Análise imunohistológica do tecido pulmonar de camundongos LDLr -/- expostos a poluição atmosférica com indução de dieta hipercolesterolêmica.

Immunohistological analysis of the lung tissue of LDLr -/- mice exposed to atmospheric pollution with hypercholesterolemic diet induction.

Silva, CB[1],AlemanyAAS[2],CostaNSX[3]

Resumo

Poluente atmosférico é definido como toda e qualquer substância que esteja presente no ar e que seja nociva à saúde humana, bem como à flora e fauna. As partículas pequenas são capazes de causar resposta inflamatória generalizada no organismo, nesse experimento mostrando com ênfase nos vasos do endotélio pulmonar. Este trabalho tem como objetivo analisar os efeitos sobre o sistema respiratório, devido a exposição à poluição do ar, associado a uma dieta hipercolesterolêmica, em camundongos LDLr -/-. Como modelo experimental foi utilizado camundongos machos, C57Bl/6 com deficiência do receptor LDL (LDLr -/-), divididos em 4 grupos, onde foram expostos ao ar filtrado (AF) e ao ar concentrado de partículas ambientais(CPA) induzidos por uma dieta normal e dieta hipercolesterolêmica. Foram utilizados os marcadores endotelina e Oxido Nítrico Sintase Endotelial (E-Nos) para ativação endotelial, sendo marcadores comuns aos humanos e camundongos. Quando analisados estatisticamente, tanto o marcador Endotelina quanto E-Nos, não apresenta diferença significativa para as alterações nos vasos pulmonares. Estudos anteriores mostraram que os animais geneticamente predispostos quando induzido por uma dieta hipercolesterolêmica e expostos a poluição atmosférica, aumentam as expressões de proteínas envolvidas em processos inflamatórios.

Palavras chave: Poluente atmosférico; camundongos LDLr -/-; dieta normal/dieta hipercolesterolêmica

Abstract

Air pollutant is defined as any substance present in the air that is harmful to human health, as well as to flora and fauna. Small particles are capable of causing widespread inflammatory response in the body, in this experiment showing with emphasis on the pulmonary endothelium vessels. This study aims to analyze the effects on the respiratory system due to exposure to air

1. Graduanda do curso de Ciências Biológicas da Universidade Paulista, Vergueiro – SP, Brasil
2. Professora do curso de Ciências Biológicas da Universidade Paulista – SP, Brasil
3. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, Brasil

pollution associated with a hypercholesterolemic diet in LDLr - / - mice. As an experimental model, C57Bl / 6 LDL receptor deficient (LDLr -/-) mice were divided into 4 groups, where they were exposed to filtered air (AF) and concentrated air of environmental particles (CPA) induced by a normal diet. and hypercholesterolemic diet. Endothelin and Nitric Oxide Endothelial Synthase (E-Nos) markers were used for endothelial activation, being common markers to humans and mice. When statistically analyzed, both Endothelin and E-Nos marker did not present significant difference for changes in pulmonary vessels. Previous studies have shown that genetically predisposed animals when induced by a hypercholesterolemic diet and exposed to atmospheric pollution increase the expression of proteins involved in inflammatory processes.
Key Words: Air pollutant; LDLr-/- mice; normal diet/ hypercholesterolemic diet

Introdução

Os poluentes atmosféricos encontrados em grandes cidades provocam afecções agudas e crônicas no trato respiratório, mesmo em concentrações abaixo do padrão de qualidade do ar.[1]"O grupo de pesquisadores do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) tem se dedicado ao estudo deste problema acumulando certa experiência em demonstrar efeitos adversos à saúde associados aos diversos poluentes do ar".[2] Veículos automotivos e as indústrias, são os principais poluentes atmosféricos, estando presentes em todos os grandes centros urbanos.

Atualmente as pessoas não se importam com sua alimentação, consumindo dietas hipercalóricas, tanto adultos quanto crianças, que já são influenciados desde pequenos, e por ser mais prático no momento do consumo, ingerindo fast-foods, alimentos processados, ultraprocessados e essa soma "poluição e colesterol" se combinam, causando efeitos prejudiciais aos seres humanos, tanto atualmente, quanto nas futuras gerações. "Dentre as faixas etárias mais atingidas pelos efeitos da poluição do ar estão às crianças e os idosos. Pessoas que já sofrem de problemas respiratórios também se tornam mais suscetíveis a sofrer com a elevação nos níveis de poluentes atmosféricos."[3]Poluente atmosférico é definido como toda e qualquer substância que esteja presente no ar e que seja nociva à saúde humana, bem como à flora e fauna.[4]

"Alguns poluentes são provenientes de atividades antrópicas ou naturais e podem ser divididos em poluentes primários e poluentes secundários, poluentes primários são aqueles lançados diretamente pelas fontes de emissão, como por exemplo: o dióxido de enxofre (SO_2), o ácido sulfídrico (H_2S), os óxidos de nitrogênio (NOx), a amônia (NH_3), o monóxido de carbono (CO), o dióxido de carbono (CO_2), o metano (CH_4), fuligem, e aldeídos. E poluentes secundários são aqueles formados na atmosfera através de reações químicas entre os poluentes primários, com destaque para o peróxido de

hidrogênio (H_2O_2), o ácido sulfúrico ($H2SO_4$), o ácido nítrico (HNO_3), o trióxido de enxofre (SO_3), os nitratos (NO_3^-), os sulfatos (SO_4^{2-}) e o ozônio (O_3).”[5]

Alguns poluentes servem como indicadores da qualidade do ar, sendo monitorados pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (Cetesb), são os principais (Quadro 1).

Quadro1. Poluentes indicadores da qualidade do ar, características e fontes.[6]

Poluente	Características	Fontes Principais	Efeitos ao Meio Ambiente
MP10	Partículas sólidas ou líquidas (faixa de tamanho - <10μ)	Processo de combustão	Danos a vegetação
Partículas totais em suspensão (PTS)	Partículas sólidas ou liquídas (faixa de tamanho - <100μ)	Processos industriais, veículos, poeira e queima de biomassa	Danos a vegetação
Dióxido de Enxofre (SO2)	Gás incolor com forte odor	Processos de queima de óleo combustível	Formação de chuva ácida
Dióxido de Nitrogênio (NO2)	Gás marrom avermelhado com forte odor	Processos de combustão (veículos e indústrias)	Formação de chuva ácida
Monóxido de Carbono (CO)	Gás incolor, inodoro e insípido	Processos de combustão incompleta de veículos.	
Ozônio (O2)	Gás incolor, inodoro nas concentrações ambientais	Não é emitido diretamente para a atmosfera. Produzido pela radiação solar	Danos a colheita e vegetação

“Duas pessoas podem ingerir os mesmos alimentos e manter a mesma rotina de exercícios, mas ao fim de alguns anos, uma pode ganhar peso e um metabolismo mais lento simplesmente por causa do ar em torno do lugar onde vive.”[7]As partículas pequenas são capazes de causar resposta inflamatória generalizada no organismo, nesse experimento mostrando com ênfase nos vasos do endotélio pulmonar.

Modelo animal - Camundongos LDLr-/-

Em humanos, a deficiência dos receptores para a LDL leva a hipercolesterolemia familiar homozigótica, onde os níveis no plasma se aproximam de 1000 mg/dL, o que pode ocasionar um quadro de infarto agudo do miocárdio durante a segunda década de vida.[8] Em camundongos a deficiência para este receptor, provoca apenas uma modesta hipercolesterolemia, com aumento dos níveis séricos das lipoproteínas aterogênicas LDL e HDL, não ocorrendo o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas se não forem alimentados com dieta aterogênica.[9]

Marcadores para ativação endotelial

Foram utilizados os marcadores endotelina e Oxido Nítrico Sintase Endotelial (E-Nos) para ativação endotelial, sendo marcadores comuns aos humanos e camundongos. A endotelina é um peptídeo composto por 21 aminoácidos, existente no ser humano sendo considerado um potente vasoconstritor. Atualmente se sabe da existência de três isoformas (ET-1, ET-2 e ET-3), está família de peptídeos vasoconstritores é produzida em vários tecidos, com a função de moduladores dos tônus vascular, proliferação celular e produção hormonal.[10]

As células endoteliais são os principais sítios de geração da ET-1, sendo também produzida pelo coração (miócitos), rins, sistema nervoso central e células musculares lisas vasculares da aorta humana. A ET-2 é produzida predominantemente dentro dos rins e intestino, e em menor quantidade no miocárdio, placenta, útero e células endoteliais. A ET-2 tem ação vasoconstritora similar da ET-1, enquanto a ET-3 apresenta reduzida ação vasoconstritora. ET-3 é encontrada em altas concentrações no cérebro,

regulando funções importantes nos neurônios e astrócitos, também sendo encontrados no trato gastrintestinal, pulmões e rins, mas não estando presente nas células endoteliais. [11]

A enzima E-Nos produz óxido nítrico em resposta ao incremento do fluxo sanguíneo, é fundamental para a manutenção do sistema vascular. Quando há inibição desta enzima, ocorre diminuição da produção de óxido nítrico, causando disfunção endotelial. Apresenta um papel crucial no estado de vasodilatação dos vasos sanguíneos e na regulação da pressão arterial.[12-13]

O objetivo deste estudo é analisar os efeitos sobre o sistema respiratório, devido a exposição à poluição do ar, associado a uma dieta hipercolesterolêmica, em camundongos LDLr -/-.

Metodologia

Modelo Experimental

Camundongos machos, C57Bl/6 com deficiência do receptor LDL (LDLr -/-), cedidos pelo Laboratório de Lípides (LIM10) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP. Os animais foram divididos em 4 (quatro) grupos, sendo, 0, 1, 2 e 3 e expostos às partículas ambientais concentradas e dieta hipercolesterolêmica, delineando o estudo da seguinte forma onde, Grupo 0 (AF): AF + dieta normal; Grupo 1 (AF): AF + dieta hipercolesterolêmica; Grupo 2 (CPA): CPA + dieta normal; Grupo 3 (CPA): CPA + dieta hipercolesterolêmica por um período aproximado de 20 semanas.

AF – Ar filtrado.

CPA – Concentrador de partículas ambientais.

Ração

Tabela1- Ingredientes adicionados para manipulação da ração experimental. [14]

Ingredientes	%
Caseína	16,5
Amido de milho	53,5
Lipidio	20
Óleo de Coco	**70,1**
Óleo de Soja	**29,9**
Açucar	10
Celulose	5
Mistura de Minerais*	3,5
Mistura de Vitaminas*	1
L-Cistina	0,3
Bitartarato de colina	0,25
Acidocólico	0,5
Colesterol	0,5

* adicionados segundo recomendação da AIN-93 (Reeves et al., 1993).[15]

Análise Imunohistoquímica

Fragmentos de diferentes regiões de tecido pulmonar foram fixados em solução de paraformoldeído 4% tamponado por 24 horas em temperatura ambiente. Após esta etapa, o material foi processado e incluído em parafina.

Posteriormente foram feitos cortes de 5µm e coletados em lâminas silanizadas para a avaliação imunohistoquímica. Nesta análise foi realizada uma avaliação histopatológica de rotina empregando técnicas imunohistoquímicas para a determinação e caracterização da resposta inflamatória nos vasos do endotélio pulmonar (Quadro 2).[16]

Tabela2. Anticorpos primários e processamento utilizado na análise imunohistoquímica – Tecido Pulmonar

Anticorpo	**Pré-Tratamento**	**Espécie**	**Diluição**	**Clone**	**Origem**
Endotelina	PP Citrato	Cabra	1:3000	Policlonal	Santa Cruz – CA USA
ENOS	PP Citrato	Coelho	1:100	Policlonal	NeoMarkers Fremont

Resultado

Para apresentar os resultados, foram realizadas análises estatística demonstrada em gráficos de distribuição não paramétrica, e assimétrica, ou seja, não exigindo que as populações tenham distribuição normal. Quando analisados estatisticamente, tanto o marcador Endotelina quanto E-Nos, não apresenta diferença significativa para as alterações nos vasos pulmonares, seja no grupo controle como nos grupos expostos a poluição e a dieta hipercolesterolêmica.

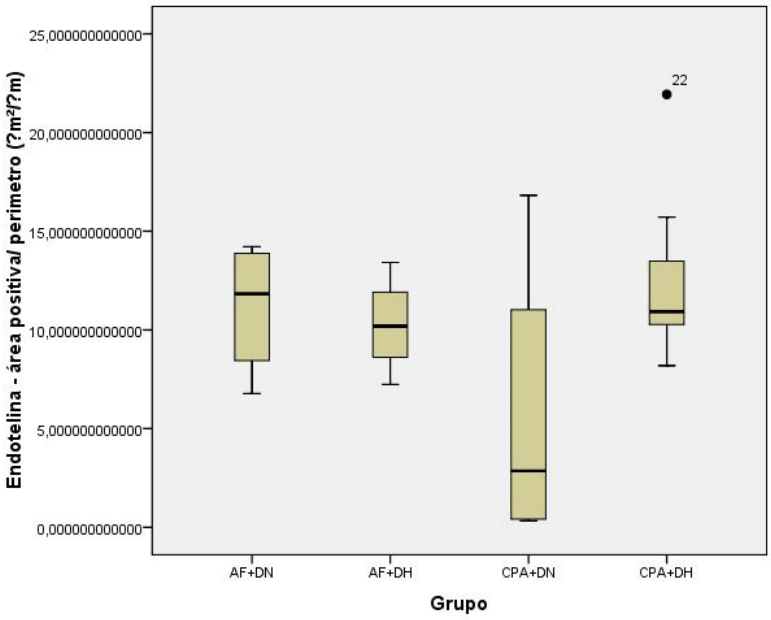

Figura 1: Ativação endotelial – Endotelina (%)

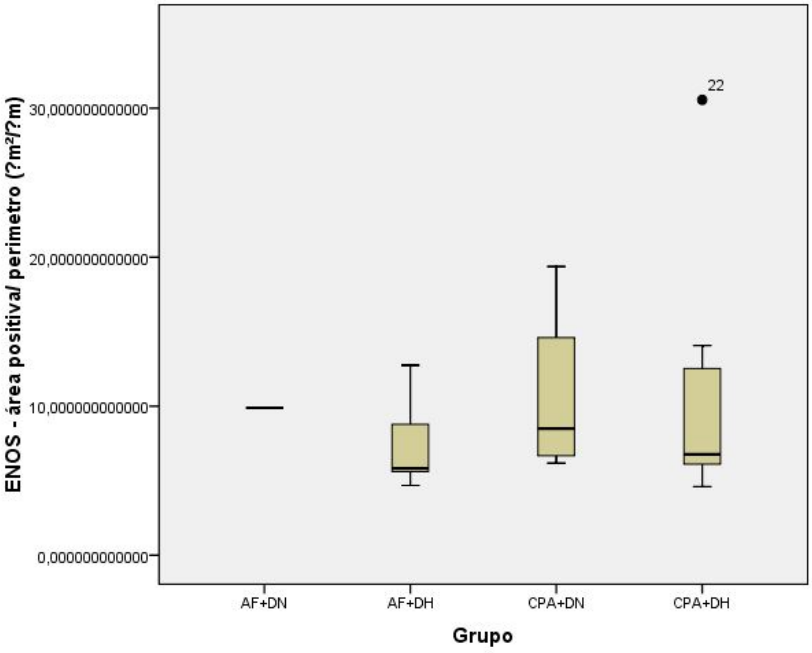

Figura 2: Ativação endotelial – E-Nos(%)

Discussão

Estudos anteriores mostraram que as exposições à poluição do ar aumentam as expressões de proteínas envolvidas em processos inflamatórios, disfunção endotelial e estresse oxidativo.[17-18]

Segundo o estudo de Andrea Rowan-Carroll, Sabina, Andrew Williams, Christophers e Carole verificaram que camundongos expostos a poluição atmosférica por 16 semanas apresentam um aumento na expressão de genes envolvidos na síntese lipídica no tecido pulmonar, o que indica um aumento na síntese de gotículas lipídicas nas células do pulmão após a exposição, sendo associada a câncer ou respostas inflamatórias.A hipótese dessas gotículas de lipídios é seqüestrar os tóxicos, a fim de proteger as células da toxicidade indesejada.Podendo haver distúrbios genéticos após a exposição ao ar total, onde foram associados a várias funções moleculares, incluindo síntese e metabolismo lipídico, morte celular, motilidade celular e câncer/ inflamação.Todas as células são capazes de formar gotículas lipídicas e um pequeno número de gotículas lipídicas também é encontrado no músculo cardíaco e esquelético, fígado e pâncreas. Análise por microarray do período de 10 semanas não revelou genes significativamente alterados.[19]

O presente estudo apresenta que as expressões proteicas, endotelina e E-Nosnão indicaram nenhuma diferença significativa associada ou não a uma dieta hipercolesterolêmica. Tanto no gráfico da endotelina, quanto no gráfico da E-Nos, as linhas medianas estão muito próximas, indicando que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, pelo fato de ter sido utilizado uma amostra pequena, caso houvesse diferença estatisticamente significativa teria que fazer um pós- teste, como nesse caso não houve, não tem necessidade de fazer outro teste.

Conclusão

Até o momento na literatura observa-se que os poluentes atmosféricos tanto primários quanto secundários, encontrados em grandes cidades são prejudiciais à saúde. Estudos anteriores mostraram que os animais geneticamente predispostos quando induzido por uma dieta hipercolesterolêmica e expostos a poluição atmosférica, aumentam as expressões de proteínas envolvidas em processos inflamatórios.

Para o resultado deste estudo, era esperada uma alteração nos vasos do endotélio do modelo animal, devido à exposição à poluição atmosférica e a indução de uma dieta hipercolesterolêmica, sugerindo assim um estudo com maior número de amostra, melhorando a estatística, e obtendo dados mais confiáveis. Aumentaria também o período de exposição do modelo animal para identificar se há alteração significativa sobre o sistema respiratório.

Referências

1. Braga A, Pereira LAA, Saldiva PHN. Poluição atmosférica e seus efeitos na saúde humana. Trabalho apresentado no evento de sustentabilidade na geração e uso de energia; 2002; UNICAMP. Campinas, SP: Faculdade de Medicina da USP; 2002. v.18 p. 20-14

2. Alemany AAS. Influência da dieta hipercolesterolêmica em camundongos nocautes*LDLr -/-* expostos a partículas ambientais concentradas sobre o sistema pulmonar [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2013.

3. Martins LC, LatorreMRDOL, SaldivaPPHN, BragaALF. Relação entre poluição atmosférica e atendimentos por infecção de vias aéreas superiores no município de São Paulo: avaliação do rodízio de veículos.Rev. bras. epidemiol.2001;4 (3):220-9.

4.Poluentes [base de dados na internet]. São Paulo. [atualizada em 2019; acesso em 25 de jul. 2019]. Disponível em: https://cetesb.sp.gov.br/ar/poluentes/

5. Conheça os principais poluentes atmosféricos[base de dados na internet]. [acesso em 25 de jul. 2019]. Disponível em: https://www.ecycle.com.br/2510-poluentes-atmosfericos

6. Alemany AAS. Influência da dieta hipercolesterolêmica em camundongos nocautes*LDLr -/-* expostos a partículas ambientais concentradas sobre o sistema pulmonar [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2013.

7. David Robson. A inesperada relação entre a poluição do ar e a obesidade[base de dados na internet]. [atualizada em 9 dezembro 2015; acesso em 15 de abr. 2019]. Disponível em:https://www.bbc.com/portuguese/noticias/2015/12/151209_vert_fut_obesidade_poluicao_ml

8. Fazio S, Linton MF. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis.Front Biosci. 2001 March 1; 6: D515-D525.

9. Alemany AAS. Influência da dieta hipercolesterolêmica em camundongos nocautes*LDLr -/-* expostos a partículas ambientais concentradas sobre o sistema pulmonar [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2013.

10. Theodoro LCMR, Federige MAF. A utilização da endotelina-1 como marcador de risco cardiovascular. ACiS. 2013; 1(3):14-6.

11. Dalle Mulle, L. Perfil dos níveis plasmáticos de endotelina-1 em lactentes submetidos à cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina; 2002.

12-13. Teixeira BC, Lopes AL, Macedo RCO, Correa CS, Ramis TR, Ribeiro JL, Reischak-Oliveira A, et al. Marcadores inflamatórios, função endotelial e riscos cardiovasculares. J. vasc. bras.2014;13(2):108-115.

Alemany AAS. Influência da dieta hipercolesterolêmica em camundongos nocautes*LDLr -/-* expostos a partículas ambientais concentradas sobre o sistema pulmonar [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2013.

14. Alemany AAS. Influência da dieta hipercolesterolêmica em camundongos nocautes*LDLr -/-* expostos a partículas ambientais concentradas sobre o

sistema pulmonar [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2013.

15. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J.Nutri. 1993 Nov 01;123(11):1939–1951.

16. Alemany AAS. Influência da dieta hipercolesterolêmica em camundongos nocautes*LDLr -/-* expostos a partículas ambientais concentradas sobre o sistema pulmonar [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2013.

17-18. Brook RD, Rajagopalan S, Pope III CA, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, Holguin F, Hong Y, Luepke RV, Mittleman MA, Peters A, Siscovick D, Smith Jr SC, Whitsel L, Kaufman JD, et al.Particulate matter air pollutionand cardiovascular disease: an update to the scientific statement from the American Heart Association. Circulation. 2010;121(21): 2331-2378.

Alemany AAS. Influência da dieta hipercolesterolêmica em camundongos nocautes*LDLr -/-* expostos a partículas ambientais concentradas sobre o sistema pulmonar [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2013.

19. Rowan-Carroll A, Halappanavar S, Williams A, Somers CM, Yauk CL. Mice Exposed In Situ to Urban Air Pollution Exhibit Pulmonary Alterations in Gene Expression in the Lipid Droplet Synthesis Pathways. Wiley Periodicals. 2013;54(4): 240-249.

Planilha de avaliação da parte escrita do artigo científico entregue como Trabalho de Conclusão de Curso de Ciências Biológicas (TCCB)	**Data:18/11/ 2019**

Título do trabalho: **Análise imunohistológica do tecido pulmonar de camundongos LDLr -/- expostos a poluição atmosférica com indução de dieta hipercolesterolêmica..**

Nome do aluno: Camila Branco da Silva RA: T77373-3

Nome do professor Adair Aparecida Santos Alemany Visto: _____
Trata-se do: orientador do trabalho (x) Sim ( ) Não ou do co-orientador do trabalho ( ) Sim ( ) Não

Itens avaliados no artigo científico – parte escrita do TCCB

Caro Professor observar que os itens **b** e **g** se repetem, coloque nota somente em um dos itens que corresponda ao tipo de trabalho apresentado. Observar que o item **f** é somente para trabalhos com levantamento de dados.

	Item a ser avaliado		Valor Máximo	Nota aluno
a	Coerência do título com o trabalho em si e com o curso de Ciências Biológicas.		1,0	1,0
b	Levantamento de dados	Observar a Presença de capa, Página de rosto, Resumo, Introdução, Justificativas e Objetivos, Material e métodos, Resultados, Discussão, Conclusão, Referências bibliográficas.	1,0	1,0
	Revisões bibliográficas,	Para observar a Presença de capa, Página de rosto, Resumo, Introdução, Justificativas e Objetivos, Material e métodos (no caso, a revisão bibliográfica), Conclusão, Referências bibliográficas.	1,0	
c	Avaliar se a introdução apresenta levantamento bibliográfico atualizado e adequado para o tema		1,0	1,0
d	Avaliar se a metodologia empregada corresponde ao propósito da pesquisa		1,0	1,0
e	Avaliar se os objetivos expressam claramente a pesquisa a ser realizada		1,0	1,0
f	Levantamento de dados,	Observar se em resultados ocorreu o correto tratamento dos dados (revisões bibliográficas não contem o item resultados).	1,0	1,0
g	Levantamento de dados,	Observar se na discussão ocorre comparação com trabalhos similares e diversos (revisões bibliográficas podem não conter discussões).	1,0	1,0
	Revisões bibliográficas	Observar se a introdução apresenta grande variedade de informações na pesquisa.	2,0	
h	Avaliar se as conclusões respondem aos objetivos propostos inicialmente		1,0	1,0
i	Avaliar se as referências bibliográficas seguem as normas Vancouver (observar mínimo de 7 e máximo de 30 referências, e observar que não podem existir somente “sites”)		1,0	1,0
j	Avaliar o conjunto do trabalho escrito.		1,0	1,0
	Somatório		**10,0**	10,0