



**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 CATALASE<sup>1</sup>**

**Sofia Pizzato Scomazzon<sup>2</sup>, Thiago Gomes Heck<sup>3</sup>, Leandro Leal de Lima<sup>4</sup>, Jadson Pereira Alves<sup>5</sup>, Paulo Ivo Homem De Bittencourt Jr<sup>6</sup>, Claudia Ramos Rhoden<sup>7</sup>.**

<sup>1</sup> Trabalho de conclusão de curso de graduação em Biomedicina-UFCSPA

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

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

<sup>4</sup> Graduado em Biologia pela UFRGS. Laboratório de Fisiologia Celular da UFRGS.

<sup>5</sup> Doutorando em Ciências da Saúde pela UFCSPA.

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

<sup>7</sup> 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 linfoides, 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  $\mu\text{L}$  de salina (grupo controle) ou 100  $\mu\text{L}$  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

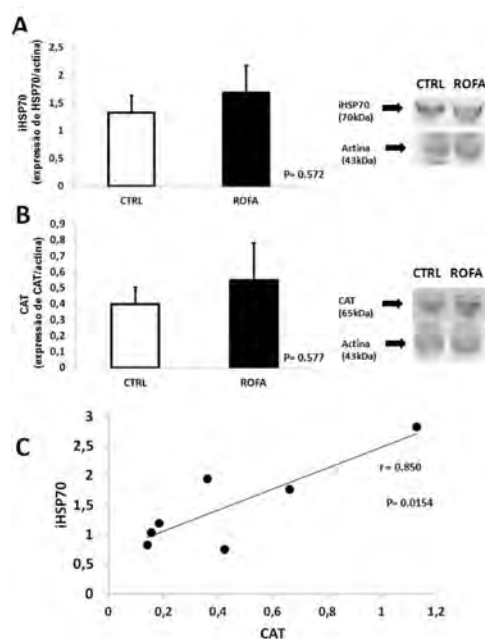
**Evento:** XX Seminário de Iniciação Científica

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.

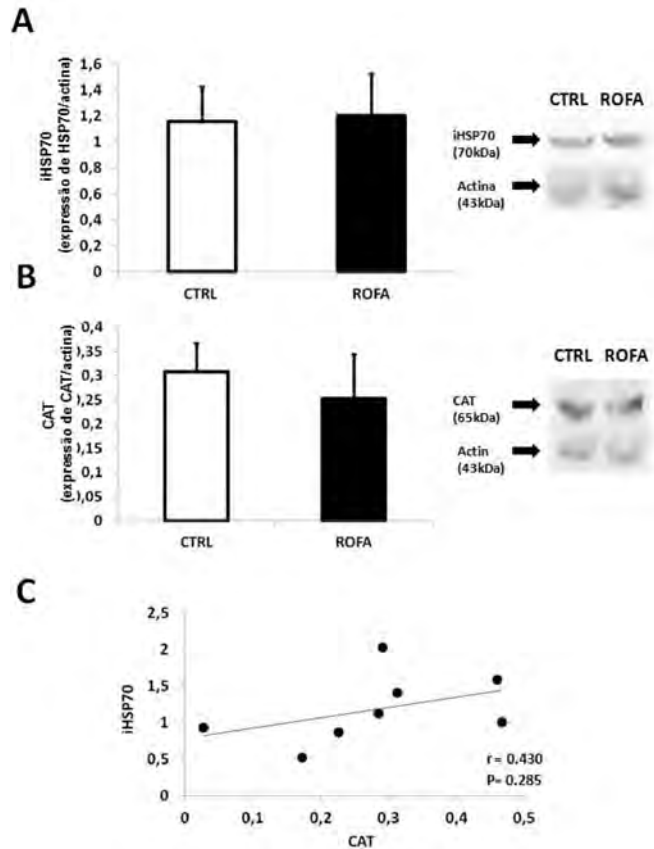


Figura2. Efeito da instilação intratraqueal de ROFA na Expressão de HSP70 e Catalase no baço de ratos.

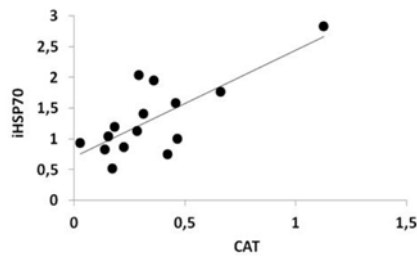


Figura 3. Correlação entre a expressão de HSP70 e Catalase em órgãos linfóides de ratos.

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*.