MARLISE DI DOMENICO

**Avaliação dos efeitos da exposição pré e pós-natal à poluição atmosférica
no sistema nervoso central de camundongos**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Dra. Mariana Matera Veras

**São Paulo
2019**

MARLISE DI DOMENICO

**Avaliação dos efeitos da exposição pré e pós-natal à poluição atmosférica
no sistema nervoso central de camundongos**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Dra. Mariana Matera Veras

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Di Domenico, Marlise

Avaliação dos efeitos da exposição pré e pós-natal à
poluição atmosférica no sistema nervoso central de
camundongos / Marlise Di Domenico. -- São Paulo,
2019.

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

Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Mariana Matera Veras.

Descritores: 1.Poluição do ar 2.Comportamento
animal 3.Material particulado 4.Sistema nervoso
central 5.Histologia 6.Inflamação 7.Reação em cadeia
da polimerase 8.Camundongos

USP/FM/DBD-213/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao concluir este trabalho expressei meus agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização do mesmo. Saibam que todos vocês contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Sou grata a todos que durante esses anos de dedicação a este projeto cruzaram meu caminho, especialmente àqueles que deixaram um pouco de si e levaram um pouco de mim. Especialmente, agradeço:

À minha orientadora, Dr^a Mariana Matera Veras, pela confiança e liberdade, ao incentivo e orientação.

Ao Prof Dr^o Paulo Saldiva e aos demais professores do Departamento de Patologia da FMUSP que são inspirações de professores. Agradeço também aos técnicos e secretários(os) do departamento pela ajuda e suporte nas questões e administrativas.

Aos meus colegas de trabalho do LIM 05, aos que permanecem e aos que já finalizaram seu ciclo, muito obrigada pela ajuda com a criação e exposição dos animais, experimentos, lâminas, conversas, cafés e parcerias. Obrigada por terem tornado minha jornada mais leve.

Aos técnicos, alunos e professores responsáveis pelos laboratórios de Poluição Atmosférica, Biologia Molecular e Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Aos demais colegas de pós-graduação pelo apoio, por terem compartilhado expectativas, angústias e conhecimento.

As professoras membros da banca de qualificação pelas sugestões e críticas que foram importantes para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Programa de Fisiopatologia Experimental e aos secretários Vanda, Igor e Gisele por sempre estarem solícitos em esclarecer dúvidas e auxiliar com trâmites burocráticos.

À Faculdade de Medicina de São Paulo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio na bolsa de doutorado.

À minha família. Pai, mãe e irmãs, podem ter certeza que sem vocês esse sonho não teria se tornado realidade. Obrigada por tudo.

À minha prima Erlise que me recebeu em São Paulo. Sem você nada disso seria possível. Muito obrigada por compartilhar seu lar.

Ao meu amor, Daniel, e aos meus sogros e a cunhada que sempre me incentivaram.

NORMALIZAÇÃO

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviações e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1.1 Poluição atmosférica	18
1.1.1 Material particulado (MP)	20
1.1.2 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).....	22
1.2 Poluição atmosférica no Brasil e em São Paulo.....	22
1.3 Impactos da poluição atmosférica à saúde	26
1.4 Sistema nervoso central (SNC).....	28
1.4.1 Desenvolvimento do SNC	28
1.4.2 O córtex cerebral.....	30
1.5 Exposição à xenobióticos no desenvolvimento fetal	35
1.6 Toxicidade da poluição atmosférica	38
1.7 Evidências patológicas da exposição à poluição atmosférica	42
1.8 Distúrbios comportamentais e poluição atmosférica	45
2. JUSTIFICATIVA.....	49
3. OBJETIVOS.....	51
3.1 Objetivo geral	51
3.2 Objetivos específicos	51
4. MÉTODOS.....	53
4.1 Animais	53
4.2 Desenho experimental	53
4.3 Exposição à poluição atmosférica.....	54
4.3.1 Caracterização química do MP _{2.5}	56
4.4 Peso corporal.....	56
4.5 Avaliação do desempenho reprodutivo	57

4.6 Avaliação comportamental	57
4.6.1 Campo aberto (CA)	57
4.6.2 Reconhecimento de objetos (RO)	59
4.6.3 Labirinto cruz elevado (LCE)	60
4.7 Coleta.....	61
4.8 Avaliação estereológica do cérebro	62
4.8.1 Amostragem do cérebro e volume cerebral total.....	62
4.8.2 Análise de volume dos compartimentos cerebrais	63
4.8.3 Quantificação de neurônios no córtex	64
4.8.4 Espessura das camadas corticais	66
4.9 Avaliação imuno-histoquímica	67
4.10 Análise da expressão gênica	69
4.11 Análise da toxicidade <i>in vitro</i> do MP _{2.5}	71
4.11.1 Extração do MP _{2.5}	71
4.11.2 Cultura celular e teste de viabilidade celular	72
4.12 Análise estatística	73
5. RESULTADOS.....	74
5.1 Caracterização química do MP _{2.5}	74
5.2 Avaliação do desempenho reprodutivo	74
5.3 Peso corporal.....	75
5.4 Testes comportamentais.....	76
5.4.1 Campo aberto (CA)	76
5.4.2 Reconhecimento de objetos (RO)	77
5.4.3 Labirinto cruz elevado (LCE)	80
5.5 Volume cerebral total	82
5.5.1 Volume dos compartimentos cerebrais	83
5.6 Quantificação de neurônios no córtex.....	84
5.7 Espessura das camadas corticais.....	84
5.8 Avaliação imuno-histoquímica	85
5.9 Expressão gênica.....	88
5.10 Citotoxicidade pelo método de incorporação de vermelho neutro	89
6. DISCUSSÃO	91
7. CONCLUSÕES.....	105

8. REFERÊNCIAS.....	106
ANEXOS	136

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

5-HIAA - Ácido 5-hidroxiindoleacético

5-HT - Serotonina

AF - Ar filtrado

ANF - Ar não filtrado

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CO - Monóxido de carbono

CO₂ - Dióxido de carbono

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

COX-2 - Ciclooxygenase 2

CP - Placa cortical

CPA - Concentrador de partículas ambientais

DA - Dopamina

DAB - Diaminobenzidina

DEP - Partículas da exaustão do diesel

DG - Dia gestacional

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crônica

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

ERN - Espécies reativas de nitrogênio

ERO - Espécies reativas de oxigênio

ERs - Espécies reativas

ER α - Receptor estrógeno α

ET-1 - Endotelina 1

GABA-A-R α 2 - GABA-A receptor α 2

GC-M - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

GFAP - Proteína glial fibrilar ácida

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ - Ácido sulfúrico

HO-1 - Heme oxigenasse I

HPAs - Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

IARC - do inglês, *International Agency for Research on Cancer*

IBA-1 - Proteína adaptadora ligante de cálcio ionizado 1

ICAM-1 - Molécula de adesão intercelular-1

IL-1 α - Interleucina 1 α

IL-1 β - Interleucina 1 β

IL-6 - Interleucina 6

MI - Metas intermediárias

NA - Noradrenalina

NECs - Células neuroepiteliais

NFE2L2 - Fator nuclear eritróide derivado 2 tipo 2

NF- κ B - Fator de transcrição nuclear Kappa B

NMDA - N-metil-D-aspartato

NO₂ - Dióxido de nitrogênio

NOS2 ou iNOS - Óxido nítrico sintase induzida

NOS3 ou eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial

NO_x - Óxido de nitrogênio

NR1 - N-metil-D-aspartato subtipo 1

NR2A - N-metil-D-aspartato subtipo 2A

Nrf-2 - Fator nuclear eritróide 2

O₃ - Ozônio

OMS - Organização Mundial da Saúde

ORT - Receptor de ocitocina

PF - Padrões finas

PP - Pré-placa

PROCONVE - Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores

PRONAR - Programa Nacional de Controle da Qualidade do Ar

PUF - Partículas ultrafinas

QI - Quociente de inteligência

SNC - Sistema nervoso central

SO₂ - Dióxido de enxofre

SOA - Aerossóis secundários orgânicos

SOD - Superóxido dismutase

SOD2 - Superóxido dismutase 2

SP - Subplaca

TDAH - Déficit de atenção e hiperatividade

TNF α - Fator de necrose tumora

US-EPA - do inglês, United States *Environmental Protection Agency*

ZM - Zona marginal

ZV - Vona ventricular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Invasividade do material particulado nas vias áreas em relação ao seu tamanho aerodinâmico	21
Figura 2 - Princípio de rotas de translocação de partículas e vias que permitem acesso ao sistema nervoso central	28
Figura 3 - Alterações na morfologia do embrião durante o período embrionário	30
Figura 4 - Representação esquemática da geração e migração da projeção de neurônios no neocórtex de mamíferos	32
Figura 5 - Delineamento experimental da exposição ao MP _{2.5} . DG: dia gestacional; DPN: dia pós-natal	54
Figura 6 - Área interna do CPA demonstrando o sistema de tubulações e os impactadores virtuais	55
Figura 7 - Área interna do CPA demonstrando as câmaras de exposição ao MP _{2.5} e ao ar filtrado	55
Figura 8 - Representação esquemática da realização dos testes comportamentais	57
Figura 9 - Aparato para teste comportamental de campo aberto	58
Figura 10 - Aparato do teste comportamental de reconhecimento de objeto ..	60
Figura 11 - Aparato do teste comportamental labirinto cruz elevado.....	61
Figura 12 - Representação esquemática da amostragem cerebral para estereologia.....	62
Figura 13 - Cérebro corado com HE para análise de volume.....	64
Figura 14 - Neurônios imuno-marcados com Neu-N no córtex cerebral de animais com 90 dias.....	65
Figura 15 - Camadas corticais do córtex cerebral	67
Figura 16 - Estabilidade do gene constitutivo no hipocampo e córtex.....	71
Figura 17 - Peso corporal da prole (g).....	75
Figura 18 - Reconhecimento de objetos nos animais aos 30 dias de idade....	78

Figura 19 - Reconhecimento de objetos nos animais aos 90 dias de idade....	79
Figura 20 - Volume cerebral total (mm ³) em relação ao peso corporal de animais com 90 dias de idade expostos ao MP _{2.5}	82
Figura 21 - Número de neurônios no córtex cerebral de animais com 90 dias de idade expostos ao MP _{2.5}	84
Figura 22 - Espessura das camadas corticais de animais com 90 dias de idade expostos ao MP _{2.5}	85
Figura 23 - Densidade óptica de células da glia no córtex de animais com 90 dias de idade expostos ao MP _{2.5}	86
Figura 24 - Densidade óptica de células da glia no corpo caloso de animais com 90 dias de idade expostos ao MP _{2.5}	86
Figura 25 - Efeito da exposição ao MP _{2.5} sobre a expressão de mRNA no hipocampo de animais aos 90 dias de vida.....	88
Figura 26 - Efeito da exposição ao MP _{2.5} sobre a expressão de mRNA no córtex de animais aos 90 dias de vida	89
Figura 27 - Sensibilidade das células C6 expostas ao MP _{2.5} extraído de filtros	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padrões de qualidade do ar de acordo com a Resolução Nº 491, de Novembro de 2018, CONAMA.	24
Tabela 2 - Padrões Estaduais de Qualidade do Ar do Estado de São Paulo pelo Decreto Estadual nº 59.113 de 23/04/2013.....	25
Tabela 3 - Relação da concentração e tempo de recuperação antigênica dos anticorpos na imunohistoquímica.	68
Tabela 4 - Descrição da sequência <i>forward</i> e <i>reverse</i> dos primers.	70
Tabela 5 - Concentração média dos elementos químicos e HPAs presente no MP _{2.5}	74
Tabela 6 - Parâmetros reprodutivos de camundongas expostas ao MP _{2.5} entre o 1,5º e 18,5º DG.	75
Tabela 7 - Parâmetros da atividade exploratória em campo aberto de animais expostos ao MP _{2.5} aos 30 e 90 dias de idade.	77
Tabela 8 - Parâmetros de ansiedade em labirinto cruz elevado de animais expostos ao MP _{2.5} aos 33 dias de idade.	80
Tabela 9 - Parâmetros de ansiedade em labirinto cruz elevado de animais expostos ao MP _{2.5} aos 93 dias de idade.	82
Tabela 10 - Efeito da exposição ao MP _{2.5} no volume (mm ³) dos compartimentos cerebrais de animais aos 93 dias de idade.	83
Tabela 11 - Densidade óptica de GFAP e IBA-1 no hipocampo de animais com 90 dias de idade expostos ao MP _{2.5}	87
Tabela 12 - Densidade óptica de células imuno-marcadas com TH no estriado e GAD65+67 no córtex de animais com 90 dias de idade expostos ao MP _{2.5} . ..	88

RESUMO

Di Domenico M. *Avaliação dos efeitos da exposição pré e pós-natal à poluição atmosférica no sistema nervoso central de camundongos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A poluição atmosférica é um problema de saúde pública. Estudos epidemiológicos e experimentais demonstram que a poluição do ar pode causar diversos efeitos à saúde, nos diversos sistemas fisiológicos. No entanto, ainda são escassos estudos que avaliem os efeitos sobre o sistema nervoso central devido à exposição pré e pós-natal aos poluentes bem como, alterações decorrentes da mudança de ambiente. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da exposição pré e pós-natal a poluição atmosférica da cidade de São Paulo sobre o sistema nervoso central de camundongos. Para isso, camundongos BALB/c foram expostos ao material particulado fino (MP_{2.5}) no concentrador de partículas ambientais (CPAs) a uma concentração diária de 600 µg/m³ durante o período gestacional (1,5 ao 18,5 dia gestacional (DG)) e pós-natal. Ao final do período de amamentação, os machos foram separados e divididos em 4 grupos experimentais: ar filtrado pré e pós-natal (AF-AF); ar filtrado pré-natal e ar não filtrado pós-natal (AF-ANF); ar não filtrado pré-natal e ar filtrado pós-natal (ANF-AF); e ar não filtrado pré e pós-natal (ANF-ANF). Os animais foram expostos a partir do 22º até o 90º dia de vida. Quando os animais completaram 30 dias de vida foram realizados os seguintes testes comportamentais: campo aberto, reconhecimento de objeto e labirinto cruz elevado. Os mesmos testes comportamentais foram repetidos aos 90º dias de idade. Os efeitos foram avaliados aos 90 dias de idade. Os resultados demonstram que filhotes cujas mães foram expostas a poluição atmosférica apresentaram comprometimento no desenvolvimento no 21º dia de vida. Em relação ao comportamento, observou-se que aos 90 dias de vida os animais apresentaram maiores alterações comportamentais, sendo que foi observada maior atividade locomotora nos grupos AF-ANF e ANF-ANF. De maneira geral, esses mesmo grupos exploraram durante mais tempo os objetos e o grupo ANF-AF apresentou um comportamento ansiolítico. O volume cerebral total não foi diferente entre os grupos, mas foi observado diminuição do volume do corpo caloso no grupo ANF-AF. Não foi observado alteração no número de neurônios no córtex cerebral; entretanto, houve diferença na espessura das camadas corticais, a III e a V. Ainda, houve aumento de micróglia no córtex e aumento de astrócitos no córtex, corpo caloso e regiões CA1 e giro denteado do grupo ANF-ANF. Não foi observado diferença de neurônios dopaminérgicos no estriado e de neurônios gabaérgicos no córtex entre grupos experimentais. A análise da expressão gênica evidenciou diminuição da expressão do gene BDNF no hipocampo dos animais do grupo ANF-ANF. Os resultados desse estudo demonstram que a exposição ao MP_{2.5} da cidade de São Paulo induz alterações morfológicas e funcionais no cérebro de camundongos.

Descritores: Poluição do ar; Comportamento animal; Material particulado; Sistema nervoso central; Histologia; Inflamação; Reação em cadeia da polimerase; Camundongos.

ABSTRACT

Di Domenico M. *Evaluation of the effects of pre and postnatal air pollution exposure on the central nervous system of mice* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Air pollution is a public health concern; Epidemiological and experimental studies demonstrate that air pollution may induce several effects on health, in various physiological systems; However, studies evaluating the effects on the central nervous system due to the pre and postnatal exposure to the pollutants, as well as changes due to the change of environment still remain scarce; Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of pre and postnatal air pollution exposure from Sao Paulo city in the central nervous system of mice; For this, BALB/c mice were exposed to the fine particulate material (MP_{2.5}) in the concentrated ambient particles (CPA) at a daily concentration of 600 µg/m³ during the gestational period (1;5 to 18;5 gestational day DG)) and postnatal; At the end of the breastfeeding period, the males were separated into the following experimental groups: pre and postnatal filtered air (AF-AF); prenatal filtered air and postnatal unfiltered air (AF-ANF); prenatal unfiltered air and postnatal filtered air (ANF-AF); and pre and postnatal unfiltered air (ANF-ANF); The animals were exposed from the 22nd to the 90th days of life; When animals were at postnatal day (PND) 30, the following behavioral tests were performed: open field, object recognition and elevated plus maze; The same behavioral tests were repeated at PND 90; The effects were evaluated at PND 90; The results showed that pups whose mothers were exposed to air pollution presented developmental impairment on the PND 21; Regarding the behavior, it was observed that at PND 90, the animals presented greater behavioral changes: a greater locomotor activity was observed in the AF-ANF and ANF-ANF groups; In general, these same groups explored objects longer and the ANF-AF group presented an anxiolytic behavior; The total brain volume was not different between groups, but it was observed that the volume of the corpus callosum was lower in the ANF-AF group; No change was observed in the number of neurons in the cerebral cortex; however, there was a difference in the thickness of the cortical layers, III and V; In addition, there was an increase of microglia in the cortex and increase of astrocytes in the cortex, corpus callosum and CA1 and dentate gyrus regions in ANF-ANF group; No difference in dopaminergic neurons in the striatum, and gabaergic neurons in the cortex were found between groups; Gene expression analysis showed a decrease in BDNF in the hippocampus of ANF-ANF group; The results of this study demonstrate that exposure to MP_{2.5} from Sao Paulo city induced morphological and functional changes in mice brain;

Descriptors: Air pollution; Behavioral, animal; Particulate matter; Central nervous system; Histology; Inflammation; Polymerase chain reaction; Mice.

---

1. INTRODUÇÃO

1.1 Poluição atmosférica

A poluição atmosférica é um problema de saúde pública mundial (Who, 2016). Ela é caracterizada pela contaminação do ar por qualquer agente físico, químico ou biológico que altera as características da atmosfera e, entre os possíveis contaminantes ambientais, a poluição apresenta maior alcance, pois não se limita a espaços geográficos. Consiste em uma mistura física e quimicamente diversificada de partículas e gases provenientes de fontes naturais, que incluem fenômenos da natureza como atividade vulcânica, incêndios florestais espontâneos, erosão do solo e/ou antropogênicas que são resultantes da ação do homem como queima de combustíveis fósseis por veículos, atividade industrial, entre outras (Dreher, 2000; Hei, 2002; Morakinyo *et al.*, 2016). A compreensão dos possíveis efeitos nocivos sobre a saúde se torna desafiadora, dada à extensa variedade de fontes, processos e substâncias que estão presentes na poluição.

Os primeiros relatos que marcaram a história em relação à elevada concentração de poluentes na atmosfera e efeitos nocivos à saúde datam do século XIX. O primeiro episódio, ocorrido na Bélgica em 1930, provocou a morte de aproximadamente 6 mil pessoas (Nemery *et al.*, 2001). Em 1948, na cidade de Donora nos Estados Unidos, mais da metade da população ficou internada e 20 pessoas morreram devido à inversão térmica ocasionada pela poluição e baixas temperaturas (Jacobs *et al.*, 2018). Anos mais tarde, em 1953, a cidade de Londres permaneceu durante quatro dias com uma intensa inversão térmica ocasionando a morte de mais de 4 mil pessoas por pneumonia, bronquite e doenças cardíacas (Brunekreef e Holgate, 2002). A partir de então, medidas preventivas começaram a ser tomadas por órgãos competentes na tentativa de controlar a emissão de poluentes para a atmosfera, mas, na ocasião, essas medidas ficaram muito aquém do considerado ideal para a saúde humana.

De maneira geral, os poluentes podem ser classificados quanto ao seu tamanho aerodinâmico, à fonte emissora e à origem. Quanto à origem, são classificados em poluentes primários e secundários. Os poluentes primários como o monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂) e dióxido de nitrogênio (NO₂), dióxido de enxofre (SO₂), entre outros, são emitidos diretamente para o ar pela queima de combustíveis fósseis. Os poluentes secundários, por sua vez, são formados na atmosfera a partir de reações químicas com poluentes primários e, pertencem a essa classe o ozônio (O₃), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ácido sulfúrico (H₂SO₄) (Mannucci *et al.*, 2015).

A constituição da poluição atmosférica varia de acordo com a localização geográfica, sazonalidade, bem como fontes emissoras. Em geral, é composta por materiais carbonáceos (orgânico e elementar), sulfatos, nitratos, carbonatos, metais, peróxidos, quartzo, silicatos, óxidos minerais, bactérias, vírus, pólen, detritos animal e vegetal e material particulado (MP) (Ghio *et al.*, 2012). Além disso, pode apresentar uma variedade de substâncias orgânicas como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) - HPAs nitrados (nitro-HPAs), HPAs oxigenados (oxi-HPAs) -, aldeídos, cetonas, quinonas, dentre outros (Valavanidis *et al.*, 2006; Morakinyo *et al.*, 2016).

Em 2016, cerca de 91% da população mundial estava morando em locais que apresentavam níveis de poluição acima dos preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Who, 2018). Diversos estudos têm demonstrado associação entre os índices de poluentes atmosféricos e desfechos clínicos negativos em consequência da exposição aguda e crônica (Dockery *et al.*, 1993; Dockery e Pope, 1994; Lepeule *et al.*, 2012; Raaschou-Nielsen *et al.*, 2013). De acordo com a OMS, em 2012, aproximadamente 7 milhões de mortes foram atribuídas à exposição da poluição do ar *outdoor* e *indoor*. Em relação ao número de mortes, 40% foram atribuídas à doença respiratória aguda e 40% por acidente vascular cerebral; 11% por doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC); 6% por câncer de pulmão e; 3% por doença cardíaca isquêmica (Who, 2014). Ainda, a poluição ambiental, tanto em grandes centros como em cidades rurais, foi relacionada à causa de morte prematura de 4,2 milhões de pessoas no mundo no ano de 2016 (Who, 2018).

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC - *International Agency for Research on Cancer*) classificou a poluição atmosférica e o MP como carcinogênicos para seres humanos (grupo 1) (IARC, 2013). Esta classificação está fundamentada em diversos estudos epidemiológicos que demonstram associação entre a exposição à poluição do ar e a incidência de câncer de pulmão (Pope *et al.*, 2002; Loomis *et al.*, 2013; Raaschou-Nielsen *et al.*, 2013; Loomis *et al.*, 2014). Além dos efeitos mais conhecidos sobre o sistema respiratório e cardiovascular, a poluição atmosférica está associada a desfechos adversos neurológicos, síndrome metabólica, efeitos reprodutivos, inflamação sistêmica, mudanças na função endotelial, entre outros (Brook *et al.*, 2010; Eze *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017).

Tendo em vista o grande número de pessoas que são involuntária e diariamente expostas à poluição, o estudo e compreensão do impacto sobre a saúde em todos os seus aspectos se torna um tópico essencial na tentativa de melhorar a qualidade e expectativa de vida da população e fundamentar políticas públicas de saúde e meio ambiente. Entre os compostos presentes na poluição atmosférica, daremos maior enfoque no material particulado e HPAs que são os poluentes de estudo deste trabalho.

1.1.1 Material particulado (MP)

Dentre os constituintes presentes na poluição atmosférica, o MP tem sido o poluente amplamente investigado tanto em estudos epidemiológicos quanto em estudos experimentais.

O MP é caracterizado como uma complexa mistura de substâncias sólidas e líquidas de componentes orgânicos e inorgânicos dentre os quais se destacam hidrocarbonetos, metais, sais e microrganismos (Donaldson *et al.*, 2001; Valavanidis *et al.*, 2008). De acordo com a fonte emissora e as condições climáticas, o MP pode variar de composição, tamanho e concentração (Hei, 2002). As partículas são classificadas de acordo com seu tamanho aerodinâmico em: partículas grossas (2,5–10 µm; MP₁₀); partículas finas (0,1–2,5 µm; MP_{2,5}); e partículas ultrafinas (PUF; <100 nm) (Hei, 2002; Nel *et al.*, 2006; Nemmar *et al.*, 2013; Falcon-Rodriguez *et al.*, 2016) (Figura 1).

Adaptada de Nemmar *et al.*, (2013).

Figura 1 - Invasividade do material particulado nas vias áreas em relação ao seu tamanho aerodinâmico

O tamanho da partícula é importante principalmente em relação aos efeitos sobre a saúde, pois é inversamente proporcional à toxicidade exercida no organismo. As partículas de maior tamanho aerodinâmico depositam-se quase que exclusivamente no trato respiratório superior enquanto que as partículas finas e ultrafinas podem atingir os alvéolos e, conseqüentemente, alcançar a circulação sistêmica e atingir outros órgãos (Nemmar *et al.*, 2001; Hei, 2002; Brook *et al.*, 2010). Assim, as PUF são potencialmente mais perigosas, pois, além da toxicidade relacionada ao seu tamanho, essas partículas estão presentes em maior concentração na atmosfera e, em termos de volume, apresentam maior área de superfície total quando comparado às demais partículas o que possibilita a presença de um maior número de grupos reativos adsorvidos em sua superfície (Hei, 2002; Nemmar *et al.*, 2013; Falcon-Rodriguez *et al.*, 2016).

1.1.2 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

Os HPAs, presentes na atmosfera, são oriundos principalmente da incompleta combustão de material orgânico ocasionada por atividades antropogênicas. Basicamente, são originados de processos de cozimento e aquecimento que utilizam substâncias orgânicas como carvão, madeira, pela atividade industrial, pela queima de cigarro e por veículos automotores (Morakinyo *et al.*, 2016). Os veículos automotores são a principal fonte de HPAS em áreas urbanas.

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA - United States *Environmental Protection Agency*) classifica 16 HPAs como sendo prioritários para o monitoramento ambiental de poluentes orgânicos (Epa, 2014). São eles: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, antraceno, fenantreno, fluoranteno, pireno, criseno, benz[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno, benzo[g, h, i]perileno e dibenz[a,h]antraceno (Epa, 2014).

Uma das principais preocupações com relação à presença de HPAs na atmosfera está relacionada com o potencial deletério desses compostos sobre a saúde humana. Alguns dos compostos são classificados como carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos. Entre os compostos, o benzo[a]pireno, um dos principais HPA, foi classificado como cancerígeno para seres humanos (Grupo 2A) pela IARC (Iarc, 2010).

1.2 Poluição atmosférica no Brasil e em São Paulo

A OMS é a agência internacional que estabelece padrões para diversos poluentes em concentrações consideradas razoavelmente seguras para a saúde humana. A recomendação preconizada pela agência para a exposição de $MP_{2.5}$ é de $10 \mu g/m^3$ como média anual e de $25 \mu g/m^3$ para média diária. Para o MP_{10} , a média anual e a média diária de exposição são $20 \mu g/m^3$ e $50 \mu g/m^3$, respectivamente (Who, 2005).

Os padrões recomendados pela OMS levam em conta a heterogeneidade; mas a agência reconhece que governos devem considerar as

circunstâncias locais para que sejam adotados valores como padrões nacionais na tentativa de balancear os riscos à saúde, viabilidade técnica, economia e fatores políticos e sociais.

Nesse sentido, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) é a agência responsável por estabelecer normas, critérios e os padrões referentes ao controle e monitoramento da qualidade do ar no Brasil. Segundo a Resolução nº 491 de 19 de Novembro de 2018 do CONAMA considera-se poluente atmosférico:

Qualquer forma de matéria em quantidade, concentração, tempo ou outras características, que tornem ou possam tornar o ar impróprio ou nocivo à saúde, inconveniente ao bem-estar público, danoso aos materiais, à fauna e flora ou prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade ou às atividades normais da comunidade (Conama, 2018).

O CONAMA, com o objetivo de reduzir e controlar a contaminação atmosférica e a emissão de ruído por veículos automotores, publicou os padrões de qualidade do ar como parte estratégica do Programa Nacional de Controle da Qualidade do Ar (PRONAR). Esse programa incorporou outros como o Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores: PROCONVE (automóveis, caminhões, ônibus e máquinas rodoviárias e agrícolas) e PROMOT (motocicletas e similares) fixando prazos, limites máximos de emissão e estabelecendo exigências tecnológicas para veículos automotores, nacionais e importados.

A Resolução nº 491 de 19/11/2018, que revogou a Resolução nº 3 de 1990, estabelece padrões da qualidade do ar sobre controle de emissão de gases poluentes que devem ser cumpridos em prazo determinado. Assim, os Padrões de Qualidade do Ar serão adotados sequencialmente em quatro etapas até o padrão de qualidade do ar final, conforme tabela 1, e os Padrões de Qualidade do Ar intermediários, o PI-1, entraram em vigor a partir da data de publicação da Resolução.

De acordo com a Resolução, os valores limites de MP₁₀ são 120 e 40 µg/m³ para emissão diária e anual, respectivamente. Já para o MP_{2.5}, cujo

limite era inexistente até a última Resolução, passou a ser considerados valores de $60 \mu\text{g}/\text{m}^3$ para média diária e de $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ para a média anual.

Esses valores são aproximadamente duas vezes maiores do que os recomendados pela OMS. Entretanto, é importante mencionar que a nova Resolução difere da antiga em relação à caracterização dos poluentes e torna-se mais semelhante à classificação estabelecida pela OMS. Ademais, a atual Resolução também estabelece que órgãos ambientais estaduais e distritais devam elaborar um Plano de Controle de Emissões Atmosféricas definido em regulamentação própria em até 3 anos a partir da publicação da Resolução.

Tabela 1 - Padrões de qualidade do ar de acordo com a Resolução Nº 491, de Novembro de 2018, CONAMA.

Poluente Atmosférico	Período de Referência	PI-1 (mg/m^3)	PI-2 (mg/m^3)	PI-3 (mg/m^3)	PF (mg/m^3)	ppm
Material Particulado - MP_{10}	24 horas	120	100	75	50	-
	Anual ¹	40	35	30	20	-
Material Particulado - $\text{MP}_{2.5}$	24 horas	60	50	37	25	-
	Anual ¹	20	17	15	10	-
Dióxido de Enxofre - SO_2	24 horas	125	50	30	20	-
	Anual ¹	40	30	20	-	-
Dióxido de Nitrogênio - NO_2	1 hora ²	260	240	220	200	-
	Anual ¹	60	50	45	40	-
Ozônio - O_3	8 horas ³	140	130	120	100	-
Fumaça	24 horas	120	100	75	50	-
	Anual ¹	40	35	30	20	-
Monóxido de Carbono - CO	8 horas ³	-	-	-	-	9
Partículas Totais em Suspensão - PTS	24 horas	-	-	-	240	-
	Anual ⁴	-	-	-	80	-
Chumbo - Pb5	Anual ¹	-	-	-	0,5	-

Fonte: Adaptado de CONAMA, 2018.

1 - média aritmética anual

2 - média horária

3 - máxima média móvel obtida no dia

4 - média geométrica anual

5 - medido nas partículas totais em suspensão

No Estado de São Paulo, desde a década de 70, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) mantém uma rede de

monitoramento da qualidade do ar para avaliar os níveis de poluição atmosférica. Em 2013, o Decreto Estadual nº 59.113 de 23/04/2013 estabeleceu novos padrões de qualidade do ar para o Estado de São Paulo, os quais também são baseados nas diretrizes estabelecidas pela OMS. Esse decreto apresenta metas progressivas e intermediárias a serem cumpridas, até chegar ao padrão final, onde a poluição atmosférica será reduzida a níveis desejáveis ao longo do tempo. Assim, a administração da qualidade do ar no Estado de São Paulo é efetuada através de Padrões da Qualidade do Ar, conforme os seguintes critérios (Cetesb, 2017) (Tabela 2):

a) Metas intermediárias (MI) – estabelecidas como valores temporários a serem cumpridos em etapas, visando à melhoria gradativa da qualidade do ar por meio da redução das emissões de fontes fixas e móveis;

b) Padrões finais (PF) – padrões determinados para que a saúde da população seja preservada ao máximo em relação aos danos causados pela exposição à poluição atmosférica.

Tabela 2 - Padrões Estaduais de Qualidade do Ar do Estado de São Paulo pelo Decreto Estadual nº 59.113 de 23/04/2013.

Poluente	Tempo de amostragem	MI 1 (ug/m³)	MI 2 (ug/m³)	MI 3 (ug/m³)	PF (ug/m³)
Partículas inaláveis (MP ₁₀)	24 horas	120	100	75	50
	MAA	40	35	30	20
Partículas inaláveis finas (MP _{2.5})	24 horas	60	50	37	25
	MAA	20	17	15	10

Fonte: Adaptado de CETESB, 2016.
MAA – média aritmética anual.

Apesar de a legislação vigente para o Estado de São Paulo e Brasil possuírem metas estratégicas para a redução de emissão de poluentes de forma subsequente, não há prazos estipulados para cumprimento das metas propostas.

Ainda, vale ressaltar que, principalmente nos centros urbanos, a maior fonte de emissão de poluentes são os veículos automotores, os quais são responsáveis pela queima de combustíveis fósseis e, conseqüentemente, pela liberação de vários poluentes para a atmosfera. Assim, mesmo após a

estipulação dos níveis de concentração dos principais poluentes a limites cada vez mais reduzidos, os efeitos deletérios dos poluentes sobre a saúde humana ainda persistem.

1.3 Impactos da poluição atmosférica à saúde

A exposição à poluição atmosférica tem sido correlacionada a efeitos adversos à saúde. Esses efeitos variam de baixo peso ao nascer (Veras *et al.*, 2009; Lakshmanan *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017) a doenças mais graves como astrocitoma e leucemia linfoblástica aguda em crianças (Lavigne *et al.*, 2017), tumores cerebrais malignos (Andersen *et al.*, 2018) e câncer de pulmão (Gogna *et al.*, 2019).

Diversos estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que a exposição aos poluentes está associada à morbidade e à mortalidade por várias doenças, sendo que os efeitos adversos não se restringem ao sistema respiratório, apesar de este ser afetado primeiramente. Estudos experimentais relatam que a exposição às partículas presentes na atmosfera pode causar danos sistêmicos cardiovasculares (Dominici *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2013), cerebrais (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2004; Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2015) e reprodutivos (Veras *et al.*, 2009).

Recentemente, Fajersztajn *et al.*, (2017) em uma revisão sistemática e meta-análise avaliaram os efeitos a curto prazo da poluição das partículas finas em eventos diários de saúde na América Latina. Nesse estudo, os autores observaram associações significativas entre a exposição de curto prazo a MP_{2.5} e o aumento do risco de mortalidade respiratória e cardiovascular em todas as idades.

Os efeitos adversos para a saúde são motivo de preocupação para a maioria dos governos e para as organizações de saúde. Todo ano, milhares de pessoas são involuntariamente expostas à poluição atmosférica a uma concentração acima dos valores recomendados como seguros à saúde humana.

No Brasil, São Paulo é a maior cidade do país com mais de 12 milhões de habitantes e frota veicular de aproximadamente 8.8 milhões de veículos

(Detran, 2019; Ibge, 2019). Apesar de haver redução da emissão de poluentes na atmosfera devido à incorporação de veículos com novas tecnologias (Proconve, 2016; Cetesb, 2017), a cidade de São Paulo apresenta elevados índices de poluição atmosférica, que, por sua vez, estão relacionados ao agravamento de problemas de saúde e à patogênese de doenças, além de consideráveis gastos atrelados a hospitalizações (Abe e Miraglia, 2016).

Nesse sentido, estudos conduzidos na cidade de São Paulo evidenciaram que os índices de $MP_{2.5}$ e MP_{10} estão acima dos níveis recomendados pela OMS e, conseqüentemente, foram observados efeitos negativos agudos e crônicos (Miraglia e Gouveia, 2014; Abe e Miraglia, 2016; Ferreira *et al.*, 2016; Gouveia *et al.*, 2017). Abe e Miraglia (2016) demonstraram que se em São Paulo os níveis de $MP_{2.5}$ fossem equivalentes a $10 \mu g/m^3$, correspondente ao limite estabelecido pela OMS, mais de 5.012 óbitos prematuros seriam evitados (mais de 266 mil ganhos de vida) e haveria uma economia (anual) de 15,1 bilhões de dólares. Além disso, esse estudo demonstrou que se São Paulo pudesse diminuir a média de $MP_{2.5}$ em $5 \mu g/m^3$, cerca de 1.724 mortes seriam evitadas anualmente e isso resultaria em um aumento de 5 meses na expectativa de vida e economizaria 4,96 bilhões de dólares por ano em termos de gastos em saúde (Abe e Miraglia, 2016).

Apesar de muitos estudos demonstrarem os efeitos adversos decorrentes da exposição à poluição no sistema respiratório e cardiovascular, apenas nos últimos anos tem-se investigado a relação entre a exposição à poluição do ar e efeitos neurológicos.

A poluição causa efeitos deletérios no sistema nervoso central (SNC) por duas principais vias: a via direta e a indireta (Figura 2). A via direta se dá pelo nervo olfatório, onde as partículas chegam ao cérebro por deslocamento através desse nervo. Já na via indireta, as partículas adentram a circulação sistêmica e apresentam a capacidade de comprometer a estrutura da barreira hematoencefálica (Oberdorster *et al.*, 2004; Oberdörster *et al.*, 2005; Elder *et al.*, 2006; Heidari Nejad *et al.*, 2015; Heusinkveld *et al.*, 2016).

Adaptado de Heusinkveld et al., (2016).

Figura 2 - Princípio de rotas de translocação de partículas e vias que permitem acesso ao sistema nervoso central

Nessa perspectiva, estudos mostram que o cérebro é um órgão suscetível à exposição aos poluentes, sendo que os mecanismos que desencadeiam efeitos deletérios são o estresse oxidativo, a inflamação, e o desequilíbrio de neurotransmissores. A susceptibilidade deste órgão está associada à alta demanda metabólica, alto consumo de energia, alto teor celular de lipídios e proteínas e baixos níveis de enzimas endógenas, como a superóxido dismutase (SOD), capazes de eliminar substâncias tóxicas (Block e Calderón-Garcidueñas, 2009; Block *et al.*, 2012; Genc *et al.*, 2012).

1.4 Sistema nervoso central (SNC)

1.4.1 Desenvolvimento do SNC

O desenvolvimento do SNC humano se inicia na terceira semana de gestação, na fase de gástrula, pelo espessamento do ectoderma que forma a placa neural e a subsequente formação do tubo neural. Por sua vez, a

formação do tubo neural se dá com o aparecimento de duas cristas que se formam nos dois lados da placa neural (Figura 3A). Após crescimento, essas cristas fundem-se e formam um tubo (Figura 3B e C), sendo que os neuroporos anterior e posterior são os últimos segmentos do tubo que se fecham (Figura 3D). Após a formação do tubo, as células progenitoras formam uma camada simples de células que revestem a parede do mesmo.

No embrião, o centro do tubo neural é oco e, conforme o cérebro se torna maior e mais complexo, a cavidade oca também se modifica e forma o sistema ventricular do cérebro. Como as células progenitoras neurais estão localizadas na região que se tornará os ventrículos, a região é denominada de zona ventricular (ZV). As células progenitoras neurais na região mais rostral do tubo neural darão origem ao cérebro, enquanto que as da região caudal darão origem ao cérebro posterior e coluna vertebral (Stiles e Jernigan, 2010).

Logo antes do fechamento do tubo neural, a extremidade anterior do tubo expande-se e forma três vesículas cerebrais primárias denominadas prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo (Figura 3E). Essas estruturas se dividirão formando cinco vesículas secundárias (Figura 3F). O prosencéfalo divide-se em telencéfalo e diencéfalo, onde o primeiro constitui os hemisférios cerebrais e a sua cavidade os ventrículos laterais, já o segundo dá origem ao tálamo, hipotálamo e vesículas ópticas. O mesencéfalo permanece sem sofrer divisão e sua cavidade se tornará o aqueduto cerebral. Já o rombencéfalo, origina o metencéfalo e o mielencéfalo, onde o primeiro formará o cerebelo e a ponte, e o segundo formará o bulbo (Stiles e Jernigan, 2010).

Adaptado de Stiles e Jernigan, (2010).

Figura 3 - Alterações na morfologia do embrião durante o período embrionário

O tubo neural e as células neuroepiteliais (NECs) que o constituem são os precursores de todos os futuros neurônios (Tan e Shi, 2013). As células neuroepiteliais são capazes de gerar o primeiro grupo de neurônios: as células radiais gliais (RGs). Esse tipo celular, por sua vez, corresponde a principal célula progenitora neuronal e é responsável pela produção de neurônios e de células da glia (Tan e Shi, 2013; Paridaen e Huttner, 2014).

1.4.2 O córtex cerebral

O desenvolvimento do córtex cerebral envolve múltiplos tipos de células progenitoras e requer a execução orquestrada de uma série de processos - engloba desde a divisão dessas células, diferenciação e até o destino final para

a formação dos subtipos de células gliais e neuronais (Kwan *et al.*, 2012; Suzuki e Hirata, 2013; Kumamoto e Hanashima, 2014).

Em mamíferos, o córtex é dividido em seis camadas horizontais, sendo que, com exceção da camada mais superficial (camada I), as camadas mais profundas são formadas por neurônios que migraram em uma fase inicial do desenvolvimento cerebral e as camadas mais superficiais, por neurônios que migram mais tardiamente (Stiles e Jernigan, 2010). Cada uma dessas camadas apresenta neurônios de projeção excitatória e interneurônios inibitórios e são distintas molecular e funcionalmente (Kwan *et al.*, 2012; Suzuki e Hirata, 2013).

Além dessa disposição, o córtex organiza-se tangencialmente em distintos domínios funcionais (Tuoc *et al.*, 2014). Essa configuração fornece a base funcional para a construção de circuitos neurais de comportamento complexo que proporcionam funções cognitivas capazes de regular as funções sensoriais, motoras, emocionais e cognitivas.

Durante a embriogênese, os primeiros neurônios de projeção cortical migram e se estabelecem como uma camada dentro da região da pré-placa (PP), que se forma entre a zona ventricular e as meninges e forma a camada I (Figura 4). Essa região é em seguida dividida em duas regiões distintas pela segunda leva de neurônios que migram radialmente e originam a zona marginal (ZM) e a subplaca (SP) (Stiles e Jernigan, 2010; Marín e Müller, 2014). Esses neurônios começam a formar uma nova região entre o ZM e SP que é a placa cortical emergente (CP). As primeiras células que chegam nessa região formam a camada VI e os neurônios subsequentes formam sucessivamente camadas mais superficiais de tal forma que a ordem de migração foi descrita como sendo de dentro para fora (Stiles e Jernigan, 2010). Tanto a ZM como a SP são camadas cerebrais transitórias que desempenham um papel crítico no desenvolvimento do córtex, mas ambas desaparecem em grande parte até o final do período fetal (Stiles e Jernigan, 2010) (Figura 4).

Adaptado de Kwan *et al.*, (2012) e Shibata *et al.*, (2015).

Figura 4 - Representação esquemática da geração e migração da projeção de neurônios no neocórtex de mamíferos

A camada I é uma camada relativamente escassa de células e acomoda principalmente sinapses intercelulares de fibras axonais e tuftos dendríticos de neurônios piramidais. Além disso, durante o desenvolvimento é constituída de uma população única de neurônios chamados Cajal-Retzius e apenas algumas dessas células sobrevivem até a idade adulta. Esses neurônios controlam a migração de neurônios projetores através da secreção da proteína reelina e também estão envolvidos na proliferação de projeções de neurônios tardios (Kumamoto e Hanashima, 2014).

As camadas superiores (camada II e III) contêm neurônios que apresentam morfologia piramidal com dendritos apicais longos atingindo a camada I e também conexão axônica com outros neurônios neocorticais. Os neurônios se projetam através do corpo caloso e estabelecem conexões sinápticas intra e inter-hemisféricas.

Em roedores a distinção entre as camadas II e III não é tão clara como em primatas. Os neurônios da camada IV são piramidais e espinhosos (granulados). Além disso, esses neurônios são os principais receptores aferentes talâmicos que transmitem informações sensoriais dentro do neocórtex, pois é a principal fonte de entrada de sinais de órgãos periféricos no

neocórtex. Já as camadas profundas (camada V e VI) contêm neurônios piramidais que projetam axônios eferentes para alvos extracorticais. Mais especificamente, os neurônios da camada V enviam axônios descendentes para várias regiões do tronco encefálico, incluindo o colículo superior e medula espinhal, enquanto que os neurônios da camada VI projetam principalmente para os núcleos talâmicos (Kwan *et al.*, 2012; Suzuki e Hirata, 2013; Marín e Müller, 2014) (Figura 4).

À medida que os neurônios são formados eles estabelecem interações com demais células. Esses princípios de interação constroem um fluxo de informações estereotipado: a entrada talâmica é recebida pelos neurônios na camada central (camada IV), posteriormente transmitida e processada pelos neurônios das camadas superiores (camada II/III) e, finalmente, os neurônios da camada inferior (camada V e VI) produzem a informação que é então processada para vários alvos fora do córtex. Devido a este fluxo de informação estereotipado através de camadas, evidencia-se a importância da organização tangencial além da horizontal no neocórtex (Suzuki e Hirata, 2013).

Apesar dos dois principais subtipos de neurônios estarem presentes no córtex, os mesmos possuem diferentes origens. Todos os neurônios excitatórios são derivados das células gliais radiais da zona ventricular e subventricular do telencéfalo dorsal e migram radialmente para a placa cortical onde constituirão o futuro córtex. Já os interneurônios inibitórios são produzidos no telencéfalo ventral, nas eminências ganglionares medianas ventrais, caudal e a área pré-óptica e migram primeiramente tangencialmente para alcançar o telencéfalo dorsal através da zona subventricular e da zona intermediária e depois migram radialmente dentro das diferentes camadas corticais e finalmente se instalam na CP (Stiles e Jernigan, 2010; Tanaka e Nakajima, 2012; Tan e Shi, 2013; Marín e Müller, 2014).

A migração dos neurônios se dá devido a fatores intrínsecos e extrínsecos, os quais contribuem para a migração apropriada. A expressão de fatores de transcrição é essencial para a correta migração, assim como respostas quimioatrativas e quimiorrepulsivas (Heng *et al.*, 2007; Luhmann *et al.*, 2015).

Após os neurônios terem alcançado a região alvo no córtex, os novos neurônios precisam se tornar parte das redes de processamento. Para isso, os neurônios precisam desenvolver processos neuronais (axônios e dendritos) que lhes permitam se comunicar com outros neurônios (Stiles, 2010). Cada célula desenvolve um axônio que é o principal meio de enviar sinais de neurônios e vários dendritos que são os principais locais para receber o sinal de outros neurônios. Os axônios podem percorrer longas distâncias e, uma vez que o axônio atingiu seu alvo, ocorrem sinapses que são conexões que permitem a transmissão de informações eletroquímicas, meio essencial de comunicação no cérebro (Stiles, 2010).

Em humanos, a produção de neurônios começa no 42º dia embrionário e, conforme produção, eles migram para diferentes áreas cerebrais onde começam a fazer conexões com outros neurônios e a estabelecer redes rudimentares de comunicação. Em adultos, a neurogênese ocorre em regiões específicas: na zona ventricular-subventricular que está localizada na parede lateral dos ventrículos laterais e na zona subgranular no giro dentado do hipocampo (Lledo *et al.*, 2006; Ming e Song, 2011; Kaneko *et al.*, 2017; Kyrrousi *et al.*, 2017).

Tanto mecanismos intrínsecos como extrínsecos regulam a neurogênese em adultos. Além disso, ela é e regulada por vários estímulos fisiológicos: exercício físico aumenta a proliferação celular; envelhecimento promove significativa redução na proliferação celular; aprendizado modula neurogênese em adultos; convulsões aumentam a proliferação celular e acidente vascular cerebral além de induzir a proliferação celular promove a migração de neurônios novos para os locais de infarto e estresse crônico promove a diminuição da proliferação celular (Ming e Song, 2011).

Durante a neurodegeneração, ativação da micróglia residente, astrócitos e infiltração de macrófagos periféricos liberam uma infinidade de citocinas, quimiocinas, neurotransmissores e espécies reativas de oxigênio, que por sua vez afetam vários aspectos da neurogênese adulta. A perturbação de qualquer uma das etapas da neurogênese geralmente resulta em anomalias organizacionais significativas, levando a déficits de aprendizado, deficiência cognitiva e epilepsia intratável (Barkovich *et al.*, 2012).

O cérebro é o órgão mais complexo dos seres vivos. É o local onde as informações de todas as modalidades sensoriais são processadas e integradas com informações previamente armazenadas; dá origem a todos os tipos de comportamentos – motor e sociais –, incluindo os mais característicos dos seres humanos como: cantar, senso de humor, pensamento abstrato entre outros (Kandel *et al.*, 2013).

A investigação das consequências cerebrais decorrentes da exposição à poluição atmosférica tem sido explorada pela literatura científica. Alguns trabalhos avaliaram os efeitos da exposição anterior e durante a gestação; enquanto que outros a exposição ocorreu somente no período gestacional; e outros ainda durante a gestação e no período pós-gestacional. No entanto, ainda é importante o estudo diferenciado das fases de desenvolvimento embrionário que, por sua vez, pode influenciar o desenvolvimento de patologias cognitivas na idade adulta.

1.5 Exposição à xenobióticos no desenvolvimento fetal

A gravidez é considerada uma complexa situação biológica que apresenta janelas críticas de desenvolvimento nas quais substâncias exógenas ambientais podem interferir na formação do embrião (Wang *et al.*, 2018). Deste modo, a exposição a substâncias tóxicas durante a gestação pode afetar o desenvolvimento do embrião e, também, prejudicar o desenvolvimento pós-natal.

Para que substâncias exógenas alcancem o feto, elas precisam, necessariamente, se translocar pela porta de entrada do organismo materno e atravessar a barreira placentária (Pietrojusti *et al.*, 2013; Hougaard *et al.*, 2015). A placenta possui tanto componente fetal quanto materno e é um órgão vital para o embrião, pois promove funções críticas como trocas gasosas, nutrição e proteção. Durante a gestação, os mecanismos de detoxificação do feto em desenvolvimento estão imaturos e a placenta garante uma proteção parcial contra a entrada de substância tóxicas ambientais (Rice e Barone, 2000; Grandjean e Landrigan, 2014). Ainda, vale ressaltar que a placenta e o embrião

sofrem mudanças anatômicas e funcionais durante a gravidez tornando-os mais suscetíveis a interferências externas (Pietroiusti *et al.*, 2013).

A exposição a substâncias exógenas pode interferir com o metabolismo e sistema imune materno, reduzir o aporte nutricional e as trocas gasosas para com o feto (Hougaard *et al.*, 2015). Somado aos danos diretos citados, a exposição materna a agentes exógenos pode induzir danos indiretos desencadeados pelo estresse oxidativo, inflamação e disfunção placentária que além de prejudicar o crescimento fetal (Brockmeyer e D'angiulli, 2016), podem induzir perturbações e consequências deletérias que perduram na vida do feto (Allen, Joshua L. *et al.*, 2014; Zhang, T. *et al.*, 2018).

Estudos experimentais e epidemiológicos têm demonstrado associação entre exposição à poluição ambiental e efeitos adversos no desenvolvimento fetal. Liu *et al.*, (2016) observou que a exposição ao MP_{2.5} pode afetar diretamente a placenta induzindo alterações patológicas e inflamação. Ainda, a exposição ao MP_{2.5} pode alterar a expressão de genes, como a via do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) que está envolvida nos processos de desenvolvimento cerebral, na placenta de humanos (Saenen *et al.*, 2015).

Além disso, estudos epidemiológicos demonstram que a exposição materna ao MP, partículas de diesel e O₃ estão associadas com baixo peso ao nascer, parto prematuro e aumento da mortalidade, entre outros (Michikawa *et al.*, 2017; Klepac *et al.*, 2018; Maghbooli *et al.*, 2018; Li, Z. *et al.*, 2019). Isso está potencialmente relacionado ao dano causado pela poluição à placenta (Veras *et al.*, 2008; Barrett, 2016). Ademais, a poluição atmosférica parece exercer efeito adverso durante a maturação cerebral, trazendo consequências críticas para o desenvolvimento (Harris *et al.*, 2016). Ressalta-se que durante o período gestacional e na primeira infância há uma proteção parcial contra a entrada de substâncias químicas, pois a barreira hematoencefálica não está completamente formada (Zheng *et al.*, 2003).

O sistema imune é a interface do organismo com o meio ambiente. Sabe-se que diversas quimiocinas e citocinas são fundamentais para a migração neural e microglial, diferenciação, maturação sináptica entre outros processos (Deverman e Patterson, 2009; Stolp, 2013).

Em relação ao desenvolvimento neural, estudos relatam que a exposição a partículas finas e ultrafinas durante o período embrionário afeta a maturação de oligodendrócitos e a mielização do cérebro na idade adulta (Klocke *et al.*, 2018). Além disso, alterações comportamentais e patológicas têm sido relacionadas à exposição a partículas ultrafinas durante o desenvolvimento embrionário (Klocke *et al.*, 2017; Kulas *et al.*, 2018).

Em humanos foram verificadas alterações estruturais no córtex cerebral decorrente da exposição a partículas finas em crianças holandesas (Guxens *et al.*, 2018). Ademais, estudos relatam que a exposição à poluição, NO₂, MP₁₀, e benzeno no período pré-natal prejudica o índice de desenvolvimento mental e psicomotor especialmente até os 6 meses de vida (Guxens *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014) e está associado a prejuízos no desenvolvimento cognitivo (Lertxundi *et al.*, 2015). Estudo realizado por Lin *et al.*, (2014) verificou que a exposição a hidrocarbonetos não metano (compreendem os hidrocarbonetos totais menos a parcela de metano) no segundo e terceiro trimestre gestacional causou prejuízo motor grosso aos 6 meses. Além disso, à exposição ao SO₂ durante toda a gestação até 12 meses de idade esteve associado com alterações no movimento motor fino aos 18 meses. Outros estudos demonstram redução no desenvolvimento cognitivo associado à poluição atmosférica proveniente do tráfego veicular (Van Kempen *et al.*, 2012; Sunyer *et al.*, 2015; Basagaña *et al.*, 2016).

Os prejuízos causados durante o desenvolvimento não se limitam às partículas ambientais. Sabe-se que a poluição atmosférica é constituída por uma mistura de poluentes e, entre eles, os metais e HPAs também apresentam efeitos tóxicos no desenvolvimento da prole resultando em prejuízos cerebrais (Clarkson, 1987; Jedrychowski *et al.*, 2015; Chibowska *et al.*, 2016; Karri *et al.*, 2016; Perera *et al.*, 2018).

Ainda, vale ressaltar que exposições a poluentes ambientais no início da vida podem estar relacionadas à patogênese de doenças neurodegenerativas (Landrigan *et al.*, 2005). Isso enfatiza a importância de se estudar os mecanismos pelos quais o embrião em desenvolvimento é afetado.

1.6 Toxicidade da poluição atmosférica

Estudos conduzidos em modelo animal auxiliam a elucidar os mecanismos envolvidos nos distúrbios relacionados à exposição a poluentes ambientais. Esses estudos são importantes para a compreensão dos mecanismos envolvidos bem como, na prevenção de efeitos adversos à saúde dos indivíduos expostos.

Nesse sentido, é notável o crescimento, principalmente na última década, de trabalhos que investigam a relação entre o desenvolvimento cerebral e a exposição aos poluentes em modelos experimentais. A literatura explora alguns mecanismos pelos quais os componentes da poluição atmosférica desencadeiam efeitos tóxicos nos organismos expostos. Entre eles, destacam-se o estresse oxidativo, a inflamação e alterações comportamentais (Block e Calderón-Garcidueñas, 2009; Genc *et al.*, 2012; Brockmeyer e D'angiulli, 2016). Essas alterações são capazes de alterar equilíbrio fisiológico e estão envolvidas na patogênese de várias doenças.

A inflamação e o estresse oxidativo parecem ser os principais mecanismos envolvidos nos efeitos adversos da exposição ao MP. O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio no balanço entre a produção de espécies reativas (ERs), como as de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), e defesas antioxidantes, como a enzima catalase e a SOD, havendo prevalência de estado pró-oxidante (Prahalad *et al.*, 1999; Dellinger *et al.*, 2001; Valavanidis *et al.*, 2008; Bardaweel *et al.*, 2018).

Em condições fisiológicas, as enzimas antioxidantes são capazes de proteger o organismo contra o dano oxidativo, como a lipoperoxidação, oxidação de proteínas, e dano ao DNA induzido pelas ERs (Halliwell e Gutteridge, 1990; Valko *et al.*, 2007). Entretanto, pode haver uma exacerbação de ER decorrente de um estímulo não fisiológico, como por exemplo, a exposição a poluentes e, isso culminar no estresse oxidativo e dano tecidual.

O processo de inflamação, após a exposição à xenobióticos, resulta em uma complexa sequência de eventos que objetivam remover a fonte de inflamação e resolver a reação inflamatória. Inicialmente, a inflamação atua como um mecanismo protetor que remove o estímulo de injúria. Porém, quando

há exacerbação do estímulo, a resposta inflamatória gera injúria ao tecido (Block e Calderón-Garcidueñas, 2009; Kraft e Harry, 2011; Wang *et al.*, 2017).

Um dos primeiros estudos relatados na literatura a investigar os efeitos do MP foi realizado por Campbell e colaboradores. Nesse estudo, os autores evidenciaram que os níveis de citocinas pró-inflamatórias, interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB) estavam mais elevados no tecido cerebral dos camundongos expostos ao material particulado do que os animais não expostos (Campbell *et al.*, 2005).

Nesse sentido, estudos têm demonstrado que a exposição gestacional a poluentes ambientais causa aumento de citocinas pró-inflamatórias, de ciclo-oxigenase 2 (COX-2), de proteína glial fibrilar ácida (GFAP, marcador de astrócitos ativados), de proteína adaptadora ligante de cálcio ionizado 1 (IBA-1, marcador de micróglia ativa) no cérebro de camundongos (Kulas *et al.*, 2018; Umezawa *et al.*, 2018). Church *et al.*, (2018) evidenciaram que a exposição no período gestacional até o 10º dia pós-natal a uma concentração de 135,8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de MP_{2.5} causou alterações de maneira sexo-dependente que perduraram na vida dos animais, sendo que as alterações estão relacionadas a déficits comportamentais semelhantes ao autismo.

A exposição a poluentes ambientais na fase adulta induziu estresse oxidativo e aumentou a concentração de micróglia ativa em animais expostos durante um mês (Levesque *et al.*, 2011) e também provocou aumento de micróglia no corpo caloso de animais expostos durante 10 semanas a nanopartículas de MP (Babadjouni *et al.*, 2018).

Outros estudos demonstraram que a exposição a curto prazo ao MP_{2.5} e ao carbono elementar causa em camundongos aumento da expressão de genes relacionados à resposta inflamatória no hipocampo com alteração de COX-2, óxido nítrico sintase induzida (NOS₂ ou iNOS), óxido nítrico sintase endotelial (NOS₃ ou eNOS), fator nuclear eritróide derivado 2 tipo 2 (NFE2L2) e diminuição da expressão no bulbo olfatório de interleucina 1 α (IL-1 α), COX-2, NFE2L2, interleucina 6 (IL-6) e BDNF (Bos, De Boever, Emmerechts, *et al.*, 2012). Além disso, um estudo verificou que a exposição durante 8 semanas a partículas ultrafinas ativa o fator nuclear eritróide 2 (Nrf-2) em conjunto com aumento da expressão de heme oxigenase 1 (HO-1), marcador pró-oxidante,

e a superóxido dismutase 2 (SOD2), enzima antioxidante, no estriado e no hipocampo, além de ativar NF- κ B aumentando a expressão de IL-1 β e TNF α no estriado. Por outro lado, as partículas grossas aumentam a expressão de marcadores de resposta de proteínas mal enoveladas pela ativação do fator nuclear XBP-1 avaliado pela proteína de ligação X-box 1 (XBP-1S) em conjunto com o aumento da expressão da proteína chaperona BiP e aumento HO-1 e SOD2 no estriado sem ativação do fator nuclear Nrf-2 nessa estrutura (Guerra *et al.*, 2013).

A exposição crônica durante 10 meses ao MP_{2.5} também está associada ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, TNF α e interleucina 1 β (IL-1 β), HO-1 e alterações na estrutura do hipocampo; além de comportamento tipo-depressivo e prejuízo cognitivo referente ao aprendizado espacial e à memória em camundongos (Fonken *et al.*, 2011).

Outros estudos demonstram que a exposição induzida à nanopartículas de combustão diesel durante três meses prejudica a memória, induz aumento do número de micróglias ativadas no hipocampo e alteração de genes relacionados ao metabolismo do glutamato em camundongos fêmeas (Win-Shwe, T.-T., Fujimaki, H., *et al.*, 2012).

O mesmo grupo de pesquisadores investigou os efeitos cerebrais causados pela exposição aos aerossóis secundários orgânicos (SOA). Assim, os pesquisadores desenvolveram um método de exposição às partículas de diesel juntamente com O₃ e verificaram que após um mês de exposição houve prejuízo na habilidade de reconhecimento de objeto e aumento de expressão da subunidade do receptor N-metil-D-aspartato subtipo 1 (NR1) do receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA). Após 3 meses de exposição houve aumento de NR1 permanece e diminuição da expressão de N-metil-D-aspartato subtipo 2A (NR2A), outra subunidade do mesmo receptor no hipocampo de camundongos. Ainda, observaram diminuição da expressão dos receptores de estrógeno α (ER α) e de ocitocina (OTR) no hipotálamo de fêmeas expostas durante um mês a essa combinação de poluentes (Win-Shwe *et al.*, 2014). Em relação à exposição ao SOA durante o período intrauterino e neonatal também foi observado aumento na expressão dos receptores NR1 e NR2A e de marcadores de inflamação como TNF α , COX-2 e IBA-1 no hipocampo nos

filhotes com 10 dias de vida (Win-Shwe, Kyi-Tha-Thu, Moe, Maekawa, *et al.*, 2015). Além disso, a exposição gestacional até o período de desmame alterou a expressão de receptores de genes relacionados ao comportamento social (ER α e OTR), de inflamação (COX-2) e estresse oxidativo (HO-1), assim como aumentou a concentração de glutamato na vida adulta dos animais (Win-Shwe, Kyi-Tha-Thu, Moe, Fujitani, *et al.*, 2015). Juntos esses estudos demonstram que a exposição durante diferentes períodos e tempos de exposição causa efeitos adversos no cérebro dos animais expostos.

Calderón-Garcidueñas e colaboradores contribuíram para a compreensão dos mecanismos relacionados aos efeitos deletérios cerebrais investigando efeitos da exposição à poluição atmosférica em modelos animais e humanos. Entre os estudos, o grupo verificou que sinais de disfunção da barreira hematoencefálica, degeneração neuronal, patologias cerebrovasculares e apoptose de células gliais são mais frequentes em cachorros que residiam em área de alta poluição atmosférica quando comparado aqueles de áreas menos poluídas (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2002).

Além disso, o mesmo grupo de pesquisa verificaram, em estudo *post mortem* em humanos, aumento na expressão de COX-2 no córtex frontal e hipocampo e aumento nos níveis do peptídeo β -42 amiloide nos indivíduos que residiram em cidades mais poluídas (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2004). Ainda, estudos comparando crianças que residem em cidade com elevados índices de poluição atmosférica com crianças que residem em áreas limpas demonstram depósito de material particulado no bulbo, aumento de COX-2, IL-1 β , baixa concentração de citocinas envolvidas na neuroproteção e acúmulo de peptídeo β -42 amiloide (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2008; Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2012).

Interessantemente, diante da diversidade dos componentes presentes na poluição atmosférica e da complexidade dos efeitos adversos causados a saúde, pesquisadores avançam nos estudos avaliando os efeitos decorrentes da co-exposição a poluentes, ou seja, da exposição a uma mistura de poluentes. Nesse sentido, Ku *et al.*, (2016) realizaram co-exposição aos seguintes poluentes: MP_{2.5}, SO₂ e NO₂. Entre os achados, os autores

observaram diminuição da razão de massa do cérebro pelo peso corporal e prejuízo de aprendizado espacial e de memória, além de infiltração de células inflamatórias e perda de células neuronais no córtex de camundongos. Além disso, o comportamento neurológico anormal foi caracterizado por disfunção mitocondrial relacionada à fusão e fissão seguida por apoptose neuronal no córtex do rato (Ku *et al.*, 2016).

Recentemente, estudos têm avaliado os efeitos da exposição às partículas ultrafinas ambientais e demonstram uma relação com alterações morfológicas no cérebro. Camundongos machos expostos entre 4 a 7 e 10 a 13 dias pós-natal apresentaram dilatação dos ventrículos laterais (Allen, J. L., Liu, X., Pelkowski, S., *et al.*, 2014). Corroborando com estes achados, a exposição gestacional (do 0,5 ao 16,5 DG) à PUF também causou ventriculomegalia, aumento da área do corpo caloso e redução do hipocampo em filhotes machos e fêmeas quando esses completaram 11-15 dias de vida. Ademais, os autores relataram hipermeliniezação no corpo caloso e ativação de micróglia (Klocke *et al.*, 2017).

Corroborando os dados, Shih *et al.*, (2018) observaram aumento do volume do hipocampo e do cérebro total em camundongos com 6 meses de idade expostos durante 3 e 6 meses a partículas oriundas do tráfego veicular com tamanho aerodinâmico $<1\mu\text{m}$. Ainda, o estudo relatou aumento de 8-isoprastano no córtex, cerebelo e hipocampo e, aumento de citocina inflamatória, IL-6, no hipocampo (Shih *et al.*, 2018).

1.7 Evidências patológicas da exposição à poluição atmosférica

As evidências patológicas decorrentes a exposição a poluentes variam de ansiedade e depressão (Lim *et al.*, 2012; Power *et al.*, 2015; Gładka *et al.*, 2018), transtorno de déficit de atenção com hiperatividade (TDAH) (Myhre *et al.*, 2018) até desfechos mais severos como acidente vascular cerebral (Shah *et al.*, 2015), Parkinson (Ritz *et al.*, 2016), Alzheimer (Kilian e Kitazawa, 2018), autismo (Volk *et al.*, 2013; Chirumbolo *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2017) e câncer (Lavigne *et al.*, 2017).

Volk e colaboradores foram pioneiros nos estudos que relacionam a exposição aos poluentes atmosféricos durante e após o período gestacional com autismo (Volk *et al.*, 2011; Volk *et al.*, 2013). Após essa primeira evidência, outros estudos foram realizados e corroboram os dados (Becerra *et al.*, 2013; Raz *et al.*, 2015; Talbott *et al.*, 2015; Weisskopf *et al.*, 2015; 2016; Chirumbolo *et al.*, 2017). Entretanto, apesar de haver estudos contraditórios a essa evidência (Gong *et al.*, 2014; Guxens *et al.*, 2016; Gong *et al.*, 2017), Flores-Pajot *et al.*, (2016), em uma revisão e meta-análise, reportaram que o risco de autismo é mais forte quando há exposição pré-natal ao MP_{2.5} e O₃ e, exposição pós-natal ao MP_{2.5} e NO₂; enquanto que Kalkbrenner *et al.*, (2015) verificaram com base em dois estudos de coorte que a associação entre autismo e exposição ao MP é maior quando a exposição à poluição ocorre no terceiro trimestre de gestação. Além disso, outros poluentes tais como: o CO, NO₂, O₃, e SO₂ têm sido associados com aumento na probabilidade de autismo (Jung *et al.*, 2013).

Não obstante, estudos apontam uma associação entre a poluição do ar e prejuízo nas habilidades cognitivas e de memória. A maioria desses estudos avaliou os efeitos decorrentes da exposição a longo prazo aos poluentes atmosféricos. Há, contudo, estudos que observaram efeitos devido à exposição aguda aos poluentes ambientais. Esses estudos reportaram alteração da atenção em crianças de acordo com flutuações de curto prazo nos níveis de poluição, sem prejuízo na memória de trabalho (Sunyer *et al.*, 2017) e redução na velocidade de processamento de informação visual (Saenen *et al.*, 2016).

Por outro lado, estudos apontam que em crianças a exposição à longo prazo a diferentes componentes presentes na poluição atmosférica tem sido associada a prejuízo de cognição com baixo quociente de inteligência (QI) verbal e não verbal e também na habilidade visual de memória (Suglia *et al.*, 2008; Harris *et al.*, 2015) e aumento do índice hiperatividade (Newman *et al.*, 2013).

Annavarapu e Kathi (2016) revisaram a literatura referente ao tema e enfatizam que crianças que vivem no meio urbano apresentam comprometimento no desenvolvimento cognitivo associado à exposição à emissão veicular.

Ainda nesse sentido, um estudo realizado com crianças de escolas em áreas com elevada concentração de poluição relacionada ao tráfego veicular demonstrou que as mesmas apresentam menor integração funcional e segregação em redes cerebrais. Isso indica que a exposição está associada à maturação cerebral mais lenta e também ao prejuízo na capacidade de memorizar sequências longas (Van Kempen *et al.*, 2012; Pujol *et al.*, 2016). Outro estudo também verificou alterações volumétricas na substância branca no lobo temporal e parietal associadas com déficit cognitivo (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2011).

Suades-González *et al.*, (2015) demonstraram que, apesar de ser escassos, estudos suportam a hipótese de que a exposição pré e pós-natal a poluição atmosférica, mais especificamente aos HPAs, MP_{2.5} e NOx, provocam um impacto negativo sobre o desenvolvimento neuropsicológico de crianças. Contudo, os autores enfatizam que não é possível distinguir o período crítico de exposição devido à heterogeneidade na abordagem das análises e também ao reduzido número de estudos.

Em relação à exposição aos HPAs durante o desenvolvimento, há evidências de que a exposição pré-natal ao HPAs não está associada a problemas comportamentais aos 3 anos (Perera *et al.*, 2006), porém prejudicou o desenvolvimento cognitivo aos 5 anos (Edwards *et al.*, 2010); e está relacionada a distúrbios de atenção e sintomas de ansiedade e depressão em crianças com 6-7 anos (Perera *et al.*, 2012).

Recentemente, um estudo relatou associação entre a exposição pré-natal e durante a infância a HPAs e TDAH em crianças com 9 anos (Perera *et al.*, 2018). Ademais, foi observada associação entre a presença de adutos de ácido desoxirribonucleico (DNA) no cordão umbilical devido à exposição aos HPAs na gestação e disfunção cognitiva nas crianças aos 7 anos (Jedrychowski *et al.*, 2015) e, que a exposição aos HPAs, em particular ao benzopireno, provocou redução de volume no núcleo caudato em crianças com 8-12 anos (Mortamais *et al.*, 2017).

Curiosamente, um estudo realizado em Barcelona relatou que crianças em idade escolar, 7-10 anos, que cresceram próximas a áreas verdes podem

ter efeitos benéficos no desenvolvimento cerebral e função cognitiva (Dadvand *et al.*, 2018).

Em crianças e adolescentes, também foi observado relação entre exposição aos poluentes atmosféricos e TDAH (Siddique *et al.*, 2011). Outros estudos observaram elevados erros na resposta e menor tempo de reação em uma avaliação computadorizada baseada em tarefas para a avaliação de distúrbios de atenção e funcionamento neurológico (Chiu *et al.*, 2013; Kicinski *et al.*, 2015; Harris *et al.*, 2016). Também são relatados efeitos relacionados ao prejuízo nas habilidades cognitivas devido à exposição à poluição em adultos e idosos (Chen e Schwartz, 2009; Power *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2012; Weuve *et al.*, 2012; Gatto *et al.*, 2014; Tonne *et al.*, 2014; Loop *et al.*, 2015) e perda de substância branca em mulheres idosas (Chen *et al.*, 2015).

Por fim, a poluição atmosférica também tem sido associada a outras desordens cognitivas como esquizofrenia (Pedersen *et al.*, 2004; Lary *et al.*, 2015) e doença neurodegenerativas, como doença de Parkinson (Lee *et al.*, 2016; Ritz *et al.*, 2016) e Alzheimer (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2015; Power *et al.*, 2016). Apesar de a exposição aos constituintes da poluição do ar poder estar envolvida na patogênese de doenças neurodegenerativas, ainda são necessários estudos para dar suporte a essa relação causal (Killin *et al.*, 2016; Attademo *et al.*, 2017; Kilian e Kitazawa, 2018).

1.8 Distúrbios comportamentais e poluição atmosférica

O cérebro é um órgão altamente complexo que ainda vem sendo desvendado. A capacidade de armazenar informações é uma vantagem evolutiva dos seres vivos que auxiliou na adaptação e sobrevivência no meio. O processo de formação de memórias engloba diferentes estruturas cerebrais e neurotransmissoras, bem como a conectividade e eventos moleculares entre ambos (Izquierdo e Medina, 1997). O aprendizado é parte essencial na formação de memórias; é um processo pelo qual se adquire conhecimento e a memória diz respeito à evocação do aprendizado adquirido, armazenado e recuperado (Izquierdo e McGaugh, 2000).

A memória engloba vários processos que ocorrem principalmente no hipocampo e no córtex pré-frontal, sendo que alterações de neurotransmissores, de eficiência de comunicação entre neurônios podem prejudicar a formação de memórias (Mcgaugh e Izquierdo, 2000). Nesse sentido, a região CA1 é importante para aquisição, consolidação e evocação de memória em roedores (Izquierdo *et al.*, 2013).

Alterações comportamentais e distúrbios cognitivos têm sido relacionados à exposição a diferentes poluentes atmosféricos tais como MP, HPAs e O₃. Estudos epidemiológicos e experimentais têm sido conduzidos nos últimos anos com o objetivo de verificar associações entre alterações comportamentais e poluentes e, tem-se observado uma correlação positiva entre essas variáveis (Allen, Klocke, *et al.*, 2017).

Alterações comportamentais foram verificadas em estudos que realizaram exposição à poluição durante período gestacional. Zhang, T. et al., (2018) verificaram que a exposição intratraqueal a diferentes concentrações de MP_{2.5} durante a gestação causou comportamento tipo ansiogênico na prole com 6 semanas de idade e que animais expostos à elevada dose (3.456 µg/µL) de MP_{2.5} apresentaram menor atividade locomotora assim como a menor atividade na área central do aparato e houve um aumento na mobilidade com aumento da concentração de poluentes. Isso evidencia os efeitos nocivos da exposição durante o período gestacional.

Não obstante, estudos têm demonstrado que a exposição gestacional às partículas e gases oriundos da combustão do diesel (DEP) tanto a baixas quanto a altas concentrações causa alterações comportamentais e desequilíbrio na concentração de neurotransmissores. Os pesquisadores observaram prejuízo na locomoção e na atividade motora espontânea, além de redução do *turnover* de dopamina (DA) no estriado e no núcleo *accumbens* e, alteração no sistema monoaminérgico, com aumento de dopamina e noradrenalina (NA) e seus metabólitos, no córtex pré-frontal de camundongos jovens-adultos (Yokota, Satoshi *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2010). Ainda, o mesmo grupo de pesquisadores evidenciou que a exposição a essas partículas no período gestacional está relacionada ao comportamento impulsivo e a uma resposta idade-dependente em relação à concentração de neurotransmissores.

O sistema monoaminérgico apresentou diminuição na concentração e *turnover* de NA no cerebelo em 3 e 6 semanas de idade, aumento de serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxiindoleacético (5-HIAA) na amígdala em 3 semanas e aumento desses mesmos neurotransmissores no córtex pré-frontal e hipotálamo com 6 semanas de idade. Em relação a DA e seus metabólitos, houve diminuição da concentração no córtex pré-frontal em 3 semanas e aumento deles na amígdala em 3 e 6 semanas de idade (Yokota *et al.*, 2013).

Em relação à discriminação entre objetos, estudos têm relatado que a exposição a poluentes presentes na atmosfera, mais especificamente a uma elevada concentração de nanopartículas ricas em diesel ($129 \mu\text{g}/\text{m}^3$) durante 3 meses, causou prejuízo de reconhecimento de objeto novo em camundongos fêmeas com 6 semanas de idade, sendo que a exposição a concentração média ($47 \mu\text{g}/\text{m}^3$) não prejudicou a memória (Win-Shwe, T. T. *et al.*, 2012). Além disso, prejuízo no reconhecimento de objetos também foi observado em camundongos machos com 5 semanas de idade que foram expostos a partículas de diesel e O_3 ($113,99 \mu\text{g}/\text{m}^3$) durante 3 meses e também não foi observado efeito negativo após um mês de exposição aos poluentes (Win-Shwe *et al.*, 2014). Allen *et al.*, (2014) investigaram os efeitos na memória de curto prazo após exposição a partículas ambientais concentradas no período pós-natal e na idade adulta e observaram que os animais permaneceram menos tempo explorando o objeto novo, caracterizando perda de memória a curto prazo ou uma resposta de medo ao objeto novo. Ainda, a exposição a níveis ambientais da poluição da cidade de Porto Alegre/RS, no período gestacional e no pós-natal provocou diminuição no índice de discriminação entre objetos quando os animais completaram 151 dias de vida (Zanchi *et al.*, 2010).

Allen e colaboradores também têm demonstrado que a exposição durante o período pós-natal de desenvolvimento neuronal e também a exposição em camundongos jovens-adultos, até mesmo a baixas doses de partículas ultrafinas, pode causar persistentes alterações na função cerebral. Entre os achados, os autores evidenciaram prejuízo de aprendizado, na memória de curto prazo, comportamento ligado à impulsividade e alteração na função motora (Allen, J. L., Liu, X., Weston, D., *et al.*, 2014). Ademais, os

autores observaram alteração na neuroquímica e inflamação como uma resposta sexo-dependente e em determinadas regiões cerebrais, como o hipocampo e o córtex cerebral (Allen, J. L., Liu, X., Pelkowski, S., *et al.*, 2014; Allen, J. L., Liu, X., Weston, D., *et al.*, 2014).

Também, Zhang, Q. *et al.*, (2018) observaram que a exposição intratraqueal a 20 mg/Kg de MP_{2.5} a cada sete dias em ratos com 2 meses causou dificuldade de aprendizado e memória espacial sendo que esses distúrbios foram associados a alterações ultraestruturais das bainhas de mitocôndria e mielina e expressão anormal de proteínas relacionadas a apoptose (caspase-3 e caspase-9).

---

2. JUSTIFICATIVA

A poluição atmosférica é um problema de saúde pública em todo mundo. Nos últimos anos, órgãos governamentais e pesquisadores vêm unindo esforços para elucidar os impactos nocivos causados à saúde dos seres vivos e meio ambiente em consequência da poluição atmosférica. Todavia, ainda é crescente a preocupação acerca dos efeitos adversos a saúde principalmente pelo fato de que a população é exposta involuntariamente. Assim, a promoção de discussões acerca da qualidade do ar e formas de redução da emissão de poluentes é imprescindível para a manutenção da vida dos seres humanos e meio ambiente.

No Brasil, o CONAMA, órgão responsável por estabelecer normas de controle da qualidade do ar, estabeleceu padrões nacionais de qualidade do ar. Apesar de recente atualização da Resolução acerca aos padrões que visam à redução da emissão de poluentes, continuamos deficitários na execução de medidas redutoras da emissão de poluentes, assim como em estratégias de fiscalização da legislação vigente. Contribuindo negativamente, muitos Estados não possuem monitoramento da qualidade do ar e outros possuem estações de monitoramento do ar não operantes.

A literatura tem demonstrado evidências de que o MP está associado a diferentes desordens patológicas no sistema respiratório e cardiovascular, principalmente. Porém, nos últimos anos, tem-se evidenciado associação entre a exposição aos poluentes ambientais e efeitos deletérios no SNC.

Considerando as evidências relacionadas às alterações cerebrais e ao perfil de toxicidade variável que a poluição apresenta, este estudo teve o intuito de colaborar para elucidar e caracterizar os efeitos do MP fino presente no ar da cidade de São Paulo sobre o SNC de animais expostos durante a gestação e/ou durante o período pós-natal.

É importante ressaltar que diante da diversidade de metodologias adotadas pelos estudos, pela heterogeneidade amostral e, além disso, pela variação da constituição e concentração dos poluentes é importante a

permanente condução de estudos para auxiliar a compreensão da relação entre exposição aos poluentes e desfechos clínicos. Ainda é reduzido o número de trabalhos que têm avaliado os efeitos da exposição materna a poluição atmosférica sobre o desenvolvimento do SNC e, de fato, há grandes desafios no estudo dos mecanismos de ações da poluição atmosférica.

Assim, este estudo se justifica ao contribuir para a avaliação dos efeitos no SNC decorrentes da exposição à poluição atmosférica da cidade de São Paulo tendo em vista o escasso número de trabalhos realizados nessa cidade que avaliam os efeitos nesse sistema.

Diante do exposto, a análise de efeitos no SNC, com ênfase em parâmetros comportamentais, moleculares e histológicos, se torna importante para toda a sociedade - população e governantes. Os resultados desse estudo poderão contribuir para fomentar discussões sobre o tema afim de que níveis seguros de exposição aos poluentes atmosféricos possam ser debatidos e estabelecidos visando, principalmente, minimizar a emissão de poluentes para a atmosfera.

---

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da exposição pré e/ou pós-natal ao MP_{2.5} presente na poluição atmosférica da cidade de São Paulo sobre o sistema nervoso central de camundongos.

3.2 Objetivos específicos

Analisar e quantificar em animais expostos à poluição atmosférica durante a fase gestacional e após o período de amamentação:

- o peso corporal;
- a atividade locomotora em animais com 30 e 90 dias de idade através do teste campo aberto;
- a memória em animais com 30 e 90 dias de idade através do teste de reconhecimento de objetos;
- a ansiedade em animais com 30 e 90 dias de idade através do teste labirinto cruz elevado;
- o volume total e das seguintes estruturas cerebrais: córtex, hipocampo, cerebelo, ventrículos e aqueduto, corpo caloso, diencéfalo e tronco encefálico de animais com 90 dias de idade por estereologia através do método de Cavalieri;
- o número de neurônios do córtex cerebral de animais com 90 dias de idade pelo método de disector;
- a espessura das camadas corticais do cérebro (camadas I, II, III, IV, V, VI) de animais com 90 dias de idade de forma direta;
- a densidade óptica de células da microglia (IBA-1) e astrócitos (GFAP) e neurônios dopaminérgicos (tirosina hidroxilase), e o número de neurônios

gabaérgicos (GAD 65+67) de diferentes estruturas cerebrais de animais com 90 dias de idade através da imunohistoquímica;

- a expressão gênica do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), receptores de serotonina (5-HT_{1A}) e GABA (GABA-A-R α ₂) e estresse oxidativo (HO-1) do hipocampo e córtex cerebral de animais com 90 dias de idade por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR);

- a citotoxicidade celular do MP_{2.5} em diferentes tempos e concentrações de exposição em células de glioma de rato (C6).

---

4. MÉTODOS

4.1 Animais

Este estudo foi realizado utilizando-se camundongos BALB/c, fêmeas, nulíparas, sexualmente maduras, com aproximadamente 90 dias de vida e, machos da mesma espécie, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno dispostas em estante ventilada, com temperatura controlada de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em sala com ciclo claro/escuro de 12 horas e com acesso livre ao alimento e à água. Os animais foram mantidos nessas condições por um período de adaptação de no mínimo cinco dias antes do início do experimento.

Os procedimentos e o manejo dos animais foram feitos de acordo com os Princípios Éticos para o Uso de Animais de Laboratório. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMUSP sob o parecer 113/14.

A eutanásia dos animais foi realizada por overdose de anestésico inalatório Isoflurane®, seguindo as recomendações do painel de eutanásia da *American Veterinary Medical Association* (Leary *et al.*, 2013).

4.2 Desenho experimental

Para o acasalamento, fêmeas BALB/c saudáveis (5-6 fêmeas para cada grupo), com aproximadamente 90 dias de idade, foram colocadas duas a duas para cada macho. Na manhã seguinte, os machos foram retirados e a prenhez foi confirmada pela presença de *plug* vaginal e, este foi considerado o 0,5 dia gestacional (DG). As gestantes foram colocadas individualmente em gaiolas moradias onde permaneceram até o desmame da prole.

As gestantes foram expostas à poluição atmosférica ou ao ar filtrado a partir do 1,5 até o 18,5 DG e tiveram sua prole por parto natural. Durante o período de amamentação os animais não foram expostos. No 21º dia foi realizado o desmame da prole e a separação dos animais pelo sexo. Os filhotes machos foram distribuídos em 4 grupos para a exposição pós-natal até completarem 90 dias de vida, conforme esquema ilustrativo da figura 5.

Figura 5 - Delineamento experimental da exposição ao $MP_{2.5}$. DG: dia gestacional; DPN: dia pós-natal

4.3 Exposição à poluição atmosférica

Os animais foram expostos a um poluente específico presente na poluição atmosférica, o $MP_{2.5}$. Os animais foram expostos à concentração de $600 \mu g/m^3$, a qual representa a concentração média diária total que habitantes da cidade de São Paulo estão diariamente expostos (Yoshizaki *et al.*, 2016).

Para a exposição à dose precisa de $MP_{2.5}$, foi utilizado um concentrador de partículas ambientais (CPA), o qual se encontra instalado no pátio da FMUSP, ao lado da rua Teodoro Sampaio e próximo à Avenida Dr. Arnaldo – ruas que apresentam intenso tráfego veicular. O CPA foi desenvolvido pela

Escola de Saúde Pública de Harvard – EUA e utiliza a tecnologia de impactadores virtuais, os quais são capazes de concentrar em até 30 vezes as partículas presentes na atmosfera sem alterar as propriedades químicas e físicas (Brito *et al.*, 2014). As partículas concentradas foram direcionadas à câmara de inalação onde os animais foram expostos. Durante a exposição, os animais ficaram acondicionados nas gaiolas de moradia, livres para respirar naturalmente e com acesso à ração e à água *ad libitum*.

Figura 6 - Área interna do CPA demonstrando o sistema de tubulações e os impactadores virtuais

Figura 7 - Área interna do CPA demonstrando as câmaras de exposição ao $MP_{2.5}$ e ao ar filtrado

Os animais do grupo controle foram expostos a uma câmara com as mesmas características apresentadas para a câmara de exposição ao MP_{2.5}; entretanto, esses animais não receberam a dose de poluição atmosférica.

4.3.1 Caracterização química do MP_{2.5}

A caracterização da poluição atmosférica foi realizada através de filtros de amostragem coletados em dias aleatórios no mesmo local e período que os animais foram expostos à poluição atmosférica.

A coleta de MP_{2.5} foi realizada em filtros de polycarbonato e de quartzo para a análise de elementos e de HPAs, respectivamente. Para ambos, a pesagem dos filtros foi realizada antes e após a amostragem, em condições de umidade controladas entre 30 e 40%. A concentração do MP_{2.5} foi obtida através da determinação da massa do material coletado e do volume de ar amostrado. Esses filtros também foram utilizados para testes de toxicidade *in vitro*.

A determinação quantitativa dos elementos presentes no MP_{2.5} foi realizada em filtros de polycarbonato coletados pelo equipamento tipo Harvard, sem impactadores e analisado em espectrômetro de fluorescência de raios X por Energia Dispersiva (Arana *et al.*, 2014). Já a identificação e quantificação dos HPAs foi realizada através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) (Santos *et al.*, 2016).

4.4 Peso corporal

O peso corpóreo foi avaliado durante a gestação. Além disso, os filhotes foram pesados semanalmente a partir do início da exposição à poluição atmosférica até o final do experimento.

4.5 Avaliação do desempenho reprodutivo

Para a avaliação do desempenho reprodutivo foram analisados os seguintes parâmetros: número de filhotes vivos e com alterações físicas, número total de filhotes por ninhada, número de fêmeas e machos e o sex ratio de cada gestante.

4.6 Avaliação comportamental

Os testes comportamentais foram realizados quando a prole de camundongos machos completaram 30 dias de vida e repetidos após 60 dias de exposição à poluição, quando os animais completaram 90 dias de vida. Todos os testes comportamentais foram conduzidos no período vespertino (13:00 às 17:00 horas). Os animais realizaram os seguintes testes comportamentais: campo aberto, reconhecimento de objetos, labirinto cruz elevado, conforme a figura 8.

Figura 8 - Representação esquemática da realização dos testes comportamentais

4.6.1 Campo aberto (CA)

A análise da atividade locomotora foi realizada de acordo com Bibancos *et al.*, (2007). Essa análise foi realizada no 30º dia de vida e repetida aos 90 dias de idade. Para isso, os animais foram gentilmente colocados no centro de uma arena de campo aberto, com tamanho de 60 x 60 x 30 cm (comprimento x

profundidade x altura) com o assoalho demarcado com 36 quadrados iguais, de paredes altas, de madeira compensada branca (Figura 9). Cada animal foi colocado individualmente e foi permitida a livre exploração do ambiente pelo animal durante 5 minutos. Ao final de cada teste o aparato foi limpo com solução de álcool 50% a fim de evitar quaisquer interferências odoríferas.

Figura 9 - Aparato para teste comportamental de campo aberto

Por meio da análise da filmagem, os seguintes parâmetros foram simultaneamente analisados:

- frequência de locomoção: correspondente ao número de vezes que o animal cruzou com as quatro patas as linhas pretas que compõem o chão da arena;
- frequência entre o centro e a periferia do aparato;
- frequência e tempo na posição levantar: correspondente ao número de vezes e tempo em que o animal se levantou apoiando-se nas patas traseiras;
- latência: correspondente ao tempo que o animal demorou a sair da posição inicial e;
- porcentagem de tempo no centro: correspondente a tempo em que o animal permaneceu no centro do aparato (quadrantes não adjacentes à parede) em relação ao tempo total.

4.6.2 Reconhecimento de objetos (RO)

Este teste foi realizado com o objetivo descrever a memória com base na exploração diferencial de novos objetos (Antunes e Biala, 2012; Leger *et al.*, 2013). Assim como no campo aberto, essa análise foi realizada no 30º e 31º dias de idade e repetida aos 90º e 91º dias de idade.

Para a realização do teste foi utilizado o mesmo aparato do campo aberto, porém incluíram-se diferentes objetos. Na primeira sessão (sessão treino), dois objetos idênticos (A1 e A2) foram colocados nas laterais não consecutivas e distante 5 cm das paredes da caixa (Figura 10A). Cada animal foi colocado individualmente no aparato em um dos cantos em que não havia objeto com o focinho voltado para a parede. Os camundongos permaneceram no aparato durante 5 minutos para livre exploração. O aparato e os objetos foram limpos entre um animal e outro com solução de álcool 50% para retirar odores e evitar quaisquer interferências.

O teste foi repetido 24 horas (sessão teste) após a sessão treino. Na sessão teste, um dos objetos idênticos (objeto familiar) foi trocado por um novo objeto (Objeto novo) (Figura 10B) e repetiram-se os procedimentos.

A exploração foi definida como cheirar ou tocar o objeto com o nariz e/ou patas dianteiras, sendo que sentar ou andar sobre o objeto não foi considerado um comportamento exploratório. Por meio da filmagem do teste, analisou-se:

- tempo de exploração de cada objeto para a sessão teste e treino;
- discriminação entre os objetos por meio do índice de discriminação (ID).

O ID é calculado pela seguinte equação:

$$ID = (\text{tempo de exploração objeto novo} - \text{tempo de exploração objeto familiar}) / \text{tempo total de exploração}.$$

Este resultado pode variar de +1 a -1, sendo que um escore positivo indica mais tempo gasto com o objeto novo e um escore negativo indica mais tempo gasto com o objeto familiar, enquanto que um escore zero indica preferência nula.

Figura 10 - Aparato do teste comportamental de reconhecimento de objeto. A) Objetos idênticos na sessão treino. B) Objetos distintos na sessão teste

4.6.3 Labirinto cruz elevado (LCE)

O LCE é o modelo amplamente utilizado para avaliar a ansiedade (Lister, 1987; Walf e Frye, 2007). O labirinto consiste em dois braços abertos (30 x 30 cm) e dois braços fechados (30 x 30 x 20 cm) dispostos de forma perpendicular formando uma plataforma central e elevado a 50 cm de altura do chão, conforme a figura 11. Esse teste foi realizado quando os animais completaram o 33º dias de idade e repetido aos 93º dias de idade. O animal foi colocado, individualmente no centro do aparato, com a cabeça voltada para um dos braços abertos. O aparato foi limpo entre um animal e outro com solução de álcool 50% para retirar odores e evitar quaisquer interferências.

Figura 11 - Aparato do teste comportamental labirinto cruz elevado

Cada animal foi submetido a uma única sessão de 5 minutos e foram avaliados os seguintes parâmetros:

- latência;
- número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos;
- número de entradas e tempo de permanência no centro;
- número e tempo gasto de *head dips*: correspondente ao movimento de estirar a cabeça para fora dos limites da plataforma dos braços abertos;
- número e tempo gasto na posição levantar.

4.7 Coleta

Os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico inalatório Isoflurano®. Para a coleta de tecido cerebral os grupos foram subdivididos e, em uma parte dos animais os cérebros foram dissecados, acondicionados em criotubos, armazenados em nitrogênio líquido e posteriormente em freezer a – 80°C para análises. Para os demais animais, o cérebro foi adicionado à solução fixadora de formaldeído 10% tamponado durante 24 horas e posteriormente em álcool 70% até o processamento do material para análises estereológicas e imunohistoquímicas.

4.8 Avaliação estereológica do cérebro

A avaliação morfológica do desenvolvimento cerebral foi realizada por métodos estereológicos. Essa metodologia possui a propriedade de ser não enviesada devido à geração de imagens randômicas e muito eficiente para se estimar volumes e quantidades de estruturas neuronais (Mayhew, 1992; Tinsley *et al.*, 2001). Assim, foi avaliado o volume total cerebral e dos seguintes compartimentos cerebrais: córtex, hipocampo, cerebelo, ventrículos e aqueduto, corpo caloso, diencéfalo e tronco encefálico.

4.8.1 Amostragem do cérebro e volume cerebral total

O volume total do cérebro foi avaliado pelo princípio de Cavalieri (Gundersen e Jensen, 1987; Mayhew, 1992; Tinsley *et al.*, 2001). Para isso, os cérebros foram pesados, emblocados em solução de ágar 10% e fixados em solução de formaldeído 10%. Após 24 horas, os cérebros foram transferidos para uma solução de álcool 70%. Em seguida, com o auxílio de um grid com linhas equidistantes, os cérebros foram seccionados em fatias seriadas de 2 mm de espessura em cortes coronais. Por fim, as faces de corte foram voltadas para cima e, com auxílio de um sistema teste (grid) de pontos com área correspondente a 2,5 mm², os pontos incidentes com a superfície do órgão foram contabilizados. A figura 12 representa os procedimentos que foram realizados para a determinação do volume cerebral total.

Figura 12 - Representação esquemática da amostragem cerebral para estereologia. A) Cérebro fixado em formaldeído 10%; B) Cérebro incluído em ágar 10%; C) Cortes seriados para determinação do volume cerebral total pelo método de Cavalieri; D) Fatia cerebral com sistema de teste de pontos

Por conseguinte, o volume cerebral estimado (V_{cer}) do cérebro foi determinado por meio da fórmula (1):

$$V_{\text{cer}} = \sum p \times a(p) \times d \quad (1)$$

onde, d é a distância entre as fatias, $a(p)$ é a área associada ao ponto do sistema teste e $\sum p$ é o somatório dos pontos incidentes cérebro como um todo.

4.8.2 Análise de volume dos compartimentos cerebrais

Para análise do volume dos compartimentos cerebrais, as fatias dos cérebros foram processadas. Para isso, banhos em concentração crescente de álcool seguido por banhos de xilol e parafina foram realizados nas fatias cerebrais e, por fim, as mesmas foram emblocadas em parafina. Em seguida, cortes coronais de 5 μm de espessura foram realizados com auxílio de um micrótomo rotativo. Os cortes foram coletados em lâminas de vidro, desparafinizados e corados pelo método de hematoxilina eosina.

Após a confecção das lâminas, as mesmas foram digitalizadas utilizando o escâner de lâminas digital Pannoramic SCAN (3DHistech Ltd., Budapest, Hungary) e, com aumento de 1x, obtiveram-se imagens de todas as fatias cerebrais por meio do software Pannoramic Viewer (3DHistech Ltd.) (Figura 13A).

A análise estereológica foi realizada utilizando-se o software Image J (NIH, <https://imagej.nih.gov/ij/>), o qual gerou um sistema teste de pontos sobre a imagem (Figura 13B). Com auxílio do *Allen Mouse Brain Atlas* do Instituto Allen (<http://atlas.brain-map.org/>) foi possível delimitar as estruturas cerebrais e, os pontos incidentes sobre cada uma das estruturas foram contabilizados em todas as fatias.

Figura 13 - Cérebro corado com HE para análise de volume. A) Imagem da lâmina digitalizada em um aumento de 1x. B) Sistema de pontos sobre as estruturas cerebrais utilizando o software ImageJ

A fração de volume (V_v) para cada compartimento foi estimada pelo método de contagem de pontos utilizando-se a seguinte fórmula (2):

$$V_v = \sum P_{\text{estrutura}} / \sum P_{\text{cérebro}} \quad (2)$$

onde, $\sum P_{\text{estrutura}}$ é a soma do número de pontos incidentes sobre a estrutura de interesse (córtex, hipocampo, cerebelo, ventrículos e aqueduto, corpo caloso, diencéfalo e tronco encefálico) e $\sum P_{\text{cérebro}}$ é a soma do número de pontos incidentes sobre todo o cérebro.

Por conseguinte, o volume total de cada estrutura cerebral ($V_{\text{totalestrutura}}$) foi estimado segundo a fórmula (3):

$$V_{\text{totalestrutura}} = V_v \times V_{\text{cer}} \quad (3)$$

onde, V_v é a fração de volume correspondente ao compartimento (fórmula 2) e V_{cer} é o volume total do cérebro (fórmula 1).

4.8.3 Quantificação de neurônios no córtex

A estimativa do número de neurônios foi realizada pelo método disector físico (Sterio, 1984; Gundersen *et al.*, 1988; Mayhew, 1992). Para tanto, para cada animal, pares de cortes consecutivos de 5 µm de espessura foram

produzidos com auxílio de um micrótomo rotativo e coletados em lâmina. Os neurônios foram marcados por meio da técnica de imunohistoquímica utilizando-se o anticorpo Neu-N (ab177487), conforme descrito na seção 4.9.

Essas lâminas também foram digitalizadas pelo escâner de lâminas digital Panoramic SCAN (3DHistech Ltd., Budapest, Hungary) e, com auxílio do software Panoramic Viewer (3DHistech Ltd.), imagens aleatórias, porém correspondentes em ambos os cortes foram obtidas em aumento de 40x no córtex cerebral.

Em seguida, para cada imagem foram escolhidos 12 frames delimitados por quadrados de área igual a $10000 \mu\text{m}^2$. Na imagem consecutiva, os 12 frames correspondentes foram delimitados (Figura 12). Dentro desses frames, realizou-se a contagem de células utilizando o software ImageJ. Os frames possuem linhas de inclusão (acima e à direita) e linhas de exclusão (abaixo e à esquerda) onde os neurônios foram ou não contados caso coincidissem sobre tais linhas. Os neurônios presentes em um frame, mas não no frame correspondente e vice-versa (células não repetidas), assim como as que não tocam as linhas de exclusão foram contabilizadas.

Figura 14 - Neurônios imuno-marcados com Neu-N no córtex cerebral de animais com 90 dias. A) Dois cortes consecutivos com frames delimitados. B) Exemplo de

contagem de neurônios pelo método disector em um par de frames distantes 5 μm no software ImageJ. Aumento de 40x

A densidade dos neurônios contados (D) do córtex cerebral foi estimada através da seguinte fórmula (4):

$$D = \sum N / (\sum n_{\text{disector}} \times V_{\text{disector}}) \quad (4)$$

onde, $\sum N$ é a somatória de neurônios contados; $\sum n_{\text{disector}}$ é a somatória do número de quadrados analisados por animal e V_{disector} é o volume total do disector ($V_{\text{dis}} = a_{\text{(quadrado)}} \times \text{espessura}$, no caso, $V_{\text{dis}} = 10000 \mu\text{m}^2 \times 5 \mu\text{m}$).

Assim, o número total de neurônios (N_{total}) foi obtido através da fórmula (5):

$$N_{\text{total}} = D \times V_{t_{\text{cortex}}} \quad (5)$$

onde, D é a densidade numérica dos neurônios contados (fórmula 4) e $V_{t_{\text{cortex}}}$ é o volume total do córtex (fórmula 3).

4.8.4 Espessura das camadas corticais

Para analisar a espessura das camadas corticais do cérebro foram utilizadas as lâminas digitalizadas. Primeiramente, na objetiva de 10x, selecionou-se um corte próximo ao plano coronal mediano, onde foi possível a visualização das seis camadas corticais (camadas I, II, III, IV, V e VI) do córtex cerebral, conforme figura 15. Em seguida, a medida da espessura total e de cada uma das camadas foi realizada de forma direta com auxílio do software ImageJ. As medidas foram feitas em triplicatas para cada animal.

Figura 15 - Camadas corticais do córtex cerebral

4.9 Avaliação imuno-histoquímica

Para a análise da imuno-histoquímica, 4 cortes de 5 μm de espessura e distanciados a 50 μm foram realizados e coletados em lâminas silanizadas. Após permanecerem em estufa 80°C durante 40 minutos, os cortes foram desparafinados em banho de xilol durante 10 minutos seguido por dois banhos de xilol durante 5 minutos. Para hidratação dos cortes as lâminas passaram por banho de etanol absoluto, banho de álcool 95%, banho de álcool 70% e banho de álcool 50%. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e a recuperação dos sítios antigênicos foi realizada a 98°C em tampão citrato de sódio, pH=6, ou TRIS/EDTA pH=9, conforme tabela 3. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com a incubação das lâminas em solução de 5% de peróxido de hidrogênio 30 volumes em metanol vol/vol por 10 minutos no escuro. Esse procedimento foi repetido por 3 vezes. Após, as lâminas foram lavadas com água destilada e, em seguida, lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) com 0,05% de Triton X-100 (PBS-TX) durante 5 minutos. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com albumina de soro bovino (BSA) 1% em tampão PBS-TX durante 1h. As lâminas foram incubadas com o anticorpo

primário GFAP (Dako®), IBA-1 (GeneTex - GTX100042), tirosina hidroxilase (Abcam – ab75875) e GAD65+67 (Abcam – ab11070), Neu-N (ab177487) diluído em 1% BSA, *overnight* à 4°C em câmara úmida, e posteriormente incubadas com o anticorpo secundário específico durante 2h em temperatura ambiente.

Tabela 3 - Relação da concentração e tempo de recuperação antigênica dos anticorpos na imunohistoquímica.

Anticorpo primário	Concentração anticorpo primário	Tampão e tempo de recuperação dos sítios antigênicos	Anticorpo secundário
GFAP	1:500	citrato - 20 min	Biocare (M4U534L)
IBA-1	1:400	citrato - 20 min	Genetex (GTX100042)
GAD65+67	1:1000	citrato - 20 min	Histofine (414341F)
TH	1:200	citrato - 40 min	Abcam (ab214880)
Neu-N	1:3000	Tris/EDTA - 40 min	Abcam (ab214880)

Após esta etapa, as lâminas foram novamente lavadas em PBS-TX e seguiu-se a revelação pelo cromógeno 3,3 Diaminobenzidina (DAB) (Dako) durante 5 minutos.

As lâminas de GAD65+67, TH e Neu-N foram lavadas e contra-coradas com Hematoxilina de Harris (Merck, Alemanha). Novamente lavadas, desidratadas e montadas com lamínulas com resina para microscopia Entellan (Merck). As lâminas de GFAP e IBA-1 não foram contra-coradas para a análise de densidade óptica.

Todas as lâminas foram digitalizadas pelo escâner de lâminas digital Panoramic SCAN (3DHistech Ltd., Budapest, Hungary) e, com auxílio do software Case Viewer (3DHistech Ltd.), as seguintes estruturas com seus respectivas objetivas de aumento foram fotografadas: córtex (20X), corpo caloso (10X), CA1 (40X), CA3 (40X) e giro denteado (20X).

Para GFAP e IBA-1, as lâminas foram fotografadas e analisadas pela densidade óptica através do software ImageJ. Já os demais marcadores foram analisados o número de células imuno-marcadas pela área total de cada campo através do software Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Inc). Os resultados estão expressos em proporção de células imuno-marcadas por área

de tecido (número de células positivamente marcadas / área de tecido analisada) ou densidade óptica.

4.10 Análise da expressão gênica

A análise da expressão dos genes HO-1, BDNF, 5-HT1A, GABA-A-R $\alpha 2$ das estruturas cerebrais hipocampo e córtex foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR – do inglês, *Polymerase Chain Reaction* (qPCR)). As estruturas cerebrais foram dissecadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises. O RNA do córtex foi extraído com TRIzol® (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. Para isso, o córtex (50-100mg) foi homogeneizado com 1 mL de TRIzol®, acrescentou-se 200 μL de clorofórmio e obteve-se uma fase aquosa após a centrifugação (12.000 g, 15 minutos, 4°C). O RNA foi precipitado com 500 μL de isopropanol por 10 minutos em temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000 g a 4°C durante 10 minutos. Em seguida, o RNA foi lavado com 200 μL de etanol 75% e centrifugado a 7.500 g, a 4°C durante 5 minutos e o *pellet* ressuscitado com água DEPC. A extração do RNA do hipocampo, devido a quantidade de tecido (<10mg), foi realizada pelo kit PureLink® RNA Mini kit (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Os *pellets* foram suspensos em água DEPC e o RNA foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop) a 260 nm. As amostras apresentando razão 260/280 entre 1,8 e 2,0 foram consideradas satisfatórias.

A síntese de cDNA foi realizada com 10 μL de RNA total seguindo as recomendações do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para tanto, adicionou-se 2 μL de tampão de transcrição reversa 10X, 1 μL de transcriptase reversa MultiScribe (50 U/ μL), 0,8 μL de trifosfatos de desoxinucleósidos (dNTPs) 25X (100mM), 2 μL de random primers e 4,2 μL de água DEPC. A síntese de cDNA foi realizada durante 10 min a 25°C , 120 min a 37°C e, por fim, 5 min a 85°C para inativar a enzima.

Os primers *forward* e *reverse* foram desenhados utilizando-se o Primer-Blast no PubMed, e a especificidade foi verificada usando a ferramenta de

busca *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) para coleção de nucleotídeos (nr) do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Todos os primers foram adquiridos da Invitrogen® (São Paulo, Brasil). A sequência de primers usados está descrita na tabela 4.

Tabela 4 - Descrição da sequência *forward* e *reverse* dos primers.

Gene	Sequência <i>Forward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
Actb	AGATCAAGATCATTGCTCCTCCT	ACGCAGCTCAGTAACAGTCC
Ppia	GTGTTCTTCGACATCACGGC	TGTAAAGTCACCACCCTGGC
GAPDH	CCCTTAAGAGGGATGCTGCC	TACGGCCAAATCCGTTTACA
HO-1	GAAGGCTTTAAGCTGGTGATGG	TGGCGTGCAAGGGATGATTT
BDNF	AAGTTGGCTTCCTAGCGGTG	ACCTGGTGGAAGTTCTTTGCG
5-HT1A	TACTCCACTTTCGGCGCTTT	GGCTGACCATTCAGGCTCTT
GABA-A-R $\alpha 2$	CAGATTCAAAGCCACTGGAGGA	TAGCCAGCACCAACCTGACT

A amplificação dos genes foi realizada utilizando-se 7,5 μ l de SYBR® (Applied Biosystems), 0,3 μ l de primers forward e reverse (0,2 μ M cada), 5 ng de cDNA para as amostras de hipocampo e 15 ng de cDNA para as amostras de córtex, e água livre de nuclease, em volume total de 15 μ l. As reações foram feitas em placa óptica de 96 poços em termociclador StepOnePlus® Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Para tanto, as amostras foram inicialmente desnaturadas durante 15 minutos a 95°C, em seguida, foram amplificadas durante 40 ciclos compostos por: anelamento a 95°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 hora. O limiar do ciclo (Ct) experimental foi calculado usando os algoritmos de realce fornecidos pelo equipamento. As expressões de cada gene alvo foram determinadas utilizando-se a fórmula: $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Para a análise do gene constitutivo, 5 amostras de cada grupo foram analisadas em duplicata e o valor médio de cada duplicata foi utilizado para os cálculos. Com o auxílio do software NormFinder (<https://moma.dk/normfinder-software>), estabeleceu-se o gene constitutivo considerado mais estável para as amostras a serem analisadas. Para isso, os valores médios de Ct das 5 amostras de cada grupo para cada estrutura cerebral foram alterados para a

forma 2^{-Ct} . Verificou-se que o gene constitutivo mais estável para ambas as estruturas foi o PPIA (Figura 16).

Figura 16 - Estabilidade do gene constitutivo no hipocampo e córtex. PPIA: peptidilprolil isomerase A; ACTB: beta-actina; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

4.11 Análise da toxicidade *in vitro* do MP_{2.5}

4.11.1 Extração do MP_{2.5}

O MP_{2.5} foi coletado concomitantemente ao período de exposição dos animais em filtros de fibra de quartzo para a extração e análise da toxicidade *in vitro*.

A extração de MP_{2.5} dos filtros de fibra de quartzo foi realizada com metanol. Para isso, cada filtro foi sonificado em 3 ciclos de 30 min em banho de ultrassom e, para cada ciclo, o material extraído foi coletado em frasco de vidro e foi adicionado novo volume de metanol ao filtro.

Após a extração, o solvente foi evaporado em rotavapor até volume final de 1 mL. O volume remanescente de solvente foi evaporado naturalmente em capela de exaustão. Para garantir a quantidade de massa extraída do filtro, o MP foi diluído em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Adicionou-se o mesmo volume de DMSO em outros frascos para obter o peso médio. Todos os frascos foram pesados em balança eletrônica de precisão e a diferença de peso foi correspondente à quantidade de massa obtida de MP. Uma vez que a concentração de MP foi determinada, as amostras foram estocadas à -20°C . O filtro branco passou pelos mesmos processos de extração.

4.11.2 Cultura celular e teste de viabilidade celular

A linhagem de células de glia de rato (C6) foi selecionada para este estudo. As células foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e mantidas a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Para avaliar a viabilidade das células expostas ao MP, foi realizado o teste de Vermelho Neutro (cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metil fenazina). Para isso, as células foram cultivadas em placas de 96 poços na concentração de $1,6 \times 10^5$ células/mL para tratamento de 24 horas e $4,4 \times 10^4$ células/mL para tratamento de 72 horas. As células foram tratadas com diferentes concentrações de MP (1, 10, 50, 100 µg/mL). As amostras de MP foram dissolvidas em DMSO (<0,5% v/v) e o controle negativo (extrato do filtro branco) recebeu a mesma quantidade de solvente.

As células foram tratadas na presença e ausência de sistema exógeno de metabolização. A mistura de S9 foi preparada com fração S9 de fígado de rato com Aroclor 1254 com uma concentração final de 2% na cultura.

As placas permaneceram incubadas em estufa durante o período de tratamento de 24 e 72h. Após o término do período de exposição, removeu-se o tratamento e as células foram cuidadosamente lavadas com PBS. Em seguida foram adicionados 25 µg/mL de solução Vermelho Neutro em meio sem soro em cada poço e incubou-se a placa durante 3h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, a solução de vermelho neutro foi removida, as células foram lavadas com PBS e adicionou-se 100 µl da solução de desadsorção (CH₃COOH: EtOH: H₂O – 1:50:49). A placa permaneceu sob agitação durante 30 min no escuro e a leitura da absorbância foi realizada em 540 nm em espectrofotômetro (SpectraMax M2^e).

O teste foi realizado em triplicatas independentes e, para cada tratamento, foi utilizado um controle negativo (células tratadas com extrato dos filtros brancos). A viabilidade celular foi calculada considerando o controle negativo como 100% de viabilidade.

4.12 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS – versão 17.0, Inc., Chicago, ILL, USA). Médias, desvios padrões (DV), erros padrões (SEM) foram calculados para cada grupo. A representação gráfica foi realizada no Prism 5 Versão 5.0.

Os dados foram analisados quanto ao seu perfil de distribuição (paramétricos ou não paramétricos) através do teste Kolmogorov-Smirnov. De acordo com a distribuição dos dados, aplicou-se o teste de variância (One-Way- ANOVA), seguido pelo pós-teste Tukey ou LDS para as variáveis paramétricas e teste de Kruskal Wallis seguido pelo pós-teste de Bonferroni para as variáveis não paramétricas. Análise multivariada foi utilizada para análise de peso corporal e para verificar associação de fatores. A análise estatística do cultivo celular foi feita por ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett. A hipótese nula foi rejeitada ao nível de probabilidade de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização química do MP_{2.5}

No período de exposição dos animais, foram amostrados e coletados filtros de polycarbonato e de quartzo para quantificação de metais e de HPAs, respectivamente. Os elementos avaliados no MP_{2.5} que foi coletado nos filtros estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 - Concentração média dos elementos químicos e HPAs presente no MP_{2.5}.

Metal	ng/m ³	HPAs	ng/m ³
Cr	28,11 (± 10,48)	Naftaleno	0,45 (± 0,2)
Mn	9,22 (± 4,26)	Acenaftileno	0,3 (± 0,11)
Fe	238,54 (± 163,89)	Acenafteno	0,2 (± 0,09)
Co	0,08 (± 0,08)	Fluoreno	0,7 (± 0,49)
Ni	40,16 (±12,72)	Fenantreno	1,92 (± 1,28)
Cu	26,56 (±12,04)	Antraceno	0,24 (± 0,15)
Zn	113,13 (± 111,00)	Fluoranteno	0,77 (± 0,27)
As	1,3 (± 1,15)	Pireno	0,96 (± 0,32)
Se	3,47 (± 2,69)	Benzo[a]antraceno	0,61 (± 0,5)
Rb	1,83 (±1,2)	Criseno	1,19 (± 1,06)
Sr	18,8 (± 32,38)	benzo[b]fluoranteno	2,14 (± 2,41)
Cd	0,6 (± 0,56)	Benzo[k]fluoranteno	0,56 (± 0,6)
Sn	12,32 (± 13,53)	Benzo[e]pireno	1,41 (± 1,43)
Pb	14,93 (±16,94)	Benzo[a]pireno	0,95 (± 1,22)

Cr, cromo; Mn, manganês; Fe, ferro; Co, cobalto; Ni, níquel; Cu, cobre; Zn, zinco; As, arsênio; Se, selênio; Rb, rubídio; Sr, estrôncio; Cd, cádmio; Sn, estanho; Pb, chumbo.

5.2 Avaliação do desempenho reprodutivo

A tabela 6 mostra os parâmetros reprodutivos das gestantes expostas à poluição atmosférica. Observamos que a exposição gestacional à poluição atmosférica não alterou o número de filhotes ($P=0,855$), o número de machos

($P=0,487$), o número de fêmeas ($P=0,950$) e, conseqüentemente o sex ratio ($P=0,381$). Não foram observadas alterações físicas na prole das gestantes.

Tabela 6 - Parâmetros reprodutivos de camundongas expostas ao $MP_{2.5}$ entre o 1,5º e 18,5º DG.

Dados reprodutivos	AF (n=11)	ANF (n=12)
Nº total de filhotes	$5,8 \pm 2,7$	$6,0 \pm 1,9$
Nº filhotes machos	$2,3 \pm 1,8$	$2,5 \pm 1,2$
Nº filhotes fêmeas	$3,3 \pm 2,1$	$3,4 \pm 1,8$
Sex ratio	$0,9 \pm 1,2$	$1,2 \pm 1,5$

Valores expressos em média $\pm$ DP. Teste T e Mann Whitney. AF, ar filtrado; ANF, ar não filtrado.

5.3 Peso corporal

Para determinar a toxicidade geral do $MP_{2.5}$ verificamos o peso corporal dos animais. Conforme figura 17, observou-se diferença significativa entre os grupos. No 21º dia de vida, os animais do grupo ANF-ANF apresentaram menor peso corporal quando comparado aos grupos AF-AF ($P=0,018$) e AF-ANF ($P<0,001$). Ainda, os animais do grupo ANF-AF também apresentaram menor peso corporal quando comparado aos grupos AF-AF ($P=0,001$) e AF-ANF ($P<0,001$). Entretanto, a partir do 60º dia de idade não houve diferença significativa no peso corporal entre os grupos.

Figura 17 - Peso corporal da prole (g). Análise multivariada. *ANF-AF vs. AF-AF ($P=0,001$) e AF-ANF ($P<0,001$) e ANF-ANF vs. AF-AF ($P=0,018$) e AF-ANF ($P<0,001$). Grupos

experimentais (n=5-7): AF-AF, ar filtrado; AF-ANF, ar filtrado / ar não filtrado; ANF-AF, ar não filtrado / ar filtrado; ANF-ANF, ar não filtrado. Valores expressos em média.

5.4 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados no período vespertino, entre 13:00 às 17:00 horas. Os animais iniciaram os testes pelo campo aberto, considerado menos estressante, seguido pelo reconhecimento de objetos e, por fim, o labirinto cruz elevado.

5.4.1 Campo aberto (CA)

A tabela 7 demonstra os diferentes parâmetros observados no teste comportamental campo aberto realizado nos animais quando completaram 30 e 90 dias de vida. Aos 30 dias de idade, não foram observadas diferenças significativas em relação à latência ($P=0,457$), à frequência ($P=0,108$) e tempo ($P=0,523$) na posição de levantar, à porcentagem de tempo no centro do aparato ($P=0,755$), à locomoção ($P=0,073$) e à frequência entre centro e periferia ($P=0,235$).

Aos 90 dias de idade, também não foi observada diferença significativa em relação aos parâmetros de latência ($P=0,354$), frequência ($P=0,937$) e tempo ($P=0,630$) de levantar e na porcentagem de tempo no centro ($P=0,103$). Porém, observou-se diferença significativa em relação à locomoção ($P<0,001$) e à frequência entre centro e periferia ($P<0,001$). O grupo AF-ANF apresentou maior locomoção quando comparado aos grupos AF-AF ($P<0,001$) e ANF-AF ($P=0,003$). Do mesmo modo, o grupo ANF-ANF apresentou maior locomoção quando comparado aos grupos AF-AF ($P<0,001$) e ANF-AF ($P<0,001$). Ainda, a frequência entre centro e periferia foi maior no grupo AF-ANF quando comparado aos grupos AF-AF ($P=0,001$) e ANF-AF ($P=0,004$) e, o grupo ANF-ANF também apresentou maior frequência entre centro e periferia do que os grupos AF-AF ($P<0,001$) e ANF-AF ($P=0,001$), conforme tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros da atividade exploratória em campo aberto de animais expostos ao MP_{2.5} aos 30 e 90 dias de idade.

Parâmetros	30º dia pós-natal			
	AF-AF (n=14)	AF-ANF (n=12)	ANF-AF (n=11)	ANF-ANF (n=10)
Latência (s)	63,5 ± 75,3	83,65 ± 48,0	51,57 ± 68,9	93,89 ± 70,9
Tempo levantar (s)	7,54 ± 12,3	9,79 ± 9,1	9,51 ± 10,6	3,84 ± 6,99
Frequência em levantar	7,07 ± 9,3	12,6 ± 10,2	9,18 ± 9,0	3,4 ± 4,8
Locomoção	67,9 ± 47,3	83,7 ± 39,9	62,3 ± 49,0	35,8 ± 19,4
Tempo no centro (%)	35,9 ± 31,4	35,06 ± 16,4	39,93 ± 35,3	47,30 ± 30,2
	90º dia pós-natal			
	AF-AF (n=14)	AF-ANF (n=10)	ANF-AF (n=10)	ANF-ANF (n=14)
Latência (s)	36,66 ± 76,9	12,42 ± 11,28	41,87 ± 39,4	16,57 ± 13,2
Tempo levantar (s)	7,24 ± 7,0	8,58 ± 6,2	9,80 ± 10,5	6,25 ± 3,21
Frequência em levantar	11,34 ± 9,1	13,80 ± 8,0	12,40 ± 11,4	12,00 ± 5,76
Locomoção	106,9 ± 57,7	184,9 ± 57,5*	115,6 ± 38,7	189,2 ± 37,8**
Frequência entre centro e periferia	15,71 ± 13,9	33,60 ± 14,3 [#]	16,70 ± 10,4	37,5 ± 11,4 ^{##}
Tempo no centro (%)	16,93 ± 17,3	24,14 ± 10,9	32,38 ± 24,4	29,73 ± 10,7

Valores expressos em média ± DP. ANOVA ou Kruskal Wallis, seguido de pos hoc LSD. Grupos experimentais: AF-AF, ar filtrado; AF-ANF, ar filtrado / ar não filtrado; ANF-AF, ar não filtrado / ar filtrado; ANF-ANF, ar não filtrado.

*AF-ANF vs. AF-AF (P<0,001), ANF-AF (P=0,003)

**ANF-ANF vs. AF-AF (P<0,001), ANF-AF (P<0,001)

[#] AF-ANF vs. AF-AF (P=0,001), ANF-AF (P=0,004)

^{##} ANF-ANF vs. AF-AF (P<0,001), ANF-AF (P=0,001)

5.4.2 Reconhecimento de objetos (RO)

Aos 30 dias de idade, na fase de treino, os animais foram apresentados a dois objetos idênticos durante 5 minutos. Nessa fase, observou-se que o tempo de exploração entre os objetos idênticos não foi estatisticamente diferente (P>0,05) para cada grupo. Além disso, o tempo de exploração dos objetos pelos animais não foi diferente entre os grupos (Objeto A1, P= 0,146 e Objeto A2, P=0,261) (Figura 18A), demonstrando que todos os grupos apresentaram locomoção e motivação similar de exploração durante a fase de aquisição.

Na fase teste, 24 horas após a fase treino, um dos objetos foi substituído por um objeto novo e, cada animal permaneceu durante 5 minutos

no aparelho para a livre exploração dos objetos. Não foi observada diferença significativa no tempo de exploração entre os objetos ($P>0,05$) e também em relação ao tempo de exploração dos objetos entre os grupos (objeto novo, $P=0,309$ e objeto familiar $P=0,543$) (Figura 18B). A discriminação entre objeto familiar e novo foi calculada pelo índice de discriminação e, não foi observada diferença significativa entre os grupos ($P=0,860$).

Figura 18 - Reconhecimento de objetos nos animais aos 30 dias de idade. A) Tempo de exploração dos objetos na fase treino. Comparação de tempo de exploração dos objetos no grupo, Mann Whitney, $P>0,05$. Comparação de tempo de exploração entre os grupos, Kruskal-Wallis - objeto A1, $P=0,146$ e objeto A2, $P=0,261$. B) Tempo de exploração dos objetos na fase teste. Comparação de tempo de exploração dos objetos no grupo, Mann Whitney, $P>0,05$. Comparação de tempo dos objetos no grupo, Mann Whitney, $P>0,05$. Comparação de tempo de exploração entre grupos, ANOVA, objeto novo, $P=0,309$ e objeto familiar, $P=0,543$. Grupos experimentais ($n= 10-13$): AF-AF, ar filtrado; AF-ANF, ar filtrado / ar não filtrado; ANF-AF, ar não filtrado / ar filtrado; ANF-ANF, ar não filtrado. Valores expressos em média $\pm$ SD

Quando os animais completaram 90 dias de idade, também não foi observada diferença estatística no tempo de exploração dos objetos idênticos em cada grupo na fase treino ($P>0,05$). Porém, diferentemente de quando os animais tinham 30 dias, aos 90 dias foi observada diferença estatística no tempo de exploração entre os grupos na fase treino para o objeto A1 ($P<0,001$) e para o objeto A2 ($P<0,001$). O tempo de exploração no objeto A1 foi maior no grupo AF-ANF quando comparado aos grupos AF-AF e ANF-AF ($P=0,026$, respectivamente). Além disso, foi maior no grupo ANF-ANF quando comparado aos grupos AF-AF e ANF-AF ($P<0,001$, respectivamente). Também o tempo de exploração do objeto A2 foi maior no grupo AF-ANF quando comparado aos grupos AF-AF ($P=0,002$) e ANF-AF ($P=0,011$) e maior no grupo ANF-ANF quando comparado aos grupos AF-AF ($P=0,008$) e ANF-AF ($P=0,042$) (Figura 19A).

Na fase teste, 24h após da sessão treino, o grupo AF-ANF explorou durante mais tempo o objeto novo do que o objeto familiar ($P=0,009$). Em relação ao tempo de exploração dos objetos entre os grupos foi observada diferença tanto no tempo de exploração do objeto familiar ($P=0,001$) quanto do objeto novo ($P<0,001$) entre os grupos. O tempo de exploração do objeto familiar foi maior no grupo ANF-ANF quando comparado ao grupo AF-AF ($P<0,001$). Já o tempo de exploração do objeto novo foi maior no grupo AF-ANF quando comparado aos grupos AF-AF ($P=0,001$) e ANF-AF ($P=0,004$). Além disso, o tempo de exploração do objeto novo foi maior no grupo ANF-ANF quando comparado aos grupos AF-AF ($P=0,006$) e ANF-AF ($P=0,028$) (Figura 19B).

Referente ao índice de discriminação observou-se diferença entre os grupos ($P=0,009$). O grupo AF-ANF apresentou um índice de discriminação maior quando comparado ao grupo ANF-AF ($P=0,005$) (Figura 19C).

Figura 19 - Reconhecimento de objetos nos animais aos 90 dias de idade. A) Tempo de exploração dos objetos na fase treino. Comparação de tempo de exploração dos objetos no grupo, Teste T, $P>0,05$. Comparação de tempo de exploração entre os grupos, Objeto A1: *AF-ANF vs AF-AF e ANF-AF ($P=0,026$, respectivamente); **ANF-ANF vs AF-AF e ANF-AF ($P<0,001$, respectivamente). Objeto A2: #AF-ANF vs AF-AF ($P=0,002$) e ANF-AF ($P=0,011$), ##ANF-ANF vs AF-AF ($P=0,008$) e ANF-AF ($P=0,042$). ANOVA, seguido pelo pós-teste Tukey. B) Tempo de exploração dos objetos na fase teste. Comparação de tempo de exploração dos objetos no grupo. @Objeto A em comparação ao Objeto B ($P=0,009$), Teste T. Objeto familiar,

#ANF-ANF vs AF-AF ($P<0,001$). Objeto novo, **AF-ANF vs AF-AF ($P=0,001$) e ANF-AF ($P=0,004$), *ANF-ANF vs AF-AF ($P=0,006$) e ANF-AF ($P=0,028$). ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey. C) Índice de discriminação. *ANF-AF vs AF-ANF ($P=0,005$). ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey. Grupos experimentais: AF-AF, ar filtrado ($n=11-14$); AF-ANF, ar filtrado / ar não filtrado ($n=11$); ANF-AF, ar não filtrado / ar filtrado ($n=7-8$); ANF-ANF, ar não filtrado ($n=11-12$). Valores expressos em média $\pm$ SM

5.4.3 Labirinto cruz elevado (LCE)

A tabela 8 demonstra os parâmetros analisados no teste comportamental de labirinto cruz elevado. Aos 33 dias de vida não foi observado diferença significativa na latência ($P=0,084$), no tempo de permanência ($P=0,411$) e número de entradas ($P=0,483$) no braço aberto, no tempo de permanência no centro do aparato ($P=0,784$), assim como, no tempo ($P=0,707$) e número de *head dips* ($P=0,669$). Entretanto, observou-se diferença significativa no tempo em posição levantar ($P=0,002$) e na frequência deste movimento ($P<0,001$). Os animais do grupo AF-ANF permaneceram durante mais tempo na posição levantada do que os grupos AF-AF ($P<0,001$), ANF-AF ($P=0,013$) e, o grupo ANF-ANF permaneceu durante mais tempo na posição levantada do que os animais do grupo AF-AF ($P=0,028$). Além disso, os animais do grupo AF-ANF apresentaram maior frequência dessa posição quando comparado aos grupos AF-AF ($P<0,001$), ANF-AF ($P<0,001$) e ANF-ANF ($P=0,007$) e, os animais do grupo ANF-ANF apresentaram maior frequência quando comparado aos animais do grupo AF-AF ($P=0,040$).

Tabela 8 - Parâmetros de ansiedade em labirinto cruz elevado de animais expostos ao MP_{2.5} aos 33 dias de idade.

Parâmetros	AF-AF (n=12)	AF-ANF (n=13)	ANF-AF (n=11)	ANF-ANF (n=10)
Latência (s)	5,60 $\pm$ 7,3	5,05 $\pm$ 4,4	22,08 $\pm$ 24,8	9,27 $\pm$ 24,1
Tempo no centro (%)	27,5 $\pm$ 16,3	21,6 $\pm$ 16,0	28,6 $\pm$ 23,4	26,2 $\pm$ 13,8
Nº entradas no centro	9,2 $\pm$ 3,7	10,5 $\pm$ 4,9	8,3 $\pm$ 5,0	9,8 $\pm$ 3,2
Tempo no braço aberto (%)	9,38 $\pm$ 21,6	0,9 $\pm$ 2,5	4,94 $\pm$ 12,6	1,99 $\pm$ 3,8
Nº entradas no braço aberto	1,2 $\pm$ 2,3	0,4 $\pm$ 0,9	0,4 $\pm$ 0,8	0,7 $\pm$ 1,0
Tempo de <i>head dips</i> (%)	1,70 $\pm$ 1,5	1,52 $\pm$ 1,1	2,12 $\pm$ 1,6	2,02 $\pm$ 0,9
Nº de <i>head dips</i>	13,0 $\pm$ 10,0	9,33 $\pm$ 5,9	12,0 $\pm$ 8,2	12,6 $\pm$ 6,4
Tempo posição levantar (%)	0,87 $\pm$ 0,3	4,28 $\pm$ 3,1*	2,07 $\pm$ 1,8	2,85 $\pm$ 1,6**
Nº posição levantar	5,66 $\pm$ 1,9	20,50 $\pm$ 9,8 [@]	10,0 $\pm$ 7,1	12,0 $\pm$ 6,3 [@]

Valores expressos em média $\pm$ DP. ANOVA ou Kruskal Wallis, seguido de pos hoc LSD. Grupos experimentais: AF-AF, ar filtrado; AF-ANF, ar filtrado / ar não filtrado; ANF-AF, ar não filtrado / ar filtrado; ANF-ANF, ar não filtrado.

* AF-ANF vs. AF-AF ($P < 0,001$), ANF-AF ($P = 0,013$)

** ANF-ANF vs. AF-AF ($P = 0,028$)

@ AF-ANF vs. AF-AF ($P < 0,001$), ANF-AF ($P < 0,001$); ANF-ANF ($P = 0,004$)

@@ ANF-ANF vs AF-AF ($P = 0,040$)

Aos 93 dias de vida observou-se que os animais apresentaram diferença significativa no tempo de permanência ($P = 0,003$) no braço aberto além de diferença significativa no tempo ($P = 0,003$) e na frequência de *head dips* ($P = 0,001$) e no tempo na posição levantar ($P = 0,031$) (Tabela 9). O grupo ANF-AF permaneceu durante mais tempo nos braços abertos quando comparado aos grupos AF-AF ($P = 0,001$), AF-ANF ($P = 0,001$) e ANF-ANF ($P = 0,007$). Além disso, o grupo ANF-AF permaneceu durante mais tempo do que os grupos AF-AF ($P = 0,008$) e AF-ANF ($P = 0,001$) executando *head dips* e também o grupo ANF-ANF permaneceu durante mais tempo fazendo o movimento quando comparado ao grupo AF-ANF ($P = 0,017$). Em relação à frequência desse movimento o grupo ANF-AF realizou esse movimento mais vezes do que os grupos AF-AF ($P = 0,004$), AF-ANF ($P < 0,001$) e ANF-ANF ($P = 0,002$). Por fim, os animais do grupo ANF-ANF permaneceram durante mais tempo na posição levantada do que os animais dos grupos AF-AF ($P = 0,024$), AF-ANF ($P = 0,009$) e ANF-AF ($P = 0,032$).

Não foi observada diferença significativa entre os grupos em relação à latência ($P = 0,309$), no tempo ($P = 0,628$) e na frequência ($P = 0,205$) de permanência no centro do aparato e no número de vezes que os animais ficaram na posição levantar ($P = 0,144$) (Tabela 9).

Tabela 9 - Parâmetros de ansiedade em labirinto cruz elevado de animais expostos ao MP_{2.5} aos 93 dias de idade.

Parâmetros	AF-AF (n=11)	AF-ANF (n=11)	ANF-AF (n=10)	ANF-ANF (n=14)
Latência (s)	10,95 ± 7,5	6,78 ± 6,13	12,32 ± 12,9	7,25 ± 5,3
Tempo no centro (%)	24,6 ± 16,6	19,6 ± 8,0	20,7 ± 7,1	23,7 ± 6,9
Nº entradas no centro	12,0 ± 5,1	16,4 ± 3,6	12,7 ± 5,2	14,2 ± 5,8
Tempo no braço aberto (%)	3,50 ± 6,7	2,91 ± 3,6	19,59 ± 20,6*	6,83 ± 6,2
Nº entradas no braço aberto	0,8 ± 1,2	1,0 ± 1,0	2,2 ± 1,8	1,7 ± 1,6
Tempo de <i>head dips</i> (%)	1,86 ± 1,0	1,47 ± 0,8	2,95 ± 1,0 ^{&}	2,37 ± 0,6 ^{&&}
Nº de <i>head dips</i>	13,72 ± 6,7	10,18 ± 5,7	22,00 ± 8,8 [#]	13,28 ± 3,2
Tempo posição levantar (%)	3,22 ± 2,7	2,89 ± 1,2	3,26 ± 1,9	5,20 ± 2,1 ^{\$}
Nº posição levantar	13,4 ± 10,6	12,5 ± 7,2	15,0 ± 8,12	19,5 ± 6,3

Valores expressos em média ± DP. ANOVA ou Kruskal Wallis, seguido de pos hoc LSD.

Grupos experimentais: AF-AF, ar filtrado; AF-ANF, ar filtrado / ar não filtrado; ANF-AF, ar não filtrado / ar filtrado; ANF-ANF, ar não filtrado.

* ANF-AF vs. AF-AF (P=0,001); AF-ANF (P=0,001); ANF-ANF (P=0,008)

& ANF-AF vs. AF-AF (P=0,008); AF-ANF (P= 0,001)

&& ANF-ANF vs. AF-ANF (P=0,017)

ANF-AF vs. AF-AF (P=0,004); AF-ANF (P<0,001); ANF-ANF (P=0,002)

\$ ANF-ANF vs. AF-AF (P=0,024); AF-ANF (P=0,009); ANF-AF (P=0,032)

5.5 Volume cerebral total

Em relação ao volume cerebral total sobre o peso corporal não foi observada diferença estatística (P=0,095). Apesar de não significativo, observamos aumento do volume cerebral nos grupos AF-ANF e ANF-ANF.

Figura 20 - Volume cerebral total (mm³) em relação ao peso corporal de animais com 90 dias de idade expostos ao MP_{2.5}. ANOVA, P=0,095. Grupos experimentais (n=5): AF-AF, ar filtrado;

AF-ANF, ar filtrado / ar não filtrado; ANF-AF, ar não filtrado / ar filtrado; ANF-ANF, ar não filtrado. Valores expressos em média $\pm$ SD

Na análise de interação dos fatores, observamos que o volume cerebral foi maior nos animais que foram expostos à poluição no período pós-natal ($16,31 \pm 0,8$) em comparação aos animais não expostos no mesmo período ($13,16 \pm 0,8$) ($P=0,015$). Não observamos diferença em relação à exposição a exposição pré-natal e na associação dessas variáveis ($P>0,05$).

5.5.1 Volume dos compartimentos cerebrais

A tabela 10 demonstra os resultados da análise do volume dos compartimentos cerebrais. Observou-se que o corpo caloso apresentou diferença significativa entre os grupos ($P=0,003$). O corpo caloso do grupo ANF-AF apresentou menor volume quando comparado aos grupos AF-AF ($P=0,043$), AF-ANF ($P=0,003$) e ANF-ANF ($P=0,001$). Não foi observado diferença estatística em relação ao volume do córtex ($P=0,089$), hipocampo ($P=0,108$), ventrículos e aqueduto ($P=0,055$), cerebelo ($P=0,382$), diencéfalo ($P=0,764$), e tronco encefálico ($P=0,065$).

Tabela 10 - Efeito da exposição ao MP_{2,5} no volume (mm³) dos compartimentos cerebrais de animais aos 93 dias de idade.

Estrutura cerebral	AF-AF	AF-ANF	ANF-AF	ANF-ANF
Córtex	100,60 $\pm$ 17,4	122,47 $\pm$ 35,6	101,35 $\pm$ 19,0	134,86 $\pm$ 15,2
Hipocampo	20,25 $\pm$ 6,0	29,50 $\pm$ 8,3	17,02 $\pm$ 5,5	24,70 $\pm$ 10,4
Corpo caloso	6,90 $\pm$ 1,3	8,44 $\pm$ 2,1	4,38 $\pm$ 0,8 *	9,27 $\pm$ 2,4
Ventrículos e aqueduto	4,60 $\pm$ 2,8	4,17 $\pm$ 2,7	2,50 $\pm$ 1,7	7,41 $\pm$ 2,8
Cerebelo	33,39 $\pm$ 11,5	52,36 $\pm$ 26,7	37,53 $\pm$ 17,6	35,90 $\pm$ 13,4
Diencéfalo	56,57 $\pm$ 8,3	55,82 $\pm$ 26,8	48,75 $\pm$ 9,2	62,71 $\pm$ 28,5
Tronco encefálico	53,71 $\pm$ 8,22	83,10 $\pm$ 18,65	59,70 $\pm$ 10,3	75,36 $\pm$ 27,1
Outros	1,26 $\pm$ 0,7	1,02 $\pm$ 0,9	1,12 $\pm$ 1,0	1,81 $\pm$ 2,27

Valores expressos em média $\pm$ DP. ANOVA ou Kruskal Wallis, seguido de pos hoc LSD. Grupos experimentais (n=5): AF-AF, ar filtrado; AF-ANF, ar filtrado / ar não filtrado; ANF-AF, ar não filtrado / ar filtrado; ANF-ANF, ar não filtrado

* ANF-AF vs. AF-AF ($P=0,043$); AF-ANF ($P=0,003$); ANF-ANF ($P=0,001$)

5.6 Quantificação de neurônios no córtex

A figura 21 demonstra o número de neurônios no córtex cerebral dos animais expostos à poluição atmosférica quando completaram 90 dias de vida. O número de neurônios no córtex cerebral não foi diferente entre os grupos analisados ($P=0,932$) (Figura 21).

Figura 21 - Número de neurônios no córtex cerebral de animais com 90 dias de idade expostos ao $MP_{2.5}$. ANOVA, $P=0,932$. Grupos experimentais ($n=3-5$): AF-AF, ar filtrado; AF-ANF, ar filtrado / ar não filtrado; ANF-AF, ar não filtrado / ar filtrado; ANF-ANF, ar não filtrado. Valores expressos em média $\pm$ SD

5.7 Espessura das camadas corticais

A figura 22 demonstra a espessura das camadas corticais nos animais expostos à poluição atmosférica quando completaram 90 dias de vida. A espessura total das camadas cerebrais não foi diferente entre os grupos analisados ($P=0,278$). A espessura da camada III e V foram diferentes entre os grupos ($P=0,034$ e $P=0,016$, respectivamente).

A espessura da camada III nos grupos AF-ANF ($10,60 \pm 1,12$) e ANF-ANF ($11,09 \pm 1,28$) foi menor do que o grupo AF-AF ($13,55 \pm 1,30$) ($P=0,017$ e $P=0,030$, respectivamente). Além disso, a espessura da mesma camada no grupo AF-ANF ($10,60 \pm 1,12$) foi menor do que o grupo ANF-AF ($13,28 \pm 2,54$; $P=0,035$). Já a espessura da camada V foi maior no grupo ANF-ANF ($35,25 \pm$

2,51) quando comparado ao grupo AF-AF ($30,69 \pm 1,07$; $P=0,004$) e ao grupo ANF-AF ($31,34 \pm 1,97$; $P=0,014$). Não foi observada diferença significativa nas demais camadas corticais analisadas.

Figura 22 - Espessura das camadas corticais de animais com 90 dias de idade expostos ao MP_{2.5}. ANOVA seguido pelo pós-teste LSD. Camada III, * AF-AF vs AF-ANF ($P=0,017$) e ANF-ANF ($P=0,030$), # AF-ANF vs ANF-AF ($P=0,035$). Camada V, @ ANF-ANF vs AF-AF ($P=0,004$) e ANF-AF ($P=0,014$). Grupos experimentais ($n=4-5$): AF-AF, ar filtrado; AF-ANF, ar filtrado / ar não filtrado; ANF-AF, ar não filtrado / ar filtrado; ANF-ANF, ar não filtrado. Valores expressos em porcentagem

5.8 Avaliação imuno-histoquímica

A análise de células gliais apresentou diferença significativa entre os grupos. No córtex, observamos diferença significativa na densidade óptica de micróglia ($P=0,002$) e astrócitos ($P=0,024$) entre os grupos. O grupo ANF-ANF apresentou maior densidade de IBA-1 quando comparado aos grupos AF-ANF ($P=0,001$) e ANF-AF ($P=0,023$) (Figura 23A) e maior densidade de GFAP no grupo ANF-ANF quando comparado aos grupos AF-AF ($P=0,041$) e ANF-AF ($P=0,032$) (Figura 23B).

Figura 23 - Densidade óptica de células da glia no córtex de animais com 90 dias de idade expostos ao MP_{2.5}. A) Densidade óptica de IBA-1 no córtex. ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey (n=4-5). *ANF-ANF vs. AF-ANF (P=0,001) e ANF-AF (P=0,023). B) Densidade óptica de GFAP no córtex. ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey (n=5-7). *ANF-ANF vs. AF-AF (P=0,041) e ANF-AF (P=0,032). Grupos experimentais: AF-AF, ar filtrado; AF-ANF, ar filtrado / ar não filtrado; ANF-AF, ar não filtrado / ar filtrado; ANF-ANF, ar não filtrado. Valores expressos em média $\pm$ SD

Em relação à análise da densidade óptica de células da glia no corpo caloso, não foi observada diferença significativa de IBA-1 entre os grupos (P=0,159) (Figura 24A). No entanto, a densidade de GFAP no corpo caloso foi diferente entre os grupos (P=0,009). O grupo ANF-ANF apresentou maior densidade óptica de GFAP do que os grupos AF-ANF (P=0,008) e ANF-AF (P=0,025) (Figura 24B).

Figura 24 - Densidade óptica de células da glia no corpo caloso de animais com 90 dias de idade expostos ao MP_{2.5}. A) Densidade óptica de IBA-1 no corpo caloso. ANOVA (P=0,159), (n=5). B) Densidade óptica de GFAP no corpo caloso. ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, (n=4-5). *ANF-ANF vs. AF-AF (P=0,008) e ANF-AF (P=0,025). Grupos experimentais: AF-AF, ar filtrado; AF-ANF, ar filtrado / ar não filtrado; ANF-AF, ar não filtrado / ar filtrado; ANF-ANF, ar não filtrado. Valores expressos em média $\pm$ SM

Conforme tabela 11, não observamos diferença na análise total de GFAP no hipocampo ($P=0,071$). Porém, ao analisarmos as regiões do hipocampo verificamos diferença na densidade de astrócitos imunorreativos à GFAP nas áreas de CA1 ($P=0,017$) e giro denteado ($P=0,009$). Na região de CA1, o grupo ANF-ANF apresentou maior densidade óptica de astrócitos do que os grupos AF-AF ($P=0,021$), AF-ANF ($P=0,026$) e ANF-AF ($P=0,028$). O mesmo perfil de resposta foi observado no giro denteado. O grupo ANF-ANF apresentou maior densidade óptica de astrócitos do que os grupos AF-AF ($P=0,039$), AF-ANF ($P=0,009$) e ANF-AF ($P=0,013$). Não foi observada diferença na área de CA3 ($P=0,279$).

Ao avaliarmos a densidade óptica de IBA-1, não observamos diferença nas células da microglia no hipocampo ($P=0,686$) e também quando analisamos as áreas CA1, CA3 e giro denteado ($P>0,05$) (Tabela 11).

Tabela 11 - Densidade óptica de GFAP e IBA-1 no hipocampo de animais com 90 dias de idade expostos ao MP_{2.5}.

	AF-AF	AF-ANF	ANF-AF	ANF-ANF
GFAP total	0,058 ± 0,016	0,068 ± 0,043	0,061 ± 0,017	0,142 ± 0,007
CA1	0,044 ± 0,005	0,057 ± 0,025	0,055 ± 0,014	0,121 ± 0,012*
CA3	0,053 ± 0,008	0,077 ± 0,066	0,058 ± 0,023	0,139 ± 0,001
GD	0,087 ± 0,032	0,071 ± 0,025	0,074 ± 0,030	0,180 ± 0,006®
IBA-1 total	0,037 ± 0,008	0,052 ± 0,056	0,018 ± 0,015	0,034 ± 0,030
CA1	0,042 ± 0,014	0,096 ± 0,011	0,031 ± 0,031	0,025 ± 0,025
CA3	0,037 ± 0,011	0,021 ± 0,013	0,027 ± 0,027	0,027 ± 0,025
GD	0,031 ± 0,015	0,012 ± 0,004	0,029 ± 0,029	0,055 ± 0,076

Valores expressos em média ± DP. GFAP, ANOVA. IBA-1, Multivariada. Grupos experimentais: AF-AF, ar filtrado; AF-ANF, ar filtrado / ar não filtrado; ANF-AF, ar não filtrado / ar filtrado; ANF-ANF, ar não filtrado. IBA-1, n=1-5 animais por grupo; GFAP, n=2-4 animais por grupo.

*ANF-ANF vs. AF-AF ($P=0,021$), AF-ANF ($P=0,026$) e ANF-AF ($P=0,028$)

® ANF-ANF vs. AF-AF ($P=0,039$), AF-ANF ($P=0,009$) e ANF-AF ($P=0,013$)

Conforme a tabela 12, não foi observada diferença no número de neurônios GABAérgicos (células marcadas com GAD65+67) no córtex ($P=0,707$). Em relação à análise de neurônios dopaminérgicos (células marcadas com tirosina hidroxilase – TH), também não foi observada diferença de densidade óptica no estriado ($P=0,616$).

Tabela 12 - Densidade óptica de células imuno-marcadas com TH no estriado e GAD65+67 no córtex de animais com 90 dias de idade expostos ao MP_{2.5}.

Marcador	Estrutura	AF-AF	AF-ANF	ANF-AF	ANF-ANF
TH	Estriado	0,24 ± 0,07	0,17 ± 0,07	0,20 ± 0,03	0,26 ± 0,05
GAD65+67	Córtex	7,09 ± 2,05	6,63 ± 0,8	6,43 ± 0,94	6,18 ± 0,65

Valores expressos em média ± DP. ANOVA. Grupos experimentais: AF-AF, ar filtrado; AF-ANF, ar filtrado / ar não filtrado; ANF-AF, ar não filtrado / ar filtrado; ANF-ANF, ar não filtrado. TH, n=4-5 animais por grupo; GAD65+67, n=4-7 animais por grupo.

5.9 Expressão gênica

Em relação à análise da expressão gênica não foi observado diferenças significativas para os genes GABA-A-R α 2 (P=0,067), 5-HT1A (P=0,405) e HO-1 (P=0,880) no hipocampo (Figura 25A, B, C). Porém, observou-se que o nível de expressão gênica de BDNF, no hipocampo, foi significativamente diferente entre os grupos (P=0,047). O grupo ANF-ANF apresentou menor nível de expressão gênica quando comparado ao grupo AF-AF (P=0,006) (Figura 25D).

Figura 25 - Efeito da exposição ao MP_{2.5} sobre a expressão de mRNA no hipocampo de animais aos 90 dias de vida. A) Expressão de mRNA de GABA-A-R α 2. B) Expressão de mRNA de 5-HT1A. C) Expressão de mRNA de HO-1. D) Expressão de mRNA de BDNF. ANOVA,

seguido pelo pós-teste de Tukey.* ANF-ANF vs AF-AF ($P=0,047$). Grupos experimentais ($n=6-8$): AF-AF, ar filtrado; AF-ANF, ar filtrado / ar não filtrado; ANF-AF, ar não filtrado / ar filtrado; ANF-ANF, ar não filtrado. Valores expressos em média $\pm$ SD

Além disso, ao analisarmos a expressão dos genes no córtex, não foi verificada diferença significativa na expressão dos genes GABA-A-R $\alpha 2$ ($P=0,536$), 5-HT1A ($P=0,221$) e HO-1 ($P=0,304$) (Figura 26A, B, C). Entretanto, apesar de não significativo, observamos uma tendência de diminuição da expressão desses genes no córtex dos animais que foram somente expostos no período gestacional (ANF-AF).

Figura 26 - Efeito da exposição ao MP_{2.5} sobre a expressão de mRNA no córtex de animais aos 90 dias de vida. A) Expressão de mRNA de GABA-A-R $\alpha 2$. B) Expressão de mRNA de 5-HT1A. C) Expressão de mRNA de HO-1. ANOVA. Grupos experimentais ($n=5-10$): AF-AF, ar filtrado; AF-ANF, ar filtrado / ar não filtrado; ANF-AF, ar não filtrado / ar filtrado; ANF-ANF, ar não filtrado. Valores expressos em média $\pm$ SD

5.10 Citotoxicidade pelo método de incorporação de vermelho neutro

Os resultados de citotoxicidade mostram que houve perda de viabilidade celular das células C6 expostas a 100 $\mu\text{g/mL}$ sem adição da fração S9 no

período de 24 horas quando comparadas ao controle ($P<0,01$) (Figura 27A). Não observamos diferença de viabilidade celular nas demais concentrações analisadas em 24 horas.

Além disso, não observamos perda da viabilidade celular das células C6 após tratamento nas diferentes concentrações no período de 72 horas tanto para as células tratadas na presença e ausência da fração S9 (Figura 27B).

Figura 27 - Sensibilidade das células C6 expostas ao $MP_{2.5}$ extraído de filtros. A) Células C6 tratadas durante 24 horas com e sem fração S9. * estatisticamente diferente quando comparado ao controle negativo ($P<0,01$). Teste de Dunett. B) Células C6 tratadas durante 72 horas com e sem fração S9

---

6. DISCUSSÃO

O presente estudo é, até o presente momento, o primeiro a investigar os efeitos da exposição pré e pós-natal à poluição atmosférica da cidade de São Paulo sobre o SNC. Nossos resultados mostram alterações comportamentais nos animais com 90 dias e expostos ao MP_{2.5} principalmente durante o período pós-natal tais como: aumento de frequência de locomoção, aumento no tempo de exploração de diferentes objetos. Ainda, observamos efeito ansiolítico no grupo ANF-AF. Além disso, observamos alterações morfométricas na espessura das camadas corticais e de volume do corpo caloso e, inflamação do córtex cerebral e hipocampo, assim como diminuição da expressão de BDNF no hipocampo dos animais expostos à poluição em ambos os períodos.

Estudos experimentais e epidemiológicos têm demonstrado que a exposição à poluição atmosférica no período gestacional é capaz de comprometer o desenvolvimento fetal e causar baixo peso ao nascer e prematuridade (Stieb *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2017; Reis *et al.*, 2017). Outros estudos conduzidos em nosso laboratório relataram que a exposição à poluição da cidade de São Paulo provocou baixo peso ao nascer em camundongos cujas mães foram expostas a poluição durante o período gestacional (Veras *et al.*, 2008; Veras *et al.*, 2009). Em nosso estudo, verificamos que os animais provenientes de mães expostas ao MP_{2.5} apresentaram menor peso corporal aos 21 dias de vida. Apesar de não termos avaliado o peso corporal ao nascimento, observamos que essa discrepância de desenvolvimento dada pela diferença de peso não persistiu na vida adulta dos animais.

O peso ao nascer é um importante índice de desenvolvimento e preditor de saúde na vida adulta (Barker, 2004; Calkins e Devaskar, 2011). A exposição a substâncias exógenas durante a gestação pode provocar não somente restrições no crescimento e parto prematuro, mas, também agir como toxicantes em período tardio do desenvolvimento podendo causar, por exemplo, prejuízos cognitivos (Hougaard *et al.*, 2008; Basagaña *et al.*, 2016; Rivas *et al.*, 2019).

A cidade de São Paulo é caracterizada por ser um grande centro urbano. E assim como em outras grandes cidades, a poluição atmosférica é o maior problema ambiental que afeta a saúde dos habitantes. Segundo o DETRAN/SP, em Dezembro de 2018 a capital possuía mais de 8.8 milhões de veículos (Detran, 2019). Assim, devido às características da cidade, a frota veicular é considerada a grande responsável pela emissão de poluentes ao ambiente. Brito *et al.*, (2018) evidenciaram que apesar de caminhões e ônibus comporem apenas 5% da frota veicular da cidade de São Paulo, os mesmos são responsáveis pela emissão de 47% de carbono elementar e de 40% de benzeno na atmosfera. Já é conhecido que esses compostos são nocivos à saúde humana (Morakinyo *et al.*, 2016).

Na análise dos componentes presentes na atmosfera realizada nos filtros verificamos a presença de metais como Pb, Cr, Ni, e HPAs como benzopireno, criseno entre outros.

Estudos conduzidos em modelo animal demonstram que a exposição a poluentes como partículas ambientais concentradas, partículas de diesel e *residual oil fly ash* (ROFA) podem causar alterações comportamentais (Zanchi *et al.*, 2008; Win-Shwe, T.-T., Yamamoto, S., *et al.*, 2012; Allen, J. L., Liu, X., Weston, D., *et al.*, 2014). Em humanos, a exposição à poluição atmosférica tem sido associada ao prejuízo de memória e aumento de incidência de distúrbios cognitivos (Xu *et al.*, 2016). Entretanto, há um número limitado de estudos que avaliaram os efeitos nocivos da interação da exposição pré e pós-natal a poluição atmosférica sobre comportamento exploratório, de memória e de ansiedade.

De maneira geral, em nosso estudo, observamos que animais jovens e adultos apresentaram diferenças comportamentais, sendo que essas alterações foram pronunciadas principalmente nos animais expostos aos poluentes durante o período pós-natal e em animais adultos.

A atividade locomotora dos camundongos foi avaliada no CA, método este que tem sido amplamente utilizado para avaliar a atividade motora e exploratória (Seibenhener e Wooten, 2015). Nossos resultados demonstram diferenças significativas em relação ao número de quadrantes andados pelos animais adultos, aos 90 dias de idade, apresentando maior atividade

locomotora os animais expostos ao MP_{2.5} no período pós-natal enquanto que em animais jovens, com 30 dias de vida, não houve diferença. O mesmo perfil comportamental foi observado em relação à frequência entre centro e periferia. Isso sugere um efeito decorrente da exposição à poluição atmosférica no desenvolvimento de estruturas cerebrais relacionadas ao comportamento motor.

Corroborando com nossos achados, estudos demonstram que a exposição aos poluentes durante a gestação e no período perinatal não provocou alterações na atividade locomotora na idade adulta. Chang *et al.*, (2018) avaliaram a exposição gestacional e pós-natal (0–4, 7–11, e 14–18 GD – 21PND) a 250-300 µg/m³ de exaustão de diesel e não observaram diferença no teste de campo aberto nos animais com 6 semanas de vida. Outro estudo verificou que gestantes de camundongos expostas a 46,70 µg/m³ de MP_{2.5} por meio de um concentrador de aerossol não apresentaram diferença na atividade locomotora aos 4 meses de idade (Kulas *et al.*, 2018).

Porém, estudos são controversos nos resultados comportamentais. Há alguns que demonstram aumento da atividade locomotora na prole de animais expostos durante a gestação (partículas de diesel, carbono elementar, MP_{2.5}) quando avaliados em idade de jovem-adultos (Thirtamara Rajamani *et al.*, 2013; Umezawa *et al.*, 2018; Cui *et al.*, 2019). Outros estudos apontam diminuição da atividade locomotora e exploratória após exposição gestacional a diferentes componentes da poluição atmosférica (Suzuki *et al.*, 2010; Allen, Joshua L. *et al.*, 2014; Jia *et al.*, 2018; Zhang, T. *et al.*, 2018).

Em relação aos demais parâmetros avaliados no CA não observamos diferença em relação à latência, ao tempo que o animal permaneceu na posição levantar, na frequência desse movimento e no tempo gasto no centro do aparato após exposição ao MP_{2.5}, diferentemente de outros estudos (Salvi *et al.*, 2017; Jia *et al.*, 2018).

A maioria dos trabalhos com resultados discrepantes aos nossos avaliaram os efeitos da exposição a poluentes quando a prole já é considerada jovem-adulta; porém, a exposição ocorreu durante o período gestacional. Idealmente, a exposição aos poluentes não ocorre somente no período pré-natal e, isso pode ser uma limitação desses trabalhos. Em nosso estudo,

avaliamos a exposição pré e pós-natal à poluição atmosférica tendo em vista que, principalmente nos grandes centros urbanos, a exposição à poluição ambiental é contínua na vida do indivíduo.

Em relação aos efeitos nocivos do $MP_{2.5}$ sobre a memória dos animais, avaliamos a memória por meio do teste de reconhecimento de objetos. Os roedores possuem preferência em explorar objetos novos em comparação a objetos familiares. Nossos resultados demonstram que a exposição ao $MP_{2.5}$ não causou alteração de memória nos animais jovens. Porém, observamos alterações de memória no teste de reconhecimento de objetos nos animais adultos. É importante ressaltar que, na sessão treino, os animais adultos e expostos ao MP_{25} no período pós-natal (AF-ANF e ANF-ANF) apresentaram perfil exploratório maior para ambos os objetos quando comparado aos animais não expostos no período pós-natal. Isso pode ter refletido no comportamento observado na sessão teste, na qual os animais do grupo AF-ANF exploraram mais o objeto novo e, animais do grupo ANF-ANF exploram ambos os objetos durante mais tempo quando comparado com os demais grupos.

Consequentemente, o índice de discriminação demonstrou que animais expostos à poluição somente no período pós-natal (AF-ANF) reconheceram o objeto novo, enquanto observamos prejuízo no grupo que foi exposto no período gestacional (ANF-AF). Não observamos diferença de discriminação dos objetos nos animais do grupo controle e no grupo que foi exposto durante a gestação e no período pós-natal. Isso demonstra que a exposição à poluição no período gestacional, durante a formação neural, causa comprometimento de memória em período tardio; porém, animais expostos durante toda vida ao $MP_{2.5}$ não apresentaram prejuízo de memória. Isso sugere uma resposta adaptativa do organismo perante o insulto.

Assim, tendo em vista os resultados apresentados sugerimos que os animais expostos à poluição apresentaram uma resposta adaptativa nos testes comportamentais realizados. Embora pareça contraditório que a exposição cause menos prejuízos, estudos são necessários para elucidar possíveis mecanismos que possam minimizar os efeitos adversos decorrentes da contínua exposição.

No entanto, é interessante mencionar que, assim como nossos resultados, outros trabalhos também demonstram que animais do grupo controle não apresentaram diferença em relação à preferência ao objeto novo (Win-Shwe *et al.*, 2014; Woodward *et al.*, 2017). Ainda, podemos especular que nossos resultados podem ser justificados pelo aumento da atividade locomotora nesses grupos, uma vez que, o grupo de animais que exploraram durante mais tempo os objetos coincide com os grupos que apresentaram maior atividade de locomoção no teste de campo aberto.

O LCE é um teste comportamental altamente utilizado para avaliar o comportamento tipo ansiogênico ou ansiolítico. O teste baseia-se na aversão natural que roedores têm a espaços abertos e, um aumento na atividade no braço aberto reflete comportamento ansiolítico (Lister, 1987; Walf e Frye, 2007). No presente estudo, verificamos que animais adultos que foram expostos durante a gestação (ANF-AF) apresentaram comportamento que indica um efeito ansiolítico da exposição. Ademais, os animais adultos que foram expostos à poluição em ambos os períodos (ANF-ANF) também apresentaram alterações comportamentais relacionadas ao efeito ansiolítico da exposição. Estes dados mostram que a exposição pode agir de forma distinta dependendo do período de exposição e que nem sempre os efeitos são observados em curto prazo.

Diferentemente dos nossos achados, há estudos em roedores que apontam comportamento ansiogênico após exposição aos constituintes presentes na poluição atmosférica em idade adulta (Salvi *et al.*, 2017; Jia *et al.*, 2018; Ehsanifar *et al.*, 2019) e outros que não encontraram interferência no comportamento de ansiedade devido à exposição aos poluentes (Thirumara Rajamani *et al.*, 2013; Morris-Schaffer *et al.*, 2019).

Assim, diante de nossos resultados, percebe-se que a exposição ao MP_{2.5} desencadeia alterações comportamentais diferenciadas tanto em relação à idade quanto ao período de exposição aos poluentes. Em nossos resultados, constatamos consideráveis alterações nos animais adultos e, apesar de os animais expostos ao MP_{2.5} no período pós-natal apresentarem maior atividade exploratória, os mesmos apresentam comportamento ansiogênico.

Geralmente, modificações comportamentais são acompanhadas por alterações patológicas em estruturas cerebrais que podem auxiliar na compreensão de tais respostas comportamentais (Allen, Klocke, *et al.*, 2017).

O desenvolvimento cerebral é um complexo fenômeno que começa no início da gestação e continua durante anos após o nascimento (Bayer *et al.*, 1993; Tole e Grove, 2001). Durante esse período, processos celulares de neurogênese, migração neural, diferenciação, entre outros, devem ocorrer em um tempo específico em cada fase do desenvolvimento (Rice e Barone, 2000). Diante da complexidade que a neurogênese engloba, interferências ambientais podem prejudicar o desenvolvimento principalmente pelo fato de que se um processo for interrompido durante o desenvolvimento cerebral haverá pouco potencial para que essa alteração seja reparada, o que pode induzir alterações permanentes (Rice e Barone, 2000; Schroeder, 2011; Grova *et al.*, 2019).

Dentre os mecanismos fisiológicos cerebrais, os neurotransmissores são fundamentais para a comunicação neural que, por sua vez, é viabilizada pela liberação e captação de aminoácidos pelos neurônios (Butt *et al.*, 2014). As células neurais possuem receptores nos quais os aminoácidos se ligam e desencadeiam respostas fisiológicas. Quaisquer alterações nos níveis de neurotransmissores são capazes de desencadear impactos nas funções cognitivas e motoras (Kinawy *et al.*, 2014).

Embora que neste estudo não analisamos a concentração de neurotransmissores nas estruturas encefálicas estudadas, acreditamos que a alteração dos mesmos poderia justificar a alteração comportamental observada, pois qualquer desequilíbrio na razão entre neurotransmissores excitatórios e inibitórios pode contribuir na disfunção de estruturas encefálicas (Yokota *et al.*, 2015). Estudos demonstram que a exposição fetal a partículas de diesel causam desequilíbrio de neurotransmissores em diferentes estruturas cerebrais (Yokota, S. *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2010; Yokota *et al.*, 2013; Yokota *et al.*, 2015; Yokota, Oshio, Moriya, *et al.*, 2016; Yokota, Oshio e Takeda, 2016). Além disso, a exposição a partículas ultrafinas ambientais no período perinatal e na vida adulta (Allen, J. L., Liu, X., Pelkowski, S., *et al.*, 2014; Allen, Joshua L. *et al.*, 2014; Allen, Oberdorster, *et al.*, 2017) e a carbono elementar e vapores de gasolina na idade adulta (Tin-Tin-Win-Shwe *et al.*,

2008; Kinawy *et al.*, 2014) também induzem perturbações nos níveis de neurotransmissores.

Contribuindo com as mudanças comportamentais, estudos têm verificado que a alteração na concentração dos receptores também pode modular respostas fisiológicas. Estudos demonstram que camundongos com deleção do receptor 5-HT1A no período pós-natal apresentam aumento do comportamento tipo ansiogênico na vida adulta (Gross *et al.*, 2002). Ademais, estudos também demonstram que o receptor 5-HT1A está envolvido na cognição (Sarnyai *et al.*, 2000). Ainda, a inibição de BDNF prejudica o aprendizado e a memória de roedores (Bartoletti *et al.*, 2002). Já o receptor GABA-A regula a ansiedade e é alvo de ansiolíticos e benzodiazepínicos. Entre os receptores de GABA-A, as subunidades $\alpha 2$ e $\alpha 3$ são as que modulam o comportamento tipo ansiogênico (Löw *et al.*, 2000).

No presente estudo não foi verificado diferença na expressão dos receptores de GABA, 5-HT1A e de HO-1 nas regiões encefálicas analisadas. Mas apesar de não significativa, observamos uma tendência de diminuição na expressão dos genes no córtex dos animais do grupo exposto somente no período gestacional ao MP_{2.5}. Contudo, apesar da tendência de diminuição da expressão dos genes, fica evidente que a exposição ao MP_{2.5} não foi capaz de modular a expressão de receptores dos sistemas serotoninérgico e gabaérgico e de estresse oxidativo e isso pode justificar nossos achados comportamentais.

Por outro lado, a análise da expressão de BDNF demonstrou diminuição da mRNA desse gene no hipocampo de animais do grupo ANF-ANF. O gene BDNF é importante fator neurotrófico que promove e mantém o crescimento e a sobrevivência do SNC, sendo que sua expressão é regulada por uma variedade de sinais, incluindo alterações na atividade neural (Patterson, 2015).

Estudos corroboram nossos achados demonstrando diminuição da expressão de BDNF após exposição a poluentes ambientais em estruturas cerebrais como bulbo olfatório e hipocampo (Bos, De Boever, Int Panis, *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2018). Xiao *et al.*, (2016) demonstraram que a exposição gestacional a fumaça do cigarro diminuiu a expressão de BDNF no hipocampo e córtex e, em animais expostos no período perinatal, houve diminuição da expressão desse gene apenas no hipocampo e não houve alteração em

animais expostos aos 21 DPN. Com base nesses achados, sugerimos que a exposição pré e pós-natal provocou diminuição persistente da expressão de BDNF enquanto que animais do grupo ANF-AF recuperaram os níveis de mRNA do gene e o grupo AF-ANF, que foi exposto em momento tardio do desenvolvimento, não apresentou interferência do meio na expressão do gene.

Estudos também demonstram que a expressão do gene BDNF relaciona-se a consolidação de memória dependente do hipocampo (Patterson, 2015), além de estar associado ao perfil inflamatório e ao comportamento tipo-depressivo (Xiao *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018). Entretanto, apesar da diminuição da expressão de BDNF, não verificamos comprometimento das funções cognitivas avaliadas.

A expressão de tirosina hidroxilase (TH), marcador de neurônios dopaminérgicos, e de glutamato descarboxilase (GAD65 e 67), que é uma enzima envolvida na síntese do principal neurotransmissor inibitório - GABA, foi similar entre os grupos estudados. De maneira semelhante, Cui *et al.*, (2019) não observaram diferença de células marcadas com TH na substância nigra de animais expostos durante a gestação ao MP_{2.5} (0,4 mg/m³), mas os autores observaram diferença nos níveis de dopamina e na expressão do receptor de dopamina DRD4. Por outro lado, animais expostos durante 4 semanas a 100 µg/m³ de DEP apresentaram diminuição de neurônios GABAérgicos (PV+) no córtex temporal, porém os níveis de PV se normalizaram após 8 semanas de exposição (Kim *et al.*, 2018). Assim, como não observamos diferença na expressão das enzimas após o período de exposição acreditamos que, se houve alteração da expressão dessas enzimas, possivelmente os níveis se restabeleceram após exposição durante período de 90 dias.

Ao analisarmos o volume do cérebro, observamos uma tendência de aumento do volume cerebral total nos animais expostos ao MP_{2.5} após o desmame. Contudo, ao analisarmos o volume das estruturas cerebrais, observamos que animais expostos ao MP_{2.5} no período gestacional apresentaram diminuição de volume do corpo caloso.

O corpo caloso é constituído por milhares de fibras que realizam a comunicação entre os hemisférios cerebrais e o principal agrupamento de substância branca do cérebro (Aboitiz e Montiel, 2003). O corpo caloso não é

uma estrutura homogênea, mas é importante para a cognição. A distribuição desigual dos tipos de fibras ao longo do corpo caloso sugere importantes diferenças funcionais na comunicação inter-hemisférica entre diferentes tipos de áreas corticais (Hinkley *et al.*, 2012). Estudos demonstram que fraca integridade do corpo caloso contribui para declínio na função cognitiva em adultos (Zahr *et al.*, 2009; Voineskos *et al.*, 2012). Há estudos que demonstram que alterações podem estar correlacionadas com déficits cognitivos e comportamentais como autismo (Barnea-Goraly *et al.*, 2004; Hardan *et al.*, 2009).

Corroborando nossos achados, Allen e colaboradores observaram redução do corpo caloso no 14º dia pós-natal de machos e fêmeas expostos às partículas ultrafinas ambientais concentradas ($96 \mu\text{g}/\text{m}^3$) no período pós-natal (4-7 e 10-13 dias pós-natal). Porém, os autores verificaram que essa diferença não persistiu com o crescimento dos animais (Allen, Oberdorster, *et al.*, 2017). O mesmo grupo de pesquisa verificou aumento de área nos ventrículos após exposição a partículas ultrafinas no período pós-natal (Allen, J. L., Liu, X., Pelkowski, S., *et al.*, 2014; Allen, Oberdorster, *et al.*, 2017) e também observaram aumento da área ventricular e do corpo caloso e redução do hipocampo na prole de animais expostos a partículas finas e ultrafinas ($96 \mu\text{g}/\text{m}^3$) durante a gestação (0,5 – 16,5 DG) (Klocke *et al.*, 2017).

Vale ressaltar que a diferença de tempo, idade e concentração de poluentes em que os animais foram expostos, assim como a análise de área versus volume realizada em nosso estudo pode justificar a diferença de resultados entre os estudos.

Em relação à espessura das camadas corticais, observamos alterações nas camadas III e V, mas não houve diferença na espessura total do córtex cerebral entre os grupos. Ainda, apesar dessas alterações nas camadas corticais, não observamos alteração no número de neurônios entre os grupos. Sugerimos que isso pode ter garantido a manutenção das funções cognitivas e funcionais.

A inflamação é um dos mecanismos pelo qual a exposição à poluição causa danos no SNC e está relacionada a várias desordens cognitivas como

autismo, esquizofrenia e doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (Morgan *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Hirsch *et al.*, 2012).

Estudos experimentais têm demonstrado alteração de citocinas pró-inflamatórias e ativação de células da glia relacionado à exposição aos poluentes atmosféricos (Block e Calderón-Garcidueñas, 2009; Kraft e Harry, 2011; Zhang, F. *et al.*, 2016; Jayaraj *et al.*, 2017). Micróglia são células do sistema imune que atuam como fagócitos mononucleares residentes no cérebro respondendo rapidamente as alterações do meio e, assim, são essenciais para a homeostasia cerebral (Kraft e Harry, 2011; Patterson, 2015).

Em nosso estudo, verificamos aumento de micróglias ativas no córtex dos animais do grupo ANF-ANF comparado aos grupos AF-ANF e ANF-AF. Porém, não observamos diferença de micróglia no hipocampo e no corpo caloso. Semelhante aos nossos resultados, Klocke *et al.*, (2017) também não observaram diferença de micróglia no hipocampo em animais expostos a partículas ambientais. Por outro lado, Allen, Oberdorster, *et al.*, (2017) mostraram que a exposição às partículas ambientais em período pós-natal, de 4–7 e 10–13 dias, causou aumento de micróglia nas na comissura anterior, hipocampo e corpo caloso de maneira diferenciada de acordo com a idade dos animais (Allen, Oberdorster, *et al.*, 2017).

No presente estudo, a análise de GFAP demonstra aumento de astrócitos no córtex, corpo caloso e regiões CA1 e giro denteado do hipocampo dos animais do grupo ANF-ANF. Sabe-se que os astrócitos participam da formação e manutenção da barreira hematoencefálica, sendo a primeira linha de defesa do SNC (Abbott, 2002; Dossi *et al.*, 2018). Assim, sugerimos que a exposição ao MP_{2.5} em ambos os períodos induziu a ativação de astrócitos promovendo uma resposta pró-inflamatória.

Ainda, tendo em vista que a exposição à poluição iniciou-se no desenvolvimento, o aumento de astrócitos nesse grupo em comparação aos demais poderia ser devido à ativação de mecanismos de defesa ainda no período intrauterino. Outros estudos demonstram ativação de astrócitos induzida pela exposição aos elementos da poluição atmosférica durante a gestação persistente em período tardio de vida (Kulas *et al.*, 2018; Umezawa *et al.*, 2018).

Além de que a expressão de GFAP parece estar relacionada à dose de exposição (Onoda *et al.*, 2017; Umezawa *et al.*, 2018) é importante ressaltar que nosso modelo de estudo diferencia-se pela metodologia de exposição à poluição adotada, na qual há troca de ambientes após período intrauterino. Nesse sentido, há um número escasso de trabalhos que se aproximam com a metodologia utilizada e, com isso, se torna limitada a comparação dos resultados entre estudos.

Allen *et al.*, (2014) expuseram animais a partículas ultrafinas ambientais em período perinatal e em idade adulta, alterando o ambiente de exposição. Entre os resultados, os autores observaram aumento de micróglia nos machos que foram expostos às partículas em algum período da vida e, por outro lado, não observaram alteração de GFAP. Já Kulas *et al.*, (2018), apesar de terem expostos os animais apenas no período gestacional ao MP_{2.5} (46,70 µg/m³), não observaram diferença em relação a micróglia ativas, mas verificaram aumento de astrócitos no córtex temporal dos animais com 3 meses de idade.

É importante considerar a potencial contribuição das várias substâncias presentes na poluição atmosférica da cidade de São Paulo sobre os efeitos observados. Em nosso estudo, apesar de não avaliarmos a concentração de metais nas estruturas encefálicas estudadas, observamos consideráveis quantidades de metais e HPAs presentes na atmosfera. Sabe-se que metais podem causar efeitos adversos mesmo quando em baixas concentrações (Ljubimova *et al.*, 2018).

Geralmente, estudos presentes na literatura tem avaliado a exposição a um único elemento; entretanto, na exposição à poluição atmosférica há vários elementos que, por sua vez, podem induzir um dano sinérgico no organismo (Karri *et al.*, 2016; Ljubimova *et al.*, 2018). Isso torna ainda mais difícil a compreensão e avaliação dos efeitos nocivos à saúde ocasionados por cada elemento bem como a associação dos mesmos.

Efeitos deletérios relacionados à exposição de elementos químicos ambientais também estão associados a prejuízos de desenvolvimento e baixo peso ao nascer, sendo esse efeito mais evidente quando há exposição a uma mistura de elementos (Govarts *et al.*, 2016), como é o caso da poluição

atmosférica. Ainda, há evidência de efeitos nocivos a prole decorrente da exposição gestacional a elementos como o Pb, Cd e Hg (Rahman *et al.*, 2016).

Metais pesados não são essenciais à vida, assim, qualquer concentração no organismo pode causar efeito nocivo. A distribuição dos metais na circulação sanguínea e no cordão umbilical diferencia-se de acordo com o metal. Alguns metais atravessam a barreira placentária e podem causar danos diretos ao feto (Arbuckle *et al.*, 2016; Li, A. *et al.*, 2019). Roberts *et al.*, (2013) reportaram que a exposição pré-natal a metais como chumbo, manganês, mercúrio, cloreto de metileno juntamente com partículas de diesel estão associadas ao autismo.

Além disso, pesquisadores têm investigado os efeitos decorrentes da exposição gestacional ao HPAs e relatado déficit de atenção (Perera *et al.*, 2014; Perera *et al.*, 2018), problemas cognitivos (Perera *et al.*, 2012; Jedrychowski *et al.*, 2015). Ainda, a exposição ao benzopireno no período gestacional causa baixo peso ao nascer e redução da circunferência do crânio (Perera *et al.*, 2003).

Em estudos experimentais a exposição ao benzopireno afetou o aprendizado e a memória além de modular os níveis de vários neurotransmissores (Xia *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Zhang, W. *et al.*, 2016), causou déficits tardios de atividade neural cortical (Mccallister *et al.*, 2008) e hiperatividade motora (Krumar das, 2016). Peterson *et al.*, (2015) observaram redução de superfície da substância branca no hemisfério esquerdo de crianças expostas durante a gestação até 7 a 9 anos.

Dessa forma, a presença de tais componentes pode ter influenciado os resultados reportados nesse estudo. Os efeitos deletérios observados após exposição à poluição ambiental podem ter origem muito anterior ao aparecimento dos efeitos, como em processos de formação que ocorrem no período intrauterino. É importante ressaltar que a diferença da concentração e componentes da poluição podem explicar, em parte, os resultados obtidos em nosso estudo. Não obstante, diferenças de raça de animais, tempo de exposição, tipo e concentração de poluentes e período de exposição devem ser levadas em consideração na interpretação dos resultados entre estudos.

Ao analisarmos a toxicidade *in vitro* do MP_{2.5} presente na cidade de São Paulo verificamos que o mesmo praticamente não induziu alterações na viabilidade celular nas células da linhagem C6 de ratos após 24 e 72 horas de tratamento. Com exceção, observamos redução de viabilidade das células tratadas com 100 µg/mL sem a fração S9.

A exposição durante 24 horas a 2 µg/mL e 20 µg/mL a partículas ultrafinas (0,18 µm) coletadas na cidade de Los Angeles, USA em células de neurônios, astrócitos e micróglia não causou alteração de viabilidade celular (Campbell *et al.*, 2014). De maneira semelhante, De Oliveira Alves *et al.*, (2017) demonstraram que a exposição à fração orgânica de MP₁₀ da queima da biomassa da região da Amazônia não alterou a viabilidade celular após 24 horas de tratamento nas concentrações de 200 e 400 µg/mL em células epiteliais pulmonares. No entanto, os autores observaram efeito citotóxico após 72h de tratamento quando as células foram expostas a 400 µg/mL. Em nosso estudo, não investigamos os efeitos causados pela exposição a elevadas doses em células C6, pois, devido às características fisiológicas do cérebro, o mesmo não é exposto a elevadas concentrações.

Apesar de não observarmos alteração na viabilidade celular, ressaltamos que outros processos podem ser desencadeados pela exposição aos poluentes e induzir dano às células (Palacio *et al.*, 2016; De Oliveira Alves *et al.*, 2017; Peixoto *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019). Assim, a investigação de possíveis mecanismos de ação se faz necessário para a compreensão de potenciais danos às células e para posterior associação com nossos achados *in vivo*.

Em suma, com base nos resultados apresentados neste estudo, verificamos que a exposição ao MP_{2.5} da cidade de São Paulo induz alterações no SNC de camundongos. A exposição aos poluentes no período pós-natal causa efeitos mais proeminentes, sendo que, entre os achados, induziu aumento da atividade locomotora e do comportamento exploratório de objetos. Em animais expostos no período gestacional e pós-natal houve aumento de micróglia ativa e astrócitos no córtex cerebral e de astrócitos no corpo caloso e nas áreas CA1 e giro denteado do hipocampo, além de diminuição da expressão de BDNF. Todavia, é importante ressaltar que a exposição no

período gestacional também induziu efeito ansiolítico e comprometimento da memória que poderia ser justificado pela diminuição volume do corpo caloso.

Por fim, apesar de parecer haver resposta adaptativa no organismo perante a constante exposição ao xenobiótico, a exposição à poluição da cidade de São Paulo é capaz de induzir distúrbios e comprometer funções cerebrais que são prejudiciais aos seus habitantes. Ainda vale a pena ressaltar a importância de permanente conscientização e engajamento pessoal, assim como adoção e monitoramento de políticas públicas com o intuito de garantir a redução de emissão dos poluentes à atmosfera.

---

7. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo mostram que a exposição ao MP_{2.5} da cidade de São Paulo durante o período pré e pós-natal em camundongos resulta em diferentes efeitos sobre os parâmetros analisados:

- Aos 30 dias de idade não verificamos diferença no campo aberto e no reconhecimento de objetos, mas houve aumento de tempo e frequência da posição levantar no labirinto cruz elevado nos grupos AF-ANF e ANF-ANF;
- Aos 90 dias de idade houve maior locomoção e frequência entre centro-periferia, assim como maior tempo de exploração dos objetos nos grupos AF-ANF e ANF-ANF. Além disso, observamos comportamento tipo ansiolítico e prejuízo de memória no grupo ANF-AF;
- Não houve alteração no volume total do cérebro;
- Houve diminuição de volume do corpo caloso dos animais do grupo ANF-AF;
- Não houve diferença no número de neurônios do córtex cerebral;
- Não houve diferença na espessura total do córtex, mas observamos diferença compensatória nas camadas III e V;
- Houve aumento de micróglia ativas no córtex e de astrócitos no córtex, corpo caloso e região CA1 e giro denteado do hipocampo no grupo ANF-ANF;
- Não houve alteração da expressão de neurônios dopaminérgicos no estriado e de neurônios gabaérgicos no córtex;
- Não houve alteração da expressão gênica de receptores de serotonina (5-HT_{1A}) e GABA (GABA-A-R α 2) e de estresse oxidativo (HO-1) no córtex cerebral e hipocampo, mas houve diminuição de BDNF no hipocampo do grupo ANF-ANF;
- Houve citotoxicidade celular induzida em células de glioma de rato (C6) expostas a 100 μ g/mL de MP_{2.5} durante 24h.

8. REFERÊNCIAS

ABBOTT, N. J. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. **J Anat**, v. 200, n. 6, p. 629-38, Jun 2002. ISSN 0021-8782. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12162730> >.

ABE, K. C.; MIRAGLIA, S. G. Health Impact Assessment of Air Pollution in São Paulo, Brazil. **Int J Environ Res Public Health**, v. 13, n. 7, Jul 2016. ISSN 1660-4601. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27409629> >.

ABOITIZ, F.; MONTIEL, J. One hundred million years of interhemispheric communication: the history of the corpus callosum. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 4, p. 409-20, Apr 2003. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12700818> >.

ALLEN, J. L. et al. Cognitive Effects of Air Pollution Exposures and Potential Mechanistic Underpinnings. **Curr Environ Health Rep**, v. 4, n. 2, p. 180-191, 06 2017. ISSN 2196-5412. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28435996> >.

_____. Early postnatal exposure to ultrafine particulate matter air pollution: persistent ventriculomegaly, neurochemical disruption, and glial activation preferentially in male mice. **Environ Health Perspect**, v. 122, n. 9, p. 939-45, Sep 2014. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24901756> >.

_____. Developmental Exposure to Concentrated Ambient Ultrafine Particulate Matter Air Pollution in Mice Results in Persistent and Sex-Dependent Behavioral Neurotoxicity and Glial Activation. **Toxicological Sciences**, v. 140, n. 1, p. 160-178, Jul 2014. ISSN 1096-6080. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000339722100015 >.

_____. Developmental exposure to concentrated ambient ultrafine particulate matter air pollution in mice results in persistent and sex-dependent behavioral neurotoxicity and glial activation. **Toxicol Sci**, v. 140, n. 1, p. 160-78, Jul 2014. ISSN 1096-0929. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24690596> >.

_____. Developmental neurotoxicity of inhaled ambient ultrafine particle air pollution: Parallels with neuropathological and behavioral features of autism and other neurodevelopmental disorders. **Neurotoxicology**, v. 59, p. 140-154, Mar 2017. ISSN 1872-9711. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26721665> >.

ANDERSEN, Z. J. et al. Long-term exposure to ambient air pollution and incidence of brain tumor: the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). **Neuro Oncol**, v. 20, n. 3, p. 420-432, 02 2018. ISSN 1523-5866. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29016987> >.

ANNAVARAPU, R. N.; KATHI, S. Cognitive disorders in children associated with urban vehicular emissions. **Environ Pollut**, v. 208, n. Pt A, p. 74-8, Jan 2016. ISSN 1873-6424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26476694> >.

ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cogn Process**, v. 13, n. 2, p. 93-110, May 2012. ISSN 1612-4790. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22160349> >.

ARANA, A. et al. **Optimized energy dispersive X-ray fluorescence analysis of atmospheric aerosols collected at pristine and perturbed Amazon Basin sites** X-Ray Spectrometry 2014.

ARBUCKLE, T. E. et al. Maternal and fetal exposure to cadmium, lead, manganese and mercury: The MIREC study. **Chemosphere**, v. 163, p. 270-282, Nov 2016. ISSN 1879-1298. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27540762> >.

ATTADEMO, L. et al. Environmental pollution and risk of psychotic disorders: A review of the science to date. **Schizophr Res**, v. 181, p. 55-59, Mar 2017. ISSN 1573-2509. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27720315> >.

BABADJOUNI, R. et al. Nanoparticulate matter exposure results in neuroinflammatory changes in the corpus callosum. **PLoS One**, v. 13, n. 11, p. e0206934, 2018. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30395590> >.

BARDAWEEL, S. K. et al. Reactive Oxygen Species: the Dual Role in Physiological and Pathological Conditions of the Human Body. **Eurasian J Med**, v. 50, n. 3, p. 193-201, Oct 2018. ISSN 1308-8734. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30515042> >.

BARKER, D. J. The developmental origins of adult disease. **J Am Coll Nutr**, v. 23, n. 6 Suppl, p. 588S-595S, Dec 2004. ISSN 0731-5724. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15640511> >.

BARKOVICH, A. J. et al. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. **Brain**, v. 135, n. Pt 5, p. 1348-69, May 2012. ISSN 1460-2156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22427329> >.

BARNEA-GORALY, N. et al. White matter structure in autism: preliminary evidence from diffusion tensor imaging. **Biol Psychiatry**, v. 55, n. 3, p. 323-6, Feb 2004. ISSN 0006-3223. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744477> >.

BARRETT, J. R. Prenatal Air Pollution and Reduced Birth Weight: Decline in Placental Mitochondria as a Potential Mechanism. **Environ Health Perspect**, v. 124, n. 5, p. A98, 05 2016. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27135399> >.

BARTOLETTI, A. et al. Heterozygous knock-out mice for brain-derived neurotrophic factor show a pathway-specific impairment of long-term potentiation but normal critical period for monocular deprivation. **J Neurosci**, v. 22, n. 23, p. 10072-7, Dec 2002. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12451106> >.

BASAGAÑA, X. et al. Neurodevelopmental Deceleration by Urban Fine Particles from Different Emission Sources: A Longitudinal Observational Study. **Environ Health Perspect**, v. 124, n. 10, p. 1630-1636, Oct 2016. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27128166> >.

BAYER, S. A. et al. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. **Neurotoxicology**, v. 14, n. 1, p. 83-144, 1993. ISSN 0161-813X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8361683> >.

BECERRA, T. A. et al. Ambient air pollution and autism in Los Angeles county, California. **Environ Health Perspect**, v. 121, n. 3, p. 380-6, Mar 2013. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23249813> >.

BIBANCOS, T. et al. Social isolation and expression of serotonergic neurotransmission-related genes in several brain areas of male mice. **Genes Brain Behav**, v. 6, n. 6, p. 529-39, Aug 2007. ISSN 1601-1848. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17083332> >.

BLOCK, M. L.; CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, L. Air pollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 9, p. 506-16, Sep 2009. ISSN 1878-108X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19716187> >.

BLOCK, M. L. et al. The outdoor air pollution and brain health workshop. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 5, p. 972-84, Oct 2012. ISSN 1872-9711. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22981845> >.

BOS, I. et al. Changed gene expression in brains of mice exposed to traffic in a highway tunnel. **Inhal Toxicol**, v. 24, n. 10, p. 676-86, Aug 2012. ISSN 1091-7691. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22906174> >.

_____. Negative effects of ultrafine particle exposure during forced exercise on the expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the hippocampus of rats. **Neuroscience**, v. 223, p. 131-9, Oct 2012. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22867973> >.

BRITO, J. et al. Disentangling vehicular emission impact on urban air pollution using ethanol as a tracer. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 10679, Jul 2018. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30013098> >.

BRITO, J. M. et al. Acute cardiopulmonary effects induced by the inhalation of concentrated ambient particles during seasonal variation in the city of São Paulo. **J Appl Physiol** (1985), v. 117, n. 5, p. 492-9, Sep 2014. ISSN 1522-1601. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25012028> >.

BROCKMEYER, S.; D'ANGIULLI, A. How air pollution alters brain development: the role of neuroinflammation. **Transl Neurosci**, v. 7, n. 1, p. 24-30, 2016. ISSN 2081-3856. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28123818> >.

BROOK, R. D. et al. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, v. 121, n. 21, p. 2331-78, Jun 2010. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20458016> >.

BRUNEKREEF, B.; HOLGATE, S. T. Air pollution and health. **Lancet**, v. 360, n. 9341, p. 1233-42, Oct 2002. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12401268> >.

BUTT, A. M.; FERN, R. F.; MATUTE, C. Neurotransmitter signaling in white matter. **Glia**, v. 62, n. 11, p. 1762-79, Nov 2014. ISSN 1098-1136. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24753049> >.

CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, L. et al. Air pollution and brain damage. **Toxicol Pathol**, v. 30, n. 3, p. 373-89, 2002 May-Jun 2002. ISSN 0192-6233. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12051555> >.

_____. Exposure to severe urban air pollution influences cognitive outcomes, brain volume and systemic inflammation in clinically healthy children. **Brain Cogn**, v. 77, n. 3, p. 345-55, Dec 2011. ISSN 1090-2147. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22032805> >.

_____. White matter hyperintensities, systemic inflammation, brain growth, and cognitive functions in children exposed to air pollution. **J Alzheimers Dis**, v. 31, n. 1, p. 183-91, 2012. ISSN 1875-8908. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22531421> >.

_____. Brain inflammation and Alzheimer's-like pathology in individuals exposed to severe air pollution. **Toxicol Pathol**, v. 32, n. 6, p. 650-8, 2004 Nov-

Dec 2004. ISSN 0192-6233. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15513908> >.

_____. Long-term air pollution exposure is associated with neuroinflammation, an altered innate immune response, disruption of the blood-brain barrier, ultrafine particulate deposition, and accumulation of amyloid beta-42 and alpha-synuclein in children and young adults. **Toxicol Pathol**, v. 36, n. 2, p. 289-310, Feb 2008. ISSN 1533-1601. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18349428> >.

CALKINS, K.; DEVASKAR, S. U. Fetal origins of adult disease. **Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care**, v. 41, n. 6, p. 158-76, Jul 2011. ISSN 1538-3199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684471> >.

CAMPBELL, A. et al. Human brain derived cells respond in a type-specific manner after exposure to urban particulate matter (PM). **Toxicol In Vitro**, v. 28, n. 7, p. 1290-5, Oct 2014. ISSN 1879-3177. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24999231> >.

_____. Particulate matter in polluted air may increase biomarkers of inflammation in mouse brain. **Neurotoxicology**, v. 26, n. 1, p. 133-40, Jan 2005. ISSN 0161-813X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15527881> >.

CETESB. **Qualidade do ar no estado de São Paulo 2016** São Paulo: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, Secretária do Meio Ambiente 2017.

CHANG, Y. C.; COLE, T. B.; COSTA, L. G. Prenatal and early-life diesel exhaust exposure causes autism-like behavioral changes in mice. **Part Fibre Toxicol**, v. 15, n. 1, p. 18, 04 2018. ISSN 1743-8977. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29678176> >.

CHEN, C. et al. Early postnatal benzo(a)pyrene exposure in Sprague-Dawley rats causes persistent neurobehavioral impairments that emerge postnatally and continue into adolescence and adulthood. **Toxicol Sci**, v. 125, n. 1, p. 248-61, Jan 2012. ISSN 1096-0929. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21984485> >.

CHEN, J. C.; SCHWARTZ, J. Neurobehavioral effects of ambient air pollution on cognitive performance in US adults. **Neurotoxicology**, v. 30, n. 2, p. 231-9, Mar 2009. ISSN 1872-9711. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19150462> >.

CHEN, J. C. et al. Ambient air pollution and neurotoxicity on brain structure: Evidence from women's health initiative memory study. **Ann Neurol**, v. 78, n. 3, p. 466-76, Sep 2015. ISSN 1531-8249. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26075655> >.

CHIBOWSKA, K. et al. Effect of Lead (Pb) on Inflammatory Processes in the Brain. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 12, Dec 2016. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27999370> >.

CHIRUMBOLO, S.; BJØRKLUND, G.; URBINA, M. A. May traffic air pollution be involved in autism spectrum disorder? **Environ Res**, v. 154, p. 57-59, Apr 2017. ISSN 1096-0953. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28038434> >.

CHIU, Y. H. et al. Associations between traffic-related black carbon exposure and attention in a prospective birth cohort of urban children. **Environ Health Perspect**, v. 121, n. 7, p. 859-64, Jul 2013. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23665743> >.

CHURCH, J. S. et al. Perinatal exposure to concentrated ambient particulates results in autism-like behavioral deficits in adult mice. **Neurotoxicology**, v. 65, p. 231-240, 03 2018. ISSN 1872-9711. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29104007> >.

CLARKSON, T. W. Metal toxicity in the central nervous system. **Environ Health Perspect**, v. 75, p. 59-64, Nov 1987. ISSN 0091-6765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3319566> >.

CONAMA. **Resolução nº 491, de Novembro de 2018**. AMBIENTE., M. D. M. A. C. N. D. M.: Diário Oficial da União 155 p. 2018.

COSTA, L. G.; CHANG, Y. C.; COLE, T. B. Developmental Neurotoxicity of Traffic-Related Air Pollution: Focus on Autism. **Curr Environ Health Rep**, v. 4, n. 2, p. 156-165, 06 2017. ISSN 2196-5412. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28417440> >.

CUI, J. et al. Metabolomics analysis explores the rescue to neurobehavioral disorder induced by maternal PM. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 169, p. 687-695, Mar 2019. ISSN 1090-2414. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30500738> >.

DADVAND, P. et al. The Association between Lifelong Greenspace Exposure and 3-Dimensional Brain Magnetic Resonance Imaging in Barcelona Schoolchildren. **Environ Health Perspect**, v. 126, n. 2, p. 027012, 02 2018. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29504939> >.

DE OLIVEIRA ALVES, N. et al. Biomass burning in the Amazon region causes DNA damage and cell death in human lung cells. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 10937, 09 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28883446> >.

DELLINGER, B. et al. Role of free radicals in the toxicity of airborne fine particulate matter. **Chem Res Toxicol**, v. 14, n. 10, p. 1371-7, Oct 2001. ISSN

0893-228X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11599928> >.

DETRAN. Frota de Veículos em SP - por tipo de veículo. 2019. Disponível em: < <https://www.detran.sp.gov.br/wps/wcm/connect/portaldetran/detran/detran/estatisticastransito/sa-frotaveiculos/d28760f7-8f21-429f-b039-0547c8c46ed1> >. Acesso em: 08, Março.

DEVERMAN, B. E.; PATTERSON, P. H. Cytokines and CNS development. **Neuron**, v. 64, n. 1, p. 61-78, Oct 2009. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19840550> >.

DOCKERY, D. W.; POPE, C. A. Acute respiratory effects of particulate air pollution. **Annu Rev Public Health**, v. 15, p. 107-32, 1994. ISSN 0163-7525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8054077> >.

DOCKERY, D. W. et al. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. **N Engl J Med**, v. 329, n. 24, p. 1753-9, Dec 1993. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8179653> >.

DOMINICI, F. et al. Fine particulate air pollution and hospital admission for cardiovascular and respiratory diseases. **JAMA**, v. 295, n. 10, p. 1127-34, Mar 2006. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16522832> >.

DONALDSON, K. et al. Ultrafine particles. **Occup Environ Med**, v. 58, n. 3, p. 211-6, 199, Mar 2001. ISSN 1351-0711. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171936> >.

DOSSI, E.; VASILE, F.; ROUACH, N. Human astrocytes in the diseased brain. **Brain Res Bull**, v. 136, p. 139-156, 01 2018. ISSN 1873-2747. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28212850> >.

DREHER, K. L. Particulate Matter Physicochemistry and Toxicology: In Search of Causality-A Critical Perspective. **Inhal Toxicol**, v. 12 Suppl 3, p. 45-57, Jan 2000. ISSN 0895-8378. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26368600> >.

EDWARDS, S. C. et al. Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and children's intelligence at 5 years of age in a prospective cohort study in Poland. **Environ Health Perspect**, v. 118, n. 9, p. 1326-31, Sep 2010. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20406721> >.

EHSANIFAR, M. et al. Exposure to nanoscale diesel exhaust particles: Oxidative stress, neuroinflammation, anxiety and depression on adult male mice. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 168, p. 338-347, Jan 2019. ISSN 1090-2414. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30391838> >.

ELDER, A. et al. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. **Environ Health Perspect**, v. 114, n. 8, p. 1172-8, Aug 2006. ISSN 0091-6765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16882521> >.

EPA. Priority Pollutant List. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf>, 2014. Acesso em: 28, April.

EZE, I. C. et al. Long-Term Exposure to Ambient Air Pollution and Metabolic Syndrome in Adults. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0130337, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26103580> >.

FAJERSZTAJN, L. et al. Short-term effects of fine particulate matter pollution on daily health events in Latin America: a systematic review and meta-analysis. **Int J Public Health**, Mar 2017. ISSN 1661-8564. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28255648> >.

FALCON-RODRIGUEZ, C. I. et al. Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases. **Front Immunol**, v. 7, p. 3, 2016. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26834745> >.

FERREIRA, T. M. et al. Effects of Particulate Matter and Its Chemical Constituents on Elderly Hospital Admissions Due to Circulatory and Respiratory Diseases. **Int J Environ Res Public Health**, v. 13, n. 10, Sep 2016. ISSN 1660-4601. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27669280> >.

FLORES-PAJOT, M.-C. et al. **Childhood autism spectrum disorders and exposure to nitrogen dioxide, and particulate matter air pollution: A review and meta-analysis** Environmental Research. 151: 763-776 p. 2016.

FONKEN, L. K. et al. Air pollution impairs cognition, provokes depressive-like behaviors and alters hippocampal cytokine expression and morphology. **Molecular Psychiatry**, v. 16, n. 10, p. 987-995, Oct 2011. ISSN 1359-4184.

GATTO, N. M. et al. **Components of Air Pollution and Cognitive Function in Middle-aged and Older Adults in Los Angeles** Neurotoxicology: 1-7 p. 2014.

GENC, S. et al. The adverse effects of air pollution on the nervous system. **J Toxicol**, v. 2012, p. 782462, 2012. ISSN 1687-8205. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22523490> >.

GHIO, A. J.; CARRAWAY, M. S.; MADDEN, M. C. Composition of air pollution particles and oxidative stress in cells, tissues, and living systems. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**, v. 15, n. 1, p. 1-21, 2012. ISSN 1521-6950. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22202227> >.

GOGNA, P. et al. Estimates of the current and future burden of lung cancer attributable to PM. **Prev Med**, v. 122, p. 91-99, May 2019. ISSN 1096-0260. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31078178> >.

GONG, T. et al. Exposure to air pollution from traffic and neurodevelopmental disorders in Swedish twins. **Twin Res Hum Genet**, v. 17, n. 6, p. 553-62, Dec 2014. ISSN 1832-4274. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25229653> >.

_____. Perinatal Exposure to Traffic-Related Air Pollution and Autism Spectrum Disorders. **Environ Health Perspect**, v. 125, n. 1, p. 119-126, Jan 2017. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27494442> >.

GOUVEIA, N. et al. Air pollution and hospitalizations in the largest Brazilian metropolis. **Rev Saude Publica**, v. 51, p. 117, Dec 2017. ISSN 1518-8787. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29211200> >.

GOVARTS, E. et al. Combined Effects of Prenatal Exposures to Environmental Chemicals on Birth Weight. **Int J Environ Res Public Health**, v. 13, n. 5, 05 2016. ISSN 1660-4601. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27187434> >.

GRANDJEAN, P.; LANDRIGAN, P. J. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. **Lancet Neurol**, v. 13, n. 3, p. 330-8, Mar 2014. ISSN 1474-4465. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24556010> >.

GROSS, C. et al. Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. **Nature**, v. 416, n. 6879, p. 396-400, Mar 2002. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11919622> >.

GROVA, N. et al. Epigenetic and Neurological Impairments Associated with Early Life Exposure to Persistent Organic Pollutants. **Int J Genomics**, v. 2019, p. 2085496, 2019. ISSN 2314-436X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30733955> >.

GUERRA, R. et al. Exposure to inhaled particulate matter activates early markers of oxidative stress, inflammation and unfolded protein response in rat striatum. **Toxicol Lett**, v. 222, n. 2, p. 146-54, Oct 2013. ISSN 1879-3169. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23892126> >.

GUNDERSEN, H. J. et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**, v. 96, n. 10, p. 857-81, Oct 1988. ISSN 0903-4641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3056461> >.

GUNDERSEN, H. J.; JENSEN, E. B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. **J Microsc**, v. 147, n. Pt 3, p. 229-63, Sep 1987. ISSN 0022-2720. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3430576> >.

GUXENS, M. et al. Air pollution during pregnancy and childhood cognitive and psychomotor development: six European birth cohorts. **Epidemiology**, v. 25, n. 5, p. 636-47, Sep 2014. ISSN 1531-5487. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25036432> >.

_____. Air Pollution Exposure during Pregnancy and Childhood Autistic Traits in Four European Population-Based Cohort Studies: The ESCAPE Project. **Environ Health Perspect**, v. 124, n. 1, p. 133-40, Jan 2016. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26068947> >.

_____. Air Pollution Exposure During Fetal Life, Brain Morphology, and Cognitive Function in School-Age Children. **Biol Psychiatry**, v. 84, n. 4, p. 295-303, Aug 2018. ISSN 1873-2402. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29530279> >.

GŁADKA, A.; RYMASZEWSKA, J.; ZATOŃSKI, T. Impact of air pollution on depression and suicide. **Int J Occup Med Environ Health**, v. 31, n. 6, p. 711-721, Dec 2018. ISSN 1896-494X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30281038> >.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. The antioxidants of human extracellular fluids. **Arch Biochem Biophys**, v. 280, n. 1, p. 1-8, Jul 1990. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2191627> >.

HARDAN, A. Y. et al. Corpus callosum volume in children with autism. **Psychiatry Res**, v. 174, n. 1, p. 57-61, Oct 2009. ISSN 0165-1781. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19781917> >.

HARRIS, M. H. et al. Prenatal and childhood traffic-related air pollution exposure and childhood executive function and behavior. **Neurotoxicol Teratol**, v. 57, p. 60-70, 2016 Sep - Oct 2016. ISSN 1872-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27350569> >.

_____. Prenatal and Childhood Traffic-Related Pollution Exposure and Childhood Cognition in the Project Viva Cohort (Massachusetts, USA). **Environ Health Perspect**, v. 123, n. 10, p. 1072-8, Oct 2015. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25839914> >.

HEI. **Understanding the health effects of components of the particulate matter mix: progress and next steps.** HEI Perspectives. Boston, USA: Health Effects Institute 2002.

HEIDARI NEJAD, S. et al. The effect of diesel exhaust exposure on blood-brain barrier integrity and function in a murine model. **J Appl Toxicol**, v. 35, n. 1, p.

41-7, Jan 2015. ISSN 1099-1263. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24477878> >.

HENG, J. I.; MOONEN, G.; NGUYEN, L. Neurotransmitters regulate cell migration in the telencephalon. **Eur J Neurosci**, v. 26, n. 3, p. 537-46, Aug 2007. ISSN 0953-816X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17686035> >.

HEUSINKVELD, H. J. et al. Neurodegenerative and neurological disorders by small inhaled particles. **Neurotoxicology**, v. 56, p. 94-106, Sep 2016. ISSN 1872-9711. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27448464> >.

HINKLEY, L. B. et al. The role of corpus callosum development in functional connectivity and cognitive processing. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e39804, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22870191> >.

HIRSCH, E. C.; VYAS, S.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 18 Suppl 1, p. S210-2, Jan 2012. ISSN 1873-5126. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22166438> >.

HOUGAARD, K. S. et al. A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles. **Reprod Toxicol**, v. 56, p. 118-40, Aug 2015. ISSN 1873-1708. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26050605> >.

_____. Effects of prenatal exposure to diesel exhaust particles on postnatal development, behavior, genotoxicity and inflammation in mice. **Part Fibre Toxicol**, v. 5, p. 3, Mar 2008. ISSN 1743-8977. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18331653> >.

IARC. **Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures.** <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono92.pdf>. Lyon, France. 2010

_____. **The carcinogenicity of outdoor air pollution.** Lyon, France: International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group 2013.

IBGE. População. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2019. Disponível em: < <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/sao-paulo/panorama> >. Acesso em: 08, Maio.

IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J. L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behav Pharmacol**, v. 11, n. 7-8, p. 517-34, Nov 2000. ISSN 0955-8810. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11198125> >.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem**, v. 68, n. 3, p. 285-316, Nov 1997. ISSN 1074-7427. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9398590> >.

IZQUIERDO, I. A. et al. **Memória: tipos e mecanismos – achados recentes** Revista USP. 98: 9-16 p. 2013.

JACOBS, E. T.; BURGESS, J. L.; ABBOTT, M. B. The Donora Smog Revisited: 70 Years After the Event That Inspired the Clean Air Act. **Am J Public Health**, v. 108, n. S2, p. S85-S88, Apr 2018. ISSN 1541-0048. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29698099> >.

JAYARAJ, R. L. et al. Outdoor Ambient Air Pollution and Neurodegenerative Diseases: the Neuroinflammation Hypothesis. **Curr Environ Health Rep**, v. 4, n. 2, p. 166-179, 06 2017. ISSN 2196-5412. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28444645> >.

JEDRYCHOWSKI, W. A. et al. Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and cognitive dysfunction in children. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 22, n. 5, p. 3631-9, Mar 2015. ISSN 1614-7499. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25253062> >.

JIA, Z. et al. Exposure to Ambient Air Particles Increases the Risk of Mental Disorder: Findings from a Natural Experiment in Beijing. **Int J Environ Res Public Health**, v. 15, n. 1, 01 2018. ISSN 1660-4601. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29351245> >.

JUNG, C. R.; LIN, Y. T.; HWANG, B. F. Air pollution and newly diagnostic autism spectrum disorders: a population-based cohort study in Taiwan. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e75510, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24086549> >.

KALKBRENNER, A. E. et al. Particulate matter exposure, prenatal and postnatal windows of susceptibility, and autism spectrum disorders. **Epidemiology**, v. 26, n. 1, p. 30-42, Jan 2015. ISSN 1531-5487. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25286049> >.

KANDEL, E. R. et al. **Principles of neural science**: The McGraw-Hill Companies, Inc. 5ª Edição 2013.

KANEKO, N.; SAWADA, M.; SAWAMOTO, K. Mechanisms of neuronal migration in the adult brain. **J Neurochem**, Mar 2017. ISSN 1471-4159. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28251650> >.

KARRI, V.; SCHUHMACHER, M.; KUMAR, V. Heavy metals (Pb, Cd, As and MeHg) as risk factors for cognitive dysfunction: A general review of metal mixture mechanism in brain. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 48, p. 203-213,

Dec 2016. ISSN 1872-7077. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27816841> >.

KICINSKI, M. et al. **Neurobehavioral performance in adolescents is inversely associated with traffic exposure**: Environment International. 75: 136–143 p. 2015.

KILIAN, J.; KITAZAWA, M. The emerging risk of exposure to air pollution on cognitive decline and Alzheimer's disease - Evidence from epidemiological and animal studies. **Biomed J**, v. 41, n. 3, p. 141-162, 06 2018. ISSN 2320-2890. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30080655> >.

KILLIN, L. O. et al. Environmental risk factors for dementia: a systematic review. **BMC Geriatr**, v. 16, n. 1, p. 175, Oct 2016. ISSN 1471-2318. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27729011> >.

KIM, E. et al. **Prenatal exposure to PM10 and NO2 and children's neurodevelopment from birth to 24 months of age: Mothers and Children's Environmental Health (MOCEH) study** Science of the Total Environment. 481: 439–445 p. 2014.

KIM, S. Y. et al. Effects of inhaled particulate matter on the central nervous system in mice. **Neurotoxicology**, v. 67, p. 169-177, 07 2018. ISSN 1872-9711. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29879396> >.

KINAWY, A. A.; EZZAT, A. R.; AL-SUWAIGH, B. R. Inhalation of air polluted with gasoline vapours alters the levels of amino acid neurotransmitters in the cerebral cortex, hippocampus, and hypothalamus of the rat. **Exp Toxicol Pathol**, v. 66, n. 5-6, p. 219-24, Aug 2014. ISSN 1618-1433. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24690269> >.

KLEPAC, P. et al. Ambient air pollution and pregnancy outcomes: A comprehensive review and identification of environmental public health challenges. **Environ Res**, v. 167, p. 144-159, Nov 2018. ISSN 1096-0953. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30014896> >.

KLOCKE, C. et al. Exposure to fine and ultrafine particulate matter during gestation alters postnatal oligodendrocyte maturation, proliferation capacity, and myelination. **Neurotoxicology**, v. 65, p. 196-206, 03 2018. ISSN 1872-9711. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29079486> >.

_____. Neuropathological Consequences of Gestational Exposure to Concentrated Ambient Fine and Ultrafine Particles in the Mouse. **Toxicol Sci**, Jan 2017. ISSN 1096-0929. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28087836> >.

KRAFT, A. D.; HARRY, G. J. Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. **Int J Environ Res**

Public Health, v. 8, n. 7, p. 2980-3018, 07 2011. ISSN 1660-4601. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21845170> >.

KU, T. et al. PM_{2.5}, SO₂ and NO₂ co-exposure impairs neurobehavior and induces mitochondrial injuries in the mouse brain. **Chemosphere**, v. 163, p. 27-34, Nov 2016. ISSN 1879-1298. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27521637> >.

KULAS, J. A. et al. In utero exposure to fine particulate matter results in an altered neuroimmune phenotype in adult mice. **Environ Pollut**, v. 241, p. 279-288, Oct 2018. ISSN 1873-6424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29843010> >.

KUMAMOTO, T.; HANASHIMA, C. Neuronal subtype specification in establishing mammalian neocortical circuits. **Neurosci Res**, v. 86, p. 37-49, Sep 2014. ISSN 1872-8111. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25019611> >.

KWAN, K. Y.; SESTAN, N.; ANTON, E. S. Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. **Development**, v. 139, n. 9, p. 1535-46, May 2012. ISSN 1477-9129. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22492350> >.

KYROUSI, C.; LYGEROU, Z.; TARAVIRAS, S. How a radial glial cell decides to become a multiciliated ependymal cell. **Glia**, v. 65, n. 7, p. 1032-1042, Jul 2017. ISSN 1098-1136. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28168763> >.

LAKSHMANAN, A. et al. Associations between prenatal traffic-related air pollution exposure and birth weight: Modification by sex and maternal pre-pregnancy body mass index. **Environ Res**, v. 137, p. 268-77, Feb 2015. ISSN 1096-0953. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25601728> >.

LANDRIGAN, P. J. et al. Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 9, p. 1230-3, Sep 2005. ISSN 0091-6765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16140633> >.

LARY, D.; LARY, T.; SATTTLER, B. **Using Machine Learning to Estimate Global PM_{2.5} for Environmental Health Studies**: Supplementary Issue: Ambient Air Quality (A). 9: 41–52 p. 2015.

LAVIGNE, É. et al. Maternal exposure to ambient air pollution and risk of early childhood cancers: A population-based study in Ontario, Canada. **Environ Int**, v. 100, p. 139-147, 03 2017. ISSN 1873-6750. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28108116> >.

LEARY, S. et al. **AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition**: American Veterinary Medical Association 2013.

LEE, P. C. et al. Traffic-related air pollution increased the risk of Parkinson's disease in Taiwan: A nationwide study. **Environ Int**, v. 96, p. 75-81, Nov 2016. ISSN 1873-6750. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27614945> >.

LEGER, M. et al. Object recognition test in mice. **Nat Protoc**, v. 8, n. 12, p. 2531-7, Dec 2013. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24263092> >.

LEPEULE, J. et al. Chronic exposure to fine particles and mortality: an extended follow-up of the Harvard Six Cities study from 1974 to 2009. **Environ Health Perspect**, v. 120, n. 7, p. 965-70, Jul 2012. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22456598> >.

LERTXUNDI, A. et al. Exposure to fine particle matter, nitrogen dioxide and benzene during pregnancy and cognitive and psychomotor developments in children at 15 months of age. **Environ Int**, v. 80, p. 33-40, Jul 2015. ISSN 1873-6750. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25881275> >.

LEVESQUE, S. et al. Diesel exhaust activates and primes microglia: air pollution, neuroinflammation, and regulation of dopaminergic neurotoxicity. **Environ Health Perspect**, v. 119, n. 8, p. 1149-55, Aug 2011. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21561831> >.

LI, A. et al. Heavy metals in maternal and cord blood in Beijing and their efficiency of placental transfer. **J Environ Sci (China)**, v. 80, p. 99-106, Jun 2019. ISSN 1001-0742. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30952357> >.

LI, C. et al. Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. **Curr Alzheimer Res**, v. 8, n. 1, p. 67-80, Feb 2011. ISSN 1875-5828. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21143158> >.

LI, X. et al. Association between ambient fine particulate matter and preterm birth or term low birth weight: An updated systematic review and meta-analysis. **Environ Pollut**, v. 227, p. 596-605, Aug 2017. ISSN 1873-6424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28457735> >.

LI, Z. et al. Impact of ambient PM_{2.5} on adverse birth outcome and potential molecular mechanism. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 169, p. 248-254, Mar 2019. ISSN 1090-2414. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30453172> >.

LIM, Y. H. et al. Air pollution and symptoms of depression in elderly adults. **Environ Health Perspect**, v. 120, n. 7, p. 1023-8, Jul 2012. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22514209> >.

LIN, C. C. et al. Multilevel analysis of air pollution and early childhood neurobehavioral development. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 7, p. 6827-41, Jul 2014. ISSN 1660-4601. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24992486> >.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, n. 2, p. 180-5, 1987. ISSN 0033-3158. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3110839> >.

LIU, X. et al. Particulate Matter Triggers Depressive-Like Response Associated With Modulation of Inflammatory Cytokine Homeostasis and Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling Pathway in Mice. **Toxicol Sci**, v. 164, n. 1, p. 278-288, 07 2018. ISSN 1096-0929. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29688525> >.

LIU, Y. et al. Effect of Fine Particulate Matter (PM_{2.5}) on Rat Placenta Pathology and Perinatal Outcomes. **Med Sci Monit**, v. 22, p. 3274-80, Sep 2016. ISSN 1643-3750. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27629830> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

LJUBIMOVA, J. Y. et al. Coarse particulate matter (PM. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 5708, Apr 2018. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29632393> >.

LLEDO, P. M.; ALONSO, M.; GRUBB, M. S. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 3, p. 179-93, Mar 2006. ISSN 1471-003X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16495940> >.

LOOMIS, D. et al. The carcinogenicity of outdoor air pollution. **Lancet Oncol**, v. 14, n. 13, p. 1262-3, Dec 2013. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25035875> >.

LOOMIS, D.; HUANG, W.; CHEN, G. The International Agency for Research on Cancer (IARC) evaluation of the carcinogenicity of outdoor air pollution: focus on China. **Chin J Cancer**, v. 33, n. 4, p. 189-96, Apr 2014. ISSN 1000-467X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24694836> >.

LOOP, M. S. et al. Correction: Fine particulate matter and incident cognitive impairment in the REasons for Geographic and Racial Differences in Stroke

(REGARDS) cohort. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0125137, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25886257> >.

LUHMANN, H. J.; FUKUDA, A.; KILB, W. Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 4, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25688185> >.

LÖW, K. et al. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. **Science**, v. 290, n. 5489, p. 131-4, Oct 2000. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11021797> >.

MAGHBOOLI, Z. et al. Air pollution during pregnancy and placental adaptation in the levels of global DNA methylation. **PLoS One**, v. 13, n. 7, p. e0199772, 2018. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29979694> >.

MANNUCCI, P. M. et al. Effects on health of air pollution: a narrative review. **Intern Emerg Med**, v. 10, n. 6, p. 657-62, Sep 2015. ISSN 1970-9366. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26134027> >.

MARÍN, O.; MÜLLER, U. Lineage origins of GABAergic versus glutamatergic neurons in the neocortex. **Curr Opin Neurobiol**, v. 26, p. 132-41, Jun 2014. ISSN 1873-6882. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24549207> >.

MAYHEW, T. M. A review of recent advances in stereology for quantifying neural structure. **J Neurocytol**, v. 21, n. 5, p. 313-28, May 1992. ISSN 0300-4864. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1607876> >.

MCCALLISTER, M. M. et al. Prenatal exposure to benzo(a)pyrene impairs later-life cortical neuronal function. **Neurotoxicology**, v. 29, n. 5, p. 846-54, Sep 2008. ISSN 0161-813X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18761371> >.

MCGAUGH, J. L.; IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends Pharmacol Sci**, v. 21, n. 6, p. 208-10, Jun 2000. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10838606> >.

MICHIKAWA, T. et al. Maternal exposure to air pollutants during the first trimester and foetal growth in Japanese term infants. **Environ Pollut**, v. 230, p. 387-393, Nov 2017. ISSN 1873-6424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28672151> >.

MING, G. L.; SONG, H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. **Neuron**, v. 70, n. 4, p. 687-702, May 2011. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21609825> >.

MIRAGLIA, S. G.; GOUVEIA, N. [Costs of air pollution in Brazilian metropolitan regions]. **Cien Saude Colet**, v. 19, n. 10, p. 4141-7, Oct 2014. ISSN 1678-4561. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25272123> >.

MORAKINYO, O. M. et al. Health Outcomes of Exposure to Biological and Chemical Components of Inhalable and Respirable Particulate Matter. **Int J Environ Res Public Health**, v. 13, n. 6, 06 2016. ISSN 1660-4601. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27314370> >.

MORGAN, J. T. et al. Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. **Biol Psychiatry**, v. 68, n. 4, p. 368-76, Aug 2010. ISSN 1873-2402. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20674603> >.

MORRIS-SCHAFFER, K. et al. Limited developmental neurotoxicity from neonatal inhalation exposure to diesel exhaust particles in C57BL/6 mice. **Part Fibre Toxicol**, v. 16, n. 1, p. 1, 01 2019. ISSN 1743-8977. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30612575> >.

MORTAMAS, M. et al. Effect of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons on basal ganglia and attention-deficit hyperactivity disorder symptoms in primary school children. **Environ Int**, v. 105, p. 12-19, May 2017. ISSN 1873-6750. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28482185> >.

MYHRE, O. et al. Early life exposure to air pollution particulate matter (PM) as risk factor for attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD): Need for novel strategies for mechanisms and causalities. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 354, p. 196-214, 09 2018. ISSN 1096-0333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29550511> >.

NEL, A. et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622-7, Feb 2006. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16456071> >.

NEMERY, B.; HOET, P. H.; NEMMAR, A. The Meuse Valley fog of 1930: an air pollution disaster. **Lancet**, v. 357, n. 9257, p. 704-8, Mar 2001. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11247570> >.

NEMMAR, A. et al. Recent advances in particulate matter and nanoparticle toxicology: a review of the in vivo and in vitro studies. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 279371, 2013. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23865044> >.

_____. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 164, n. 9, p. 1665-8, Nov 2001. ISSN 1073-449X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11719307> >.

NEWMAN, N. C. et al. Traffic-related air pollution exposure in the first year of life and behavioral scores at 7 years of age. **Environ Health Perspect**, v. 121, n. 6, p. 731-6, Jun 2013. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23694812> >.

OBERDORSTER, G. et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. **Inhalation Toxicology**, v. 16, n. 6-7, p. 437-445, Jun 2004. ISSN 0895-8378. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000221111100012 >.

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 7, p. 823-39, Jul 2005. ISSN 0091-6765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16002369> >.

ONODA, A.; TAKEDA, K.; UMEZAWA, M. Dose-dependent induction of astrocyte activation and reactive astrogliosis in mouse brain following maternal exposure to carbon black nanoparticle. **Part Fibre Toxicol**, v. 14, n. 1, p. 4, 02 2017. ISSN 1743-8977. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28148272> >.

PALACIO, I. C.; BARROS, S. B.; ROUBICEK, D. A. Water-soluble and organic extracts of airborne particulate matter induce micronuclei in human lung epithelial A549 cells. **Mutat Res**, v. 812, p. 1-11, Dec 2016. ISSN 1873-135X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27908382> >.

PARIDAEN, J. T.; HUTTNER, W. B. Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. **EMBO Rep**, v. 15, n. 4, p. 351-64, Apr 2014. ISSN 1469-3178. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24639559> >.

PATTERSON, S. L. Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: Interactions of microglia, IL-1 β , BDNF and synaptic plasticity. **Neuropharmacology**, v. 96, n. Pt A, p. 11-8, Sep 2015. ISSN 1873-7064. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25549562> >.

PEDERSEN, C. B. et al. Air pollution from traffic and schizophrenia risk. **Schizophr Res**, v. 66, n. 1, p. 83-5, Jan 2004. ISSN 0920-9964. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14693358> >.

PEIXOTO, M. S.; DE OLIVEIRA GALVÃO, M. F.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S. R. Cell death pathways of particulate matter toxicity. **Chemosphere**, v. 188, p. 32-48, Dec 2017. ISSN 1879-1298. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28865791> >.

PERERA, F. P. et al. Early-life exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and ADHD behavior problems. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e111670, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25372862> >.

_____. Effects of transplacental exposure to environmental pollutants on birth outcomes in a multiethnic population. **Environ Health Perspect**, v. 111, n. 2, p. 201-5, Feb 2003. ISSN 0091-6765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12573906> >.

_____. Effect of prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. **Environ Health Perspect**, v. 114, n. 8, p. 1287-92, Aug 2006. ISSN 0091-6765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16882541> >.

_____. Prenatal polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and child behavior at age 6-7 years. **Environ Health Perspect**, v. 120, n. 6, p. 921-6, Jun 2012. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22440811> >.

_____. Combined effects of prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and material hardship on child ADHD behavior problems. **Environ Res**, v. 160, p. 506-513, 01 2018. ISSN 1096-0953. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28987706> >.

PETERSON, B. S. et al. Effects of prenatal exposure to air pollutants (polycyclic aromatic hydrocarbons) on the development of brain white matter, cognition, and behavior in later childhood. **JAMA Psychiatry**, v. 72, n. 6, p. 531-40, Jun 2015. ISSN 2168-6238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25807066> >.

PIETROIUSTI, A.; CAMPAGNOLO, L.; FADEEL, B. Interactions of engineered nanoparticles with organs protected by internal biological barriers. **Small**, v. 9, n. 9-10, p. 1557-72, May 2013. ISSN 1613-6829. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23097249> >.

POPE, C. A. et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. **JAMA**, v. 287, n. 9, p. 1132-41, Mar 2002. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11879110> >.

POWER, M. C. et al. Exposure to air pollution as a potential contributor to cognitive function, cognitive decline, brain imaging, and dementia: A systematic review of epidemiologic research. **Neurotoxicology**, v. 56, p. 235-253, Sep 2016. ISSN 1872-9711. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27328897> >.

_____. The relation between past exposure to fine particulate air pollution and prevalent anxiety: observational cohort study. **BMJ**, v. 350, p. h1111, Mar 2015. ISSN 1756-1833. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25810495> >.

_____. Traffic-related air pollution and cognitive function in a cohort of older men. **Environ Health Perspect**, v. 119, n. 5, p. 682-7, May 2011. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21172758> >.

PRAHALAD, A. K. et al. Ambient air particles: effects on cellular oxidant radical generation in relation to particulate elemental chemistry. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 158, n. 2, p. 81-91, Jul 1999. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10406923> >.

PROCONVE. Programa de controle de emissões veiculares (PROCONVE). 2016. Disponível em: < <https://www.ibama.gov.br/emissoes/veiculos-automotores/programa-de-controle-de-emissoes-veiculares-proconve> >. Acesso em: 18, Março.

PUJOL, J. et al. Traffic pollution exposure is associated with altered brain connectivity in school children. **Neuroimage**, v. 129, p. 175-84, Apr 2016. ISSN 1095-9572. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26825441> >.

RAASCHOU-NIELSEN, O. et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). **Lancet Oncol**, v. 14, n. 9, p. 813-22, Aug 2013. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23849838> >.

RAHMAN, A.; KUMARATHASAN, P.; GOMES, J. Infant and mother related outcomes from exposure to metals with endocrine disrupting properties during pregnancy. **Sci Total Environ**, v. 569-570, p. 1022-1031, Nov 2016. ISSN 1879-1026. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27378155> >.

RAZ, R. et al. **Autism Spectrum Disorder and Particulate Matter Air Pollution before, during, and after Pregnancy: A Nested Case-Control Analysis within the Nurses' Health Study II Cohort** Environmental Health Perspectives. 123: 264-270 p. 2015.

REIS, M. M. D. et al. Air pollution and low birth weight in an industrialized city in Southeastern Brazil, 2003-2006. **Rev Bras Epidemiol**, v. 20, n. 2, p. 189-199, 2017 Apr-Jun 2017. ISSN 1980-5497. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28832843> >.

RICE, D.; BARONE, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environ Health Perspect**, v. 108 Suppl 3, p. 511-33, Jun 2000. ISSN 0091-6765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10852851> >.

RITZ, B. et al. Traffic-Related Air Pollution and Parkinson's Disease in Denmark: A Case-Control Study. **Environ Health Perspect**, v. 124, n. 3, p.

351-6, Mar 2016. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26151951> >.

RIVAS, I. et al. Association between Early Life Exposure to Air Pollution and Working Memory and Attention. **Environ Health Perspect**, v. 127, n. 5, p. 57002, May 2019. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31070940> >.

ROBERTS, A. L. et al. Perinatal air pollutant exposures and autism spectrum disorder in the children of Nurses' Health Study II participants. **Environ Health Perspect**, v. 121, n. 8, p. 978-84, Aug 2013. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23816781> >.

SAENEN, N. D. et al. In Utero Fine Particle Air Pollution and Placental Expression of Genes in the Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling Pathway: An ENVIRONAGE Birth Cohort Study. **Environ Health Perspect**, v. 123, n. 8, p. 834-40, Aug 2015. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25816123> >.

_____. Recent versus chronic exposure to particulate matter air pollution in association with neurobehavioral performance in a panel study of primary schoolchildren. **Environ Int**, v. 95, p. 112-9, Oct 2016. ISSN 1873-6750. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27575366> >.

SALVI, A. et al. Psychological Impact of Vehicle Exhaust Exposure: Insights from an Animal Model. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 8306, 08 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28814807> >.

SANTOS, A. G. et al. A simple, comprehensive, and miniaturized solvent extraction method for determination of particulate-phase polycyclic aromatic compounds in air. **J Chromatogr A**, v. 1435, p. 6-17, Feb 2016. ISSN 1873-3778. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26830633> >.

SARNYAI, Z. et al. Impaired hippocampal-dependent learning and functional abnormalities in the hippocampus in mice lacking serotonin(1A) receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 26, p. 14731-6, Dec 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121072> >.

SCHROEDER, H. Developmental Brain and Behavior Toxicity of Air Pollutants: A Focus on the Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). v. 41, n. 22, p. 2026-2047, 2011.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. **J Vis Exp**, n. 96, p. e52434, Feb 2015. ISSN 1940-087X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25742564> >.

SHAH, A. S. et al. Global association of air pollution and heart failure: a systematic review and meta-analysis. **Lancet**, v. 382, n. 9897, p. 1039-48, Sep

2013. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23849322> >.

_____. Short term exposure to air pollution and stroke: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 350, p. h1295, Mar 2015. ISSN 1756-1833. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25810496> >.

SHIBATA, M.; GULDEN, F. O.; SESTAN, N. From trans to cis: transcriptional regulatory networks in neocortical development. **Trends Genet**, v. 31, n. 2, p. 77-87, Feb 2015. ISSN 0168-9525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25624274> >.

SHIH, C. H. et al. Chronic pulmonary exposure to traffic-related fine particulate matter causes brain impairment in adult rats. **Part Fibre Toxicol**, v. 15, n. 1, p. 44, 11 2018. ISSN 1743-8977. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30413208> >.

SHWE, T. T. W. et al. Analysis of spatial learning performance and memory function-related gene expressions in the hippocampus of mice exposed to nanoparticle-rich diesel exhaust. **Neuroscience Research**, v. 61, p. S258-S258, 2008 2008. ISSN 0168-0102.

SIDDIQUE, S. et al. Attention-deficit hyperactivity disorder in children chronically exposed to high level of vehicular pollution. **Eur J Pediatr**, v. 170, n. 7, p. 923-9, Jul 2011. ISSN 1432-1076. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21191614> >.

STERIO, D. C. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. **J Microsc**, v. 134, n. Pt 2, p. 127-36, May 1984. ISSN 0022-2720. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6737468> >.

STIEB, D. M. et al. Ambient air pollution, birth weight and preterm birth: a systematic review and meta-analysis. **Environ Res**, v. 117, p. 100-11, Aug 2012. ISSN 1096-0953. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22726801> >.

STILES, J.; JERNIGAN, T. L. The basics of brain development. **Neuropsychol Rev**, v. 20, n. 4, p. 327-48, Dec 2010. ISSN 1573-6660. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21042938> >.

STOLP, H. B. Neurotrophic cytokines in normal brain development and neurodevelopmental disorders. **Mol Cell Neurosci**, v. 53, p. 63-8, Mar 2013. ISSN 1095-9327. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22926235> >.

SUADES-GONZÁLEZ, E. et al. Air Pollution and Neuropsychological Development: A Review of the Latest Evidence. **Endocrinology**, v. 156, n. 10,

p. 3473-82, Oct 2015. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26241071> >.

SUGLIA, S. F. et al. Association of black carbon with cognition among children in a prospective birth cohort study. **Am J Epidemiol**, v. 167, n. 3, p. 280-6, Feb 2008. ISSN 1476-6256. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18006900> >.

SUNYER, J. et al. Association between traffic-related air pollution in schools and cognitive development in primary school children: a prospective cohort study. **PLoS Med**, v. 12, n. 3, p. e1001792, Mar 2015. ISSN 1549-1676. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25734425> >.

_____. Traffic-related Air Pollution and Attention in Primary School Children: Short-term Association. **Epidemiology**, v. 28, n. 2, p. 181-189, Mar 2017. ISSN 1531-5487. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27922536> >.

SUZUKI, I. K.; HIRATA, T. Neocortical neurogenesis is not really "neo": a new evolutionary model derived from a comparative study of chick pallial development. **Dev Growth Differ**, v. 55, n. 1, p. 173-87, Jan 2013. ISSN 1440-169X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23230908> >.

SUZUKI, T. et al. In utero exposure to a low concentration of diesel exhaust affects spontaneous locomotor activity and monoaminergic system in male mice. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 7, Mar 23 2010. ISSN 1743-8977. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000276738300001 >.

TALBOTT, E. O. et al. Fine particulate matter and the risk of autism spectrum disorder. **Environ Res**, v. 140, p. 414-20, Jul 2015. ISSN 1096-0953. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25957837> >.

TAN, X.; SHI, S. H. Neocortical neurogenesis and neuronal migration. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, v. 2, n. 4, p. 443-59, Jul 2013. ISSN 1759-7692. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24014417> >.

TANAKA, D. H.; NAKAJIMA, K. GABAergic interneuron migration and the evolution of the neocortex. **Dev Growth Differ**, v. 54, n. 3, p. 366-72, Apr 2012. ISSN 1440-169X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22524606> >.

THIRAMARA RAJAMANI, K. et al. Prenatal and early-life exposure to high-level diesel exhaust particles leads to increased locomotor activity and repetitive behaviors in mice. **Autism Res**, v. 6, n. 4, p. 248-57, Aug 2013. ISSN 1939-3806. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23495194> >.

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

8, Jan 2008. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17950771> >.

TINSLEY, C. J. et al. Stereological analysis of regional brain volumes and neuron numbers in rats displaying a spontaneous hydrocephalic condition. **Exp Neurol**, v. 168, n. 1, p. 88-95, Mar 2001. ISSN 0014-4886. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11170723> >.

TOLE, S.; GROVE, E. A. Detailed field pattern is intrinsic to the embryonic mouse hippocampus early in neurogenesis. **J Neurosci**, v. 21, n. 5, p. 1580-9, Mar 2001. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222648> >.

TONNE, C. et al. Traffic-related air pollution in relation to cognitive function in older adults. **Epidemiology**, v. 25, n. 5, p. 674-81, Sep 2014. ISSN 1531-5487. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25036434> >.

TUOC, T. C. et al. Control of cerebral size and thickness. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 17, p. 3199-218, Sep 2014. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24614969> >.

UMEZAWA, M. et al. Maternal inhalation of carbon black nanoparticles induces neurodevelopmental changes in mouse offspring. **Part Fibre Toxicol**, v. 15, n. 1, p. 36, 09 2018. ISSN 1743-8977. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30201004> >.

VALAVANIDIS, A.; FIOTAKIS, K.; VLACHOGIANNI, T. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. **J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev**, v. 26, n. 4, p. 339-62, 2008 Oct-Dec 2008. ISSN 1532-4095. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19034792> >.

VALAVANIDIS, A. et al. Characterization of atmospheric particulates, particle-bound transition metals and polycyclic aromatic hydrocarbons of urban air in the centre of Athens (Greece). **Chemosphere**, v. 65, n. 5, p. 760-8, Oct 2006. ISSN 0045-6535. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16674985> >.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978905> >.

VAN KEMPEN, E. et al. Neurobehavioral effects of exposure to traffic-related air pollution and transportation noise in primary schoolchildren. **Environ Res**, v. 115, p. 18-25, May 2012. ISSN 1096-0953. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22483436> >.

VERAS, M. M. et al. Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. **Biol Reprod**, v. 79, n. 3, p. 578-84, Sep 2008. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18509159> >.

_____. Chronic exposure to fine particulate matter emitted by traffic affects reproductive and fetal outcomes in mice. **Environ Res**, v. 109, n. 5, p. 536-43, Jul 2009. ISSN 1096-0953. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19394924> >.

VOINESKOS, A. N. et al. Age-related decline in white matter tract integrity and cognitive performance: a DTI tractography and structural equation modeling study. **Neurobiol Aging**, v. 33, n. 1, p. 21-34, Jan 2012. ISSN 1558-1497. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20363050> >.

VOLK, H. E. et al. Residential proximity to freeways and autism in the CHARGE study. **Environ Health Perspect**, v. 119, n. 6, p. 873-7, Jun 2011. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21156395> >.

_____. Traffic-related air pollution, particulate matter, and autism. **JAMA Psychiatry**, v. 70, n. 1, p. 71-7, Jan 2013. ISSN 2168-6238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23404082> >.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nat Protoc**, v. 2, n. 2, p. 322-8, 2007. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406592> >.

WANG, Q. et al. Identifying windows of susceptibility for maternal exposure to ambient air pollution and preterm birth. **Environ Int**, v. 121, n. Pt 1, p. 317-324, 12 2018. ISSN 1873-6750. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30241019> >.

WANG, Y.; XIONG, L.; TANG, M. Toxicity of inhaled particulate matter on the central nervous system: neuroinflammation, neuropsychological effects and neurodegenerative disease. **J Appl Toxicol**, v. 37, n. 6, p. 644-667, 06 2017. ISSN 1099-1263. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28299803> >.

WANG, Y. et al. Fine particulate matter induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in human SH-SY5Y cells. **Chemosphere**, v. 218, p. 577-588, Mar 2019. ISSN 1879-1298. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30502696> >.

WEISSKOPF, M. G.; KIOUMOURTZOGLOU, M.-A.; ROBERTS, A. L. **Air Pollution and Autism Spectrum Disorders: Causal or Confounded?** Curr Environ Health Rep. 2: 430-439 p. 2015.

WEUVE, J. et al. Exposure to particulate air pollution and cognitive decline in older women. **Arch Intern Med**, v. 172, n. 3, p. 219-27, Feb 2012. ISSN 1538-3679. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22332151> >.

WHO. **Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide** Summary of risk assessment. Geneva, Switzerland: Public Health, Social and Environmental Determinants of Health Department, World Health Organisation 2005.

_____. **Burden of Disease from Household Air Pollution for 2012**. Public Health, Social and Environmental Determinants of Health Department, World Health Organisation. Geneva, Switzerland. 2014

_____. **Ambient air pollution: A global assessment of exposure and burden of disease**. Geneva, Switzerland: World Health Organisation 2016.

_____. Ambient (outdoor) air quality and health. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health), 2018. Acesso em: 23 April.

WIN-SHWE, T.-T. et al. Novel object recognition ability in female mice following exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 262, n. 3, p. 355-362, Aug 1 2012. ISSN 0041-008X.

_____. Effects of Diesel Engine Exhaust Origin Secondary Organic Aerosols on Novel Object Recognition Ability and Maternal Behavior in BALB/C Mice. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 11, p. 11286-11307, Nov 2014. ISSN 1660-4601. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000345532000016 >.

_____. Nanoparticle-rich diesel exhaust affects hippocampal-dependent spatial learning and NMDA receptor subunit expression in female mice. **Nanotoxicology**, v. 6, n. 5, p. 543-553, Aug 2012. ISSN 1743-5390. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000306232200007 >.

WIN-SHWE, T. T. et al. Novel object recognition ability in female mice following exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 262, n. 3, p. 355-62, Aug 2012. ISSN 1096-0333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22659509> >.

_____. Exposure of BALB/c Mice to Diesel Engine Exhaust Origin Secondary Organic Aerosol (DE-SOA) during the Developmental Stages Impairs the Social Behavior in Adult Life of the Males. **Front Neurosci**, v. 9, p. 524, 2015. ISSN 1662-4548. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26834549> >.

_____. Nano-Sized Secondary Organic Aerosol of Diesel Engine Exhaust Origin Impairs Olfactory-Based Spatial Learning Performance in Prewearing Mice. **Nanomaterials (Basel)**, v. 5, n. 3, p. 1147-1162, Jun 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28347057> >.

WOODWARD, N. C. et al. Traffic-related air pollution impact on mouse brain accelerates myelin and neuritic aging changes with specificity for CA1 neurons. **Neurobiol Aging**, v. 53, p. 48-58, 05 2017. ISSN 1558-1497. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28212893> >.

WU, Y. C. et al. Association between air pollutants and dementia risk in the elderly. **Alzheimers Dement (Amst)**, v. 1, n. 2, p. 220-8, Jun 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27239507> >.

XIA, Y. et al. Effects of subchronic exposure to benzo[a]pyrene (B[a]P) on learning and memory, and neurotransmitters in male Sprague-Dawley rat. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 2, p. 188-98, Mar 2011. ISSN 1872-9711. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21216261> >.

XIAO, L. et al. Prenatal and Early Postnatal Exposure to Cigarette Smoke Decreases BDNF/TrkB Signaling and Increases Abnormal Behaviors Later in Life. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 19, n. 5, 05 2016. ISSN 1469-5111. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26503133> >.

XU, X.; HA, S. U.; BASNET, R. A Review of Epidemiological Research on Adverse Neurological Effects of Exposure to Ambient Air Pollution. **Front Public Health**, v. 4, p. 157, 2016. ISSN 2296-2565. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27547751> >.

YOKOTA, S. et al. Effect of prenatal exposure to diesel exhaust on dopaminergic system in mice. **Neurosci Lett**, v. 449, n. 1, p. 38-41, Jan 2009. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18938223> >.

_____. Effect of prenatal exposure to diesel exhaust on dopaminergic system in mice. **Neuroscience Letters**, v. 449, n. 1, p. 38-41, Jan 2 2009. ISSN 0304-3940.

_____. Exposure to diesel exhaust during fetal period affects behavior and neurotransmitters in male offspring mice. **J Toxicol Sci**, v. 38, n. 1, p. 13-23, Feb 2013. ISSN 1880-3989. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23358136> >.

_____. Social Isolation-Induced Territorial Aggression in Male Offspring Is Enhanced by Exposure to Diesel Exhaust during Pregnancy. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0149737, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26919122> >.

YOKOTA, S.; OSHIO, S.; TAKEDA, K. In utero exposure to diesel exhaust particles induces anxiogenic effects on male offspring via chronic activation of serotonergic neuron in dorsal raphe nucleus. **J Toxicol Sci**, v. 41, n. 5, p. 583-93, 2016. ISSN 1880-3989. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27665768> >.

YOKOTA, S. et al. In utero exposure of mice to diesel exhaust particles affects spatial learning and memory with reduced N-methyl-D-aspartate receptor expression in the hippocampus of male offspring. **Neurotoxicology**, v. 50, p. 108-15, Sep 2015. ISSN 1872-9711. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26291742> >.

YOSHIZAKI, K. et al. The effects of urban particulate matter on the nasal epithelium by gender: An experimental study in mice. **Environ Pollut**, v. 213, p. 359-69, Jun 2016. ISSN 1873-6424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26942683> >.

ZAHR, N. M. et al. Problem solving, working memory, and motor correlates of association and commissural fiber bundles in normal aging: a quantitative fiber tracking study. **Neuroimage**, v. 44, n. 3, p. 1050-62, Feb 2009. ISSN 1095-9572. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18977450> >.

ZANCHI, A. C. et al. Pre and post-natal exposure to ambient level of air pollution impairs memory of rats: the role of oxidative stress. **Inhal Toxicol**, v. 22, n. 11, p. 910-8, Sep 2010. ISSN 1091-7691. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20569119> >.

_____. Chronic nasal instillation of residual-oil fly ash (ROFA) induces brain lipid peroxidation and behavioral changes in rats. **Inhal Toxicol**, v. 20, n. 9, p. 795-800, Jul 2008. ISSN 1091-7691. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18645718> >.

ZHANG, F. et al. Microglial migration and interactions with dendrimer nanoparticles are altered in the presence of neuroinflammation. **J Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 65, Mar 2016. ISSN 1742-2094. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27004516> >.

ZHANG, Q. et al. PM_{2.5} impairs neurobehavior by oxidative stress and myelin sheaths injury of brain in the rat. **Environ Pollut**, v. 242, n. Pt A, p. 994-1001, Nov 2018. ISSN 1873-6424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30373045> >.

ZHANG, T. et al. Maternal Exposure to PM_{2.5} during Pregnancy Induces Impaired Development of Cerebral Cortex in Mice Offspring. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 1, Jan 2018. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29337904> >.

ZHANG, W. et al. Chronic Administration of Benzo(a)pyrene Induces Memory Impairment and Anxiety-Like Behavior and Increases of NR2B DNA

Methylation. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0149574, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26901155> >.

ZHENG, W.; ASCHNER, M.; GHERSI-EGEA, J. F. Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 192, n. 1, p. 1-11, Oct 2003. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14554098> >.

ANEXOS

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 21/08/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **113/14** intitulado: **“Avaliação dos efeitos da exposição pré e pós-natal à poluição atmosférica da cidade de São Paulo sobre o desenvolvimento cerebral e comportamental de camundongos”** que utilizará **05** animais da espécie **camundongo**, apresentado pelo Departamento de Patologia - FMUSP

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Mariana Matera Veras

CEUA-FMUSP, 21 de Agosto de 2014

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10/06/15, **APROVOU** o documento recebido em 10/06/15 para o protocolo de pesquisa nº **113/14** intitulado “Avaliação dos efeitos da exposição pré e pós-natal à poluição atmosférica da Cidade de São Paulo sobre o desenvolvimento cerebral e comportamental de camundongos” apresentado pelo Departamento de Patologia.

- Inclusão de pesquisadora executante:
Marlise Di Domenico

Pesquisador Responsável: Mariana Matera Veras

CEUA-FMUSP, 10 de Junho de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais