desenvolvimento embrionário. A – concentração de MDA; B – atividade da SOD; C – atividade da catalase com diferença significativa em relação aos grupos controles (*). Não foram constatadas diferenças entre os grupos deste estudo quanto à concentração de MDA e à atividade da SOD (p≥0,05). Barra de erro: ± 2DP 82
- FIGURA 12 - Oxidação da DHE nas folhas VI-VII do cerebelo de animais submetidos ao PM_{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg) e de animais dos grupos controle (CI: intacto e S: salina) avaliados no 18º dia de desenvolvimento embrionário. A – Imagens digitais de secções para-medianas do cerebelo ilustrando as camadas do córtex (CG: camada granular; CP: camada de células de Purkinje; CM: camada molecular) submetido à reação com DHE (filtro TRITC); B – Avaliação da intensidade de fluorescência no córtex cerebelar considerando o conjunto das camadas de células de Purkinje e granular (CP+CG) e, separadamente, a camada molecular (CM). Não foram constatadas diferenças entre os grupos deste estudo (p≥0,05). Barra de escala 50µm; núcleo de célula de Purkinje (seta); UA: unidades arbitrárias; barra de erro ± 2DP 83
- FIGURA 13 - Densidade dos dendritos de células de Purkinje na folha VI do cerebelo de animais submetidos ao PM_{2,5} (1,5µg e 20,0µg) e de animais dos grupos controle (intacto e salina) avaliados no 18º dia de desenvolvimento embrionário. A avaliação feita em secções submetidas à marcação por imuno-peroxidase com anticorpo dirigido à calbindina indicou aumento significativo na densidade de dendritos no córtex

apenas no grupo submetido a 20,0µg de PM_{2,5}. Barra de erro ± 2DP;
 *p≤0,05 em relação aos controles 87

FIGURA 14 - Imagens digitais de secções paramedianas do cerebelo de embriões de galinha submetidos ao PM_{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg) e os controles (CI: controle intacto; S: salina) ilustrando a região do córtex cerebelar (Folha VI) marcados por imuno-peroxidase com anticorpo dirigido à calbindina. A – animais no 16º dia de desenvolvimento embrionário e B - animais no 18º dia de desenvolvimento embrionário. CG: camada granular; CP: células de Purkinje; CM: camada molecular; Barras de escala A: 20 µm e B: 50µm 88

FIGURA 15 - Imagens digitais do córtex cerebelar de embriões no 18º dia de desenvolvimento submetidos a PM_{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg) e os controles (CI: controle intacto; S: salina) marcados por reação de imuno-peroxidase com anticorpo dirigido a microtúbulos (MAP2). CG: camada granular; CP: células de Purkinje; CM: camada molecular; Barra de escala 50µm 89

FIGURA 16 - Densidade dos dendritos de células de Purkinje na folha VI do cerebelo de animais submetidos ao PM_{2,5} nas doses de 1,5 µg e 20,0 µg e de animais dos grupos controle (intacto e salina) avaliados no 18º dia de desenvolvimento embrionário. A avaliação feita em secções submetidas à marcação por imuno-peroxidase com anticorpo dirigido à microtúbulos (MAP2) indicou aumento significativo na densidade de dendritos no córtex apenas no grupo submetido a 20,0 µg de PM_{2,5}. Barra de erro ± 2DP; *p≤0,05 em relação aos controles 90

FIGURA 17 - Relação percentual entre o comprimento linear de dendritos de células de Purkinje (Folha VI) dos grupos submetidos a PM_{2,5} tomando como referência (100%) o valor obtido do grupo salina. Note a acentuada diminuição no comprimento de dendritos do grupo PM_{1,5} µg, principalmente em sua porção distal, e o aumento da região proximal dos dendritos dos animais do grupo submetido a PM_{2,5} na dose de 20,0 µg 92

FIGURA 18 - Comprimento linear médio de dendritos de células de Purkinje (folha VI) considerando as porções proximal e distal e sua somatória, representada pelo comprimento total das estruturas marcadas por imuno-peroxidase com anticorpo dirigido à calbindina nos grupos controle (intacto e salina) e os grupos submetidos a PM_{2,5} nas doses de 1,5 µg e 20,0 µg. *p≤0,05 e ** p≤0,01 em relação aos controles; barra de erro ± 2DP 93

Listas de tabelas

TABELA 1 -	Perfil de elementos traço do material particulado fino em suspensão aquosa (PM _{2,5}) proveniente da extração do PM _{2,5} em filtros de polycarbonato em solução salina. O material particulado foi extraído por sonicação e a concentração final da suspensão de PM _{2,5} foi ajustada para 15,0µg.ml ⁻¹ . O perfil observado na amostra SALINA é referente à solução empregada na extração submetida a igual sonicação com filtros de polycarbonato limpos. A determinação dos elementos foi realizada pelo método de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e indica a presença de elementos traço na suspensão (PM _{2,5}).Valores apresentados como média ± DP	56
TABELA 2 -	Perfil de elementos traço no cerebelo e teto óptico (TO) de animais submetidos a PM _{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg) e dos grupos controle (CI: intacto; salina) no 18º dia de desenvolvimento embrionário. A determinação dos elementos foi realizada pelo método de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Valores são apresentados como média ± DP. *p≤0,05 em relação ao grupo salina; cerebelo n=5; TO n=4	64
TABELA 3 -	Densidade de células de Purkinje (CP) no córtex cerebelar da folha VI de animais em E16 e E18 submetidos à coloração de Giemsa e à marcação com anticorpo dirigido à calbindina (CB) nos grupos controles (intacto, falso injetado e salina) e nos grupos submetidos a PM _{2,5} (1,5µg e 20,0µg). Os valores são dados como média ± DP. *p≤0,05 em relação ao grupo salina	69
TABELA 4 -	Densidade de células de Purkinje (CP) no córtex cerebelar (Folha VI) de animais no 18º dia de desenvolvimento embrionário submetidas à marcação anticorpos dirigidos a BDNF e caspase (CAS-3) nos grupos controle (CI: intacto; Salina) e nos grupos ao PM _{2,5} (1,5µg e 20,0µg. Os valores dados como média ± DP. *p≤0,05 em relação ao grupo salina	79
TABELA 5 -	Tabela 5: Avaliação de moléculas relacionadas ao estresse oxidativo em cerebelo de animais no 18º dia de desenvolvimento embrionário submetidos a PM _{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg) e controles intacto e salina. (MDA: malonaldeído; DHE:di-hidro-etidina; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase). † Massa de proteínas totais; ‡ Folhas VI e VII do cerebelo; *p≤0,05 em relação aos controles	87

TABELA 6 - Densidade de dendritos das células de Purkinje no córtex cerebelar (Folha VI) do cerebelo de animais no 18º dia de desenvolvimento embrionário submetidos à reação de imuno-peroxidase com anticorpos dirigidos à calbindina (CB) e a microtúbulos (Map2) nos grupos controle (intacto e salina) e nos grupos submetidos a PM_{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg). Os valores são dados como média ± DP. *p≤0,05 em relação aos controles intacto e salina 89

TABELA 7 - Comprimento linear médio dos dendritos das células de Purkinje na folha VI do cerebelo de animais dos grupos dos submetidos a PM_{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg) e controles (intacto e salina) nas categorias avaliadas. Os valores dados como média ± DP; valores mínimos e máximos entre parênteses. ** p≤0,01 e p≤0,05 em relação aos controles 97

Lista de abreviaturas

BNDF	<i>brain derived neural factor</i>
CB	calbindina
CO	monóxido de carbono
DAB	diaminobenzidina
DHE	dihidroetidina
DTPA	pentaacetato-dietilenotriamina
EDXFR	espectrometria de fluorescência de raios-x por dispersão de energia
FITC	<i>isotiocianate fluorescein</i>
ICP-MS	espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado equipado com célula de reação
MAP2	<i>microtubule associated protein</i>
MDA	malondialdeído
NO	óxido nítrico
NO _x	óxidos de nitrogênio
NO ₂	dióxido de nitrogênio
PM _{2,5}	material particulado de 2,5 a 10 µm de diâmetro
PM ₁₀	material particulado menor do que 2,5 µm de diâmetro
PTS	partículas totais em suspensão
ppb	partes por bilhão
ppm	partes por milhão
ROFA	residual oil fly ash
SOD	superóxido dismutase
SO ₂	dióxido de enxofre
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TMAH	hidróxido de tetrametilamônio
TRITC	<i>tetramethyl-rodamine-isotiocianate</i>

Resumo

A poluição do ar é associada a diferentes patologias inclusive as que afetam o sistema nervoso central. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do material particulado fino (PM_{2,5}) da cidade de São Paulo nas células de Purkinje de embriões de galinha. Dose única de PM_{2,5} em suspensão (1,5 ou 20,0 µg.100µl⁻¹) foi injetada em ovos fertilizados de galinha em E0 foram artificialmente incubados por 18 dias (E18). Análises morfométricas no cerebelo foram realizadas em material submetido à reação imuno-histoquímica com anticorpos dirigidos à calbindina (CB), ao fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e à caspase 3 (CAS) para avaliação da densidade de células de Purkinje, de seus dendritos e da taxa de apoptose nestas células. A expressão do BDNF no cerebelo foi determinada pelo método de *immunoblotting*. A ocorrência de elementos traço e de peroxidação lipídica no cerebelo foi avaliada, assim como a atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase. Não foram observadas diferenças no desenvolvimento geral e na taxa de mortalidade dos embriões submetidos ao PM_{2,5} em comparação aos controles. Embora o PM_{2,5} em suspensão tenha apresentado elevada quantidade de elementos traço, depleção na concentrações de elementos como Cu, Mg, Mn, Se e Zn foi observada no cerebelo dos animais. Comparados ao controle salina, animais submetidos às concentrações de PM_{2,5} apresentaram diminuição da densidade de células de Purkinje CB+ nos grupos PM_{2,5} (18% no PM_{2,5} 1,5 µg e 23% no grupo PM_{2,5} 20,0 µg). Aumento de 45% na densidade de dendritos das células de Purkinje no grupo exposto a PM_{2,5} 20,0 µg foi observado. Redução significativa na expressão de BDNF no cerebelo e também na densidade de células de Purkinje BDNF+ no grupo PM_{2,5} 20,0 µg foi observada em relação aos controles e ao grupo PM_{2,5} 1,5 µg. A ocorrência de células de Purkinje apoptóticas não variou entre os grupos deste estudo da mesma forma em que a peroxidação lipídica e a atividade de SOD também não variaram. Contudo, foi observada maior atividade da catalase no cerebelo dos animais expostos ao material particulado. Conclusão: O material particulado fino da cidade de São Paulo afetou o desenvolvimento embrionário das células de Purkinje no modelo empregado e promoveu a ativação de mecanismos antioxidantes. A composição elementar do material particulado da cidade de São Paulo pode estar associada à perturbação da poda dendrítica nas células de Purkinje.

Descritores: 1.Poluição do ar 2.Material particulado 3.Desenvolvimento embrionário
4.Células de Purkinje 5.Embrião de galinha 6.Cerebelo

Summary

Air pollutants are associated to several diseases including those related to central nervous system. The aim of this work was to evaluate the effect of urban fine particles ($PM_{2.5}$) in chicken embryo Purkinje cells. A single dose of $PM_{2.5}$ suspension in two different concentrations (1.5 or $20.0 \mu\text{g} \cdot 100\mu\text{l}^{-1}$) was injected in fresh laid fertilized eggs on E0. Control groups were performed (intact and saline groups). After 18 days of embryo incubation (E18), no differences in general abnormal development and mortality ratio were found between groups. Cerebellar morphometrical analysis for neuronal density, dendritic outgrowth and cellular apoptosis were scored in anti-CB, anti-BDNF and anti-CAS immune-labeled Purkinje cells. Measurements of trace elements, lipid peroxidation, superoxide dismutase and catalase were performed as well. $PM_{2.5}$ suspensions presented high amounts of metals but the cerebellar tissue presented metal depletion. Compared to control animals (saline group) both $PM_{2.5}$ doses exposed embryos showed a decreased number of Purkinje cell CB+ (ca. 18% for $PM_{2.5}$ $1.5 \mu\text{g}$ and 23% for $PM_{2.5}$ $20.0 \mu\text{g}$) and increased Purkinje cell dendritic branches density in the $PM_{2.5}$ $20.0\mu\text{g}$ exposed embryos (ca. 45% for $PM_{2.5}$ $20.0\mu\text{g}$). Interestingly, a significant reduction of Purkinje cell BDNF expression was observed in the $PM_{2.5}$ $20 \mu\text{g}$ group embryos when compared to those of the control and $PM_{2.5}$ $1.5\mu\text{g}$ groups. No alterations in the number of Purkinje cells CAS+ were observed. The lipid peroxidation and SOD activity showed similar levels in the cerebellar tissue of all experimental groups, although significant higher levels of CAT were detected in $PM_{2.5}$ $20 \mu\text{g}$ group cerebella. In conclusion, urban fine particles impair the embryonic development of Purkinje cells in chick embryo model as well promote the antioxidant defense activation. $PM_{2.5}$ elemental compounds may disrupt the physiological dendritic pruning of Purkinje cells.

Descriptors: 1. Air pollution; 2. Particulate matter; 3. Embryo development; 4. Purkinje cells; 5. Chick embryo; 6. Cerebellum.

1. Introdução

1.1 Poluição Atmosférica

Nas áreas metropolitanas a poluição do ar constitui uma das mais graves ameaças à qualidade de vida de seus habitantes. O processo de combustão do diesel e da gasolina, considerado a maior fonte de poluentes atmosféricos em áreas urbanas com intenso tráfego de veículos automotore, libera diversas substâncias tóxicas que podem levar a vários efeitos à saúde humana (Lewtas, 2007; Geller et al., 2006).

De acordo com o Ministério do Meio Ambiente, poluente atmosférico é qualquer forma de matéria ou energia com intensidade, quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos, e que tornem ou possam tornar o ar impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde, inconveniente ao bem-estar público, danoso aos materiais, à fauna e à flora ou prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade.

Os poluentes atmosféricos podem ser divididos em categorias distintas. A fração gasosa é composta por monóxido e dióxido de carbono, óxidos de nitrogênio e enxofre, compostos orgânicos voláteis e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. A fração particulada, por sua vez, é composta por

partículas sólidas ou líquidas denominadas de material particulado (MP ou PM). A composição do material particulado pode incluir diferentes elementos dentre os quais, destacam-se os metais e os compostos de carbono.

O Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) por meio da Resolução nº 03 de 28/06/1990 estabelece o Padrão de Qualidade do Ar através de níveis primários e secundários para poluentes tais como partículas totais em suspensão, material particulado inalável (PM_{10} ou MP_{10}), fumaça, dióxido de enxofre, monóxido de carbono, ozônio e dióxido de nitrogênio.

1.1.1 Material particulado

O termo material particulado reúne um conjunto de poluentes constituído por poeiras, fumaças e todo tipo de material sólido e líquido que se mantém suspenso na atmosfera.

De acordo com Baird (2002), o material particulado é classificado de acordo com seu tamanho em partículas totais em suspensão e em partículas grossas, finas e ultrafinas.

As partículas totais em suspensão (PTS) representam um conjunto formado por partículas com diâmetro aerodinâmico igual ou inferior a $100\mu m$.

A fração grossa, denominada de partículas inaláveis, apresenta diâmetro aerodinâmico igual ou inferior a $10\ \mu\text{m}$ (MP_{10} ou PM_{10}) e pode estar presente naturalmente na atmosfera ou ser gerada a partir da ressuspensão do solo e de outros materiais presentes na crosta terrestre.

O material particulado fino, denominado de partículas respiráveis, é aquele que efetivamente chega aos alvéolos pulmonares e que apresenta diâmetro aerodinâmico igual ou inferior a $2,5\ \mu\text{m}$ ($\text{MP}_{2,5}$ ou $\text{PM}_{2,5}$). A ocorrência desta fração do material particulado depende da ocorrência de processos de combustão em veículos ou indústrias e termoeletricas.

As partículas ultrafinas são compostas por material particulado de diâmetro aerodinâmico inferior a $0,1\ \mu\text{m}$ e apresentam tempo de residência na atmosfera relativamente curto uma vez que tendem a formar partículas maiores por meio de agregação a outras (Pope, 2000a).

Desta forma, as principais fontes de emissão de particulado para a atmosfera são representadas por veículos automotores, processos industriais e pela queima de biomassa. Além disso, o material particulado também pode ser formado a partir de reações atmosféricas de gases como dióxido de enxofre, óxidos de nitrogênio e compostos orgânicos voláteis. Em sua maioria, estes elementos são provenientes de atividades de combustão e as reações que ocorrem entre eles, por sua vez, são dependentes de condições

atmosféricas e, portanto, variam ao longo do dia e também em relação à época do ano.

Diversos componentes orgânicos e inorgânicos podem estar adsorvidos ao núcleo de carbono do material particulado. Entre eles, estão incluídos sulfatos, nitratos, amônia, hidrogênio iônico, lipopolissacarídeos, metais e água que apresentam concentrações variadas de acordo com as características da fonte de emissão (Craig et al., 2008).

Os metais estão presentes naturalmente na crosta terrestre mas sua presença também é decorrente da atividade antropogênica como queima de combustíveis e atividades industriais. Alguns metais são denominados de elementos-traço uma vez que sua ocorrência se dá em concentrações da ordem de partes por milhão (ppm) ou de partes por bilhão (ppb). Embora alguns elementos sejam essenciais ao organismo, a ocorrência de concentrações elevadas é determinante da toxicidade destes elementos. (Jarup, 2003).

Estudo realizado por Lacz (2008) com particulado proveniente da combustão de diesel revelou que, após tratamento com n-hexano e conseqüente eliminação dos elementos orgânicos deste, a toxicidade pulmonar foi reduzida destacando, desta forma, o papel da fração orgânica nos efeitos associados ao particulado.

1.1.2 Efeitos da poluição atmosférica

Os efeitos da poluição atmosférica sobre a saúde são considerados um problema de saúde pública e têm sido objeto de inúmeros estudos nos últimos anos. Estudos relacionados à exposição aos poluentes do ar relatam os efeitos desta exposição nos sistemas cardio-respiratório, reprodutivo e nervoso (OMS, 2003).

O conhecimento acerca dos efeitos da poluição atmosférica, construído com base em estudos epidemiológicos e toxicológicos, indica que tanto exposições de curto como de longo prazo são capazes de produzir efeitos nos organismos vivos (Katsouyanni et al., 2001). Foi também demonstrado que a exposição aguda a poluentes poderia causar a exacerbação de doenças pré-existentes (Pope, 2004). Além disso, alguns estudos também sugerem que exposição a baixos níveis de poluentes atmosféricos, pode produzir efeitos adversos à saúde (Brunenkreef et al., 1995; Lin et al., 1999). As partículas finas e ultrafinas são as que causam maiores impactos à saúde humana e são capazes de atingir os alvéolos e, a partir destes, passarem à circulação sistêmica (Kampa e Castañas, 2008)

Estudos têm relatado que a natureza dos componentes adsorvidos é determinante para a sua toxicidade superando, inclusive, o efeito da variação

do tamanho da partícula em relação à toxicidade (Saldiva et al., 2002; Burnett et al., 2000).

Com o propósito de conhecer e de avaliar os efeitos sobre a saúde da poluição da cidade de São Paulo, estudos vêm sendo realizados há mais de duas décadas. Diversos trabalhos demonstraram a ocorrência de forte correlação entre o material particulado da poluição atmosférica e a os desfechos em saúde (Lin et al., 1993; Souza et al., 1998; Freitas et al., 2003). Estudos também revelaram que a população de idosos e crianças são as mais susceptíveis em relação aos impactos da poluição atmosférica sobre os sistemas cardiovascular e respiratório (Saldiva et al., 1994; Lin et al., 1999; Gouveia e Fletcher, 2000a, Gouveia e Fletcher , 2000b , Braga et al., 2001; Conceição et al., 2001; Ribeiro e Cardoso, 2003).

Também foi descrita a ação sistêmica dos elementos promovendo efeitos adversos sobre a função reprodutiva (Saldiva et al., 1995; Pereira et al., 1998; Pires, 2009; Veras et al., 2009). Diversos trabalhos relatam impactos sobre o período pré-natal de desenvolvimento revelando a relação entre a exposição materna aos poluentes e tanto com a mortalidade neonatal como com a ocorrência de defeitos congênitos (Lewtas, 2007; Veras et al 2008; Veras et al, 2009). Além disso, a exposição às concentrações ambientais do material particulado é capaz de interferir na fertilidade de fêmeas e de causar o baixo peso dos filhotes (Veras et al., 2009).

1.1.2.1 Efeitos da poluição atmosférica no sistema nervoso

Os efeitos da exposição a poluentes atmosféricos também têm sido relacionados ao sistema nervoso e um crescente interesse nesta relação pode ser observado por meio do aumento de publicações a este respeito.

Os poluentes atmosféricos são capazes de originar efeitos adversos no encéfalo. Várias evidências sugerem que o sistema nervoso apresenta sensibilidade bastante elevada aos poluentes atmosféricos, fato que o torna um alvo fácil para ação de poluentes desta natureza (Calderón-Garcidueñas et al., 2002; Block e Calderón-Garcidueñas, 2009; Migliore e Coppedè, 2009).

As correlações realizadas inicialmente levaram à necessidade da realização de estudos toxicológicos específicos a fim de que os exatos mecanismos envolvidos nesta relação sejam conhecidos.

A associação entre exposição à poluição do ar de grandes cidades e neuroinflamação foi relatada em estudos de coorte realizado em adultos que relataram elevação na transcrição da enzima ciclooxigenase no hipocampo e no córtex-prefrontal (Calderón-Garcidueñas et al., 2004). Os trabalhos realizados também mostram que o material particulado, assim como metais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos a ele adsorvidos, é captado por terminações nervosas do epitélio nasal e, por meio de translocação axonal

via bulbo olfatório atinge estruturas do sistema nervoso central (Calderón-Garcidueñas et al., 2002; Oderdöster et al., 2002a; Oderdöster et al., 2002b; Calderón-Garcidueñas et al., 2004; Peters et al., 2006; Calderón-Garcidueñas et al., 2007).

Estudos também descrevem que a inflamação pulmonar persistente em cães e seres humanos, devida à deposição de partículas finas e ultrafinas em várias partes do sistema respiratório, acarreta a liberação de citocinas na circulação sanguínea. Por meio destes mediadores inflamatórios, interleucinas e fator de necrose tumoral, ocorre a ativação de receptores do endotélio vascular da barreira hematoencefálica que promove o aumento de permeabilidade desta barreira (Calderón-Garcidueñas et al., 2008). Além disso, essas moléculas também induzem a formação de macrófagos que, ao cruzarem a barreira hematoencefálica, diferenciam-se em microglia no sistema nervoso e são capazes de promover neuroinflamação por meio da liberação de substâncias como óxido nítrico, proteases, derivados do ácido aracdônico e de proteína precursora β -amilóide. (Calderón-Garcidueñas et al., 2008a; Calderón-Garcidueñas et al., 2008b; Block e Calderón-Garcidueñas, 2009).

Processos oxidativos são também relacionados aos impactos de poluentes atmosféricos sobre os sistemas respiratório e cardiovascular. Deste modo, tanto processos oxidativos como inflamatórios, têm sido definidos

como mecanismos básicos por meio dos quais a poluição atmosférica impõe danos ao sistema nervoso. (Schwartz, 1995; Zelikoff et al., 2002; Block et al., 2004; Mills et al., 2009). Mecanismos promotores de estresse oxidativo também foram observados em indivíduos com doenças pulmonares pré-existentes submetidos à inalação de material particulado (Seaton et al., 1995; Utell et al., 2000, Brook et al., 2003).

1.1.2.2 Susceptibilidade do sistema nervoso em desenvolvimento

Embora diversos trabalhos relatem as características de toxicidade e mecanismos de ação de elementos presentes na poluição atmosférica como cádmio, chumbo, cobre, mercúrio e platina, a observação individual dos efeitos sobre o organismo pode não refletir inteiramente os efeitos causados por exposições a condições ambientais. Se por um lado a análise individual dos elementos é capaz de elucidar os mecanismos de toxicidade de um elemento, por outro, este tipo de análise não considera as interações que podem ocorrer entre diferentes componentes de uma mistura tão complexa como a poluição do ar (Weiseman e Zereine, 2009).

A exposição à agentes tóxicos durante o desenvolvimento embrionário é descrita como capaz de impactar o organismo num período que representa uma janela crítica para ação de diferentes substâncias. O desenvolvimento do encéfalo mostra-se vulnerável a danos de diversas naturezas que

interferem em processos críticos do desenvolvimento como proliferação celular, diferenciação, sinaptogênese, mielinização e apoptose no sistema nervoso central (Rice e Barone, 2000).

A exposição a elementos neurotóxicos em estágios precoces da embriogênese mostrou que os efeitos podem ser bastante sutis e apenas se tornarem evidentes após um prolongado período de latência além de serem capazes de afetar estruturas diferentes das inicialmente afetadas (Campbell et al., 2005).

A limitada capacidade do sistema nervoso em desenvolvimento em compensar a perda de células, resulta no comprometimento de funções neuronais além de elevar o risco de neurodegeneração (Bayer 1989; Grandjean e Landrigan 2006).

O cerebelo é citado como um órgão-alvo de diferentes compostos tóxicos (Fonnum e Lock, 2000). Especificamente, alterações no desenvolvimento do fenótipo das células de Purkinje no período no qual estão sob intenso crescimento dendrítico e formação de sinapses podem interferir no comportamento da célula após o dano (Gianola e Rossi, 2001). Além das células de Purkinje, as células granulares que ocorrem em grande quantidade no cerebelo são descritas como os alvos preferenciais de agentes tóxicos (Fonnum e Lock, 2000).

Estudos que avaliaram a exposição precoce a tóxicos descrevem a ocorrência de alteração da morfogênese neuronal entre outros efeitos (Campbell et al., 2005). Além disso, a exposição *in ovo* de *Gallus gallus* a metais como mercúrio e chumbo revelou a deposição de metais no encéfalo destes animais, inclusive no cerebelo, ao mesmo tempo em que alterações comportamentais também foram observadas. Além da toxicidade dos elementos, estes estudos também destacam a sensibilidade do período embrionário e da eficiência da exposição *in ovo* dos embriões no sentido de promover alterações mensuráveis nos animais (Carvalho et al., 2008; Müller et al., 2008).

A acumulação de metais como chumbo, cobre, mercúrio, manganês e platina em células gliais é relatada ao mesmo tempo em que foi detectada a indução de mecanismos de detoxificação destes elementos no encéfalo por meio da ação de metalotioneínas em embriões de galinha expostos (Tiffany-Castiglioni e Qian, 2001; Gagnon e Patel, 2007).

1.2 Cerebelo

O córtex cerebelar é uma região do encéfalo cuja correlação entre estrutura e função é bastante precisa. Essa região envolve o controle da coordenação motora e é composta por diferentes tipos neuronais como células de Purkinje, de Golgi, granulares, em cesto e células estreladas já descritas por Ramon y Cajal em 1911. O arranjo característico observado no cerebelo é determinado pela posição dos neurônios e das fibras aferentes que confere ao córtex cerebelar a típica estrutura tri-dimensional.

1.2.1 Estrutura cerebelar

Em aves e mamíferos adultos o córtex do cerebelo apresenta três regiões principais denominadas camada molecular, camada de células de Purkinje e camada granular. Deste modo, diferenças encontradas entre essas classes, são relativas ao momento embrionário ou pós natal no qual as características se desenvolvem (Sotelo, 2004).

A camada molecular é caracterizada por baixa densidade de células e localiza-se mais externamente. Apresenta células em cesto, com axônios longos e dendritos que se estendem na camada molecular em direção ao soma das células de Purkinje. Esta camada também apresenta as células

estreladas externas, com axônios curtos, que fazem sinapses com os dendritos distais das células de Purkinje (Delgado-Garcia, 2001).

A camada granular é formada por células granulares e por células de Golgi. Os axônios das células granulares se dirigem à camada molecular e se bifurcam dando origem às fibras paralelas que fazem sinapses com as células de Purkinje (Bower e Parsons, 2003). As células de Golgi estendem seus dendritos por todas as camadas do córtex cerebelar porém com maior extensão na camada molecular.

As células de Purkinje são grandes neurônios distribuídos em monocamada entre as camadas molecular e granular no córtex cerebelar. As células de Purkinje apresentam a arborização dendrítica em direção à camada molecular e, na porção lisa destes dendritos, existe formação de sinapses com as fibras trepadeiras e as células estreladas. Na região dos espinhos dendríticos, as sinapses ocorrem com as fibras paralelas. Os axônios das células de Purkinje se estendem através da camada granular em direção à substância branca e aos núcleos cerebelares profundos (Sarna e Hawkes, 2003).

No entorno das células de Purkinje estão presentes células gliais (ou de Bergmann) representadas por astrócitos protoplasmáticos cujos prolongamentos fazem sinapse com as células de Purkinje. As células de

Bergmann são associadas à migração, formação de dendritos, sinaptogênese e à maturação das células de Purkinje (Yamada e Watanabe, 2002).

1.2.2 Desenvolvimento embrionário do cerebelo

O desenvolvimento do sistema nervoso central como um todo envolve a coordenação de numerosos processos tais como proliferação celular, diferenciação, adesão, migração e morte que podem levar a alteração de forma, movimento e funções celulares (Rakic, 1990).

A matriz germinativa inicial do cerebelo apresenta neuroepitélio típico na zona ventricular e na região do lábio rômico, região mais caudal. Os primeiros neurônios a deixarem a zona ventricular são os neurônios nucleares que migram em direção à 'futura' região dos núcleos cerebelares profundos. Em camundongos esse processo ocorre entre o 10º e o 12º dia de desenvolvimento embrionário (E10-E12). Após a ocorrência dos primeiros neurônios nucleares, dá-se o surgimento de células de Purkinje e a migração destas da zona ventricular. Esse processo, que dará início à estrutura laminada do cerebelo, ocorre entre E11-E13 em camundongo.

A segunda matriz germinativa, que ocorre a partir da região do lábio rômico, ocorre no momento em que os neurônios nucleares e as células de Purkinje cessam a divisão celular. Neste momento, a migração de

precursores das células granulares até a superfície cerebelar origina, então, a camada granular externa. Após intensa proliferação na camada granular externa e, também, após o desenvolvimento de células de Purkinje, as células migram radialmente através da camada molecular em direção à região mais interna orientadas pelas fibras de Bergmann (glia radial) e se diferenciarão em neurônios da camada granular interna. Ao mesmo tempo, são geradas as células estreladas e as células em cesto presentes na camada molecular (Goldowitz e Hamre, 1998).

A partir de estrutura inicial curva, o cerebelo apresenta nesta fase uma estrutura com profundas fissuras e grandes apêndices semelhantes a dedos denominados de lóbulos ou folhas cerebelares (Sarna e Hawkes, 2003). A disposição celular em cada uma das camadas ocorre da mesma maneira em todas as folhas cerebelares (Delgado-Garcia, 2001; Sarna e Hawkes; 2003).

Após o estabelecimento da estrutura tri-laminada do cerebelo, observa-se a maturação de duas das maiores aferências do córtex cerebelar. O cerebelo recebe estímulos de várias regiões do cérebro envolvidas com atividade motora como medula espinal, núcleo vestibular e córtex cerebral.

As células de Purkinje recebem aferências extra-corticais diretas pelas fibras trepadeiras oriundas do núcleo olivar inferior e, indiretas, por meio das

fibras musgosas através das fibras paralelas das células granulares. Por outro lado, as células de Purkinje representam as únicas eferências do córtex cerebelar e assim, morte de células de Purkinje resulta em lesão funcional do cerebello (Goldowitz e Hamre, 1998; Sarna e Hawkes; 2003).

As etapas da embriogênese cerebelar são bastante similares entre aves e mamíferos variando apenas em relação ao momento de sua ocorrência. O desenvolvimento do cerebello das aves ocorre mais precocemente em comparação ao de roedores. No 10º dia de desenvolvimento (E10), por exemplo, três folhas das dez folhas cerebelares já estão formadas no cerebello de aves (Feirabend, 1990; Lee et al., 2001).

Desta forma, processos como mudanças morfológicas, diferenciação neuronal e sinaptogênese no cortex cerebelar do embrião de galinha já são observados a partir de E16 (E16-E20). Nesta fase, então, observa-se elevada atividade metabólica e pico da sinaptogênese em E18 (Palacios-Pru et al., 1981; Sacchetto et al., 1995; Pires et al., 2006).

O final da sinaptogênese e do crescimento dendrítico nestes animais ocorre entre E18 e P3 (3º dia pós natal) (Lopez-Roman and Armengol, 1996). Nesta última fase do desenvolvimento embrionário, vários processos ocorrem concomitantemente como, rápido crescimento e arborização dendrítica das células de Purkinje, estabelecimento das sinapses entre estas

células e as fibras paralelas, formação de sinapses inibitórias entre as células de Purkinje e interneurônios, redução das conexões entre as células de Purkinje e as fibras trepadeiras (poda) e maturação de suas propriedades eletrofisiológicas (Sacchetto et al., 1995; Kapfhammer, 2004). Deste modo, a poda e morte neuronal é um processo natural do desenvolvimento porém, apesar da importância os mecanismos envolvidos nos processos de poda neuronal e dendrítica permanecem ainda pouco compreendidos (Nikolaev et al., 2009).

As neurotrofinas desempenham um papel indispensável nos processos de diferenciação neuronal, plasticidade sináptica e sobrevivência das células neuronais. Dentre as neurotrofinas, o fator de crescimento derivado do encéfalo (BDNF: *brain derived neural factor*) apresenta um importante papel na regulação de características da sinaptogênese como densidade e conectividade sináptica (Causing *et al.*, 1997; Kapfhammer, 2004; Johnson et al., 2007).

1.3 Justificativa

Nos grandes centros urbanos os poluentes atmosféricos originados principalmente da combustão em veículos automotores são caracterizados pela presença de elementos potencialmente tóxicos ao desenvolvimento do sistema nervoso.

Considerando que:

a) a poluição do ar da cidade de São Paulo é uma mistura complexa apresentando elementos de diversas naturezas;

b) dentre os poluentes presentes na atmosfera, o material particulado fino de origem veicular é relacionado a patologias incluindo afecções do sistema nervoso;

c) o desenvolvimento embrionário representa uma janela crítica para a ação de tóxicos de diferentes naturezas;

d) importantes processos do desenvolvimento do sistema nervoso como neurogênese, migração, diferenciação e sinaptogênese podem ser impactados por poluentes atmosféricos,

faz-se necessária a avaliação das conseqüências da exposição embrionária ao material particulado fino da cidade de São Paulo sobre o sistema nervoso em desenvolvimento.

Este estudo foi concebido para uma avaliação inicial dos efeitos do material particulado fino da cidade de São Paulo sobre o desenvolvimento do sistema nervoso. O modelo animal proposto para este primeiro estudo viabiliza a observação de possíveis efeitos da exposição frente a um grande número de animais além de permitir a triagem das concentrações-teste, ambos de destacada importância para estudos nesta fase.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral:

Determinar a ocorrência de alterações no desenvolvimento do sistema nervoso de embriões de galinha expostos à dose única de material particulado fino de origem veicular.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a influência do material particulado fino da cidade de São Paulo sobre a densidade de células de Purkinje e sua arborização dendrítica no período de intensa atividade neuronal e sinaptogênese de embriões de galinha (E18);
- Avaliar a expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo no cerebelo dos animais em E18 expostos ao material particulado fino;
- Avaliar a taxa de apoptose das células de Purkinje nos embriões em E18 expostos ao material particulado fino;
- Avaliar elementos relacionados à ocorrência de estresse oxidativo no cerebelo de embriões em E18 expostos ao PM2.5;

METODOLOGIA

3 Metodologia

3.1 Material Particulado Fino – PM_{2,5}

3.1.1 Caracterização da local de coleta

O material particulado fino (PM_{2,5}) empregado nos ensaios biológicos foi coletado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo situada no número 455 da avenida Dr. Arnaldo, bairro Cerqueira César, São Paulo, SP, Brasil. Na altura do cruzamento desta avenida com a Rua Teodoro Sampaio, a circulação diária de veículos automotores é estimada em 83.941 carros, 9.936 veículos movidos a diesel e de 6.321 motocicletas na via principal além de outros 25.590 carros, 5.299 veículos movidos a diesel e 808 motocicletas nas vias laterais deste cruzamento. Não há contribuição de queima de biomassa nem de atividade industrial na região (CETESB, 2005).

Componentes do ar desta região são continuamente monitorados pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) uma vez que a estação Cerqueira César de monitoramento está instalada nos jardins da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, localizada na mesma avenida, no número 725, cerca de 160 metros de distância da Faculdade de Medicina (CETESB, 2005). A rede automática da estação

Cerqueira César realiza monitoramento de partículas inaláveis (MP_{10} ou PM_{10}), dióxido de enxofre (SO_2), monóxido de nitrogênio (NO), dióxido de nitrogênio (NO_2), óxido de nitrogênio (NO_x) e monóxido de carbono (CO). A rede manual, por sua vez, realiza monitoramento de fumaça, dióxido de enxofre (SO_2), partículas totais em suspensão (PTS) e partículas inaláveis finas ($MP_{2,5}$ ou $PM_{2,5}$).

Estudos feitos com $PM_{2,5}$ amostrado na estação de monitoramento Cerqueira César e na Faculdade de Medicina atribuíram cerca de 67% de sua massa à origem veicular com uma razão entre *black carbon*/carbono orgânico variando de 40-70% (Cetesb, 2002; Castanho e Artaxo, 2001).

Em outro estudo com o $PM_{2,5}$ amostrado na Faculdade de Medicina, as emissões veiculares e a ressuspensão da asfáltica foram caracterizadas como as principais fontes de $PM_{2,5}$ neste local no período de agosto de 2005 a maio de 2007 (Mauad et al., 2008). No mesmo estudo, a análise das componentes principais do $PM_{2,5}$, baseada nos dados obtidos por EDXFR, indicou a presença de dois fatores distintos nas amostras. No primeiro fator, foram agrupados os elementos ferro, silício, cobre, vanádio e zinco - típicos de emissões de escapamentos de veículos automotores e, no segundo fator, foram agrupados os elementos chumbo e enxofre, característicos das emissões de veículos movidos a diesel.

3.1.2 Coleta de PM_{2,5} e análise gravimétrica dos filtros

O material particulado utilizado neste estudo foi coletado nos meses de setembro e novembro de 2006, janeiro, fevereiro, março e maio de 2007, outubro de 2008 e maio e dezembro de 2009.

A coleta foi realizada por meio de amostrador de ar de pequeno volume do tipo Harvard (Air Diagnostics, EUA) operando a uma vazão de ar de 10L.min⁻¹ por um período de 24 horas. O amostrador do tipo Harvard possui ponto de corte para partículas de tamanho aerodinâmico equivalente igual ou inferior a 2,5µm e possibilita que partículas maiores que 2,5µm em suspensão no ar dentro do coletor sejam separadas do material particulado remanescente que é, por fim, coletado no filtro de polycarbonato.

Um total de 37 filtros de polycarbonato (Isopore™ Membrane Filters Polycarbonate, Millipore) com porosidade igual a 0,8µm e diâmetro igual a 37mm foram utilizados para coleta do PM_{2,5} empregado nesse estudo.

A análise gravimétrica dos filtros empregados na coleta de PM_{2,5} foi realizada no Laboratório de Análise de Processos Atmosféricos (LAPAt) do Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, consistiu na determinação da massa dos

filtros de polycarbonato antes e depois da coleta de $PM_{2,5}$ em balança ultra micro-analítica (UMX2, Mettler e Toledo) com sensibilidade para 0,000001g. Previamente à análise, os filtros foram mantidos em ambiente com temperatura e umidade relativa controladas (temperatura de $25,0 \pm 1,0$ °C; U.R. 35-40%) e, também, submetidos à ação de fontes de polônio (Po^{210}) a fim de serem descarregados eletrostaticamente.

A massa final presente nos filtros foi determinada por meio da diferença anterior e posterior à pesagem da qual foi, então, subtraído o valor médio da massa acumulada dos filtros não expostos utilizados como controle. Após a determinação da massa de $PM_{2,5}$, os filtros foram estocados à temperatura ambiente até o momento de uso.

3.1.3 Extração do material particulado dos filtros

Os filtros contendo $PM_{2,5}$ foram submetidos à extração em solução salina tamponada estéril (0,9%, pH 7,4) em banho com ultra-som durante 30 min. Este processo foi repetido cinco vezes a fim de garantir a máxima extração de $PM_{2,5}$ que era constatada pelo clareamento gradual do filtro de polycarbonato.

Paralelamente, filtros de polycarbonato sem uso (filtros “branco”) juntamente com uma alíquota da solução salina foram sonicados nas

mesmas condições e mantida igual relação entre o volume de solução salina e o número de filtros empregados na extração do $PM_{2,5}$.

Para obtenção de suspensão de $PM_{2,5}$ em concentração final igual a $200\mu\text{g}/\text{m}$ foram considerados os valores da massa de $PM_{2,5}$ nos filtros obtidos nas análises gravimétricas e, a partir desta solução inicial, as demais concentrações de $PM_{2,5}$ empregadas neste estudo foram derivadas.

Todas as suspensões de $PM_{2,5}$ foram preparadas imediatamente antes de sua utilização e não foram re-utilizadas em exposições posteriores.

3.1.4 Determinação das concentrações de elementos traço no $PM_{2,5}$

A determinação da composição de elementos traço do $PM_{2,5}$ em suspensão e da solução salina e empregada como veículo de extração foi realizada no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, (Ribeirão Preto, SP).

A análise foi realizada por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado equipado com célula de reação (ICP-MS) (ELAN DRC II, Perkin-Elmer, SCIEX, EUA) que emprega o plasma como fonte de ionização e um espectrômetro de massa para detecção dos íons produzidos.

Este método possibilita a análise simultânea de vários elementos químicos e apresenta limites de detecção em geral inferiores a partes por trilhão, segundo Batista et al. (2009).

A suspensão contendo $PM_{2,5}$ e a solução salina (25 g) foram submetidas à digestão em forno de microondas (ETHOS, Milestone START D) com 5 ml de ácido nítrico 20% (v/v) e 3 ml de peróxido de hidrogênio conforme descrito por Sucharova and Suchara (2006). Ao produto final da digestão foi adicionada água Milli-Q para obtenção de volume final igual a 25ml. O elemento ródio foi empregado como padrão interno com concentração final igual a $10\mu g.L^{-1}$. Solução estoque multi-elementar (Perkin-Elmer) contendo $1000 mg.L^{-1}$ de cada elemento foi empregada e os padrões de calibração analítica foram preparados diariamente pela diluição da solução estoque na faixa de $0-20\mu g.L^{-1}$ nas mesmas condições das amostras.

3.2 Animais

O presente estudo foi conduzido de acordo com as normas nacionais e internacionais de cuidados com animais de laboratório e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de projeto de pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP – protocolo número 0779/07 (ANEXO 1).

3.2.1 Desenho Experimental

Para realização das análises toxicológicas, o total de 175 ovos fertilizados de *Gallus gallus* - linhagem white leghorn, SPF (SPF: *specific pathogen free*) e com zero dia de desenvolvimento embrionário (E0) foram obtidos do laboratório Biovet (Vargem Grande Paulista, SP).

A definição das doses de PM_{2,5} avaliadas neste estudo foi baseada em estudos prévios com material particulado (Bueno et al., 2010) e material particulado de diesel (Block et al., 2004; Hartz et al., 2008; Wegesser, 2008). Foram definidas as doses de PM_{2,5} de 1,5µg e 20,0µg uma vez que maior espectro de doses (0,5µg, 3,0µg, 8,0µg e 10,0 µg) não mostrou maior eficácia na caracterização de alterações estruturais nas células de Purkinje no modelo de exposição proposto neste estudo.

Dessa forma, os ovos embrionados (E0) foram aleatoriamente separados nos grupos de estudo descritos a seguir:

Grupos controle:

- Controle Intacto (CI): formado por animais provenientes de ovos não manipulados. Destinado à verificação da viabilidade dos ovos e da adequação das condições artificiais de incubação (temperatura, umidade e viragem dos ovos);
- Salina (S): formado por animais provenientes de ovos submetidos ao processo de injeção com 100 µL de salina tamponada estéril (0,9%; pH 7,4) sonicada com filtros de policarbonato sem uso.
- Falso injetado (FI): formado por animais provenientes de ovos submetidos ao processo de perfuração da casca e fechamento com parafina derretida.

Grupos PM_{2,5}:

- PM_{2,5} dose 1,5 µg: formado por animais provenientes de ovos submetidos à injeção de 100µl de suspensão de PM_{2,5} em concentração de 15 µg.1000 µl⁻¹;
- PM_{2,5} dose 20,0 µg: formado por animais provenientes de ovos submetidos à injeção de 100 µl de suspensão de PM_{2,5} em concentração de 200 µg.1000 µl⁻¹.

3.2.2 Exposição ao material particulado

A partir da postura, os ovos foram mantidos em ambiente com temperatura entre 10,0 °C e 15,0 °C a fim de que o processo de embriogênese fosse interrompido por período não superior a 18 horas.

Após aferição da massa dos ovos em balança (AL-500, Marte), a região da câmara de ar foi limpa com etanol (70%) e, com o auxílio de uma agulha estéril (21G11/4), foi criado um orifício de diâmetro de até 1mm nessa região para injeção de 100µl da suspensão de PM_{2,5} ou da solução salina no interior da câmara de ar. A massa dos ovos em E0 apresentou valor médio igual a 45,09 g $\pm$ 1,69 e, uma vez que os valores neste estágio do desenvolvimento não revelaram diferenças significativas entre os grupos, o volume de 100 µl foi padronizado para todas as injeções (Spinar et al., 2000).

Imediatamente após a injeção, o orifício foi selado com parafina derretida (Bueno et al., 2010; DeWitt et al., 2005; Henshel et al., 1997). Os ovos do grupo salina foram injetados com solução salina tamponada estéril (0,9%, pH 7,4) sonicada com filtros de policarbonato sem uso conforme descrito (item 3.1.3) e os ovos do grupo falso injetado foram perfurados e, em seguida, selados com parafina derretida.

Os ovos foram incubados em temperatura igual a $38,0 \pm 1,0$ °C e em umidade relativa igual a 51% (Pires et al., 2006) em incubadora com viragem automática modelo TX6 (Lyon Technologies) a cada duas horas.

O principal foco deste estudo recaiu sobre as características numéricas e estruturais das células de Purkinje do cerebelo *Gallus gallus* no 18º dia de desenvolvimento embrionário (Estágio HH42-43). No entanto, a fim de estabelecer parâmetros comparativos, algumas análises foram realizadas em paralelo em material adicional proveniente do cerebelo de animais no 16º dia de desenvolvimento embrionário e do teto óptico de animais em E18.

3.3 Avaliação inicial dos animais em E18

Após abertura dos ovos, os animais foram avaliados quanto ao estágio de desenvolvimento alcançado de acordo com a classificação de Hamburger e Hamilton (1951) que considera o comprimento do bico e do terceiro dedo na determinação do estágio HH em animais com 18 dias de incubação.

A massa corpórea dos animais foi determinada previamente à perfusão e a massa das estruturas encefálicas foi determinada apenas nos animais não submetidos à perfusão em balança analítica (TP-214, Denver) com sensibilidade de 0,0001 g.

Aspectos da morfologia externa dos animais foram avaliados e comparados às características morfológicas do desenvolvimento normal do embrião de *Gallus gallus* descritas por Hamburger e Hamilton (1951). Além do comprimento do bico terceiro dedo, definidos como parâmetros para determinação quanto ao estágio HH de desenvolvimento, também foram avaliados a morfologia do bico e do globo ocular, ocorrência de pálpebras, fechamento da cavidade abdominal e posicionamento das patas nos animais.

3.4 Concentração de elementos traço em estruturas encefálicas

A determinação da composição de elementos traço do cerebelo e do teto óptico foi realizada no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

A determinação de elementos químicos nas estruturas encefálicas de animais dos grupos controle (intacto e salina) e dos grupos submetidos às doses de PM_{2,5} foi realizada pelo método descrito por Batista et al. (2009) (item 3.1.4).

Após a decapitação dos animais, o cerebelo e os dois tetos ópticos foram dissecados, pesados e mantidos sob refrigeração à temperatura de 4°C até o momento da análise.

Cerca de 30 a 50 mg de tecido foram solubilizados por 3 horas com adição de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH). Em seguida, à solução resultante foi adicionado solução contendo 0.5% (v/v) de HNO₃ para um volume final de 10 ml. O elemento ródio foi empregado como padrão interno com concentração final igual a 10µg.L⁻¹. Solução estoque multi-elementar contendo 1000 mg.L⁻¹ de cada elemento obtida da Perkin-Elmer foi empregada e os padrões de calibração analítica foram preparados

diariamente pela diluição da solução estoque na faixa de 0-20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ nas mesmas condições das amostras. Além dos padrões internos adicionados às amostras (item 3.1.4), músculo bovino em pó foi empregado como material de referência tendo sido submetido ao mesmo processo de digestão ao qual foram submetidos o cerebelo e teto óptico.

3.5 Processamento dos encéfalos

Decorridos 18 dias de incubação, animais dos grupos controle e animais submetidos a $PM_{2,5}$ foram removidos do ovo e, após pesagem, foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca. Foram utilizadas solução salina tamponada (0,9%, pH 7,4) e solução fixadora de paraformaldeído (4%) em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,4). Após a perfusão, os encéfalos foram dissecados e mantidos em solução fixadora por 4 horas e, então, imersos em solução de sacarose (30%) em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,4), destinada a promover a crioproteção do tecido, à temperatura de 4°C durante 24 horas.

Animais dos grupos controle (intacto e salina) e dos grupos submetidos a $PM_{2,5}$ incubados por 16 dias (E16) também foram submetidos à perfusão transcardíaca seguindo o mesmo procedimento descrito para animais em E18.

Em virtude das características das análises propostas, os embriões de *Gallus gallus* foram submetidos a diferentes métodos de coleta e fixação do encéfalo. Desta forma, animais no 18º dia de desenvolvimento embrionário dos grupos controle (intacto e salina) e dos grupos expostos a $PM_{2,5}$ destinados à técnica de *immunoblotting*, de determinação de peroxidação lipídica e de atividades enzimáticas foram removidos do ovo, pesados e,

então, decapitados. O cerebelo destes animais foi rapidamente dissecado, congelado em nitrogênio líquido e mantido à temperatura de -80 °C até o momento da análise. Após dissecação, os encéfalos destinados à reação com DHE foram rapidamente emblocados em meio para congelamento (TBS, Durham) em gelo seco e mantidos à temperatura de -80°C até o momento da análise.

As secções histológicas foram obtidas a partir de encéfalos emblocados individualmente em meio para congelamento (TBS, Durham) em criostato (CM3050, Leica). O eixo mediano do encéfalo foi assumido como o eixo vertical do cerebelo e, então, secções paralelas a este eixo, ou seja, secções para-medianas, de 18µm de espessura foram obtidas. A partir da observação integral das dez folhas cerebelares, seis secções foram coletadas alternadamente em lâminas gelatinizadas e, desta forma, um intervalo médio de cerca de 200 µm foi obtido entre as secções de uma mesma lâmina uma vez que foram coletadas 12 lâminas por animal. O material obtido foi estocado à temperatura de -20 °C até o momento do uso.

3.6 Métodos de marcação do tecido cerebelar

3.6.1 Coloração de Giemsa

As secções histológicas em lâminas gelatinizadas foram mantidas em placa quente à temperatura de 37°C por 30 minutos, re-hidratadas e, em seguida, submetidas ao corante Giemsa e à descoloração e contraste com etanol. Após revelação, o material foi lavado e foi desidratado em gradiente etanólico (70% - 100%), diafanizado em xilol e montado com Permount (Fisher) e lamínulas.

3.6.2 Reações de imuno-histoquímica

Reações imuno-histoquímicas realizadas por meio do método de imuno-peroxidase foram realizadas com os anticorpos primários dirigidos à calbindina (1:100; CB, Sigma), à proteína associada a microtúbulos (1:500; MAP2, Chemical) e à caspase (1:100; Cas-3, Chemical).

O material em lâminas gelatinizadas foi mantido em placa quente à temperatura de 37°C por 30 minutos, lavado e, em seguida, incubado com solução contendo o anticorpo primário e 5% de soro normal do animal no qual foi produzido o anticorpo secundário em tampão fosfato (0,1 M) contendo Triton X-100 (0,3%). A incubação foi realizada em câmara úmida à

temperatura ambiente por um período de 14 a 18 horas. Após lavagem, o material foi submetido à solução contendo o anticorpo secundário biotilado (comercial) (1:200) em tampão fosfato (0,1 M) contendo Triton X-100 (0,3%) por noventa minutos. Após nova lavagem, o material foi incubado por 60 minutos em tampão fosfato (0,1M) contendo Triton X-100 (0,3%) e NaCl (0,4M) onde se incluiu o complexo avidina-biotina-peroxidase (1:100; ABC ELITE Kit, Vector Lab).

A revelação foi feita por imersão do material em diaminobenzidina (DAB) (0,05%) em tampão fosfato (0,1 M) por 5 minutos e acréscimo de cerca de 200µl de peróxido de hidrogênio (30%).

Ao término da revelação, o material nas lâminas foi submetido a rápido banho de tetróxido de ósmio (0,05%; Sigma) e, em seguida, desidratado em gradiente etanólico (70% - 100%), diafanizado em xilol e coberto com Permount (Fisher) e lamínula.

Todas as lavagens foram realizadas em tampão fosfato (0,1M), à temperatura ambiente e com agitação leve por três vezes com duração de dez minutos cada banho.

Nas reações realizadas pelo método de imuno-fluorescência foram empregados os anticorpos primários dirigidos à calbindina (1:1000; CB,

Sigma) e a fator neurotrófico derivado do encéfalo (1:200; BDNF-Chemical). O processo de incubação dos anticorpos primários seguiu as mesmas etapas das descritas para reação por meio de imuno-peroxidase. Os anticorpos secundários (diluição 1:100) empregados estiveram ligados aos fluorófilos FITC e TRITC a fim de promover a co-localização de CB e BDNF nas células de Purkinje. Após incubação com os anticorpos secundários durante noventa minutos, os cortes histológicos foram cobertos com meio de montagem contendo glicerol, carbonato de sódio e bicarbonato de sódio, cobertos com lamínula e mantidos ao abrigo de luz à temperatura de 4°C.

3.6.3 Reação com DHE

Os encéfalos destinados à reação com dihidroetidina (DHE) emblocados em meio para congelamento em gelo seco, foram seccionados com espessura de 18µm e as secções dispostas em lâminas silanizadas como descrito no item 3.5.

O material recém seccionado em criostato foi incubado com tampão fosfato (PB e DTPA 100 µM) em câmara úmida durante 5 minutos em temperatura ambiente. O material foi, então, submetido à solução contendo 2 µM de dihidroetidina (DHE; Invitrogen) no mesmo tampão fosfato, em câmara úmida durante 1 minuto à temperatura ambiente. Todo o

procedimento foi realizado protegido da luz e os tempos das etapas foram rigorosamente obedecidos.

A fluorescência foi detectada em microscópio de fluorescência (E1000, Nikon) em objetiva de 20x com filtro para rodamina (TRITC) e a quantificação nas imagens digitais obtidas foi realizada por meio do programa ImageJ 4.37 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA).

A intensidade da fluorescência foi avaliada como densidade média considerando o conjunto das camadas de células de Purkinje e granular (CP+CG) e, separadamente, a camada molecular interna (CM). Os valores finais correspondem aos valores obtidos na quantificação da fluorescência das camadas em razão dos valores obtidos em regiões não marcadas da própria secção.

3.7 Captura de imagens e orientações de leitura

Imagens seqüenciais ao longo do comprimento da folha VI foram capturadas em objetivas de 20x e 40x utilizando um microscópio (E1000, Nikon) acoplado à câmera digital e programa Nikon Imaging Software ACT-U. A captura de imagens provenientes de material fluorescente foi realizada com auxílio de filtros específicos às características da reação ou do fluorófilo empregado.

No material submetido à reação com DHE, foram consideradas as folhas VI-VII do cerebelo.

As bases e o ápice das folhas foram desconsiderados e os valores apresentados são referentes à média obtida a partir da avaliação de três secções por animal.

3.8 Análises morfométricas do cerebelo

Previamente à avaliação da densidade de células e dos dendritos, todas as imagens digitais obtidas foram normalizadas em relação à equivalência entre comprimento por pixel utilizando o programa ImageJ 4.37 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA).

3.8.1 Densidade numérica de células de Purkinje

A determinação da densidade do número de células de Purkinje em cada secção analisada considerou o número de células de Purkinje no córtex cerebelar cuja área foi considerada como compartimento de referência. Com emprego do programa ImageJ 4.37 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA), um retículo digital composto por pontos eqüidistantes de 500 μm^2 de área por ponto (Ap) foi sobreposto às imagens capturadas em objetiva de 20x. O número de células de Purkinje e a área referente ao compartimento de referência por secção foram estimados por meio das seguintes fórmulas (Bolender et al., 1993):

- 1) Densidade numérica de células de Purkinje em relação ao córtex cerebelar (N_{PURKINJE}):

$$N_{\text{PURKINJE}} = \frac{\sum Q}{\sum p \times A(p)}$$

Onde,

N_{PURKINJE} : densidade de células de Purkinje no compartimento de referência (córtex cerebelar)

$\sum Q$: somatória do número de células de Purkinje no compartimento de referência

$\sum p$: somatória de pontos incidentes no compartimento de referência

$A(p)$: área por ponto ($500 \mu\text{m}^2$)

- 2) Área do compartimento de referência na secção ($A_{\text{CÓRTEX}}$):

$$A_{\text{CÓRTEX}} = \sum p \times A(p)$$

Onde,

$A_{\text{CÓRTEX}}$: área do compartimento de referência na secção

$\sum p$: somatória de pontos incidentes no compartimento de referência (córtex cerebelar)

$A(p)$: área associada ao ponto ($500 \mu\text{m}^2$)

O número de células de Purkinje em cada secção foi determinado considerando as características típicas do corpo celular deste neurônio. As margens superior e direita do retículo foram consideradas como linhas de inclusão e, as margens inferior e esquerda, consideradas linhas de exclusão (Gundersen 1977; Sterio, 1984).

3.8.2 Caracterização de dendritos de células de Purkinje

3.8.2.1 Densidade de dendritos

A densidade dos dendritos das células de Purkinje foi estimada em imagens digitais das secções vertical da folha VI (Baddeley et al.,1986; Batra et al.,1994).

Com auxílio do programa ImageJ 4.37 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA; *plug in grid cycloid arc*), um retículo digital formado por linhas ciclóides foi sobreposto às imagens capturadas com objetiva de 40x para a determinação do número de intersecções entre dendritos e ciclóides. O córtex cerebelar foi empregado como compartimento de referência na determinação do comprimento dos dendritos das células de Purkinje e, para tal, foram considerados os pontos das ciclóides incidentes sobre esta região (Gambino et al., 2002).

Os mesmos critérios de exclusão das linhas descritos para a determinação da densidade de células (item 3.8.1) foram empregados. A determinação da densidade de dendritos no córtex cerebelar foi realizada empregando a seguinte fórmula:

3) Densidade de dendritos no compartimento de referência ($L_{\text{DENDRITOS}}$):

$$L_{\text{DENDRITOS}} = 2 \times \frac{1}{l_p} \times \frac{\sum I}{\sum p}$$

Onde,

$L_{\text{DENDRITOS}}$: densidade de dendritos (comprimento) no compartimento de referência (córtex cerebelar);

l/p : comprimento por ponto da ciclóide (8,9381 μm);

$\sum I$: somatória das intersecções entre dendritos e ciclóides no compartimento de referência;

$\sum p$: somatória de pontos incidindo no compartimento de referência.

3.8.2.2 Comprimento linear dos dendritos

O comprimento linear médio dos dendritos das células de Purkinje foi avaliado em imagens digitais obtidas em objetiva de 40x com o emprego do programa ImageJ 4.37 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA).. Para tal, os dendritos foram analisados em categorias pré-definidas

como região proximal, relativa ao dendrito de primeira ordem, e região distal, relativa às demais ordens de dendritos. As células de Purkinje cujos dendritos apresentaram sobreposição evidente não foram avaliadas.

3.9 Determinação da expressão de BDNF

Os animais no 18º dia de desenvolvimento embrionário dos grupos controle (intacto e salina) e dos grupos experimentais foram decapitados e os cerebelos foram rapidamente dissecados, congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer à temperatura de -80 °C.

As amostras foram homogeneizadas à temperatura de 4°C com auxílio de um homogeneizador do tipo Turratec MA-102/mini (Marconi) em tampão de extração (Tris pH 7,4 100 mM; EDTA 10 mM; PMSF 2 mM; aprotinina 0.01 mg.ml⁻¹). Os homogenatos obtidos foram centrifugados a 12000 rpm por 20 minutos em centrífuga refrigerada (CT-14000DR, Cientec).

A dosagem de proteínas totais obtidas dos cerebelos foi realizada pelo método de Bradford. A curva padrão protéica foi obtida a partir de concentrações conhecida da solução padrão de albumina bovina (1mg.ml⁻¹).

Tampão Laemmli (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 2,5%; 2-mercaptoetanol 2%; EDTA 4 mM; azul de bromofenol 0,05%) (Laemmli,

1970) e 100 mM de DDT foram adicionados às amostras para seu armazenamento à temperatura de -80°C.

Para separação das proteínas, cerca de 100 µg de conteúdo protéico obtido dos cerebelos foram submetidos à eletroforese em gel de acrilamida (8%) em cuba para mini-gel (Mini protein 3, BioRad). A transferência das proteínas no gel para membrana de nitrocelulose foi realizada em aparelho Trans-Blot Cell System (BioRad) conforme descrito por Towbin et al. (1992).

A reação de bloqueio foi realizada em solução contendo tampão salina com Tween 20 (TTBS: Tris-HCl 0,01 M, pH 7,4; NaCl 0,15 M; Tween 20 0,05%) e leite desnatado em pó (5%) por duas horas em temperatura ambiente com agitação leve.

A incubação com os anticorpos dirigidos a BDNF (1:1000; Chemical) e β -actina (1:10000, Sigma) em solução de albumina foi realizada durante 18 horas em temperatura de 4°C com agitação leve.

A incubação com anticorpo dirigido a coelho conjugado com peroxidase (1:10000; Amersham Biosciences) em solução de albumina contendo leite desnatado em pó (1%) foi realizada por uma hora em temperatura ambiente com agitação leve. A revelação da ligação entre o anticorpo primário empregado e o epítipo foi realizada com o kit

quimioluminescente ECL (Amersham Biosciences). As imagens digitalizadas dos filmes revelados foram analisadas por meio do programa Scion Image (Scion Corporation) e os dados foram apresentados como a razão entre as densidades ópticas das bandas marcadas com BDNF e com β -actina.

3.10 Caracterização de elementos relacionados ao estresse oxidativo no cerebelo

As análises referentes à determinação da peroxidação lipídica e da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase foram realizadas no Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica da Universidade Federal de Ciências da Saúde (Porto Alegre, RS).

O cerebelo dos animais foi homogeneizado manualmente em tampão KPi (KCL 1,15%, pH 7,4), na proporção de 9 mL para 1g de tecido, em macerador de vidro com pistilo de teflon, com 30 movimentos de rotação e compressão do cerebelo segundo descrito por Neves (1997).

Os homogenatos obtidos foram centrifugados a 3000 g por 10 minutos à temperatura de 6°C e o sobrenadante destinado à dosagem de proteínas total para posterior determinação de malondialdeído e da atividade das enzimas SOD e catalase. A concentração protéica nos homogenatos foi determinada pelo método de Bradford (1976) e a leitura das absorbâncias foi

realizada em espectrômetro (Lambda 35; Perkin-Elmer). A curva padrão protéica foi obtida a partir de concentrações conhecidas de solução padrão de albumina bovina (1 mg.mL^{-1}).

3.10.1 Determinação da concentração de malondialdeído (MDA)

A partir das amostras de cerebelo submetidas à extração e quantificação protéica, 125 μl destas foram adicionados a 375 μl de solução de ácido tricloroacético (10%) e, após serem mantidos em banho de gelo por 30 minutos, foram submetidos à agitação em aparelho vortex e centrifugados a 3000 g por 10 minutos à temperatura de 6°C . Em tubos de vidro, 250 μl do sobrenadante e 250 μl de ácido tiobarbitúrico (0,67%) (Sigma) submetidos à agitação em aparelho vortex por 10 segundos e, em seguida, a banho em temperatura de 100°C por 15 minutos. Após resfriamento em banho de gelo foram acrescentados 750 μl de n-butanol e em seguida a absorbância, a 535 nm , foi determinada em espectrômetro (Lambda 35; Perkin-Elmer) (Neves, 1997). Para cálculo da concentração de foi utilizada curva padrão de absorbâncias gerada a partir da solução padrão 1,1,3,3-tetrametoxipropano ($100 \text{ } \mu\text{M.mL}^{-1}$; Sigma-Aldrich) em solução de H_2SO_4 (1%).

3.10.2 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com o método descrito por Marklund e Marklund (1974) que consiste na inibição da auto-oxidação do pirogalol pela atividade da SOD; a quantidade de enzima capaz de inibir 50% desta oxidação é determinada como uma unidade da enzima.

A partir do material obtido da extração de proteínas, 30µl e 50µl de amostra do tecido foram adicionados 930µl de tampão (Tris 50mM; EDTA1mM; pH 8,2), 4 µl de catalase em cubeta de quartzo (10mm). Após 60 e 120 segundos de reação após a adição de 16µl de pirogalol (24mM em HCL 10 mM), leitura das absorbâncias a 420 nm foram realizadas em espectrômetro Lambda 35 (Perkin-ElmerBrasil). Os resultados são expressos em unidades de SOD.mg⁻¹ de proteínas totais (Marklund e Marklund, 1974).

3.10.3 Determinação da atividade da catalase

A concentração da enzima catalase foi determinada por meio da decomposição do peróxido de hidrogênio a 25°C. Em cubeta de quartzo (10mm), 30µl de amostra foram adicionados a 2865µl de tampão fosfato (50mM, pH 7,0) e, em seguida, 35µl de peróxido de hidrogênio (0,02M) foram adicionados à reação. A leitura das absorbâncias a 240nm foi

realizadas em espectrômetro Lambda 35 (Perkin-Elmer). Os resultados foram expressos em pmol.mg^{-1} de proteína totais (Aebi, 1984).

3.11 Análise estatística

Os dados obtidos foram inicialmente submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para a determinação da normalidade de distribuição.

A partir da normalidade da distribuição (dados paramétricos), os valores médios foram submetidos à análise de variância One-Way (ANOVA) seguido pelos testes de Tukey HSD e Bonferroni. A diferenças entre grupos foi considerada significativa quando o valor de $p \leq 0,05$.

Os valores são dados como média $\pm$ desvio padrão.

Dados provenientes da determinação de elementos químicos no cerebelo e teto óptico foram submetidos à análise de correlação (2-tailed) assim como a os dados referentes ao comprimento linear dos dendritos.

As análises foram realizadas com o emprego do programa estatístico *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 17.0.

RESULTADOS

4 Resultados

4.1 Perfil de elementos traço do PM_{2,5} em suspensão

A avaliação dos elementos traço presentes na suspensão de PM_{2,5} a 15 µg.mL⁻¹ foi capaz de comprovar a eficiência do processo de extração do PM_{2,5} dos filtros de polycarbonato e, também, de caracterizar o perfil dos elementos no PM_{2,5} em suspensão salina (FIGURA 1). Dentre os elementos analisados, destacam-se arsênio e chumbo, tóxicos mesmo quando em concentrações muito baixas além de outros elementos de média e baixa toxicidade como cobalto, cobre, ferro, magnésio, manganês, selênio, zinco, alumínio, bário (TABELA 1).

FIGURA 1: Perfil de elementos traço do material particulado fino em suspensão aquosa (PM_{2,5}) proveniente da extração do PM_{2,5} em filtros de polycarbonato em solução salina. O material particulado foi extraído por sonicação e a concentração final da suspensão de PM_{2,5} foi ajustada para 15,0 µg.mL⁻¹. O perfil observado na amostra SALINA é referente à solução empregada na extração submetida a igual sonicação com filtros de polycarbonato limpos. A determinação dos elementos foi realizada pelo método de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e indica a presença de elementos traço na suspensão (PM_{2,5}). Note a escala de poder – exponencial 0,5

TABELA 1: Perfil de elementos traço do material particulado fino em suspensão aquosa ($PM_{2,5}$) proveniente da extração do $PM_{2,5}$ em filtros de polycarbonato em solução salina. O material particulado foi extraído por sonicação e a concentração final da suspensão de $PM_{2,5}$ foi ajustada para $15,0\mu g.mL^{-1}$. O perfil observado na amostra SALINA é referente à solução empregada na extração submetida a igual sonicação com filtros de polycarbonato limpos. A determinação dos elementos foi realizada pelo método de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e indica a presença de elementos traço na suspensão ($PM_{2,5}$). Valores apresentados como média $\pm$ DP

ELEMENTO	Concentração elementar ($\mu g.L^{-1}$)	
	Suspensão	Solução
	$PM_{2,5}$	Salina
Alumínio (Al)	$396,0 \pm 3,0$	$280,0 \pm 7,0$
Antimônio (Sb)	$16,3 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,1$
Arsênio (As)	$136,0 \pm 2,0$	$69,0 \pm 4,0$
Bário (Ba)	$223,0 \pm 2,0$	$115,4 \pm 8,0$
Berílio (Be)	$0,10 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$
Cálcio (Ca)	$2320,0 \pm 25,0$	$2385,0 \pm 32,0$
Chumbo (Pb)	$73,5 \pm 0,9$	$3,8 \pm 0,1$
Cobalto (Co)	$0,98 \pm 0,01$	$0,39 \pm 0,03$
Cromo (Cr)	$14,5 \pm 2,1$	$10,0 \pm 1,0$
Estrôncio (Sr)	$22,6 \pm 0,4$	$20,1 \pm 0,2$
Ferro (Fe)	$693,0 \pm 12,0$	$248,0 \pm 15,0$
Lítio (Li)	$2,9 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,2$
Magnésio (Mg)	$523,0 \pm 12,0$	$504,0 \pm 13$
Manganês (Mn)	$31,4 \pm 0,4$	$12,7 \pm 0,3$
Níquel (Ni)	$17,2 \pm 0,4$	$8,8 \pm 0,2$
Potássio (K)	$12130,0 \pm 32,0$	$12380,0 \pm 45,0$
Prata (Ag)	$58,0 \pm 1,0$	$55,0 \pm 6,0$
Selênio (Se)	$19,0 \pm 2,0$	$0,08 \pm 0,02$
Urânio (U)	$0,1 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$
Vanádio (V)	$58,0 \pm 1,0$	$34,0 \pm 2,0$
Zinco (Zn)	$641,0 \pm 12,0$	$68,0 \pm 1,0$

4.2 Caracterização inicial dos embriões de galinha

Uma vez definido como principal foco deste estudo a avaliação das células de Purkinje em estágio inicial de ocorrência da sinaptogênese (E18), a observação do estágio de desenvolvimento dos animais a serem incluídos no estudo configura uma premissa da maior importância. Desta forma, decorridos dezoito dias de incubação (E18) os animais dos grupos controle (intacto e salina) e dos grupos submetidos à dose de 1,5 µg e 20,0 µg de PM_{2,5} foram avaliados quanto ao estágio de desenvolvimento alcançado de acordo com a classificação de Hamburger e Hamilton (1951) que tem como base, para este estágio, o comprimento do bico e do terceiro dedo. Os animais vivos avaliados apresentaram desenvolvimento correspondente ao estágio HH42-43 e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos deste estudo.

A análise de características externas como morfologia do bico, globo ocular e pálpebras, abdômen e patas dos animais em estágio HH42-43 não indicou a presença de malformações nos animais. Da mesma maneira, não foi constatado retardo no estágio de desenvolvimento destas estruturas em relação ao esperado para animais nesta fase do desenvolvimento.

Análises complementares do cerebelo de animais no 16º dia de desenvolvimento embrionário foram realizadas e, para tanto, os animais em

E16 e em estágio HH41-42, conforme classificação de Hamburger e Hamilton (1951), foram avaliados em relação aos parâmetros acima citados. Da mesma forma que os animais E18, não foram observadas diferenças significativas na massa corpórea e em relação à ocorrência de malformações externas entre os grupos controle (intacto e salina) e os grupos submetidos ao PM_{2,5} nas doses de 1,5 µg e 20,0 µg.

As análises referentes à massa corpórea dos animais em E18 bem como, à massa do cerebelo e do teto óptico não indicaram diferenças significativas entre os grupos avaliados neste estudo. O valor médio da massa corpórea dos animais do grupo CI (controle intacto) foi igual a 20,3g ± 3,52 (n=49), no grupo salina igual a 19,35g ± 2,92 (n=53) e, no grupo FI (falso injetado) igual a 18,91g ± 4,42 (n=15). Animais submetidos ao PM_{2,5} na dose de 1,5 µg apresentaram valor médio da massa corpórea igual a 20,29g ± 2,78 (n=31) e, os submetidos à dose de 20,0µg, o valor apresentado foi igual a 18,89g ± 3,24 (n=35).

Em relação à massa do cerebelo, os valores médios observados foram iguais a 0,096g ± 0,03 e 0,095g ± 0,02 no grupo CI (n=14) e salina (n=14), respectivamente. Nos animais submetidos ao PM_{2,5} nas doses de 1,5µg (n=20) e 20,0µg (n=21), os valores médios foram iguais a 0,093g ± 0,02 e 0,09g ± 0,02 (n=21), respectivamente.

Tetos ópticos de 16 animais destinados à determinação de elementos traço apresentaram valores médios de massa iguais a $0,14\text{g} \pm 0,03$ nos animais do grupo CI ($n=4$) e de $0,13\text{g} \pm 0,01$ nos animais do grupo salina ($n=4$). Animais submetidos ao $\text{PM}_{2,5}$ apresentaram valores iguais a $0,16\text{g} \pm 0,03$ e $0,14\text{g} \pm 0,03$ nos grupos submetidos à dose de $1,5\mu\text{g}$ ($n=4$) e de $20,0\mu\text{g}$ ($n=4$), respectivamente. Os valores foram dados como média $\pm$ DP.

As condições artificiais de incubação às quais os ovos embrionados foram submetidos se mostraram adequadas ao desenvolvimento e à sobrevivência dos embriões. Do total de 191 ovos férteis incubados, foi observada mortalidade média dos embriões da ordem de 13,3%. Os ovos foram avaliados quanto à sobrevivência dos embriões apenas nos momentos especificados neste estudo (E16 e E18) e, portanto, não foi possível determinar o estágio de ocorrência da morte dos embriões. Animais com massa corpórea média igual a $4,55\text{g} \pm 1,8$ corresponderam a 7,7% das mortes; os 5,6% restantes, corresponderam a animais classificados em estágios de desenvolvimento entre HH40 e HH42 (Hamburger e Hamilton, 1951).

4.3 Perfil de elementos traço em estruturas encefálicas

A determinação das concentrações de elementos traço no cerebelo e tetos ópticos de animais no 18º dia de desenvolvimento embrionário realizada por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) revelou as concentrações de cobre, magnésio, manganês, selênio, tálio e zinco significativamente menores nos animais submetidos a PM_{2,5} (1,5µg e 20,0µg) em comparação aos grupos intacto e/ou salina.

Dentre os elementos analisados, foram observadas diferenças significativas entre as duas doses de PM_{2,5} empregadas neste estudo apenas com exceção em relação ao tálio. Outros elementos detectados como chumbo, cobalto, platina e urânio apresentaram concentrações sem diferença significativa entre os grupos deste estudo nas estruturas encefálicas avaliadas (FIGURA 2). Os elementos estrôncio, mercúrio e molibdênio sempre estiveram em concentrações menores que o limite de detecção. Os valores obtidos a partir das análises são apresentados na tabela 2.

FIGURA 2A: Perfil de elementos traço no cerebelo e teto óptico (TO) de animais submetidos a PM_{2,5} (1,5µg e 20,0µg) e grupos controle (CI: intacto; S: salina) determinada pelo método de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). A – Elementos cobre, magnésio, manganês com variações significativas entre grupos submetidos a PM_{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg) e controles (CI: intacto e S: salina). Barra de erro ± 1DP; *p≤0,05 em relação ao grupo salina

FIGURA 2B: Perfil de elementos traço no cérebro e tecto óptico (TO) de animais submetidos a PM_{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg) e grupos controle (CI: intacto; S: salina) determinada pelo método de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). (continuação de A) B – Elementos selênio, tálio e zinco com variações significativas entre grupos submetidos a PM_{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg) e controles (CI: intacto e S: salina). Barra de erro $\pm$ 1DP; * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo salina

FIGURA 2C: Perfil de elementos traço no cerebelo e teto óptico (TO) de animais submetidos a $PM_{2,5}$ (1,5 µg e 20,0 µg) e grupos controle (CI: intacto; S: salina) determinada pelo método de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). (continuação da figura B) C – Elementos chumbo, cobalto, platina e urânio com ausência ou pequena diferença entre grupos submetidos a $PM_{2,5}$ (1,5 µg e 20,0 µg) e controles (CI: intacto e S: salina) $PM_{2,5}$ e controles. Barra de erro $\pm 1DP$

TABELA 2: Perfil de elementos traço no cerebelo e teto óptico (TO) de animais submetidos a PM_{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg) e dos grupos controle (CI: intacto; salina) no 18º dia de desenvolvimento embrionário. A determinação dos elementos foi realizada pelo método de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Valores são apresentados como média ± DP. *p≤0,05 em relação ao grupo salina; cerebelo n=5; TO n=4

Concentração elementar (ηg.g ⁻¹)					
GRUPOS					
ELEMENTO	ESTRUTURA	CI	Salina	1,5µg	20,0µg
Chumbo (Pb)	Cerebelo	0,73 ± 0,26	0,53 ± 0,50	0,50 ± 0,0	0,53 ± 0,05
	TO	0,50 ± 0,00	0,53 ± 0,50	0,55 ± 0,01	0,60 ± 0,12
Cobalto (Co)	Cerebelo	0,32 ± 0,45	0,30 ± 0,00	0,30 ± 0,00	0,34 – 0,51
	TO	0,30 ± 0,00	0,30 ± 0,00	0,30 ± 0,00	0,32 ± 0,50
Cobre (Cu)	Cerebelo	503,60 ± 8,88	336,40 ± 35,60	343,80 ± 66,55	214,80 ± 31,07*
	TO	764,50 ± 35,58	534,19 ± 16,18	436,63 ± 17,93*	336,50 ± 32,79*
Magnésio (Mg)	Cerebelo	76033,1 ± 8646,7	69517,0 ± 3549,2	48981,9 ± 7460,4*	36519,4 ± 1335,2*
	TO	69093,3 ± 3260,4	55502,3 ± 2009,1	38227,0 ± 2408,7*	31577,8 ± 2406,9*
Manganês (Mn)	Cerebelo	142,40 ± 25,64	103,60 ± 11,08	69,00 ± 13,93*	20,20 ± 12,93*
	TO	148,75 ± 19,14	89,50 ± 2,08	62,75 ± 7,18*	39,75 ± 1,71*
Platina (Pt)	Cerebelo	0,47 ± 0,13	0,24 ± 0,9	0,18 ± 0,02	0,25 ± 0,97
	TO	0,15 ± 0,05	0,18 ± 0,7	0,12 ± 0,04	0,22 ± 0,13
Selênio (Se)	Cerebelo	86,10 ± 14,24	70,40 ± 3,36	53,80 ± 7,29*	27,80 ± 4,09*
	TO	83,50 ± 3,11	36,00 ± 1,41	45,50 ± 4,12*	27,00 ± 2,58*
Tálio (Tl)	Cerebelo	0,71 ± 0,15	0,34 ± 0,64	0,18 ± 0,16*	0,04 ± 0,01*
	TO	0,46 ± 0,9	0,25 ± 0,06	0,13 ± 0,01*	0,08 ± 0,01*
Urânio (U)	Cerebelo	0,28 ± 0,03	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,01 ± 0,01
	TO	0,02 ± 0,00	0,2 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Zinco (Zn)	Cerebelo	5456,0 ± 306,3	4348,6 ± 174,7	2965,1 ± 166,6*	2358,8 ± 120,6*
	TO	3933,0 ± 149,0	3025,0 ± 50,0	2241,8 ± 125,8*	1811,0 ± 113,6*

A análise da concentração dos elementos zinco, manganês e selênio no cerebelo dos animais mostrou valores significativamente menores no grupo salina quando comparados ao grupo CI e, também, nos grupos PM 1,5µg e PM 20,0µg quando comparados aos controles. A concentração de magnésio apresentou diferença entre os grupos submetidos a PM_{2,5} (1,5µg e 20,0µg) e, também, quando estes foram comparados aos controles (CI e Salina).

De maneira similar, a concentração de tálio foi significativamente diferente entre os grupos controle e, também, entre os grupos submetidos ao PM_{2,5} (1,5µg e 20,0µg), porém, não foi estabelecida relação dose resposta. Deste modo, em relação ao zinco, manganês, selênio, magnésio e tálio foi observado decréscimo na concentração em função inversa ao aumento da dose de PM_{2,5} às quais os animais foram submetidos.

A análise da concentração dos elementos cobalto, chumbo e urânio não indicou diferenças significativas entre os grupos controle e os submetidos a PM_{2,5}. Os elementos arsênio, antimônio, cádmio, mercúrio, molibdênio estiveram abaixo do limite de detecção.

Tetos ópticos dos animais também foram submetidos à avaliação pelo método de ICP-MS com o intuito de melhor caracterizar a concentração dos elementos essenciais e tóxicos no tecido encefálico. A opção por esta

estrutura foi baseada no valor de sua massa, superior a do cerebelo em cerca de 50% e, também, na simplicidade de sua dissecação em aves.

Padrões similares de variação na concentração dos elementos foram observados entre o cerebelo e o teto óptico do mesmo modo em que níveis de significância semelhantes foram estabelecidos entre os grupos nos pós testes realizados (FIGURA 2).

As análises de correlação referente às concentrações dos elementos magnésio, selênio, tálio e zinco entre cerebelo e teto óptico indicaram que estas estruturas foram forte e positivamente relacionadas (R de Pearson superiores a 0,9; $p \leq 0,01$). Também foram observados índices de correlação superiores a 0,8 ($p \leq 0,01$) entre cerebelo e o teto óptico relativo à concentração dos elementos cobre e manganês.

4.4 Densidade de células de Purkinje

Análises morfométricas realizadas em imagens digitais de secções para-medianas da folha VI do cerebello de embriões no 16º e no 18º dia de desenvolvimento embrionário revelaram a ocorrência de alterações na densidade de células de Purkinje nos grupos submetidos a PM_{2,5} em relação à densidade observada nos grupos controle.

Neste estudo, o córtex da folha VI do cerebello foi empregado como compartimento de referência tanto para a determinação da densidade de células de Purkinje como para a determinação da densidade de dendritos destas células. As diferentes marcações propostas para estudo das células de Purkinje neste estudo foram avaliadas quanto à área do córtex cerebelar e não revelaram diferenças significativas entre os grupos de animais de mesma idade embrionária. Os valores referentes à área do córtex cerebelar de animais E16 e E18 avaliados com marcação por imuno-peroxidase dirigida à calbindina estão ilustrados na figura 3.

A análise da densidade de células de Purkinje (N_{PURKINJE}) de animais no 18º dia de desenvolvimento embrionário (E18) avaliadas em secções submetidas à coloração de Giemsa e à marcação com anticorpo dirigido à calbindina por imuno-peroxidase revelou a eficiência da marcação com este anticorpo para avaliação da totalidade destas células. Além disso, as

marcações foram capazes de demonstrar a organização das camadas do córtex cerebelar evidenciando as células de Purkinje em monocamada (FIGURA 4). Os dados deste estudo mostraram alta correlação entre os métodos de marcação empregados (Giemsa e imuno-peroxidase dirigido à calbindina) (R de Pearson de 0,755; $p \leq 0,01$). Os pós-testes realizados indicaram semelhantes níveis de significância entre os controles (intacto e salina) e os grupos submetidos ao $PM_{2,5}$ considerando $p \leq 0,05$. Os valores obtidos empregados na análise são apresentados na tabela 3.

FIGURA 3: Área do córtex na folha VI do cerebelo de animais em E16 e E18 avaliada em secções paramedianas submetidas à reação por imuno-peroxidase com anticorpo dirigido à calbindina nos grupos expostos ao material particulado fino nas concentrações de 1,5µg e 20,0µg e nos controles intacto e salina. Observe a ausência de diferença significativa entre os grupos nos dois momentos do desenvolvimento avaliados. Barra de erro $\pm 2DP$

TABELA 3: Densidade de células de Purkinje (CP) no córtex cerebelar da folha VI de animais em E16 e E18 submetidos à coloração de Giemsa e à marcação com anticorpo dirigido à calbindina (CB) nos grupos controles (intacto, falso injetado e salina) e nos grupos submetidos a PM_{2,5} (1,5µg e 20,0µg). Os valores são dados como média ± DP. *p≤0,05 em relação ao grupo salina

		Densidade de células de Purkinje (CP.mm ⁻²)		
		E18		E16
GRUPO		GIEMSA (n = 5)	CB (n = 7)	CB (n = 5)
CONTROLE	Intacto	139,65 ± 7,7	120,06 ± 6,0	107,59 ± 7,0
	Falso injetado	138,06 ± 6,1	123,45 ± 4,4	104,20 ± 4,2
	Salina	140,04 ± 4,8	116,76 ± 10,1	105,43 ± 3,9
PM _{2,5}	1,5 µg	127,30 ± 6,2 *	95,66 ± 6,0 *	106,20 ± 3,8
	20,0 µg	112,76 ± 5,4 *	89,62 ± 3,4 *	85,98 ± 1,4*

A avaliação de animais dos grupos controle intacto (CI) e falso injetado (FI) no 18º dia de desenvolvimento embrionário, realizada a fim de averiguar interferências decorrentes do processo de perfuração da casca dos ovos, não mostrou diferença significativa entre os grupos. Em ambos os grupos, foram observadas células de Purkinje dispostas em monocamada no córtex cerebelar e a análise dos valores de densidade destas células submetidas à coloração de Giemsa e à marcação com anticorpo dirigido à calbindina não revelou diferenças significativas entre os métodos confirmando, deste modo, a ausência de interferência do processo de perfuração da casca do ovo sobre a densidade de células de Purkinje (FIGURA 4). De posse destes resultados, os demais testes propostos foram realizados considerando como os grupos CI e Salina como controles.

FIGURA 4: Imagens digitais de secções paramedianas do cerebelo de embriões de galinha no 18º dia de desenvolvimento embrionário ilustrando a região do córtex cerebelar da folha VI (CG: camada granular; CP: camada de células de Purkinje; CM: camada molecular). O material foi submetido à coloração de Giemsa e à imuno-peroxidase dirigida à calbindina (CB). Note a equivalência existente entre os métodos, a eficiente distinção da camada de células de Purkinje na marcação com calbindina e a semelhança entre os animais dos grupos controles (CI: controle intacto; FI: falso injetado; S: salina). Barra de escala 50µm

4.4.1 Densidade de células de Purkinje CB-positivas em animais E18

A análise da densidade de células de Purkinje em animais no 18º dia de desenvolvimento embrionário em secções marcadas com anticorpo dirigido à calbindina por imuno-peroxidase indicou menor densidade destas células no cerebelo dos animais submetidos a PM_{2,5} nas doses de 1,5µg e 20,0µg em relação aos animais dos grupos CI e salina ($p \leq 0,05$).

Considerando que a densidade de células de Purkinje foi estabelecida baseada na relação entre seu número e a área do compartimento de referência (neste estudo, córtex cerebelar da folha VI) e que não ocorreram variações nesta área entre os grupos, é possível atribuir a menor densidade de células observadas nas secções da folha VI à variação do número das células de Purkinje.

A análise da densidade de células não indicou relação dose-dependente uma vez que não houve diferença significativa na densidade de células de Purkinje entre as doses de PM avaliadas (TABELA 3; FIGURAS 5 e 6).

FIGURA 5: Imagens digitais de secções paramedianas do cerebelo de embriões de galinha no 18º dia de desenvolvimento embrionário ilustrando a região do córtex cerebelar da folha VI (CG: camada granular; CP: camada de células de Purkinje; CM: camada molecular). O material foi submetido à coloração de Giemsa e à imuno-peroxidase dirigido à calbindina (CB). Note a menor densidade de células de Purkinje em nos grupos submetidos ao material particulado fino (1,5µg e 20,0µg) em comparação aos grupos controles (CI: controle intacto; S: salina). Barra de escala 50µm

FIGURA 6: Densidade de células de Purkinje no córtex cerebelar (Folha VI) de animais no 18º dia de desenvolvimento embrionário submetidos ao material particulado fino (1,5µg e 20,0 µg) e controles (intacto e salina) marcadas pela coloração de Giemsa e com anticorpo dirigido à calbindina (CB). Observe a menor densidade de células nos grupos submetidos ao material particulado em relação aos grupos controles em ambas as marcações. * $p \leq 0,05$ em relação aos controles; barra de erro $\pm 2DP$

4.4.2 Densidade de células de Purkinje CB-positivas em animais E16

Análises referentes à densidade de células de Purkinje no cerebelo de embriões no 16º dia de desenvolvimento embrionário (E16) (HH40-41) revelaram a ocorrência de menor densidade das células de Purkinje no córtex cerebelar de animais submetidos a $PM_{2,5}$ na doses de 20,0µg em relação aos animais dos grupos CI e salina ($p \leq 0,05$). Análise dos valores referentes aos animais submetidos à dose de 1,5 µg não indicou diferença significativa em comparação com os grupos controles como ilustrado na figura 7.

FIGURA 7: Densidade de células de Purkinje no córtex cerebelar (Folha VI) de animais no 16º dia de desenvolvimento embrionário submetidos ao material particulado fino (1,5µg e 20,0 µg) e controles (CI: intacto; salina) marcadas por imuno-peroxidase com anticorpo dirigido à calbindina (CB). Observe a menor densidade de células no grupo submetido ao material particulado (20,0µg) em relação aos grupos controles e ao grupo submetido a 1,5µg. * $p \leq 0,05$ em relação aos controles; barra de erro $\pm 2DP$

Os animais em E18 submetidos a $PM_{2,5}$ nas doses de 1,5 μg e 20,0 μg apresentaram, respectivamente, diminuição de 18% e de 23% na densidade de células de Purkinje nas secções avaliadas quando comparados aos animais do grupo salina. Dentre os animais avaliados no 16º dia de desenvolvimento embrionário, os submetidos à dose de 20,0 μg de $PM_{2,5}$ apresentaram diminuição da densidade de células de Purkinje da ordem de 18% em relação ao grupo salina. Portanto, quando comparamos grupos em E16 e E18 submetidos a diferentes concentrações de $PM_{2,5}$, observamos que os animais submetidos à dose de 20,0 μg já apresentavam um menor número de células de Purkinje em E16 e que esta redução foi mantida nos animais avaliados em E18 enquanto mudanças decorrentes da dose de 1,5 μg foram observadas apenas nos animais em E18.

A observação de menor densidade de células de Purkinje no cerebelo dos animais nos levou a investigar alguns aspectos bioquímicos, além de outros parâmetros celulares, que pudessem contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos nas mudanças relacionadas à densidade de células de Purkinje observadas em animais submetidos a $PM_{2,5}$.

4.5 Expressão de BDNF no cerebelo

A avaliação de células de Purkinje em secções submetidas à reação de imuno-fluorescência com anticorpo dirigido ao BDNF revelou ocorrência de menor densidade de células BDNF-positivas em animais submetidos à 20,0 µg de PM_{2,5} quando comparados aos animais dos grupos controles (CI e salina) e aos animais submetidos à 1,5 µg de PM_{2,5} ($p \leq 0,05$) (Figura 8; Tabela 4).

A análise relativa à expressão de BDNF no cerebelo, avaliada pelo método de *immunoblotting*, indicou menor expressão desta neurotrofina no cerebelo de animais submetidos à dose 20,0 µg de PM_{2,5} em relação aos demais grupos avaliados neste estudo. O resultado da análise da expressão de BDNF corroborou os dados obtidos pelo método de imuno-fluorescência com o anticorpo dirigido ao BDNF em secções da folha VI do cerebelo. (FIGURA 9). Os valores médios da razão BDNF/ β -actina obtidas dos grupos CI, salina e do grupo submetido a 1,5 µg de PM_{2,5} não apresentaram diferenças significativas. Os valores obtidos da análise densitométrica, expressos como a razão BDNF/ β -actina e, foram iguais a $1,07 \pm 0,12$ no grupo CI e a $0,82 \pm 0,09$ no grupo salina. Nos grupos submetidos a PM_{2,5}, valores iguais a $0,73 \pm 0,13$ e $0,58 \pm 0,03$ foram obtidos nas doses de 1,5 µg e 20,0µg, respectivamente.

FIGURA 8. Imagens digitais de secções do cerebelo de embriões de galinha no 18º dia de desenvolvimento embrionário ilustrando células de Purkinje (CP) no córtex cerebelar submetidas à co-localização por imuno-fluorescência com anticorpos dirigidos à calbindina (CB+) e ao fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF+). Ocorrência de co-localização indicada por cor laranja (seta). Barra de escala 50µm

FIGURA 9: Expressão de BDNF no cerebelo de animais submetidos a PM_{2,5} (1,5 μg e 20,0 μg) e dos grupos controle (CI: controle intacto; S:salina) avaliados por *immunoblotting* e por imuno-peroxidase. A – *Immunoblots* de BDNF e controle β-actina das amostras; B – Razão entre os valores obtidos da análise densitométrica entre a expressão de BDNF e β-actina; C – Densidade de células BDNF+ na folha VI do cerebelo. *p≤0,05; Barra de erro ± 2DP

TABELA 4: Densidade de células de Purkinje (CP) no córtex cerebelar (Folha VI) de animais no 18º dia de desenvolvimento embrionário submetidas à marcação anticorpos dirigidos a BDNF e caspase (CAS-3) nos grupos controle (CI: intacto; Salina) e nos grupos ao PM_{2,5} (1,5µg e 20,0µg. Os valores dados como média ± DP. *p≤0,05 em relação ao grupo salina

GRUPOS		Densidade de células de Purkinje(CP.mm ⁻²)	
		BDNF (n = 5)	CAS-3 (n = 5)
CONTROLE	CI	103,55 ± 5,18	28,04 ± 2,94
	Salina	96,79 ± 6,78	28,47 ± 1,58
PM _{2,5}	1,5µg	97,84 ± 7,19	30,61 ± 1,75
	20,0µg	73,93 ± 5,85*	33,53 ± 6,05

4.6 Densidade de células de Purkinje caspase positivas

A análise relativa à marcação de células de Purkinje por imunoperoxidase com anticorpo dirigido à caspase em animais no 18º dia de desenvolvimento embrionário não revelou diferenças significativas entre aqueles submetidos a PM_{2,5} nas doses de 1,5 e 20,0 µg e os animais dos grupos controles (intacto e salina) ($p \leq 0,05$) (TABELA 4). Embora não tenha sido observado diferenças significativas entre os grupos, os valores de p obtidos na comparação entre o grupo 20,0 µg de PM_{2,5} em relação aos controles intacto e salina foram iguais a 0,067 e 0,138, respectivamente. A avaliação de células caspase-positivas levou em consideração apenas as células com intensa marcação como ilustrado na figura 10. Os valores obtidos são observados na tabela 4.

FIGURA 10. Marcação por imunoperoxidase com anticorpo dirigido à caspase 3 (CAS) na folha VI do cerebelo de animais submetidos ao $PM_{2,5}$ nas doses de 1,5 μg e 20,0 μg e de animais dos grupos controles (CI: intacto; S: Salina) avaliados no 18º dia de desenvolvimento embrionário. A – Imagens digitais de secções para-medianas do cerebelo ilustrando células de Purkinje caspase-positivas; B – Densidade de células de Purkinje CAS+. $p=0,067$ e $p=0,138$ foram obtidos em comparação entre o grupo 20,0 μg e controles intacto e salina, respectivamente. Barra de escala 50 μm ; Barra de erro ± 2 DP

4.7 Estresse oxidativo no cerebelo

A análise de elementos indicativos de aumento da geração de espécies reativas não revelou diferenças significativas na concentração de MDA e na oxidação da di-hidro-etidina no cerebelo de animais avaliados no 18º dia de desenvolvimento embrionário submetidos ao PM_{2,5} nas doses de 1,5 µg e 20,0µg em comparação aos grupos controle (intacto e salina)

Embora a concentração de MDA, diretamente relacionado às espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), não tenha indicado diferença significativa entre os grupos deste estudo, foi possível observar uma leve queda nos valores médios nos animais submetidos ao PM_{2,5} em relação aos animais controles com valores de p iguais a 0,153 e a 0,327 nos grupos 1,5 µg e 20,0 µg em relação ao controle intacto, respectivamente (FIGURA 11A).

A fluorescência total derivada da reação com DHE permitiu a análise da produção de espécies reativas de oxigênio em secções histológicas do cerebelo dos animais sem distinguir o hidroxietídio e o etídio que são os produtos fluorescentes derivados desta reação. A avaliação da fluorescência total derivada da reação com DHE foi dirigida à camada molecular e às camadas de células de Purkinje e granular conjuntamente, a fim de melhor retratar as respostas do córtex cerebelar frente à oxidação da DHE. Desta

forma, a intensidade de fluorescência apresentou marcantes diferenças entre as camadas analisadas com valores superiores no conjunto das camadas granular e de Purkinje. A diferença observada é devida às características de suas células uma vez que a camada granular é composta por pequenos, porém numerosos neurônios e que as células de Purkinje possuem tamanho bastante superior em relação aos demais neurônios do córtex cerebelar, em contrapartida da menor celularidade da camada molecular interna. Deste modo, embora com intensidades diferentes, a intensidade da fluorescência não variou significativamente entre os grupos deste estudo em nenhuma das camadas definidas para sua avaliação ($p \geq 0,05$) (FIGURA 12).

Quanto à presença de anti-oxidantes no cerebelo dos animais, não foi observada diferença significativa na atividade da SOD entre os grupos submetidos ao $PM_{2,5}$ (1,5 μg e 20,0 μg) quando comparados aos controles (CI e salina). Apesar de não significativa, uma pequena diminuição nos valores médios foi observada nos grupos submetidos a 20,0 μg de $PM_{2,5}$ em relação aos controles (FIGURA 11B).

Dentre as análises propostas para determinação de compostos diretamente relacionados ao estresse oxidativo, a determinação da atividade de catalase foi a que revelou diferenças significativas entre os grupos submetidos ao $PM_{2,5}$ e controles. Desta forma, foi observada maior atividade desta enzima no cerebelo de animais dos grupos submetidos ao $PM_{2,5}$ nas

doses de 1,5 µg e 20,0 µg quando comparados aos controles (CI e salina) ($p \leq 0,05$) (FIGURA 11C). O aumento verificado foi da ordem de 32,5% e de 28,7% nas doses de 1,5 µg e 20,0 µg de PM_{2,5}, respectivamente, em relação à atividade da catalase nos animais do grupo salina. Os valores médios obtidos das análises de MDA, DHE, SOD e catalase são apresentados na tabela 5.

FIGURA 11: Representação gráfica da concentração de MDA e da atividade das enzimas SOD e catalase no cerebelo de animais submetidos ao PM_{2.5} nas doses de 1,5 µg e 20,0 µg e de animais dos grupos controle (CI: intacto e S: salina) avaliados no 18º dia de desenvolvimento embrionário. A – concentração de MDA; B – atividade da SOD; C – atividade da catalase com diferença significativa em relação aos grupos controles (*). Não foram constatadas diferenças entre os grupos deste estudo quanto à concentração de MDA e à atividade da SOD ($p \geq 0,05$). Barra de erro: $\pm 2SD$

FIGURA 12: Oxidação da DHE nas folhas VI-VII do cerebelo de animais submetidos ao PM_{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg) e de animais dos grupos controle (CI: intacto e S: salina) avaliados no 18º dia de desenvolvimento embrionário. A – Imagens digitais de secções para-medianas do cerebelo ilustrando as camadas do córtex (CG: camada granular; CP: camada de células de Purkinje; CM: camada molecular) submetido à reação com DHE (filtro TRITC); B – Avaliação da intensidade de fluorescência no córtex cerebelar considerando o conjunto das camadas de células de Purkinje e granular (CP+CG) e, separadamente, a camada molecular (CM). Não foram constatadas diferenças entre os grupos deste estudo ($p \geq 0,05$). Barra de escala 50µm; núcleo de célula de Purkinje (seta); UA: unidades arbitrárias; barra de erro $\pm 2DP$

Tabela 5: Avaliação de moléculas relacionadas ao estresse oxidativo em cerebelo de animais no 18º dia de desenvolvimento embrionário submetidos a PM_{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg) e controles intacto e salina. (MDA: malonaldeído; DHE:di-hidro-etidina; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase). † Massa de proteínas totais; ‡ Folhas VI e VII do cerebelo; UA: unidades arbitrárias, *p≤0,05 em relação aos controles

GRUPO		MDA (n=6)	DHE ‡ (n = 3)		CAT (n=6)	SOD (n=6)
		(nmol MDA.mg ⁻¹ †)	CP /CG (UA)	CM (UA)	(pmol CAT.mg ⁻¹ †)	(U SOD.mg ⁻¹ †)
Controle	Intacto	0,793 ± 0,3	2,04 ± 0,2	1,22 ± 0,1	185,51 ± 23,5	31,83 ± 3,6
	Salina	0,696 ± 0,2	2,37 ± 0,2	1,34 ± 0,2	195,06 ± 16,2	31,92 ± 6,0
PM _{2,5}	1,5µg	0,514 ± 0,1	2,35 ± 0,3	1,47 ± 0,1	258,44 ± 36,1 *	29,64 ± 6,2
	20,0µg	0,673 ± 0,2	2,26 ± 0,2	1,52 ± 0,2	250,99 ± 44,1 *	26,96 ± 4,4

4.8 Densidade de dendritos de células de Purkinje

A avaliação da densidade de dendritos das células de Purkinje, que corresponde ao comprimento destas estruturas no córtex cerebelar, foi capaz de identificar características distintas entre grupos correspondentes de animais submetidos a PM e controles avaliados no 16º e no 18º dia desenvolvimento embrionário por meio de sistema com linhas ciclóides. O método empregado expressa o comprimento dos dendritos em função da área de referência e, como relatado anteriormente (item 4.4), a área do córtex cerebelar não variou significativamente entre os grupos de animais em igual estágio de desenvolvimento (FIGURA 3). Da mesma maneira, a estimativa do comprimento de dendritos por célula de Purkinje no compartimento de referência também revelou a relação distinta entre animais em E16 e em E18. Além disso, a avaliação da densidade de dendritos frente à calbindina, um marcador neuronal, e a MAP2, um marcador de microtúbulos, indicou a eficiência da marcação por calbindina na determinação de variações estruturais. Os valores obtidos na avaliação estão descritos na tabela 6.

Tabela 6: Densidade de dendritos das células de Purkinje no córtex cerebelar (Folha VI) do cerebelo de animais no 18º dia de desenvolvimento embrionário submetidos à reação de imuno-peroxidase com anticorpos dirigidos à calbindina (CB) e a microtúbulos (Map2) nos grupos controle (intacto e salina) e nos grupos submetidos a PM_{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg). Os valores são dados como média ± DP. *p≤0,05 em relação aos controles intacto e salina

GRUPO		CB (n = 5)		Map2 (n =5)	
		E16	E18	E16	E18
Controle	Intacto	28,99 ± 4,2	45,45 ± 7,7	22,18 ± 3,0	45,26 ± 5,9
	Salina	25,59 ± 2,8	40,52 ± 7,9	18,36 ± 3,6	43,82 ± 3,3
PM _{2,5}	1,5 µg	22,95 ± 3,62	35,43 ± 4,2	16,06 ± 2,5	42,80 ± 4,8
	20,0 µg	25,99 ± 2,08	58,84 ± 6,9*	15,03 ± 4,6	57,62 ± 4,28*

4.8.1 Densidade de dendritos CB-positivos

A análise da densidade dos dendritos das células de Purkinje de animais em E18 avaliadas nas secções submetidas à marcação com anticorpo dirigido à calbindina revelou maior densidade de dendritos em relação ao córtex cerebelar em animais submetidos à dose de 20,0 µg de PM_{2,5} quando comparados aos controles (intacto e salina) e aos animais do grupo PM_{2,5} dose de 1,5 µg (FIGURAS 13 e 14). Esses resultados indicam, portanto, a ocorrência de maior extensão da árvore dendrítica uma vez que a área do córtex cerebelar não variou significativamente entre os grupos deste estudo.

A análise referente à densidade dos dendritos no cerebelo de embriões no 16º dia de desenvolvimento embrionário (E16) (estágio HH40-41) não revelou ocorrência de diferenças entre os grupos submetidos a PM_{2,5} e os grupos controles (FIGURA 13). Os valores obtidos na avaliação estão descritos na tabela 5.

FIGURA 13: Densidade dos dendritos de células de Purkinje na folha VI do cerebelo de animais submetidos ao PM_{2,5} (1,5µg e 20,0µg) e de animais dos grupos controle (intacto e salina) avaliados no 18º dia de desenvolvimento embrionário. A avaliação feita em secções submetidas à marcação por imuno-peroxidase com anticorpo dirigido à calbindina indicou aumento significativo na densidade de dendritos no córtex apenas no grupo submetido a 20,0µg de PM_{2,5}. Barra de erro $\pm$ 2DP; * $p \leq 0,05$ em relação aos controles

FIGURA 14: Imagens digitais de secções paramedianas do cerebelo de embriões de galinha submetidos ao PM_{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg) e os controles (CI: controle intacto; S: salina) ilustrando a região do córtex cerebelar (Folha VI) marcados por imuno-peroxidase com anticorpo dirigido à calbindina. A – animais no 16º dia de desenvolvimento embrionário e B - animais no 18º dia de desenvolvimento embrionário. CG: camada granular; CP: células de Purkinje; CM: camada molecular; Barras de escala A: 20 µm e B: 50µm

4.8.2 Densidade de dendritos MAP2-positivos

As análises da densidade de dendritos das células de Purkinje em animais em E18 e E16 realizadas em secções submetidas à marcação com anticorpo dirigido à microtúbulos (MAP2) corroboraram o resultado da marcação com anticorpo dirigido à calbindina obtido para cada um dos momentos do desenvolvimento dos animais. Animais em E18 submetidos 20,0 μg de $\text{PM}_{2,5}$ apresentaram a arborização dendrítica mais extensa em relação aos controles (FIGURA 15).

FIGURA 15: Imagens digitais do córtex cerebelar de embriões no 18º dia de desenvolvimento submetidos a $\text{PM}_{2,5}$ (1,5 μg e 20,0 μg) e os controles (CI: controle intacto; S: salina) marcados por reação de imuno-peroxidase com anticorpo dirigido a microtúbulos (MAP2). CG: camada granular; CP: células de Purkinje; CM: camada molecular; Barra de escala 50 μm

Desta forma, os animais em E18 submetidos à dose de 20,0 μg de $\text{PM}_{2,5}$ revelaram aumento significativo da densidade de dendritos no córtex cerebelar em relação aos grupos controle (intacto e salina) e ao grupo submetido à dose de 1,5 μg de $\text{PM}_{2,5}$. Já os animais no 16º dia de desenvolvimento embrionário avaliados frente à marcação com anticorpo dirigido à MAP2, não indicaram presença de diferenças significativas entre os grupos deste estudo (FIGURA 16). Nos animais em E18, o aumento da densidade de dendritos do grupo submetido a 20,0 μg de $\text{PM}_{2,5}$ foi da ordem de 45,21% na avaliação com calbindina e de 19,0% na avaliação com MAP2 quando comparados ao grupo controle salina.

FIGURA 16: Densidade dos dendritos de células de Purkinje na folha VI do cerebelo de animais submetidos ao $\text{PM}_{2,5}$ nas doses de 1,5 μg e 20,0 μg e de animais dos grupos controle (intacto e salina) avaliados no 18º dia de desenvolvimento embrionário. A avaliação feita em seções submetidas à marcação por imuno-peroxidase com anticorpo dirigido à microtúbulos (MAP2) indicou aumento significativo na densidade de dendritos no córtex apenas no grupo submetido a 20,0 μg de $\text{PM}_{2,5}$. Barra de erro $\pm$ 2DP; * $p \leq 0,05$ em relação aos controles

4.8.3 Comprimento linear de dendritos de células de Purkinje

Considerando a similaridade da avaliação da densidade de dendritos das células de Purkinje expressando calbindina e MAP2, a aferição do comprimento linear dos dendritos dos animais em E18 foi realizada em imagens digitais de secções marcadas por imuno-peroxidase com anticorpo dirigido à calbindina.

A análise dos valores médios relativos ao comprimento linear total dos dendritos dos animais submetidos à 1,5µg de PM_{2,5} revelou a ocorrência de dendritos 18,7% menores em relação aos animais do grupo salina. Por outro lado, em animais submetidos à 20,0µg de PM_{2,5}, foi constatada a ocorrência de dendritos 16,9% maiores quando igualmente comparados (FIGURA 17).

Os valores do comprimento dos dendritos indicaram diferenças significativas nos grupos submetidos ao PM_{2,5} e comparação aos controles (intacto e salina) tanto em relação à porção proximal dos dendritos como em relação ao comprimento total destas estruturas. Além disso, foi verificada diferença significativa no comprimento total dos dendritos entre as doses de PM_{2,5} deste estudo, indicando ocorrência de resposta dose-dependente ($P \leq 0,01$) (FIGURA 18; TABELA 5).

Figura 17: Relação percentual entre o comprimento linear de dendritos de células de Purkinje (Folha VI) dos grupos submetidos a $PM_{2,5}$ tomando como referência (100%) o valor obtido do grupo salina. Note a acentuada diminuição no comprimento de dendritos do grupo $PM_{1,5}$ µg, principalmente em sua porção distal, e o aumento da região proximal dos dendritos dos animais do grupo submetido a $PM_{2,5}$ na dose de 20,0 µg.

A análise dos valores do segmento proximal dos dendritos revelou a ocorrência do comprimento desta região 14,8% menor no grupo submetido a 1,5µg de $PM_{2,5}$ quando comparado ao grupo salina. No grupo submetido a 20,0 µg, o valor médio observado para esta região foi da ordem de 25,7% maior em relação ao grupo salina (Figura 18). Em relação aos valores do segmento proximal dos dendritos, foram observadas diferenças significativas quando os grupos submetidos ao $PM_{2,5}$ foram comparados entre si e aos controles intacto e salina ($p \leq 0,01$).

Figura 18. Comprimento linear médio de dendritos de células de Purkinje (folha VI) considerando as porções proximal e distal e sua somatória, representada pelo comprimento total das estruturas marcadas por imuno-peroxidase com anticorpo dirigido à calbindina nos grupos controle (intacto e salina) e os grupos submetidos a $PM_{2,5}$ nas doses de 1,5 µg e 20,0 µg. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo $PM_{20,0\mu g}$; ** $p \leq 0,01$ em relação aos controles; barra de erro $\pm 2DP$

A análise da somatória do comprimento das demais ordens de dendritos, denominada neste estudo de porção distal, não indicou diferenças significativas quando os grupos submetidos ao $PM_{2,5}$ foram comparados aos grupos controles. Entretanto, a análise dos valores médios revelou diferença significativa entre os grupos de animais submetidos a 1,5µg e 20,0 µg de $PM_{2,5}$ ($p \leq 0,01$). Não foram observadas diferenças significativas nas análises de comprimento de dendritos realizadas entre grupo CI e salina (Figura 18).

Os valores médios obtidos na aferição do comprimento dos dendritos estão descritos na tabela 5.

TABELA 7: Comprimento linear médio dos dendritos das células de Purkinje na folha VI do cerebelo de animais dos grupos dos submetidos a PM_{2,5} (1,5 µg e 20,0 µg) e controles (intacto e salina) nas categorias avaliadas. Os valores dados como média ± DP; valores mínimos e máximos entre parênteses. ** p≤0,01 e p≤0,05 em relação aos controles

Grupo		Comprimento linear médio de dendritos (µm)		
		Proximal	Distal	Total
Controle	Intacto	36,92 ± 4,7	43,07 ± 6,4	79,99 ± 6,8
	Salina	37,84 ± 1,6	43,24 ± 3,6	81,07 ± 4,2
PM _{2,5}	1,5µg	32,23 ± 2,8 **	33,69 ± 4,6*	65,91 ± 6,6 **
	20,0µg	47,57 ± 3,4 **	47,16 ± 9,1	94,73 ± 6,8 **

As análises de correlação indicaram o comprimento total dos dendritos positivamente relacionado às porções distais destas estruturas em todos os grupos avaliados. O índice de correlação (R de Pearson) entre o comprimento total e a porção distal dos dendritos foi igual a 0,743 no grupo CI e superior a 0,930 nos grupos salina e submetidos ao PM_{2,5} (p≤0,05). Participação destacada do comprimento do segmento proximal no comprimento total do dendrito foi observada apenas no grupo submetido à dose de 1,5 µg de PM_{2,5} uma vez que o índice de correlação obtido neste grupo foi igual a 0,817 (p=0,024). Nos grupos CI, salina e PM_{2,5} dose 20,0 µg os índices de correlação (R de Pearson) foram inferiores a 0,576 (p≥0,05).

DISCUSSÃO

5 Discussão

A poluição do ar é uma mistura complexa cujos componentes variam em função das características das fontes de emissão.

O ar da cidade de São Paulo apresenta características típicas das grandes metrópoles nas quais se observa a predominância de poluentes de origem veicular. Em relação ao material particulado que, em sua maior parte provem da combustão de diesel e gasolina, observa-se a ocorrência de diversos elementos adsorvidos ao núcleo de carbono como os metais, por exemplo, que imprimem características bastante peculiares a este particulado.

A composição e as propriedades físico-químicas do material particulado determinam sua toxicidade. As concentrações de arsênio, chumbo, cobre, platina, vanádio e zinco observadas na suspensão de material particulado fino ($PM_{2,5}$) empregada neste estudo, estão em concordância com a composição típica do material particulado de áreas com intenso tráfego de veículos automotores caracterizada anteriormente (Castanho e Artaxo, 2001; CETESB, 2002; Ynoue e Andrade, 2004; Carvalho-Oliveira et al., 2005).

A complexidade intrínseca da poluição do ar de origem urbana produz resultados com grande variabilidade tornando fundamental a realização de múltiplos experimentos para determinação de seus efeitos. Desta forma, o embrião de galinha parece ser um modelo adequado ao estudo dos efeitos da poluição do ar sobre o desenvolvimento uma vez que possibilita a experimentação de diferentes doses além da possibilidade de análise dos animais em diferentes momentos do desenvolvimento possibilitando a investigação dos mecanismos de ação envolvidos. O emprego deste modelo animal para a análise dos efeitos da poluição do ar e de seus possíveis mecanismos também possibilita excluir variáveis inerentes da exposição materna contribuindo para a redução da variabilidade dos resultados.

O presente estudo realizado com embriões de galinha expostos à dose única de material particulado fino da cidade de São Paulo mostrou que a fração particulada da poluição atmosférica foi capaz de promover alterações mensuráveis no cerebelo.

A sensibilidade do cerebelo dos embriões expostos à dose única de metais durante o desenvolvimento embrionário já foi demonstrada e está associada a respostas morfológicas e bioquímicas nesta estrutura (Carvalho et al., 2008; Müller et al., 2008).

Da mesma forma, o potencial embriotóxico dos metais presentes no ar da cidade de São Paulo já foi demonstrado em embriões de galinha indicando que a injeção no interior do saco aéreo de material particulado em suspensão aquosa é um método eficaz para a avaliação dos efeitos do material particulado (de Siqueira Bueno et al., 2010).

De maneira geral, os dados obtidos neste estudo corroboram os efeitos decorrentes da exposição pré-natal ao material particulado fino da cidade de São Paulo observados em roedores. Dentre os efeitos, destacam-se alterações e retardo no desenvolvimento além de maior mortalidade embrionária (Mohallem et al., 2005, Lichtenfels et al., 2007; Veras et al., 2008). Estudo realizado em embriões de galinha submetidos a PM_{10} ressalta a influência de metais em relação à embriotoxicidade desta fração da poluição atmosférica (de Siqueira Bueno, 2010).

Recentes relatos sugerem que o sistema nervoso central possa ser afetado de forma negativa por particulado ambiental além de poder sofrer efeitos de substâncias liberadas nas reações teciduais derivadas das afecções do sistema cardiovascular e respiratório (Stefanidou e Maraviella, 2004; Kern e Jones, 2006; Block e Calderón-Garcidueñas, 2007; Suglia et al., 2008; Zanchi et al., 2008; Block e Calderón-Garcidueñas, 2009). Estes relatos garantem a plausibilidade da realização de estudos epidemiológicos e

experimentais cujo foco recaia sobre as doenças neurodegenerativas e sua associação a fatores ambientais como poluição do ar.

A análise dos elementos traço presentes no cerebelo dos animais mostrou que a variação na concentração da maioria dos elementos analisados variou de maneira inversa em relação às concentrações de particulado fino testadas neste estudo.

O encéfalo é capaz de concentrar determinados metais para posterior uso metabólico e tem sido sugerido que a distribuição intracelular e a especiação de metais é um processo dinâmico que é influenciado por estímulos externos e fatores fisiológicos (Finney et al., 2010). Estudos que avaliaram a exposição de embriões de galinha frente a doses únicas dos metais metilmercúrio (0,1µg) e chumbo (28,0µg) mostraram a deposição destes elementos no cerebelo, especialmente na camada molecular, e no cérebro dos animais (Carvalho et al., 2008; Müller et al., 2008). Paradoxalmente, nossos dados indicaram que os animais expostos à maior concentração de material particulado fino apresentaram menores concentrações de diversos elementos traço quando comparados aos controles. Os resultados obtidos em relação ao cerebelo foram corroborados pela análise de elementos traço no teto óptico nos quais foram observados valores decrescentes na concentração de elementos como cobre, magnésio, manganês, selênio, tálio e zinco. Esses achados sugerem ocorrência de hiper

regulação de mecanismos envolvidos na detoxificação destes elementos uma vez que a toxicidade de vários destes tem sido descrita (Weiseman e Zereine, 2009).

Em diferentes estudos tem sido destacado o papel das metalotioneínas na detoxificação de metais. Estas proteínas intracelulares ligantes de metais apresentam um importante papel na homeostase de metais essenciais e no controle e detoxificação de metais não essenciais (Stankovic et al., 2007). Além disso, fortes correlações entre elevada expressão de metalotioneínas e danos causados pela ação de metais no encéfalo já foram relatadas (Hidalgo et al., 2001; West et al., 2004; Penkowa, 2006). Em vista do importante papel que as metalotioneínas desempenham em relação detoxificação de metais, a avaliação destas proteínas deve integrar estudos relativos aos possíveis mecanismos de ação do material particulado no sistema nervoso.

Este estudo não nos permite determinar os elementos metálicos foram os responsáveis pelos efeitos observados nas células devido à complexidade da composição do particulado fino de origem urbana. Embora os metais já tenham sido evocados em várias doenças que representem que afetam os sistemas nervoso, respiratório e cardiovascular, a ação tóxica de outros componentes adsorvidos ao material particulado fino urbano deve ser considerada.

Neste estudo, o sistema de coleta empregado não possibilitou a análise de elementos orgânicos uma vez que a análise destes elementos demanda quantidade de material particulado bastante superior. Por outro lado, a fração orgânica é relatada com maior toxicidade em relação à inflamação pulmonar observada em camundongos expostos ao material particulado proveniente da exaustão de diesel (Laks et al., 2008). Deste modo, a ação de componentes orgânicos do material particulado fino urbano sobre as células de Purkinje em desenvolvimento não deve ser descartada.

A exposição a baixas concentrações de material particulado fino de origem veicular promoveu ocorrência de menor densidade de células de Purkinje em relação aos controles. Além disso, o efeito observado neste estágio (E18) não foi dependente das concentrações de material particulado às quais os animais foram expostos.

A redução no número de células de Purkinje tem sido descrita como uma resposta aos efeitos da poluição do ar no sistema nervoso central (Calderón-Garcidueñas et al., 2003; Calderón-Garcidueñas et al., 2004; Campbell et al., 2005). Nossos dados também corroboram estudos nos quais a perda de células de Purkinje foi observada em animais expostos a metais pesados como arsênico, bismuto, cádmio, chumbo e mercúrio (Sorensen et al., 2000; Warfvinge, 2000; Kenntner et al., 2001; Sakamoto et al., 2002;

Stoev et al., 2003; Piao et al., 2005). Além disso, a despopulação destas células é citada como a mais reprodutível observação patológica em autópsias de encéfalos de autistas (Kern e Jones, 2006).

A despopulação neuronal observada na folha VI do cerebelo não pareceu estar relacionada à apoptose das células de Purkinje uma vez que a taxa de apoptose destas células nos animais avaliados em E18 não variou de forma significativa entre os grupos.

A apoptose é um mecanismo bastante estudado na degeneração celular induzida por compostos metálicos presentes na poluição do ar de origem veicular. Sugamata et al. (2006) reportaram diminuição significativa de células de Purkinje além de aumento destas células marcadas com anticorpo dirigido à caspase-3 em camundongos expostos à material particulado proveniente da exaustão de diesel durante o desenvolvimento embrionário.

Entretanto, uma vez que a apoptose é capaz de atingir diferentes tipos celulares durante o desenvolvimento, inclusive neuroblastos e neurônios pós mitóticos antes ou após de seus axônios terem alcançado alvos celulares (Oppenheim et al., 1990; de la Rosa e de Pablo, 2000), a ocorrência de maior taxa de apoptose em estágio anterior de desenvolvimento das células de Purkinje pode ser sugerida.

A análise do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) não indicou o envolvimento desta neurotrofina na ocorrência de alterações na densidade das células de Purkinje em animais avaliados em E18. A despopulação neuronal observada nestes animais ocorreu de maneira semelhante entre as concentrações de material particulado porém, apenas em animais expostos a 20,0µg, foi observada variação da expressão de BDNF em relação aos controles. Já foi relatado o papel do BDNF e de outras neurotrofinas como NGF (*neural growth factor*) na sobrevivência de células de Purkinje em cultura porém, sua ação no desenvolvimento *in vivo* das células de Purkinje ainda não foi totalmente esclarecida (Kapfhammer, 2004). Entretanto, a importância do BDNF para a sobrevivência de células de Purkinje e desenvolvimento de seus dendritos ainda é controversa (Duncan et al., 2004).

A menor densidade de células de Purkinje observada nos embriões pode ter sido originada tanto no processo destas células como durante migração delas a partir da zona ventricular, quando do estabelecimento das camadas cerebelares. A migração das células de Purkinje e, também, as moléculas promotoras da adesão destas células à glia radial, já foram relacionadas à ocorrência de células de Purkinje ectópicas e a formação deficiente das folhas cerebelares (Darmanto et al., 1998) entretanto, o escopo deste trabalho não permitiu que essas hipóteses fossem testadas.

A diminuição da densidade de células de Purkinje na folha VI do cerebelo de animais no 18º dia de desenvolvimento (E18) estabeleceu a demanda pela investigação de alguns aspectos bioquímicos do cerebelo além da observação da densidade de células em momento prévio a E18.

A densidade de células de Purkinje nos embriões em E16 foi menor apenas nos animais submetidos à dose de 20,0µg de material particulado indicando que a despopulação já estava presente neste estágio nos animais submetidos à dose de 20,0µg. Uma vez que menor densidade de células nos animais submetidos ao material particulado fino não esteve associada com exacerbação da apoptose em E18 e, também, que a despopulação já estava presente no estágio E16, é possível sugerir que os eventos determinantes da despopulação neuronal nos animais submetidos à dose de 20,0µg sejam oriundos de etapas do desenvolvimento anteriores a E18.

A ocorrência de alterações morfológicas sugestivas de neurodegeneração em células de Purkinje já foi relatada em embriões de galinha (Bertossi et al., 1986) ao mesmo tempo em que a perda de células de Purkinje está relacionada à ativação da microglia em ratos adultos submetidos a dano severo (Park et al., 2006). Desta forma, acreditamos que a investigação dos efeitos da exposição ao material particulado fino sobre as células gliais poderia acrescentar elementos importantes a nossa discussão.

Entretanto, os experimentos realizados para a avaliação da resposta glial no cerebelo dos embriões em E18 não foram conclusivos tanto no que se refere à marcação das células gliais no cerebelo por imuno-histoquímica como em relação à análise da expressão das proteínas OX-42 (microglia) e GFAP (astrócito) por *immunoblotting*. Desta forma, não foi possível estabelecer a relação entre a despopulação de células de Purkinje e estes indicadores de neurodegeneração. Trabalhos que relataram marcação eficiente de células gliais (astrócito e microglia) por imuno-histoquímica em teto óptico e em cerebelo de embriões de galinha empregaram os anticorpos GFAP e HIS-07, respectivamente (Cuadros et al., 2006; Je Hoon et al., 2008). Uma vez que as proteínas utilizadas como marcadores destas células são bastante conservadas (Cuadros et al., 1993) a não reatividade poderia estar relacionada a uma mudança na exposição do epítipo destas proteínas nos cerebelos desses embriões.

Além da despopulação das células de Purkinje na folha VI em animais expostos ao material particulado fino, um outro efeito identificado foi o aumento da densidade de dendritos destas células.

Nossos dados revelaram um aumento substancial no padrão de arborização nos animais expostos a 20,0µg de material particulado fino comparados aos animais submetidos a 1,5µg e controles. Semelhante

alteração é observada em células de Purkinje de gatos expostos a chumbo no período pós-natal (Patrick e Anderson, 2000).

A ocorrência natural de poda e morte neuronal colabora para o modelamento das conexões neuronais durante o desenvolvimento. A despeito de sua importância, os mecanismos envolvidos nos processos de poda neuronal e dendrítica permanecem ainda pouco compreendidos (Nikolaev et al., 2009).

Sabe-se, entretanto, que a poda de conexões supranumerárias é um processo fundamental na sinaptogênese que, em embriões de galinha, ocorre no período de E16–E20 (Palacios-Pru et al., 1981; Sacchetto et al., 1995). Nestes animais, a finalização normal da sinaptogênese entre as células de Purkinje e as fibras trepadeiras ocorre entre o 18º dia de desenvolvimento embrionário e o 3º dia de vida pós natal (Lopez-Roman e Armengol, 1996). Nesta fase do desenvolvimento, as células de Purkinje apresentam elevada atividade metabólica e eventos como diferenciação da arborização dendrítica, proliferação das sinapses com as fibras paralelas e elaboração da inervação proveniente das fibras trepadeiras podem ser destacados (Altman e Bayer, 1997; Zhao et al., 1998).

Perturbações no processo de poda das sinapses entre as fibras trepadeiras e as células de Purkinje podem estar relacionadas ao

comprometimento da sinalização de BDNF (Riva-Depaty et al. 1998; Johnson et al., 2007). Em animais submetidos a 20,0µg de material particulado, além do aumento da densidade dendrítica, uma expressiva redução da expressão de BDNF no cerebelo em comparação aos animais dos grupos 1,5µg e controles foi constatada. Contrária as nossas observações, foi relatada severa redução da arborização dendrítica das células de Purkinje em camundongos 'BDNF-deficientes' (Schwartz et al., 1997). A divergência dos resultados pode ser explicada pela utilização de diferentes protocolos experimentais uma vez que no presente estudo a diminuição da expressão do BDNF foi decorrente da exposição ao material particulado fino e, no estudo citado, a expressão diminuiu em decorrência de uma mutação genética.

Nossos resultados sugerem que exposição única a 20,0µg de material particulado de origem urbana é capaz de induzir um aumento da densidade dendrítica por meio da deficiência de expressão de BDNF (*"down regulation"*). Deste modo, as alterações no desenvolvimento da árvore dendrítica das células de Purkinje frente à exposição ao particulado de origem veicular pode representar uma falha da poda sináptica normal ou mesmo, de ramificação anormal destes dendritos.

Estas observações vêm ratificar a sensibilidade das células de Purkinje e do modelo de exposição empregado frente ao material particulado fino da cidade de São Paulo.

Doenças relacionadas ao desenvolvimento do sistema nervoso podem estar associadas a padrões alterados de conectividade neuronal e um determinante crítico desta conectividade é a morfologia dendrítica de neurônios individuais (Yang et al., 2009). Além disso, alterações no desenvolvimento do fenótipo das células de Purkinje no período no qual estão sob intenso crescimento dendrítico e formação de sinapses podem interferir no comportamento da célula após o dano (Gianola e Rossi, 2001)

A deficiência no processo de poda neuronal é um fenômeno relativamente estereotipado para ação de substâncias tóxicas ambientais e está potencialmente relacionada a uma série de doenças associadas ao fumo, a exposição a chumbo entre outras. Além disso, perturbações ou falhas no processo de poda sináptica entre as fibras trepadeiras e as células de Purkinje são associadas ao comprometimento da coordenação motora (Ribar et al., 2000; Hashimoto et al., 2001; Johnson et al., 2007) e, quando ocorrem no estriado levar a disfunções cognitivas na esquizofrenia (Roberts et al., 2005).

Variações na morfologia dos dendritos nos levaram a investigá-los além do aspecto da densidade uma vez que este aspecto dos neurônios é determinante da sua conectividade (Yang et al., 2009). Embora com várias limitações metodológicas, nossas observações a respeito do comprimento linear de dendritos individuais indicaram haver diferenças em função da concentração de PM_{2,5}. Fazendo uso de diferente metodologia analítica, variações nos segmentos dos dendritos foram já relatadas em gatos expostos a chumbo no período pós natal (Patrick e Anderson, 2000) indicando que a importância da realização deste tipo de análise.

As estruturas encefálicas são particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo pela ocorrência de lipídeos facilmente oxidáveis, presença de elevado fluxo de cálcio e elevado consumo de oxigênio molecular (O₂) associado a poucas defesas antioxidantes (Floyd, 1999).

Nossos dados não indicaram ocorrência de variação significativa na peroxidação lipídica de embriões em E18 submetidos ao particulado fino de origem veicular ao contrário de diversos trabalhos nos quais os processos oxidativos foram sugeridos como mecanismos de ação do material particulado e de ROFA (*residual oil fly ash*) no sistema cardio-respiratório (Gurgueira et al., 2002; Gonzalez-Flecha, 2004; Rhoden et al., 2005; Soberanes et al., 2009) e no sistema nervoso central (Zanchi et al., 2010;

Block e Calderón-Garciduenas, 2009). Da mesma forma, a oxidação da DHE também não revelou diferenças entre os embriões.

Por outro lado, o cerebelo de embriões submetidos ao material particulado demonstrou a ativação de mecanismos antioxidantes, observado pelo aumento da atividade da catalase. Em estudo com animais submetidos à ROFA, foi demonstrada a diminuição da peroxidação lipídica no cerebelo e no estriado de animais frente à administração de antioxidantes (Zanchi et al., 2008). Considerando a discreta diminuição nos valores relacionados ao marcador de peroxidação lipídica (MDA) obtidos neste estudo pode ser sugerida a ação antioxidante eficiente desempenhada pela catalase frente ao particulado fino urbano.

CONCLUSÃO

1. A exposição à dose única de material particulado fino da cidade de São Paulo é capaz de afetar o desenvolvimento das células de Purkinje no modelo de embrião de galinha.
2. O modelo de exposição proposto é capaz de produzir alterações estruturais mensuráveis nas células de Purkinje de embriões de galinha, tornando-o viável ao desenvolvimento de novos estudos para o esclarecimento da toxicidade de poluentes atmosféricos específicos e, também, para a pesquisa dos mecanismos envolvidos com sua toxicidade.
3. O material particulado afetou a expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo no cerebelo de embrião de galinha, sugerindo que este pode ser um dos mecanismos envolvidos na falta da poda dendrítica presente nesta fase do desenvolvimento embrionário. E mais, o BDNF não mostrou ação sobre a sobrevivência das células de Purkinje.
4. Os elementos presentes no material particulado fino de origem veicular promoveram alterações no equilíbrio do redox celular no cerebelo.

REFERÊNCIAS

7 Referências

Aebi H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol.* 1984; 105-21.

Altman, J., Bayer, S.A., 1997. Development of the Cerebellar System in Relation to its Evolution, Structure, and Functions. CRC, New York.

Baddeley AJ, Gundersen HJ, Cruz-Orive LM. Estimation of surface area from vertical sections. *J Microsc.* 1986; 142, 259-76.

Baird C. *A química e a poluição do ar na troposfera.* In Química Ambiental, Porto Alegre: Bookman, 2ed. 3:107-91,2002.

Batista BL, Rodrigues JL, Nunes JÁ, Souza VCO, Barbosa FJr. Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MA) for sequential determination of trace elements in blood using dilute-and-shoot procedure. *Anal Chim Acta.* 2009; 639:13-18.

Batra S, König MF, CRUZ-ORIVE LM. Unbiased estimation of capillary length from vertical slices. *J Microsc.* 1995; 178:152-9.

Bayer SA, Wills KV, Yue Feng JW, Dlouhy SR, Hodes ME, Ghetti, TVB. Phenotypic effects of the weaver gene are evident in the embryonic cerebellum but not in the ventral midbrain. *Develop Brain Res.* 1996; 96: 130-7.

Bertossi M, Roncali L, Mancini L, Ribatti D, Nico B. Process of differentiation of cerebellar Purkinje neurons in the chick embryo. *Anat Embryol.* 1986; 175: 25-34.

Block ML, Wu X, Pei Z, Li G, Wang T, Qin L, Wilson B, Yang J, Hong JS, Veronesi B. Nanometer size diesel exhaust particles are selectively toxic to dopaminergic neurons: the role of microglia, phagocytosis, and NADPH oxidase. *FASEB J.* 2004; 18: 1618-20.

Block, M.L., Calderón-Garcidueñas, L., 2009. Air pollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease. *Trends Neurosc.* 32, 506-516.

Bolender RP, Hyde, DM; DEHOFF RT. Lung morphometric: a new generation of tools and experiments for organ, tissue, cell, and molecular biology. *Am J Physiol.* 1993; 265:521-48.

Bower JM, Parsons LM. Rethinking the "lesser brain". *Sci Am.* 2003; 289:50-7.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1979; 72:248.

Braga ALF, Saldiva PHN, Pereira LAA, Menezes JJC, Conceição GMS, Lin CA, Zanobetti A, Schwartz J, Dockery DW. Health effects of air pollution exposure on children and adolescents in São Paulo, Brazil. *Pediatric Pulmonology.* 2001;31:106-13.

Brook RD, Brook JR, Rajagopalan S. Air pollution: the "heart" of the problem. *Curr Hypertens Rep.* 2003; 5: 32-9.

Brunenkreef B, DockeryDW, Krzyzanowski M. Epidemiologic studies on short term effect of low levels of major ambient air pollution components. *Environ Health Perspect.* 1995; 103 (Suppl):3-13.

Bueno HMS, Martins RSL, Pannuti C, Santos RN, Sowmy T, Barbosa Junior F, Carvalho-Oliveira R, Garcia MLB, Saldiva PHN. Metal embryotoxicity from urban particles in São Paulo city: An experimental study in chicken embryos. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2010;73:1385-90.

Burnett, R.T., Brook, J., Dann, T., Delocla, C., Philips, O., Cakmak, S., Vincent, R., Goldberg, M.S., Krewski, D., 2000. Association between particulate- and gas-phase components of urban air pollution and daily mortality in eight Canadian cities. *Inhal Toxicol.* 4, 15-39.

Calderón-Garcidueñas, L., Azzarelli, B., Acuna, H., Garcia, R., Gambling, T.M., Osnaya, N., Monroy, S., M.R., Carson, J.L., Villarreal-Calderon, A., Rewcastle, B., 2002. Air pollution and brain damage. *Toxicol Pathol.* 30, 373–389.

Calderón-Garcidueñas, L., Maronpot, R.R., Torres-Jardon, R., Henriquez-Roldan, C., Schoonhoven, R., Acuna-Ayala, H., Villarreal-Calderon, A., Nakamura, J., Fernando, R., Reed, W., Azzarelli, B., Swenberg, J.A., 2003. DNA damage in nasal and brain tissues of canines exposed to air pollutants is associated with evidence of chronic brain inflammation and neurodegeneration. *Toxicol Pathol.* 31, 524–538.

Calderón-Garcidueñas, L., Reed, W., Maronpot, R.R., Henriquez-Roldan, C., Delgado-Chavez, R., Calderón-Garcidueñas, A., Dragustinovis, I., Franco-Lira, M., Aragon-Flores, M., Solt, A.C., Altenburg, M., Torres-Jardon, R., Swenberg, J.A., 2004. Brain inflammation and Alzheimer's like pathology in individuals exposed to severe air pollution. *Toxicol Pathol.* 32, 650–658.

Calderon-Garcidueñas L, Franco-Lira M; Torres-Jardon R, Henriquez-Roldan C, et al. Pediatric Respiratory and Systemic Effects of Chronic Air Pollution Exposure: Nose, Lung, Heart, and Brain Pathology . *Toxicologic Path.* 2007; 35:154–62.

Calderón-Garcidueñas L, Mora-Tiscareño A, Ontiveros E, Gómez-Garza G, Barragán-Mejía G, et al. Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: a pilot study with children and dogs. *Brain Cogn.* 2008a; 68:117-27.

Calderón-Garcidueñas L, Villarreal-Calderon R, Valencia-Salazar G, Henríquez-Roldán C, Gutiérrez-Castrellón P, Torres-Jardón R, Osnaya-Brizuela N, Romero L, Torres-Jardón R, Solt A, Reed W. Systemic inflammation, endothelial dysfunction, and activation in clinically healthy children exposed to air pollutants. *Inhal Toxicol.* 2008b;20:499-506.

Campbell, A., Oldham, M., Becaria, A., Bondy, S.C., et al. Particulate matter in polluted air may increase biomarkers of inflammation in mouse brain. *Neurotoxicology.* 2005; 26, 133-40.

Carvalho MC, Nazari EM, Farina M, Müller YM. Behavioral, morphological, and biochemical changes after in ovo exposure to methylmercury in chicks. *Toxicol Sci.* 2008; 106:180-5.

Carvalho-Oliveira R, Pozo RMK, Lobo DJA, Lichtenfels AJFC, Martins-Junior HA, Bustilho JOWV, Saiki M, Sato I.M, Saldiva P.H.N. 2005a. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case of study in Sao Paulo, *Brazil. Environm. Res.* 98, 1-7.

Castanho ADA, Artaxo P. Wintertime and summertime São Paulo aerosol source apportionment study. *Atmos Environ.* 2001; 35: 4889-902.

Causing CG, Gloster A, Aloyz R, Bamji SX ,et al. Synaptic innervation density is regulated by neuron-derived BDNF. *Neuron.* 1997: 18, 257-67.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. (CETESB): Modelo recetor – Estudo de caracterização de aerossóis na Região Metropolitana de São Paulo. 2002. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/relatorios.asp>

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

Conceição GM, Miragli SG, Kishi HS, Saldiva PH, Singer JM Air pollution and child mortality: a time series study São Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect.* 2001; 109 (Suppl): 347-50.

Craig L. Air pollution and public health: a guidance document for risk managers. *J. Toxicol Environ Health.* 2008; 71:588–698.

Cuadros MA, Martin C, Coltey P, Almendros A, Navascués J First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J Comp Neurol.* 1993; 330:113-29

Cuadros MA, Santos AM, Martín-Oliva D, Calvente R, Tassi M, Marin-Teva, JL Navascués J. Specific Immunolabeling of Brain Macrophages and microglial cells in the developing and mature chick central nervous system. *J Hist Cyto.* 2006; 54: 727-738.

Darmanto W, Inouye M, Hayasaka S, Takagishi Y, Ogawa M, Mikoshiba K, Murata Y. Disturbed Purkinje cell migration due to reduced expression of Reelin by X-irradiation in developing rat cerebellum. *Biol Sci Space*; 1998;12:254-5.

de la Rosa EJ, de Pablo F. Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends Neurosci*. 2000;23:454-8.

Delgado-Garcia JM. Structure and function of the cerebellum. *Rev Neurol*. 2001; 33:635-42.

DeWitt JC, Meyer EB, Henshel DS. Environmental toxicity studies using chickens as surrogates for wildlife: effects of injection day. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2005;48:270-7.

Duncan JR, Cock ML, Harding R, Rees SM. Neurotrophin expression in the hippocampus and cerebellum is affected by chronic placental insufficiency in the late gestational ovine fetus. *Develop Brain Res*. 2004; 153:243-50.

Feirabend HKP. Development of longitudinal patterns of the cerebellum of the chicken (*Gallus domesticus*): a cytoarchitectural study on the genesis of cerebellar modules. *Eur J Morphol*. 1990; 28: 191-233.

Finney L, Chishti Y, Khare T, Giometti C, Levina A, Lay PA, Vogt S. Imaging metals in proteins by combining electrophoresis with rapid x-ray fluorescence mapping. *ACS Chem Biol*. 2010 Jun 18;5(6):577-87.

Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999; 222: 236-45.

Fonnum F, Lock EA. Cerebellum as a target for toxic substances. *Toxicol Letters*. 2000; 112-113: 9-16.

Freitas C, Bremner AS, Owman C, Persoon H, Sjöberg NO. Histochemical and pharmacological associations with air pollution in São Paulo, Brazil, [1993 to 1997]. *Rev Saúde Pública*. 2003; 38: 751-57.

Gagnon ZE, Patel A. Induction of metallothionein in chick embryos as a mechanism of tolerance to platinum group metal exposure. *J Environ Sci Health*. 2007; 42: 381-7.

Gambino L, Wreford NG, Bertram JF, Dockery P, Lederman F, Rogers PAW. Angiogenesis occurs by vessel elongation in proliferative phase human endometrium. *Human Reproduction*. 2002; 17: 1199-206.

Geller MD, Ntziachristos L, Mamakos A, Samaras Z, Schmitz DA, Froines JR, Sioutas C. Physicochemical and redox characteristics of particulate matter (PM) emitted from gasoline and diesel passenger cars. *Atmospheric Envir*. 2006; 4: 6988-7004.

Gianola S, Rossi F. Evolution of the Purkinje cell response to injury and regenerative potential during postnatal development of the rat brain
J Comp Neurol. 2001; 430:101-17.

Goldowitz D, Hamre K. The cells and molecules that make a cerebellum.
Trens Neurosci. 1998; 21, 375-82.

González-Flecha B. Oxidant mechanisms in response to ambient air particles.
Mol Aspects Med. 2004; 25:169-82.

Gouveia N, Fletcher T. Time series analysis of air pollution and mortality: effects by cause, age and socioeconomic status. *J Epidemiol Community Health*. 2000a;54: 750-5.

Gouveia N, Fletcher T. Respiratory diseases in children and outdoor air pollution in São Paulo, Brazil: a time series analysis. *Occup Environ Med*. 2000b;57:477-83.

Grandjean P, Landrigan PJ. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet*. 2006; 368: 2167-78.

Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J Microsc*. 1977; 111: 219-23.

-
- Gurgueira SA, Lawrence J, Coull B, Murthy GG, González-Flecha B. Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environ Health Perspect.* 2002;110:749-55.
- Hamburger V, Hamilton HL, A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol.* 1951; 88: 49-92.
- Hartz AMS, Bauer B, Block ML, Hong JS, Miller DS. Diesel exhaust particles induce oxidative stress, proinflammatory signaling, and P-glycoprotein up-regulation at the blood-brain barrier. *FASEB J.* 2008; 22: 2723-33.
- Hashimoto K, Ichikawa R, Takechi H, Inoue Y, Aiba A, Sakimura K, Mishina M, Hashikawa T, Konnerth A, Watanabe M & Kano M (2001). Roles of glutamate receptor δ 2 subunit (GluR δ 2) and metabotropic glutamate receptor subtype 1 (mGluR1) in climbing fibre synapse elimination during postnatal cerebellar development. *J Neurosci* 21, 9701–9712.
- Henshel DS, Martin JW, DeWitt JC. Brain asymmetry as a potential biomarker for developmental TCDD intoxication: a dose-response study. *Environ Health Perspect.* 1997; 105: 718-25.
- Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vasák M. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res Bull.* 2001; 55: 133-45.
- Jarup L. hazards of heavy metal contamination. *British Med Bull.* 2003; 68: 167-82.
- Je Hoon S, Jae Hyuk C, Seon Hwa S, Ha Na L, et al Spatiotemporal Gradient of Astrocyte Development in the Chick Optic Tectum: Evidence for Multiple Origins and Migratory Paths of Astrocytes *Neurochem Res.* 2008; 33:1346-55
- Johnson EM, Craig ET, Yeh HH. TrkB is necessary for pruning at the climbing fibre-Purkinje cell synapse in the developing murine cerebellum. *J Physiol.* 2007; 582:629-46.

Kapfhammer, J.P., 2004. Cellular and molecular control of dendritic growth and development of cerebellar Purkinje cells. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 39, 131-82.

Kampa M, Castañas E. Human health effects of air pollution. *Environ Pollution*. 2008; 151:362-67.

Katsouyanni K, Touloumi G, Samoli, E Confounding and effect modification in short term effects of ambient particles on total mortality. *Epidemiology*. 2001; 12: 521-31

Kenntner N, Tataruch F, Krone O. Heavy metals in soft tissue of white-tailed eagles found dead or moribund in Germany and Austria from 1993 to 2000. *Environ Toxicol Chem*. 2001 Aug;20(8):1831-7.

Kern JK, Jones AM. Evidence of toxicity, oxidative stress, and neuronal insult in autism. *J Toxicol Environ Health*. 2006; 9:485-99.

Laks D, de Oliveira RC, de André PA, Macchione M, Lemos M, Faffe D, Saldiva PH, Zin WA. Composition of diesel particles influences acute pulmonary toxicity: an experimental study in mice. *Inhal Toxicol*. 2008; 20:1037-42.

Lee J, Chen S, Golemboski KA, Parsons PJ, Dietert R. Developmental windows of differential lead-induced immunotoxicity in chickens. *Toxicology* , 2001; 156: 161-70.

Lewtas, J., 2007. Air pollution combustion emissions: Characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutation Res*, 636, 95-133.

Lopez-Roman, A., Armengol, J.A., 1996. Naturally occurring neuronal death during the development of the inferior olive in the chick. *Neurosci. Res*. 26, 171–179.

Lin CA, Martins MA, Farhat SC, Pope CA, Concenição GM, Anastacio VM. Air pollution and respiratory illness of children in São Paulo, Brazil. *Pediatr Perinat Epidemiol.* 1999; 13: 475-88.

Lichtenfels AJ, Gomes JB, Pieri PC, El Khouri Miraglia SG, Hallak J, Saldiva PH. Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in São Paulo, Brazil. *Fertil Steril.* 2007; 87:230-2

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

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; 469-74.

Migliore L, Coppedè F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutat Res.* 2009; 31:73-84.

Mills NL. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2009; 6, 36–44.

Mohallem SV, de Araújo Lobo DJ, Pesquero CR, Assunção JV, de André PA, Saldiva PH, Dolnikoff M. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of São Paulo. *Environ Res.* 2005; 98: 196-202.

Müller YMR, Rivero, LBD, Carvalho, MC, Kobus, K, Farina, M, Nazari, EM, Behavioral impairments related to lead-induced developmental neurotoxicity in chicks. *Arch Toxicol.* 2008; 82, 445-51.

Neves CMM. *Lipoperoxidação no encéfalo de rato submetidos à isquemia global transitória*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1997.

Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DDM, Tessier-Lavigne M. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature*. 2009; 457:981-89

Oppenheim RW, Calderó J, Cuitat D, Esquerda J, McArdle JJ, Olivera BM, Prevet D, Teichert RW. The rescue of developing avian motoneurons from programmed cell death by a selective inhibitor of the fetal muscle-specific nicotinic acetylcholine receptor. *Dev Neurobiol*. 2008; 68:972-80.

Palacios-Pru E., PalaciosL, Mendoza RV. Synaptogenetic mechanisms during chick cerebellar cortex development. *J Submicrosc Cytol*. 1981; 13:145-67.

Park E, McKnight S, Ai J, Baker AJ. Purkinje cell vulnerability to mild and severe forebrain head trauma. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006; 65:226-34.

Patrick GW, Anderson WJ. Dendritic alterations of cerebellar Purkinje Neurons in Postnatally lead-exposed kittens. *Develop Neurosci*. 2000; 22:320-28.

Penkowa M. Metallothionein I + II expression and roles during neuropathology in the CNS. *Dan Med Bull*. 2006; 53:105-21.

Pereira LAA, Loomis D, Conceição GMS, Braga ALF, Arcas RM, Kishi HS, Singer JM, Böhm G, Saldiva PHN. Association between air pollution and intrauterine mortality in São Paulo. *Perspect*. 1998;325-9.

Peters A, Veronesi B, Calderon-Garciduenas L, Gehr P, Chen LC, Geiser M, et al. Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. *Partic Fibre Toxicol* .2006;3:13

Piao F, Ma N, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S, Cheng F, Zhong L, Yamauchi T, Kawanishi S, Yokoyama K. Oxidative DNA damage in relation to neurotoxicity in the brain of mice exposed to arsenic at environmentally relevant levels. *J Occup Health*. 2005; 47:445-9.

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

Pires RS, Real C, Hayashib MAF, Britto LRG, Ontogeny of subunits 2 and 3 of the AMPA-type glutamate receptors in Purkinje cells of the developing chick cerebellum. *Brains Res.* 2006;1096:11-9.

Pope CA Epidemiological basis for particulate air pollution health standards. *Aerosol Sci Tech.* 2000a. 32:4-14;

Pope C. Air pollution and health – good newa and bad news. *N Engl J Med.* 2004; 351: 1132-4.

Rakic P. Principles of neural cell migration. *Experimentia*, 1990; 46: 882-91.

Ribar TJ, Rodriguiz RM, Khiroug L, Wetzel WC, Augustine GJ & Means AR. Cerebellar defects in Ca²⁺/calmodulin kinase IV-deficient mice. *J Neurosci.* 2000; 20, RC107.

Ribeiro H, Cardoso MR. Air pollution and children's health in São Paulo (1986-1998). *Sco Sci Med.* 2003; 57: 2013-22.

Rice D, Barone S, Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect.* 2000; 108: 511-33.

Riva-Depaty I, Dubreuil YL, Mariani J & Delhay-Bouchaud N. Eradication of cerebellar granular cells alters the developmental expression of trk receptors in the rat inferior olive. *Int J Dev Neurosci.* 1998; 16, 49–62.

Roberts RC, Roche JK, Conley R. Synaptic differences in the postmortem striatum of subjects with schizophrenia: a stereological ultrastructural analysis. *Synapse.* 2005; 56, 185-97.

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 :305-13.

Sacchetto R, Cliffer KD, Podini P, Villa A, Christensen BN, Volpe P. Intracellular Ca²⁺ stores in chick cerebellum Purkinje neurons: ontogenetic and functional studies. *Am J Physiol.* 1995; 269, 1219-27.

Sakamoto M, Kakita A, Wakabayashi K, Takahashi H, Nakano A, Akagi H. Evaluation of changes in methylmercury accumulation in the developing rat brain and its effects: a study with consecutive and moderate dose exposure throughout gestation and lactation periods. *Brain Res.* 2002; 949:51-9.

Saldiva PHN, Lichtenfels AJ, Paiva PS, Barone IA, Martins MA et al. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo, Brazil: a preliminary report. *Environ Res.* 1994; 65: 218-225.

Saldiva PHN, Parada MA, Macchione M, Paiva PS, Guimarães ET, Lorenzi G, Martins MA, Montes GS, Balbani AP, King M Nasal mucus clearance in rats: differences with sex and phase of the oestrous cycle. *J Appl Toxicol.* 1995; 15:289-95.

Saldiva PHN. Air pollution in urban areas: the role of automotive emissions as a public health problem. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998; 2:868.

Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, Diaz E, Koutrakis P, Suh H, Tsuda A, Godleski JJ. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 15: 1610-17.

Sarna JR, Hawkes R. Patterned Purkinje cell death in the cerebellum. *Prog Neurobiol.* 2003; 70:473-507.

Schwartz, P.M., Borghesani, P.R., Levy, R.L., Pomeroy, S.L., Segal, R.A., 1997. Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF^{-/-} mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning. *Neuron* 19, 269-281.

Seaton A, Macnee W, Donaldson K, Godden D Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet.* 1995; 345: 176-178.

Soberanes S, Urich D, Baker CM, Burgess Z, Chiarella SE, et al. Mitochondrial complex III-generated oxidants activate ASK1 and JNK to induce alveolar epithelial cell death following exposure to particulate matter air pollution. *J Biol Chem*. 2009; 284: 2176-86.

Sorensen FW, Larsen JO, Eide R, Schionning JD. Neuron loss in cerebellar cortex of rats exposed to mercury vapor: a stereological study. *Acta Neuropathol*. 2000; 100:95-100.

Sotelo C. Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Progress Neurobio*. 2004; 72, 295-339.

Souza MB, Saldiva, PHN, Pope CA, Capelozzi VL. Respiratory changes due to long term exposure to urban levels of air pollution: a histopathologic study in humans. *Chest*. 1998; 113: 1312-8.

Spinar A, Garcia-Oliva A, Quesada IEM, Parada A, Guerrero JM. Neuroprotection by melatonin from glutamate-induced excitotoxicity during development of the cerebellum in the chick embryo. *J Pineal Res*. 2000; 28:81-8.

Stankovic RK, Chung RS, Penkowa M. Metallothioneins I and II: neuroprotective significance during CNS pathology. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:484-9.

Stefanidou M, Maravelias C, Dona A, Spiliopoulou C. Zinc: a multipurpose trace element. *Arch Toxicol*. 2006; 80:1-9.

Sterio DC. Then unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc*. 1984; 134: 127-36.

Stoev SD, Grozeva N, Simeonov R, Borisov I, Hubenov H, Nikolov Y, Tsaneva M, Lazarova S. Experimental cadmium poisoning in sheep. *Exp Toxicol Pathol*. 2003; 55:309-14.

Sucharova J, Suchara I. Determination of 36 elements in plant reference materials with different Si contents by inductively coupled plasma mass spectrometry: comparison of microwave digestions assisted three types of digestions mixtures. *Anal Chim Acta*. 2006;576:163-76.

Sugamata M, Ihara T, Sugamata M, Takeda K. 2006. Maternal exposure to diesel leads to Pathological similarity to autism in newborns. *Journal of Health Science*. 52(4) 486-488.

Suglia SF, gryparis A, Wright RO, Schwartz J, Wright RJ. Association of black carbon with cognition among children in a prospective cohort study. *Am J Epidemiol*. 2008; 167: 2080-86.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology*. 1992;24:145-9.

Utell MJ, Frampton MW. Acute health effects of ambient air pollution: the ultrafine particle hypothesis. *J Aerosol Med*. 2000; 13: 355-59.

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

Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Guimarães Silva RM, Scoriza JN, Saldiva PH, Caldini EG, Dolhnikoff M. Chronic exposure to fine particulate matter emitted by traffic affects reproductive and fetal outcomes in mice.

Environ Res. 2009;109:536-43

Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Guimarães Silva RM, Scoriza JN, Saldiva PH, Caldini EG, Dolhnikoff M. Chronic exposure to fine particulate matter emitted by traffic affects reproductive and fetal outcomes in mice. *Environ Res*. 2009; 109:536-43.

Yamada K, Watanabe M. Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anat Sci Int*. 2002;77:94-108.

Yang D, Kim KH, Phimister A, Bachstetter AD, Ward TR, et al. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls interferes with experience-dependent dendritic plasticity and ryanodine receptor expression in weanling rats. *Environ Health Perspect.* 2009; 117: 426-35

Ynoue RY, Andrade MF. Characteristics of urban aerosols. Size resolved mass balance of aerosol particles over the São Paulo metropolitan area of Brazil. *Aerosol Sci Technol.* 2004; 38: 52-62.

Warfvinge K. Mercury distribution in the neonatal and adult cerebellum after mercury vapor exposure of pregnant squirrel monkeys. *Environ Res.* 2000; 83:93-101.

Wegesser TC, Last JA. Lung response to coarse PM: bioassay in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;230:159-66.

Weiseman CLS, Zereini F. Airborne particulate matter, platinum group elements and human health: A review of recent evidence. *Sci Tot Environ.* 2009; 407: 2493–500

West AK, Hidalgo J, Eddins D, Levin ED, Aschner M. Metallothionein in the central nervous system: Roles in protection, regeneration and cognition. *Neurotoxicology.* 2008; 29:489-503.

WHO, Health aspects of air pollution with particulate matter, ozone and nitrogen dioxide. Report on a WHO Working Group, Bonn, Germany, 13-15 January 2003, 2003. Disponível em : <http://www.euro.who.int/document/e79097.pdf>.

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; 20:795-800.

Zanchi AC, Fagundes LS, Barbosa F Jr, 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; 22:910-8.

Zelikoff JT, Schermerhorn KR, Fang K, Cohen MD, Schlesinger RB. A role for associated transition metals in the immunotoxicity of inhaled ambient particulate matter. *Environ Health Perspect.* 2002; 5:871-5.

Zhao HM, Wenthold RJ, Petralia RS. Glutamate receptor targeting to synaptic populations on Purkinje cells is developmentally regulated. *J Neurosci.* 1998; 18, 5517-28.

Apêndice 1: Parecer com aprovação do projeto realizado pela Cappelq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 12/09/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0779/07**, intitulado: **"AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA POLUIÇÃO POR MATERIAL PARTICULADO GERADO POR DIFERENTES FONTES EMISSORAS: PROPOSIÇÃO DE ESTUDOS CLÍNICOS E EXPERIMENTAIS"** apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Paulo Hilário Nascimento Saldiva**

Pesquisador (a) Executante: **Heloísa Maria Bueno Guimarães**

CAPPesq, 18 de Setembro de 2007

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**