



Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XX Seminário de Iniciação Científica

EFEITO DA INSTILAÇÃO INTRATRAQUEAL DE ROFA SOBRE PARÂMETROS DO ESTRESSE CELULAR DE ÓRGÃOS LINFOIDES DE RATOS: RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE HSP70 E CATALASE¹

Sofia Pizzato Scomazzon², Thiago Gomes Heck³, Leandro Leal de Lima⁴, Jadson Pereira Alves⁵, Paulo Ivo Homem De Bittencourt Jr⁶, Claudia Ramos Rhoden⁷.

¹ Trabalho de conclusão de curso de graduação em Biomedicina-UFCSPA

² Aluna do curso de Biomedicina da UFCSPA, bolsista CNPq do Laboratório de Fisiologia Celular da UFRGS.

³ Professor do Departamento de Ciências da Vida (DCVida). Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF).

⁴ Graduado em Biologia pela UFRGS. Laboratório de Fisiologia Celular da UFRGS.

⁵ Doutorando em Ciências da Saúde pela UFCSPA.

⁶ Professor do Departamento de Fisiologia da UFRGS. Laboratório de Fisiologia Celular-UFRGS (co-orientador).

⁷ Professora do Departamento de Ciências Básicas da Saúde da UFCSPA.

Professora do PPG Ciências da Saúde-UFCSPA. (orientadora)

Resumo: A poluição atmosférica é uma das principais causas de doenças no mundo, incluindo inflamações e doenças alérgicas. O MP decorrente da poluição causa estresse oxidativo nos tecidos. As HSP70 são utilizadas como marcador de estresse celular e a enzima catalase como marcador de estresse oxidativo em diferentes situações. Por isso, o objetivo do trabalho foi verificar a expressão de HSP70 e da enzima catalase em ratos submetidos a instilação intratraqueal de ROFA. Para o trabalho, utilizamos 8 ratos os quais foram divididos em 2 grupos (controle e ROFA), sendo submetidos a instilação do MP (ROFA) ou salina (CTRL). Os animais foram mortos 24 h após o procedimento e foram realizadas dosagens de expressão de HSP70 e catalase (CAT) nos linfonodos mesentéricos e no baço. Como resultados, verificamos que não houve diferença entre os grupos estudados em relação a expressão dessas proteínas. No entanto, verificamos forte correlação entre a expressão de HSP70 e catalase em ambos tecidos e grupos.

Palavras-Chave: Poluição; HSP70; Estresse oxidativo; Material particulado; Catalase.

Introdução

A poluição atmosférica é uma das principais causas de doenças do trato respiratório superior e inferior como infecções respiratórias e câncer de pulmão e de doenças cardiovasculares. O material particulado (MP), incluindo aquele proveniente de queima de combustíveis fósseis utilizados em siderurgia (residual oil fly-ash ou ROFA) é um dos principais componentes da poluição atmosférica e tem, pelo seu tamanho pequeno, a capacidade de invadir o trato respiratório e o sistema vascular (Pearson et al., 2010). Com isso, elas possuem um importante potencial danoso aos seres vivos.





Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XX Seminário de Iniciação Científica

A exposição à poluição causa estresse oxidativo tecidual que é responsável pela inflamação de diversos tecidos (Rhoden et al., 2004), corroborando para a instalação ou complicações de doenças. A poluição está, também, estritamente relacionada com doenças imunológicas, tanto alérgicas quanto inflamatórias (Mazzoli-Rocha et al., 2010). Os processos imuno-inflamatórios e a própria presença de MP no organismo são fatores relacionados ao quadro pró-oxidante, o que favorece a ocorrência de estresse oxidativo e pode prejudicar a funcionalidade do sistema imune (Cannizzo et al., 2011).

Além de promover o estresse oxidativo, o MP induz a resposta celular ao estresse como aumento na expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias e de moléculas de adesão, aumentando o recrutamento de células e a geração de mediadores inflamatórios (Imrich et al., 2007). Neste contexto, o estudo das proteínas de choque térmico da família de 70 kDa (HSP70, do inglês, heat shock proteins) que possuem funções extremamente importantes para a manutenção do bom funcionamento celular, atuando como chaperonas moleculares principalmente durante o estresse celular (Heck et al., 2011) podem representar marcadores importantes das funções intracelulares, pois quando expressas previnem a inflamação (Salminen et al., 2008), inclusive em células imunológicas (Heck, 2011).

Enquanto é evidente e consolidado o conhecimento de que a exposição a MP cause dano oxidativo ao pulmão, por ser este órgão diretamente atingido, em outros tecidos o efeito deste tipo de exposição ainda não está evidente. Neste cenário, o sistema de defesa antioxidante enzimático, como a enzima catalase (CAT), é acionado para neutralizar esse processo de dano oxidativo e proteger as células da ação das espécies ativas de oxigênio (EAO) (Maritim et al., 2003), sendo utilizados como marcadores de estresse oxidativo, como o causado pela exposição ao MP (Zanchi et al., 2008). Sendo assim, a verificação da expressão de HSP70 (marcador de estresse celular) e da enzima CAT (marcador de estresse oxidativo) pode ser um importante conjunto de marcadores em tecidos imunológicos após a exposição a poluentes. Portanto, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da exposição aguda ao ROFA em órgãos linfóides, mensurando a expressão de HSP70 e CAT.

Metodologia

Para o presente trabalho, foram utilizados 8 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*, cepa Wistar) com 90 dias de idade. Os animais foram obtidos no Biotério Central da UFRGS e mantidos em caixas de polipropileno (33x17x40 cm), sob condições padrão de biotério e ciclo claro/escuro de 12 h cada e temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, recebendo água e comida ad libitum. Todos os animais foram manipulados de acordo com as leis nacionais e internacionais (Diretriz de Conselho da Comunidade Europeia de 24 de novembro de 1986, 86/609/EEC) que regem a execução de experimentos com animais em laboratório em condições éticas de trabalho. O presente projeto foi submetido aos comitês de ética de uso de animais da UFCSPA e UFRGS.

No dia do experimento, os animais foram submetidos a anestesia (Cetamina 80 mg/kg e Xilasina 10 mg/kg) por via intraperitoneal e posterior instilação intratraqueal de 100 μL de salina (grupo controle) ou 100 μL de ROFA diluído em solução salina (500 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ – grupo ROFA). Os animais foram mortos 24 horas após a instilação e foram retirados os linfonodos mesentéricos e o baço para avaliações moleculares (expressão de proteínas).

SALÃO DO CONHECIMENTO

XX Seminário de Iniciação Científica
XVII Jornada de Pesquisa
XIII Jornada de Extensão

II Mostra de Iniciação Científica Júnior
II Seminário de Inovação e Tecnologia

2012



Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

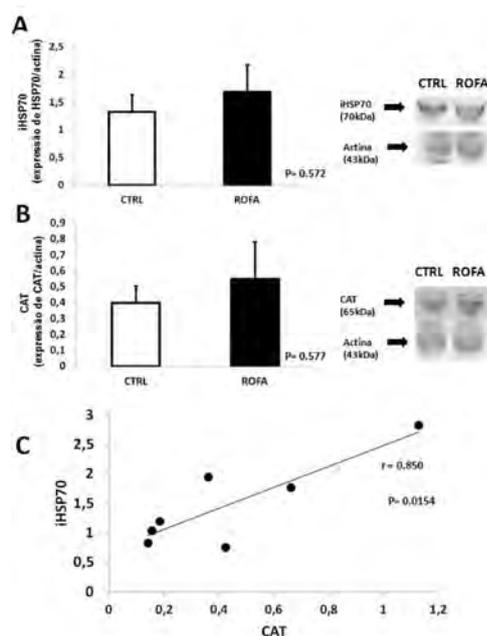
Evento: XX Seminário de Iniciação Científica

Os tecidos foram homogeneizados em SDS 0,1% contendo inibidores de protease (aprotinina, leupeptina, TLCK e PMSF) para a determinação da expressão de proteínas. A expressão de HSP70 intracelular e da enzima catalase (CAT) foi avaliada pelo método de Western Blotting utilizando anticorpos específicos (H5147 e SC 34285, respectivamente).

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão e analisados pelo programa estatístico SPSS, versão 13.0, utilizando Teste t de Student, considerando-se o nível de significância para erros do tipo I de 0,5%.

Resultados e discussão

Neste estudo, não foi observado diferença na expressão de HSP70 intracelular e da enzima catalase, tanto nos linfonodos mesentéricos (Fig. 1 A e B) quanto no baço (Fig. 2 A e B) quando comparado o grupo controle (CTRL) com o grupo que recebeu a solução com material particulado (ROFA), diferentemente de outros estudos que demonstram uma correlação entre a expressão de HSP70 e a toxicidade de metais pesados e material particulado (Collin-Hansen et al., 2005). Por exemplo, ocorre aumento na expressão de HSP70 no cerebelo em resposta a poluição (Zemolin et al., 2012). Por outro lado, outros estudos demonstraram a diminuição de HSP70 em tratamento crônico com cromo em tecido hepático (Lee and Lim, 2012), o que sugere que cada tecido pode responder diferentemente diante da exposição a agentes nocivos ao organismo, além de apresentar respostas agudas e crônicas distintas. Entretanto, quando feita correlação da expressão de HSP70 e catalase nos tecidos estudados, houve correlação positiva tanto nos linfonodos (figura 1C) quanto no baço (figura 2C). A análise de maneira conjunta destes dois tecidos demonstra de maneira mais evidente uma correlação na expressão destes dois marcadores, HSP70 e catalase (Fig. 3), independente da exposição ao ROFA.





Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XX Seminário de Iniciação Científica

Figura1. Efeito da instilação intratraqueal de ROFA na Expressão de HSP70 e Catalase no linfonodo de ratos.

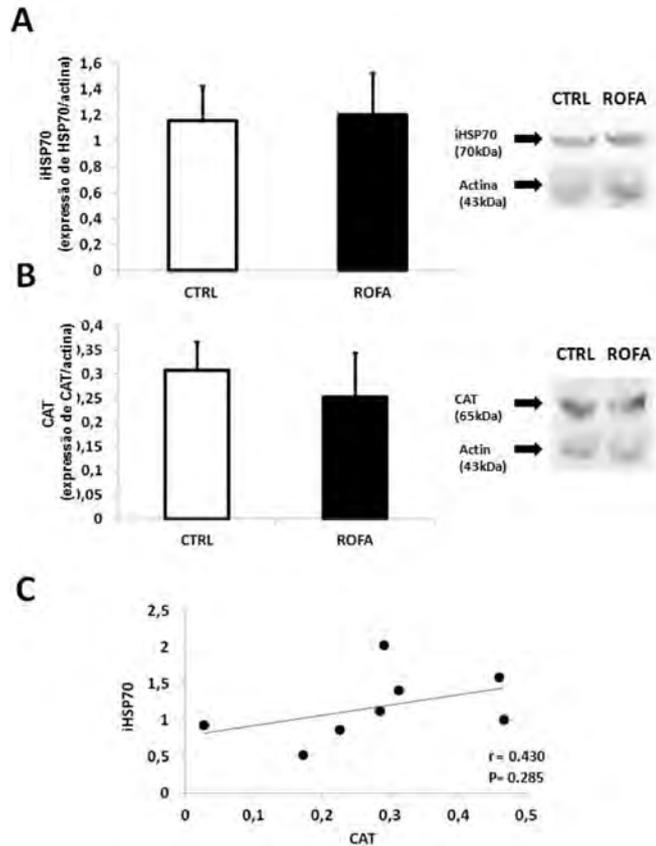


Figura2. Efeito da instilação intratraqueal de ROFA na Expressão de HSP70 e Catalase no baço de ratos.

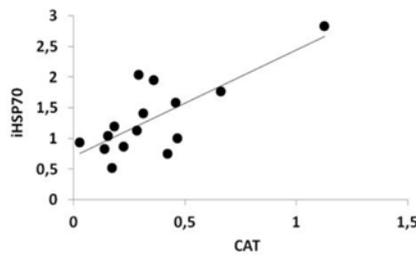


Figura 3. Correlação entre a expressão de HSP70 e Catalase em órgãos linfóides de ratos.

Conclusão



Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XX Seminário de Iniciação Científica

O presente estudo sugere que, no tempo proposto (24 horas após a instilação do poluente), não há aumento na expressão de HSP70 e de CAT em resposta a exposição aguda com ROFA. No entanto, os resultados mostram que existe uma correlação positiva entre a expressão de HSP70 e catalase em tecidos linfoides (linfonodo e baço) em todos os grupos, independente da exposição ao ROFA.

Agradecimentos

UFRGS, UFCSPA, CNPq, FAPESP.

Referências Bibliográficas

- CANNIZZO, E. S., CLEMENT, C. C., SAHU, R., FOLLO, C. & SANTAMBROGIO, L. 2011. Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. *J Proteomics*, 74, 2313-23.
- COLLIN-HANSEN, C., ANDERSEN, R. A. & STEINNES, E. 2005. Molecular defense systems are expressed in the king bolete (*Boletus edulis*) growing near metal smelters. *Mycologia*, 97, 973-83.
- HECK, T. G. 2011. RAZÃO ENTRE O CONTEÚDO EXTRACELULAR E INTRACELULAR DE HSP70 COMO UM SINAL DE ALERTA IMUNOLÓGICO E MARCADOR DE INTENSIDADE DE EXERCÍCIO. Doutorado Tese, UFRGS.
- HECK, T. G., SCHOLER, C. M. & DE BITTENCOURT, P. I. 2011. HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? *Cell Biochem Funct*, 29, 215-26.
- IMRICH, A., NING, Y., LAWRENCE, J., COULL, B., GITIN, E., KNUTSON, M. & KOBZIK, L. 2007. Alveolar macrophage cytokine response to air pollution particles: oxidant mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol*, 218, 256-64.
- LEE, J. & LIM, K. T. 2012. Inhibitory effect of SJSZ glycoprotein (38 kDa) on expression of heat shock protein 27 and 70 in chromium (VI)-treated hepatocytes. *Mol Cell Biochem*, 359, 45-57.
- MARITIM, A. C., SANDERS, R. A. & WATKINS, J. B., 3RD 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*, 17, 24-38.
- MAZZOLI-ROCHA, F., FERNANDES, S., EINICKER-LAMAS, M. & ZIN, W. A. 2010. Roles of oxidative stress in signaling and inflammation induced by particulate matter. *Cell Biol Toxicol*, 26, 481-98.
- PEARSON, J. F., BACHIREDDY, C., SHYAMPRASAD, S., GOLDFINE, A. B. & BROWNSTEIN, J. S. 2010. Association between fine particulate matter and diabetes prevalence in the U.S. *Diabetes Care*, 33, 2196-201.
- RHODEN, C. R., LAWRENCE, J., GODLESKI, J. J. & GONZALEZ-FLECHA, B. 2004. N-acetylcysteine prevents lung inflammation after short-term inhalation exposure to concentrated ambient particles. *Toxicol Sci*, 79, 296-303.
- SALMINEN, A., PAIMELA, T., SUURONEN, T. & KAARNIRANTA, K. 2008. Innate immunity meets with cellular stress at the IKK complex: regulation of the IKK complex by HSP70 and HSP90. *Immunol Lett*, 117, 9-15.
- ZANCHI, A. C., VENTURINI, C. D., SAIKI, M., NASCIMENTO SALDIVA, P. H., TANNHAUSER BARROS, H. M. & RHODEN, C. R. 2008. Chronic nasal instillation of residual-oil



Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XX Seminário de Iniciação Científica

fly ash (ROFA) induces brain lipid peroxidation and behavioral changes in rats. *Inhal Toxicol*, 20, 795-800.

ZEMOLIN, A. P., MEINERZ, D. F., DE PAULA, M. T., MARIANO, D. O., ROCHA, J. B., PEREIRA, A. B., POSSER, T. & FRANCO, J. L. 2012. Evidences for a role of glutathione peroxidase 4 (GPx4) in methylmercury induced neurotoxicity in vivo. *Toxicology*.