http://journal.unoeste.br/index.php/cv
DOI: 10.5747/cv.2019.v11.n3.v267
ISSN on-line 1984-6436

Colloquium Vitae

Submetido: 16/08/2019 Revisado: 21/08/2019 Aceito: 26/08/2019

EXPOSIÇÃO PÓS-NATAL À POLUENTES DO AR (MP≤2,5) COMO FATOR DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DE COMPORTAMENTOS DE DEPRESSÃO E ANSIEDADE: UM ESTUDO EXPERIMENTAL.

Carla de Oliveira Carletti[1], Rodrigo Correia Santos[1], Luis Fernando Sierra de Araújo[1], Murilo Américo de Paiva Santos[1], Mariana Matera Veras[2], Regina Helena da Silva[2], Maria José da Silva Fernandes[1].

[1]Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo, SP; [2]Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, SP. e-mail: carlacarletti28@yahoo.com.br

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar as alterações comportamentais de ratos machos e fêmeas adultos, expostos ao material particulado fino e ultrafino (MP≤2,5) suspenso na poluição do ar, durante o desenvolvimento. Ratos Wistar, com idade de 7 dias pós-natal, foram expostos à câmara de um concentrador de partículas atmosféricas. Foram realizados os testes de campo aberto e teste de preferência por sacarose para avaliação da presença de comportamentos de ansiedade e depressão. Ratos machos do grupo poluição apresentaram redução da atividade locomotora e do tempo de permanência no centro do campo aberto quando comparados aos machos do grupo controle. O teste de preferência por sacarose evidenciou significância estatística entre os grupos poluição e controle (machos+fêmeas), e entre os machos do grupo poluição e controle. O estudo concluiu que a exposição ao MP≤2,5 causa alterações comportamentais características de depressão e ansiedade, em ratos machos, adultos, expostos durante o período de desenvolvimento.

Palavras-chave: Poluição do ar, material particulado, depressão, ansiedade, ratos.

POSTNATAL EXPOSURE TO AIR POLLUTANTS (PM≤2,5) AS RISK FACTOR FOR THE DEVELOPMENT OF DEPRESSION AND ANXIETY: AN EXPERIMENTAL STUDY.

ABSTRACT

The purpose of the study was to evaluate the behavioral changes of male and female adult rats exposed to fine and ultrafine particulate matter (PM≤2,5) suspended in air pollution during development. Wistar rats aged 7 postnatal days were exposed to the chamber of an atmospheric particle concentrator. Open field tests and sucrose preference tests were performed to assess the presence of anxiety and depression behaviors. Male rats from the pollution group showed reduced locomotor activity and length of stay in the open field center when compared to the control group. The sucrose preference test showed statistical significance between the pollution and control groups (male+female), and among the males of the pollution and control group. The study concluded that exposure to PM≤2.5 causes behavioral changes characteristic of depression and anxiety in adult male rats exposed during the developmental period.

Keywords: Air pollution, particulate matter, depression, anxiety, rats

INTRODUÇÃO

A poluição do ar caracteriza-se por uma mistura complexa de poluentes que inclui materiais particulados (MP) e gasosos e deriva de uma variedade de fontes internas e externas[1,2].

As principais fontes de contribuição humana são o tráfego e a combustão industrial de combustíveis fósseis, bem como a mineração,

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

atividades agrícolas e queima de combustíveis, sendo que as emissões de combustão representam mais da metade da poluição do ar[3,4].

De acordo com American Environmental Protection Administration (EPA)[5] os principais poluentes atmosféricos são dióxidos de nitrogênio (NO_2), dióxidos de enxofre (SO_2), ozônio (O_3), $MP_{2,5}$, MP_{10}, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), monóxido de carbono (CO), metano, compostos orgânicos voláteis (benzeno, tolueno e xileno) e metais (como o chumbo, manganês, vanádio e ferro)[6].

O MP inclui uma ampla variedade de matéria líquida ou sólida microscópica na atmosfera. A composição exata do MP varia com base no tamanho, localização, clima, estação do ano, hora do dia e em vários outros fatores[4]. O MP recebe diferentes denominações de acordo com o tamanho: partículas grossas, são as que apresentam diâmetro de 2,5 a 10 micrômetros (MP_{10}), partículas finas, apresentam diâmetro de 0,1 a 2,5 micrômetros ($MP_{2,5}$), e as partículas ultrafinas apresentam diâmetro igual ou inferior a 0,1 micrômetros ($MP_{0,1}$). As menores frações contêm maiores quantidades de carbono negro derivado da combustão de combustíveis fósseis[4,7].

Dessa forma, o tamanho e o peso do MP são fatores determinantes na deposição de partículas no trato respiratório. Enquanto as partículas maiores tendem a se depositar e afetar o trato respiratório superior, as menores (MP≤2,5) se depositam em partes mais profundas do tecido pulmonar[4,8,9]. Uma vez no pulmão, essas partículas são absorvidas pelas células e entram na corrente sanguínea, sendo a forma mais tóxica do MP[4,10,11].

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) a poluição atmosférica é um problema mundial de saúde pública e ambiental, pois as exposições iniciam-se no período gestacional e são cumulativas ao longo da vida[1,12].

A OMS estima ainda que 92% da população mundial viva em áreas onde as diretrizes de qualidade do ar (10 µg/m^3 como média anual máxima e 25 µg/m^3 como média máxima de 24 horas) não são cumpridas, causando altas taxas de mortalidade em consequência da poluição[1,13]. Estima-se que o número total de mortes atribuíveis ao $MP_{2,5}$ aumentará nas próximas três décadas em mais de 50% e poderá causar a morte de 6,6 milhões pessoas até o ano de 2050[14,15].

O Brasil ocupa a 44ª posição entre os países mais poluídos do mundo e a 10ª posição entre os países da América[16]. Dentre as cidades brasileiras, São Paulo, com mais de 12,2 milhões de habitantes e frota veicular equivalente a 15,3 milhões de veículos, apresenta altos índices de poluição atmosférica e consequentemente elevados problemas de saúde, além de consideráveis gastos relacionados a hospitalizações[17]. Alguns pontos da cidade chegam a registrar valores de MP duas vezes superiores aos estabelecidos pela OMS como aceitáveis. Estima-se que se esses valores permanecessem dentro da faixa estabelecida pela OMS, ou seja 10 µg/m^3, mais de 5.012 óbitos de bebês prematuros seriam evitados e haveria uma economia anual de 15,1 bilhões de dólares no país[17,18]. Desde a década de 70, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) faz uso de 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 preconizou novos padrões de qualidade do ar para o Estado de São Paulo, os quais são baseados nas diretrizes estabelecidas pela OMS. Esse decreto ressalta metas progressivas e intermediárias a serem cumpridas, até chegar ao padrão final, ao qual a poluição atmosférica será reduzida a níveis aceitáveis ao longo do tempo[17].

Diversos estudos relatam os efeitos deletérios da poluição do ar no sistema respiratório e cardiovascular[6,19,20]. A poluição do ar pode afetar também o sistema nervoso central (SNC), atingindo o cérebro por via direta, por meio do bulbo olfatório e por via indireta, adentrando a circulação sistêmica e atravessando a barreira hematoencefálica[3,4,12]. Este processo pode danificar estruturas cerebrais e predispor ao aparecimento de patologias neurológicas como Parkinson, Alzheimer, Esclerose Múltipla, Autismo, Esquizofrenia, Acidente Vascular Encefálico, entre outras[3,4,14]. Há relatos de que a poluição do ar pode aumentar ainda a frequência de crises de pacientes com epilepsia[21]. Acredita-se que os principais mecanismos envolvidos sejam por inflamação e estresse oxidativo[3,4,12,22].

Além de neuropatologias, a exposição a poluentes atmosféricos tem sido associada a alterações comportamentais como ansiedade, depressão, hiperatividade, distúrbios cognitivos, diminuição da capacidade de raciocínio não-verbal, alterações na memória e atraso no desenvolvimento psicomotor[3,4,20,23-25],

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

principalmente quando as exposições se iniciam no período gestacional e pós-natal, pois pode interferir nos processos de proliferação, diferenciação, migração e maturação celular do sistema nervoso[5,25,26].

Pesquisas com modelos animais confirmam a presença de distúrbios de cognição, sintomas de ansiedade e comportamentos depressivos em resposta as exposições gestacionais e pós-natais à poluição do ar[23,24,26,27]. Estudos epidemiológicos também sugerem que a poluição do ar no cérebro em desenvolvimento (pré-natal e neonatal) pode causar prejuízos cognitivos e comportamentais em adultos[5,12,25], sendo considerado um fator de risco para o aumento de casos relacionados ao transtorno do espectro autista e esquizofrenia[27,28]. Outros estudos também sugerem que crianças e adultos que vivem, estudam ou trabalham em áreas com intenso tráfego veicular geralmente são acometidos por comprometimento cognitivo e sintomas de ansiedade e depressão[23,29].

Apesar das evidências do impacto que a poluição atmosférica causa no desempenho cognitivo e comportamental do cérebro em desenvolvimento e nas repercussões da vida adulta em modelos animais e estudos epidemiológicos, ainda se faz necessário elucidar e entender por quais mecanismos isso ocorre.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações comportamentais de ratos machos e fêmeas adultos, expostos ao material particulado fino e ultrafino (MP≤2,5) suspenso na poluição do ar, durante o desenvolvimento. Testes comportamentais para avaliação de depressão e ansiedade foram empregados.

METODOLOGIA

Animais

Ratos Wistar, fêmeas, nulíparas, sexualmente maduras, com aproximadamente 90 dias de vida e, machos da mesma linhagem, provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) foram empregados no estudo. Os animais foram alojados no biotério da Disciplina de Neurociência em gaiolas de polipropileno dispostas em estante ventilada, permanecendo com livre acesso à água e comida, com controle do ciclo claro-escuro de 12 horas (claro das 7-19h), e temperatura de 21 ± 2°C. O conceito dos 3R (Reduction, Replacement and Refinement) foi considerado no planejamento dos experimentos. Todos os experimentos tiveram início após aprovação da Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da UNIFESP sob o nº2134070518.

Delineamento experimental

Ratos Wistar (4 fêmeas e 2 machos), provenientes do CEDEME da UNIFESP, foram mantidos juntos em gaiola para acasalamento. A cada manhã era feito o esfregaço vaginal para a detecção da presença do espermatozoide no canal vaginal, cuja presença estabelecia o dia zero da gestação.

Após a detecção do espermatozoide, as fêmeas permaneceram juntas (2 ratas por caixa) até o 15º dia de gestação e, após esse período, foram separadas permanecendo uma fêmea por caixa até o nascimento da ninhada (21 dias de gestação). O dia do nascimento foi considerado como dia zero pós-natal.

No 2º dia após nascimento dos filhotes, as ratas juntamente com sua ninhada foram levadas para a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), onde se encontra o CPA, e lá foram acondicionadas no Biotério do Laboratório de Poluição Ambiental (LIM-05), Departamento de Patologia, sob as mesmas condições ambientais e com alimentação *ad libitum*.

Protocolo de exposição à poluição atmosférica

A exposição à câmara de ar poluído do CPA teve início no 7º dia de vida pós-natal, e os filhotes eram mantidos com as mães durante a exposição (Grupo poluição). Filhotes com a mesma idade foram expostos à câmara de ar filtrado, para obtenção do grupo controle. No 21º dia de vida, foi realizado desmame e as proles foram separadas por sexo. Os animais foram expostos ao MP≤2,5 ou ar filtrado, 5 dias por semana, durante 30 dias (P7 – P60). Os animais machos e fêmeas foram agrupados de acordo com o procedimento (Poluição e ar filtrado, N=7/grupo), e mantidos em número de 4 por caixa.

O CPA concentra o MP≤2,5 de tamanho aerodinâmico. Os animais receberam uma concentração de 600 µg/m³ de MP≤2,5 que representa a concentração média diária total inalada por indivíduos que vivem na região de Pinheiros, onde o CPA está instalado[30].

A figura abaixo representa os valores de $MP_{2,5}$ em São Paulo, região de Pinheiros, durante os dias de exposição dos animais.

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

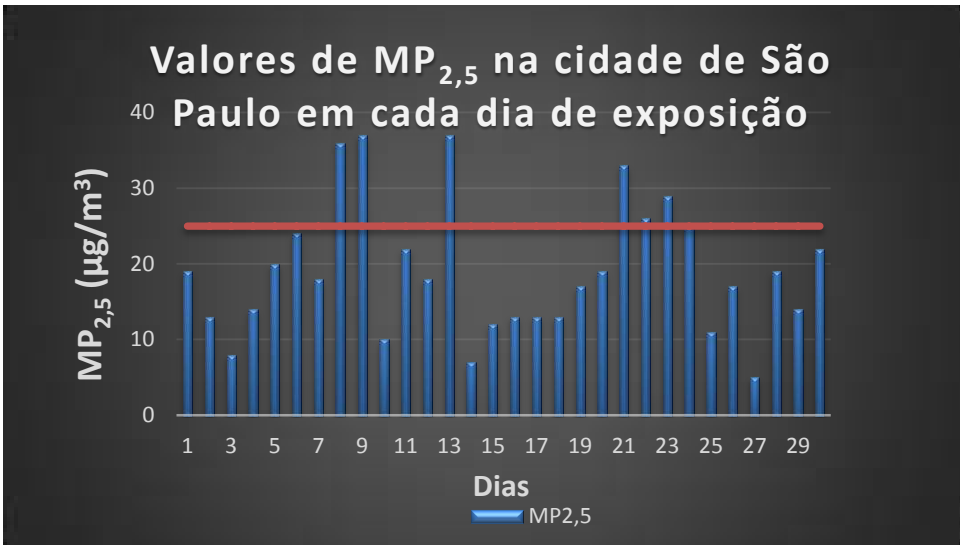

Figura 1. Valores de $MP_{2,5}$ medidos na estação da CETESB em Pinheiros da cidade de São Paulo durante os dias de exposição dos animais entre os meses de agosto a setembro de 2018. O valor preconizado pela OMS é de 25 ug/m^3 em 24h.

A região de Pinheiros, cidade de São Paulo, foi estrategicamente escolhida para a instalação do CPA, devido alto tráfego de veículos movidos a diesel, portanto, com alta taxa de MP≤2,5 resultante da queima do combustível fóssil. O CPA foi desenvolvido pela Escola de Saúde Pública de Harvard nos Estados Unidos e faz uso da 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[31]. É provido de um medidor de poluentes digital (Data RAM) que faz a leitura online da concentração de MP≤2,5 dentro da câmara, e a partir dos valores obtidos é possível calcular o tempo de exposição para a concentração desejada.

Estima-se que um indivíduo que vive nesta região aspire uma concentração média de 600 µg/m³, em 24h. Para que os ratos recebam concentrações similares de $MP_{\leq 2,5}$ no CPA, o tempo de exposição pode ser calculado pela seguinte fórmula, lembrando que os valores de MP são medidos online pelo Data RAM.

Cálculo do tempo de exposição

CA = Exposição desejada aos animais = 600 µg/m³
CC = Concentração medida online na câmara = 495 µg/m³

$$tempo\ de\ exposição = \frac{CA}{CC}\ x\ 60\ minutos$$
$$= \frac{600}{495}\ x\ 60\ minutos$$
$$= 72.7\ minutos$$
$$= 1\ hora\ e\ 13\ minutos\ de\ exposição$$

De uma maneira geral, o tempo de exposição não ultrapassa o período de 2h. Durante a exposição, os animais ficaram acondicionados em gaiolas de moradia, livres para respirar naturalmente e com acesso à ração e água *ad libitum*.

Avaliação comportamental

Ao término da exposição ao MP≤2,5 ou ao ar filtrado nas câmaras do CPA, ou seja, 60 dias do período pós-natal, os animais foram levados de volta ao biotério da Disciplina de Neurociência da UNIFESP e alojados em gaiolas de polipropileno dispostas em estantes ventiladas, permanecendo por um período de adaptação de no mínimo cinco dias antes do início dos testes comportamentais para evidenciar a presença de comportamentos característicos de depressão e ansiedade.

Rotineiramente, entre um experimento e outro, todos os aparatos usados nos testes foram limpos com álcool 70%, com a finalidade de evitar interferência causada pelo odor do animal anterior. Antes do início de cada teste, os animais foram deixados na sala de comportamento por 60 minutos para habituação. Os animais

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

realizaram os seguintes testes comportamentais: campo aberto e teste de preferência a sacarose. O teste comportamental campo aberto foi conduzido no período matutino (9h às 13h) e o teste de preferência a sacarose foi realizado as 17h e teve duração de 24h.

Teste de locomoção em campo aberto

O teste de locomoção em Campo Aberto (CA) foi realizado em uma única sessão de 10 minutos, na qual os animais foram colocados sozinhos, no centro do aparato (campo circular de 1 m de diâmetro) e tiveram seu comportamento filmado. A distância percorrida e o tempo de permanência no centro do aparato foram calculados utilizando o software AnyMaze®. A análise se baseia em avaliar o comportamento frente à novos ambientes, e investiga a atividade exploratória dos animais, sendo possível avaliar a ansiedade e atividade locomotora[32].

Teste de preferência por sacarose

Este teste é utilizado para avaliar os efeitos da anedonia induzida por estresse[34] e consiste na livre escolha entre duas soluções, água e sacarose 0,8%. Os animais foram isolados e habituados a beberem água de duas garrafas com 250 mL cada, por 24h (habituação). No segundo dia uma das garrafas de água foi substituída por uma solução de sacarose 0,8% (medida basal). Após 24h foi feita a primeira medida e a posição das garrafas foi invertida para evitar o viés da preferência do animal por um lado específico e, 24h após esta medida, foi realizada a última medida. O consumo das soluções (mL) foi mensurado por meio de uma proveta, no período de 24 e 48h após a apresentação da solução de sacarose[35,36]. O consumo de líquidos nos dois dias foi somado e a preferência por sacarose foi calculada pela seguinte fórmula.

$$PS = \frac{CS}{CTL\ (sacarose+água)} \times 100$$

Onde:
PS = Preferência por sacarose
CS = Consumo de sacarose
CTL = Consumo total de líquido

Eutanásia

Todos os animais do estudo foram anestesiados com Cetamina (150 mg/Kg i.p.) e Xilasina (30 mg/Kg i.p.) e posteriormente eutanasiados por decapitação.

Análise estatística

Para todas as análises descritas, foram obedecidos os pré-requisitos de normalidade e homogeneidade de variâncias. O nível de significância adotado para todo o estudo foi de 5% e o tamanho da amostra seguiu o padrão de 7 animais/grupo. Os testes adotados para estes casos foram ANOVA two-way seguido de post-Hoc Bonferroni. Para os dados que não cumpriram estes pré-requisitos, foi realizada a padronização com z-escore a fim de corrigir a não-normalidade da distribuição e a correção de Welch para corrigir a não-homogeneidade de variâncias. As análises foram realizadas pelo software estatístico IBM SPSS Statistics 20®.

RESULTADOS

Teste de campo aberto

Os comportamentos avaliados pelo teste de campo aberto foram a atividade locomotora e o tempo de permanência do rato no centro do aparato, que permite avaliar a presença de ansiedade.

Os dados mostraram que ratos machos do grupo poluição apresentaram menor atividade locomotora comparados aos ratos do grupo controle (9,4±20,0 m versus 16,3±28,8 m; $F(1,24)=7,47$; $p=0,012$). Esses dados indicam aumento de ansiedade nos machos do grupo poluição devido a baixa atividade locomotora. Essa alteração não foi observada nas fêmeas do grupo poluição comparado ao grupo controle ($p=0,39$). No entanto, as fêmeas de ambos os grupos apresentaram comportamento de hiper-locomoção em relação aos machos poluição ($F(1,24)=35,29$; $p=0,001$) e machos controle ($F(1,24)=5,426$; $p=0,02$). Não houve alteração na atividade locomotora entre os grupos poluição e controle (machos+fêmeas) ($p=0,20$). Os dados estão expressos na Tabela 1.

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Tabela 1. Atividade locomotora medida pela distância percorrida (m) no aparato entre os grupos poluição e controle no teste de campo aberto.

Condição	Macho	Fêmea
Controle	16,28 ± 28,86	21,14 ± 56,21 #
Poluição	9,42 ± 20,00 *	23,00 ± 58,85 ##

Dados expressos em média ± desvio padrão (*p<0,01, comparação com os machos do grupo controle; #p<0,02, ##p<0,001 comparação com os machos do grupo controle e poluição).

A análise do tempo de permanência do animal no centro do aparato mostrou diferença significante entre os ratos machos do grupo poluição comparado ao grupo controle. O tempo de permanência dos animais machos do grupo poluição foi menor comparado aos machos controle (Poluição versus Controle: 14,3±9,0 s versus 40,4±29,2 s) e a diferença foi significante [F(1,24)=4,73; p=0,040]. Não houve diferença significante quando se comparou fêmeas do grupo poluição e fêmeas do grupo controle (p=0,22), mas houve diferença significante na comparação entre fêmeas e machos do grupo controle (F(1,24)=7,361; p=0,01). As fêmeas permaneceram menos tempo no centro do aparato do que os machos controles, indicando menor ansiedade. Os resultados são indicativos da presença de ansiedade nos ratos machos expostos ao MP≤2,5 comparados ao grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2. Tempo de permanência no centro do aparato (s) do campo aberto.

Condição	Macho	Fêmea
Controle	40,44 ± 29,19	7,82 ± 2,25 #
Poluição	14,30 ± 9,03 *	23,04 ± 32,92

Dados expressos em média ± desvio padrão. (*p<0,04, comparação com os machos do grupo controle; #p<0,01, comparação com os machos do grupo controle).

Teste de preferência por sacarose

O teste de preferência por sacarose mostrou a presença de anedonia no grupo poluição comparado ao grupo controle. Um menor percentual de ratos do grupo poluição teve preferência por sacarose (62,3±21,5%) quando comparado ao grupo controle (80,9±5,7%), e os dados foram significantes (F(1,24)=18,500; p= 0,001) (Figura 2).

A análise do mesmo parâmetro por sexo, revelou a presença de anedonia nos ratos machos do grupo poluição comparados aos machos do grupo controle. O percentual de ratos machos do grupo poluição apresentou menor preferência por sacarose (47,1±20,5%) comparado ao grupo controle (83,6±7,0%), e a diferença foi significante (F(1,24)=35,729; p=0,001). A comparação entre machos e fêmeas do grupo poluição também mostrou a presença de anedonia nos machos. Um menor percentual de ratos machos apresentaram preferência por sacarose (47,1±20,5%) quando comparados às fêmeas (77,51±7,00%), e a diferença foi significante (F(1,24)=24,81; p=0,001). Os dados mostram que a exposição ao MP≤2,5 induz anedonia, comportamento sugestivo de depressão, e o efeito é observado em ratos machos (Figura 3).

DISCUSSÃO

O presente estudo mostra que ratos expostos ao MP≤2,5 durante o desenvolvimento causa alterações comportamentais na vida adulta, compatíveis com depressão e ansiedade, e essas alterações ocorrem principalmente nos machos. O protocolo de exposição ao $MP\leq_{2,5}$ buscou mimetizar a condição de pessoas que vivem em regiões com altas taxas de poluentes, como é o caso das pessoas que vivem na região de Pinheiros na cidade de São Paulo. A região tem expressivo tráfego de veículos com queima de diesel responsável por produzir altas taxas de MP≤2,5, podendo atingir 2-2,5 vezes o valor das taxas preconizadas pela OMS que é de 10 $\mu g/m^3$ como média anual máxima.

Estudos epidemiológicos e em modelos experimentais relatam o impacto da toxicidade de poluentes atmosféricos em períodos gestacionais e pós-natais, no comportamento e nas habilidades cognitivas[5,12,24,29].

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

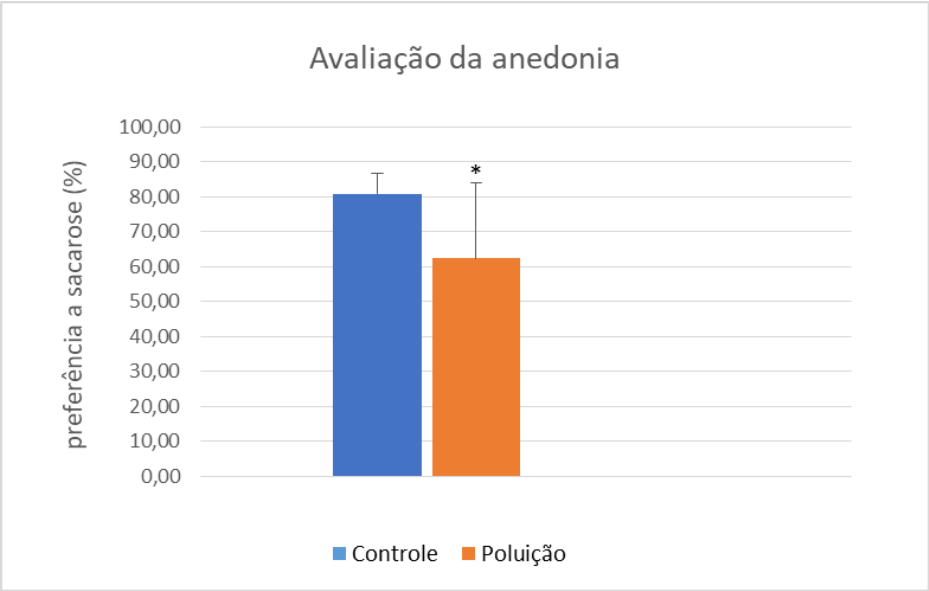

Figura 2. Porcentagem de animais que manifestaram preferência por sacarose nos grupos poluição e controle (machos+fêmeas). Dados expressos em média ± desvio padrão (*p<0,001).

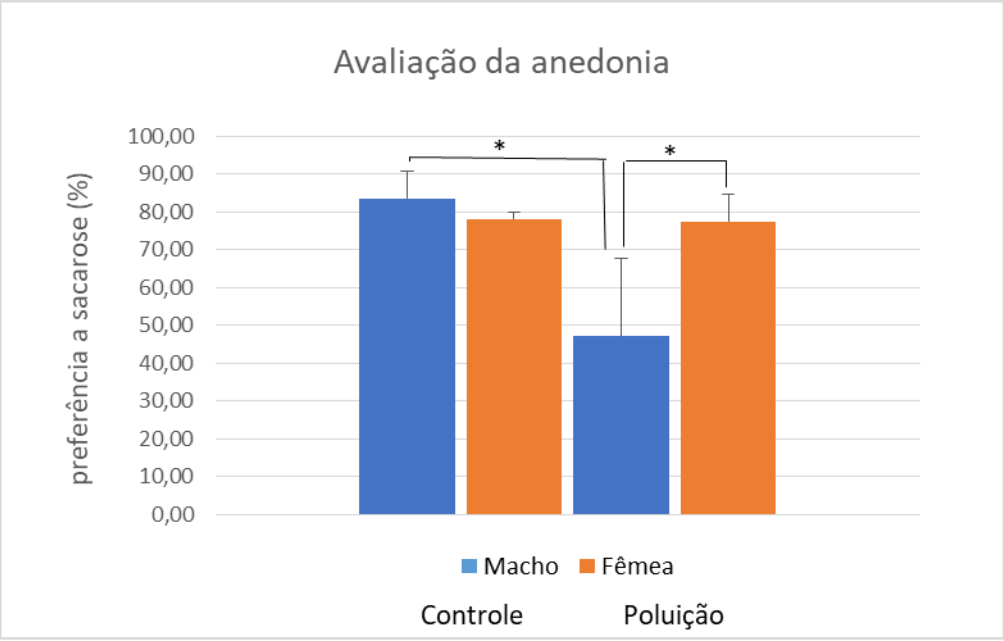

Figura 3. Porcentagem de animais machos e fêmeas, que apresentaram preferência por sacarose nos grupos poluição e controle. Dados expressos em média ± desvio padrão (*p<0,001).

Zhang et al.[5], investigaram o efeito da exposição ao $MP_{2,5}$ em diferentes doses, em camundongos gestantes, e mediram o impacto no comportamento da prole. Os autores mostraram por meio de teste do campo aberto, que os animais expostos à altas taxas de MP≤2,5 apresentaram redução significante na atividade locomotora e diminuição do tempo de permanência no centro do aparato, sugerindo a presença de ansiedade. Os dados do presente estudo corroboram os de Zhang et al.[5] pois mostram que a exposição ao MP≤2,5 causa ansiedade em ratos machos adultos, embora os estudos tenham empregado animais diferentes e

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

protocolos de exposição também distintos. Os ratos do presente estudo foram expostos ao poluente durante a fase inicial do período pós-natal, e no estudo de Zhang, camundongos foram expostos no período gestacional.

Esse mesmo estudo[5] mostrou a presença de comportamento depressivo nos camundongos expostos a média e alta taxa de MP, estimado por meio de medida de imobilidade no teste de suspensão da cauda.

No presente estudo, o teste de preferência à sacarose foi usado para avaliar o comportamento de depressão e os dados mostram que ratos expostos ao MP apresentam anedonia, um comportamento que indica a presença de depressão, e o mesmo não é observado nos ratos expostos ao ar filtrado usado como grupo controle.

A presença de depressão foi descrita também no estudo de Woodward et al.[24]. Os autores submeteram camundongos a uma longa exposição à poluição, com início no período gestacional e término na fase adulta jovem, e mostraram alterações comportamentais compatíveis com depressão. Os autores empregaram o teste de natação forçada e observaram que os animais do grupo poluição permaneciam 80% do tempo em imobilidade total. Além disso, analisaram a ansiedade pelo teste de labirinto em cruz elevado, porém não encontraram diferença significante entre os grupos poluição e controle [24].

O presente estudo avaliou o comportamento de ansiedade por meio do teste de campo aberto. Os parâmetros avaliados foram distância percorrida e tempo de permanência no centro do aparato. Os dados mostraram que os animais machos do grupo poluição tiveram baixa atividade locomotora e menor tempo de permanência no centro quando comparados aos animais machos do grupo controle, sugerindo a presença de ansiedade nos animais machos adultos expostos à poluição durante fase inicial do desenvolvimento. Dados similares foram demonstrados em estudos prévios empregando camundongos[23]. De acordo com esses autores, os mecanismos responsáveis por essas alterações comportamentais não estão claramente elucidados, no entanto, disfunções moleculares que incluem inflamação e estresse oxidativo em áreas como o cortéx pré-frontal, hipotálamo, hipocampo e amígdala podem estar envolvidas[22-24]. Outros delineamentos experimentais sugerem uma ligação causal entre o aumento do estresse oxidativo e o consequente acúmulo de espécies de radicais livres no hipocampo e amígdala associados aos déficits comportamentais[23,37], principalmente porque a amígdala desempenha importante papel na modulação das emoções[23,38,39].

Há relatos de que a exposição à poluentes atmosféricos, em especial ao $MP_{2,5,}$ no período pré-natal e inicial da vida, pode prejudicar a neurogênese hipocampal além de intensificar a resposta inflamatória cerebral[5]. Essas alterações podem provocar comportamentos depressivos[24,41]. A ativação da micróglia hipocampal e o aumento da expressão de algumas citocinas pró-inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-α), prejudicam a neurogênese e dessa forma podem representar fatores de risco para o aparecimento de déficits comportamentais[24]. Em particular, a citocina Interleucina 1-beta (IL-1β) tem sido associada à redução da plasticidade hipocampal, e a alterações comportamentais características da depressão[22,42]. Alteração na micróglia durante o desenvolvimento neural é crítico pois pode induzir mudanças de longo prazo na função cerebral e comportamental na vida adulta[40].

A exposição ao MP durante a fase inicial do desenvolvimento não causou alterações comportamentais características de depressão e ansiedade em fêmeas quando comparadas ao grupo controle. Grande parte dos estudos epidemiológicos mostram que a depressão afeta principalmente as mulheres[43,44]. Essa predisposição se deve, em parte, ao efeito dos hormônios sexuais e fluxos hormonais durante o desenvolvimento do cérebro. Os parâmetros comportamentais de ansiedade podem alterar em Wistar fêmeas de acordo com as fases do ciclo estral[45]. Ratas nas fases proestro-estro apresentam aumento significativo no número de entradas e permanência no braço aberto do labirinto em cruz elevado, sugerindo reduzidos níveis de ansiedade[45]. O ciclo estral das fêmeas não foi avaliado no presente estudo, o que talvez pudesse explicar parte dos resultados obtidos.

Estudos apontam diferenças sexuais em animais machos e fêmeas durante o neurodesenvolvimento. A colonização microglial do cérebro de machos é mais ativa, e as fêmeas parecem ser menos sensíveis às alterações do sistema imunológico no início da vida[26,40] . Além disso, outro estudo mostra que o sexo e os determinantes genéticos podem modular de

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

forma diferente o efeito neurotóxico entre camundongos machos e fêmeas. Os machos se mostraram mais suscetíveis ao efeito tóxico de poluentes da queima de diesel do que as fêmeas, e isso se deve ao baixo nível de expressão da enzima paraoxonase-2 (PON2) no tecido cerebral[46]. Os estrogênios das fêmeas estimulam o aumento da expressão de PON2, e essa enzima tem efeito antioxidante e anti-inflamatório. Altos níveis de PON2 no cérebro e em outros tecidos têm sido associado com redução da susceptibilidade ao estresse oxidativo e neuroinflamação[46,47].

Allen et al.[26] expuseram animais machos e fêmeas à poluição atmosférica durante o período pós-natal e observaram que os machos apresentavam dilatação do ventrículo lateral. A ventriculomegalia foi considerado um preditor de baixo desenvolvimento neurológico. Esses achados são consistentes com a literatura que mostra que os homens têm maior probabilidade de serem diagnosticados com distúrbios neurológicos e neuropsicológicos na infância, incluindo autismo, esquizofrenia e transtorno do déficit de atenção, do que as mulheres[12]. A neurotoxicidade nas fêmeas aparece em períodos mais tardios da vida, razão pela qual o efeito deletério da poluição durante o desenvolvimento somente ocorre mediante concentrações elevadas de MP ou por longos períodos de exposição.

Allen et al.[26] avaliaram a atividade locomotora de camundongos machos e fêmeas expostos à poluição durante fase inicial pós-natal e fase adulta e mostraram que fêmeas apresentavam efeito cumulativo quanto a distância percorrida quando as exposições eram feitas em combinação, no período pós-natal e fase adulta[48]. Da mesma forma, o comportamento depressivo não foi observado nas fêmeas expostas à poluição na fase pré-natal, avaliadas pelo teste de natação forçada[27], corroborando os achados da presente pesquisa.

CONCLUSÃO

A exposição ao MP≤2,5 causou alterações comportamentais de depressão e ansiedade em ratos machos adultos expostos durante o período inicial do desenvolvimento. Os mecanismos envolvidos nestas respostas não foram estudados nesta etapa do trabalho, mas alguns experimentos para avaliar morte celular e neuroinflamação estão em andamento. Abordagens experimentais que tragam novas informações sobre a ação dos principais poluentes do ar na geração de doenças do SNC e os mecanismos envolvidos são fundamentais para que se estabeleçam formas de prevenção e tratamento mais eficientes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, e os membros do Laboratório de Poluição Ambiental (LIM-05) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) pelo apoio técnico-cientifico e uso da CPA.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization (WHO). Ambient Air Pollution: A global assessment of exposure and burden of disease. World Heal Organ [Internet]. 2016;1-131. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250141/9789241511353eng.pdf?sequence=1%0Awww.who.int.org

2. Ku T, Ji X, Zhang Y, Li G, Sang N. PM2.5, SO2 and NO2 co-exposure impairs neurobehavior and induces mitochondrial injuries in the mouse brain Tingting. Chemosphere. 2016;163(2):27-34. DOI: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.009

3. Cipriani G, Danti S, Carlesi C, Borin G. Danger in the Air: Air Pollution and Cognitive Dysfunction. Vol. 33, American Journal of Alzheimer's Disease and other Dementias. 2018; 33(6):333-341. DOI: http://dx.doi.org/10.1177/1533317518777859

4. 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. Biomedical Journal. Elsevier Ltd. 2018; 41(3):141-162. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.06.001

5. Zhang T, Zheng X, Wang X, Zhao H, Wang T, Zhang H, et al. Maternal exposure to PM 2.5 during pregnancy induces impaired development of cerebral cortex in mice offspring. Int J Mol Sci. 2018;19(1):1-17. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms19010257

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

6. Block ML, Elder A, Auten RL, Bilbo SD, Chen H, Chen C, et al. The Outdoor Air Pollution and Brain Health Workshop. Neurotoxicology. 2013;33(5):972-84. DOI: https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.08.014.

7. Kam W, Liacos JW, Schauer JJ, Delfino RJ, Sioutas C. Size-segregated composition of particulate matter (PM) in major roadways and surface streets. Atmos Environ. 2012;55:90-7. DOI: https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.03.028

8. Brauer M, Avila-casado C, Fortoul TI, Vedal S, Stevens B, Churg A. Air Pollution and Retained Particles in the Lung. Environ Health Perspectives. 2001;109(10):1039-43. DOI: https://doi.org/10.1289/ehp.011091039

9. Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, Asgharian B, Hext PM, Warheit DB, et al. Pulmonary Responses of Mice , Rats , and Hamsters to Subchronic Inhalation of Ultrafine Titanium Dioxide Particles. Toxicological Sciences. 2004;77(2):347-57. DOI: https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh019

10. Kim S, Jaques PA, Chang M, Barone T. Versatile aerosol concentration enrichment system (VACES) for simultaneous in vivo and in vitro evaluation of toxic effects of ultra&ne, &ne and coarse ambient particles Part II: Field evaluation. Aerosol Science. 2001; 32:1299-314. https://doi.org/10.1016/S0021-8502(01)00058-1

11. Valavanidis A, Fiotakis K. Airborne Particulate Matter and Human Health: Toxicological Assessment and Importance of Size and Composition of Particles for Oxidative Damage and Carcinogenic Mechanisms. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev. 2008; 26(4):339-362. DOI: https://doi.org/10.1080/10590500802494538

12. Allen JL, Oberdorster G, Morris-Schafer K, Wong C, Klocke C, Sobolewski M et al. Developmental neurotoxicity of inhaled ambient ultrafine particle air pollution: Parallels with neuropathological and behavioral features of autism and other neurodevelopmental disorders. Neurotoxicology. 2017; 59(1):140-154. DOI: https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.12.014

13. Cohen AJ, Brauer M, Burnett R, Anderson HR, Frostad J, Estep K, et al. Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution : an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015. Lancet. 2015;389(10082):1907-18. DOI: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30505-6

14. Borisova T. Nervous system injury in response to contact with environmental, engineered and planetary micro- and nano-sized particles. Frontiers in Physiology. 2018; 9(1):1-16. DOI: https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00728

15. Landrigan PJ, Fuller R, Acosta NJR, Adeyi O, Arnold R, Basu NN, et al. The Lancet Commission on pollution and health. The Lancet. 2018; 391(10119): 462-512. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32345-0

16. World Air Quality Report. 2018; Available from: http://aqicn.org/city/mexico/mexico/camarones.

17. Qualidade do ar no estado de São Paulo. 2016 [Internet]. Available from: https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2017/09/relatorio-ar-2016.pdf.

18. Abe KC, El Khouri Miraglia SG. Health impact assessment of air pollution in São Paulo, Brazil. Int J Environ Res Public Health. 2016;13(7):1-10. DOI: https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00728

19. Ho AFW, Zheng H, Earnest A, Cheong KH, Pek PP, Seok JY, et al. Time-Stratified Case Crossover Study of the Association of Outdoor Ambient Air Pollution With the Risk of Acute Myocardial Infarction in the Context of Seasonal Exposure to the Southeast Asian Haze Problem. J Am Heart Assoc. 2019;8(6):1-10. DOI: https://doi.org/10.1161/JAHA.118.011272

20. Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux A V., et al. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the american heart association. Vol. 121, Circulation. 2010; 121(21):2331-78. DOI: https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e3181dbece1

21. Cakmak S, Dales RE, Vidal CB. Air pollution and hospitalization for epilepsy in Chile. Environ Int. 2010;36(6):501-5. DOI:

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.03.008

22. Fonken LK, Weil XX, Chen G, Sun Q, Rajagopalan S, Nelson RJ, et al. Air pollution impairs cognition, provokes depressive-like behaviors and alters hippocampal cytokine expression and morphology. Mol Psychiatry. 2011;16(10):973-87. DOI: https://doi.org/10.1038/mp.2011.76

23. Salvi A, Patki G, Liu H, Salim S. Psychological Impact of Vehicle Exhaust Exposure: Insights from an Animal Model. Sci Rep. 2017;7(1):1-8. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-017-08859-1

24. Woodward NC, Haghani A, Johnson RG, Hsu TM, Saffari A, Sioutas C, et al. Prenatal and early life exposure to air pollution induced hippocampal vascular leakage and impaired neurogenesis in association with behavioral deficit. Transl Psychiatry. 2018;8(1):1-10. DOI: https://doi.org/10.1038/s41398-018-0317-1

25. Cory-Slechta DA, Allen JL, Conrad K, Marvin E, Sobolewski M. Developmental exposure to low level ambient ultrafine particle air pollution and cognitive dysfunction. Neurotoxicology. 2018;69(1):217-31. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2017.12.003

26. Allen JL, Liu X, Pelkowski S, Palmer B, Conrad K, Oberdörster G, et al. Early postnatal exposure to ultrafine particulate matter air pollution: Persistent ventriculomegaly, neurochemical disruption, and glial activation preferentially in male mice. Environ Health Perspect. 2014;122(9):939-45. DOI: https://doi.org/10.1289/ehp.1307984

27. Davis DA, Bortolato M, Godar SC, Sander TK, Iwata N, Pakbin P, et al. Prenatal Exposure to Urban Air Nanoparticles in Mice Causes Altered Neuronal Differentiation and Depression-Like Responses. PLoS One. 2013;8(5):1-7. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064128

28. Volk HE; Messer MPH, Lurmann F, Penfold B, Hertz-Picciotto I McConnell R. Traffic Related Air Pollution, Particulate Matter, and Autism. JAMA Psychiatry. 2013;70(1):71-7. DOI: https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.266

29. Sunyer J, Esnaola M, Alvarez-Pedrerol M, Forns J, Rivas I, López-Vicente M, et al. Association between Traffic-Related Air Pollution in Schools and Cognitive Development in Primary School Children: A Prospective Cohort Study. PLoS Med. 2015;12(3):1-24. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001792

30. Yoshizaki K, Fuziwara CS, Brito JM, Santos TMN, Kimura ET, Correia AT, et al. The effects of urban particulate matter on the nasal epithelium by gender: An experimental study in mice. Environ Pollut. 2016;213:359-69. DOI: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.02.044

31. Brito JM, Macchione M, Yoshizaki K, Toledo-Arruda AC, Saraiva-Romanholo BM, Andrade MF, 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. 2014;117(5):492-9. DOI: https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00156.2014

32. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. J Vis Exp. 2015;(96):1-6. DOI: https://doi.org/10.3791/52434

33. Fernandes VS, Santos JR, Leão AHFF, Medeiros AM, Meloa TG, Izidioa GS et al. Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. Pak J Pharm Sci . 2012;(2):154-63. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.03.008

34. Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: Consistency and behavioural- neurobiological concordance in the effects of CMS. Neuropsychobiology. 2005;52(2):90-110. https://doi.org/10.1159/000087097

35. Tadaiesky MT, Dombrowski PA, Figueiredo CP, Cargnin-Ferreira E, Da Cunha C, Takahashi RN. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. Neuroscience. 2008;156(4):830-40. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.08.035

36. Slattery DA, Markou A, Cryan JF. Evaluation of reward processes in an animal model of depression. Psychopharmacology (Berl). 2007;190(4):555-68. DOI:

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

https://doi.org/10.1007/s00213-006-0630-x

37. Salim S, Asghar M, Taneja M, Hovatta I, Chugh G, Vollert C et al. Potential Contribution of Oxidative Stress and Inflammation to Anxiety and Hypertension. Brain Res. 2011;1404(1):63-71. DOI: https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.024

38. Phelps EA, LeDoux JE. Contributions of the amygdala to emotion processing: From animal models to human behavior. Neuron. 2005;48(2):175-87. DOI: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.025

39. Shin LM, Liberzon I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. Neuropsychopharmacology [Internet]. 2010;35(1):169-91. DOI: http://dx.doi.org/10.1038/npp.2009.83

40. Schwarz, Jaclyn; Scholar, Paige; Bilbo S. Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain. J Neurochem. 2012;6:948-963. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07630.x

41. Miller B and Hen R. The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. Curr Opin Neurobiol. 2015;51-8. https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.08.012

42. Goshen I, Kreisel T, Ben-Menachem-Zidon O, Licht T, Weidenfeld J, Ben-Hur T, et al. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. Mol Psychiatry. 2008;13(7):717-28. DOI: https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002055

43. Beery, Annaliese and Zucker I. Sex Bias in Neuroscience and Biomedical Research. Neurosci Biobehav Rev. 2011;35(3):565-72. DOI: https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.07.002

44. Kessler C, Mcgonagle KA, Swartz M, Blazer DG, Nelson B. Sex and depression in the National Comorbidity Survey I: Lifetime prevalence, chronicity and recurrence. J Affect Disord. 1993; 29(2-3):85-96. DOI: https://doi.org/10.1016/0165-0327(93)90026-G

45. D'Souza D, Sadananda M. Estrous cycle phase-dependent changes in anxiety-and depression-like profiles in the late adolescent Wistar-Kyoto rat. Ann Neurosci. 2017;24(3):136-45. DOI: http://dx.doi.org/10.1159/000477151.

46. Cole Toby; Coburn Jacki; Dao Khoi; Roque Pam; Chang Yu-Chi; Kalia Vrinda; Guilarte Tomas; Dziedzic Jennifer and Costa Lucio. Sex and genetic differences in the effects of acute diesel exhaust exposure on inflammation and oxidative stress in mouse brain. Toxicology. 2016;374:1-9. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2016.11.010.

47. Bourquard, Noam; Ng, Carey; Reddy S. Impaired hepatic insulin signalling in PON2-deficient mice: a novel role for the PON2/apoE axis on the macrophage inflammatory response. Biochem J. 2011;436(1):91-100. DOI: http://dx.doi.org/10.1042/BJ20101891.

48. Allen JL, Liu X, Weston D, Prince L, Oberdörster G, Finkelstein JN, et al. 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. 2014;140(1):160-78. DOI: http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfu059.

Artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).