



EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA AO MP_{2,5} NO TECIDO PULMONAR NA PROLE DE RATAS: ESTRESSE OXIDATIVO E PERDA TECIDUAL¹

João Henrique Eckert², Bethina Barz Basso³, Lucas Machado Sulzbacher⁴, Shana Segatto Vendruscolo⁵, Matias Nunes Frizzo⁶, Pauline Brendler Goettens Fiorin⁷

¹ Pesquisa desenvolvida na Unijuí; financiado pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - PIBIC/CNPq.

² Estudante do Curso Medicina da UNIJUÍ. Bolsista PIBIC/CNPq. E-mail: joao.eckert@sou.unijui.edu.br

³ Estudante do Curso de Biomedicina da UNIJUÍ. Bolsista PIBIC/UNIJUÍ. E-mail:

bethina.basso@sou.unijui.edu.br

⁴ Enfermeiro, Mestre em Atenção Integral à Saúde - PPGAIS (UNICRUZ/UNIJUI/URI). E-mail:

lucas.sulzbacher@unijui.edu.br

⁵ Médica Pneumologista Pediátrica, Mestre em Atenção Integral à Saúde - PPGAIS (UNICRUZ/UNIJUI/URI).

E-mail: shana.vendruscolo@unijui.edu.br

⁶ Docente do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (UNICRUZ/UNIJUÍ). E-mail:

matias.frizzo@unijui.edu.br

⁷ Docente do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (UNICRUZ/UNIJUÍ). E-mail:

pauline.goettens@unijui.edu.br

INTRODUÇÃO

A contaminação do ar atmosférico por material particulado fino MP_{2,5} está cada vez mais associada à doenças pulmonares e se torna uma ameaça particular à saúde infantil (Lim et al., 2012, Pope et al., 2002). Estima-se que esse poluente cause cerca de 0,8 milhão de mortes prematuras anuais no mundo todo, sendo responsável por cerca de 1% da mortalidade por infecções respiratórias agudas em crianças menores de 5 anos (Cohen et al., 2005).

A exposição a agentes tóxicos no pulmão em pleno desenvolvimento, no período fetal, pode alterar mecanismos de reparo tecidual, aumentando a suscetibilidade ao remodelamento tecidual e alterando as respostas à injúria (Kajekar R., 2007). Investigações epidemiológicas têm relacionado a exposição materna de MP_{2,5} a sintomas respiratórios pós-natais, como sibilância frequente, tosse crônica e diminuição das funções pulmonares nas crianças (Gurley et al., 2013; Hwang et al., 2015).

Não obstante, devido aos índices crescentes de poluição atmosférica e de doenças respiratórias na infância, estudos experimentais têm sido realizados para compreender os mecanismos fisiopatológicos envolvidos. O objetivo do nosso estudo foi avaliar se a exposição materna à poluição atmosférica por MP_{2,5} está relacionada com aumento nos níveis de estresse oxidativo pulmonar da prole de ratas.

Este trabalho está alinhado aos ODS 3 da ONU, Saúde e Bem-estar, que visa garantir o acesso à saúde de qualidade e promover o bem-estar para todos, em todas as idades, vistas a



preocupação à exposição a agentes tóxicos na gestação, que possam agravar a saúde na infância.

METODOLOGIA

Este estudo foi realizado na UNIJUÍ, no Laboratório de Ensaio Biológicos – LeBio e Biotério da UNIJUÍ. Foram utilizadas 9 ratas fêmeas Wistar, com 50 a 60 dias de vida, alojados no Biotério da UNIJUÍ sob condições ideais para animais de laboratório (CEUA/UNIJUÍ, parecer 021/2021).

O estudo foi realizado ao decorrer de 63 dias, tendo a primeira etapa a duração de 21 dias, correspondendo ao período gestacional das ratas, e a segunda etapa, de 42 dias, correspondente ao período de amamentação da prole e desenvolvimento correspondente ao primeiro ano de vida do humano (Sengupta, 2013).

Após o acasalamento, as ratas gestantes (n=9) foram divididas aleatoriamente em grupos Controle (n=8) e Poluído (n=8). Grupo CTRL: Fêmeas gestantes (n=1) receberam instilação intranasal de soro fisiológico 0,9%, cinco dias por semana, ao longo de 21 dias. Grupo POL: Fêmeas gestantes (n=8) receberam instilação intranasal do ROFA (250µg/50µL), cinco dias por semana, ao longo de 21 dias, período da gestação. Durante a segunda etapa deste estudo, após o parto, as puérperas e seus respectivos filhotes seguiram em caixas individuais com sua prole durante o período de amamentação, na qual as mães seguiram expostas (POL) ou não (CTRL) ao ROFA. Encerrada a amamentação (42º dia), também finalizou-se a exposição, e ao completar 63 dias de estudo, os animais foram eutanasiados.

Para determinação dos parâmetros de Estresse Oxidativo Pulmonar, a lipoperoxidação do tecido pulmonar foi realizada por meio do teste de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) (Bueg; Aust, 1978). A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada a partir da inibição da autooxidação do pirogalol a 420 nm (Marklund & Marklund, 1974). A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada a partir da decomposição de peróxido de hidrogênio a 240 nm (Aebi, 1984). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA de uma e duas vias, seguida de pós teste de Tukey, no programa estatístico GraphPad Prism 9.0, considerando nível de significância estatística $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



Ao final do período gestacional, os respectivos filhotes da prole permaneceram com suas mães, sendo 52 animais no Grupo Poluído e 11 animais no Grupo Controle. A partir do nascimento da prole foram iniciadas as atividades de acompanhamento dos animais, como avaliação do consumo de água, ração e biometria. Após transcorridos 42 dias (21 de amamentação e 21 de acompanhamento dos animais), foi realizada a eutanásia, a coleta dos tecidos e iniciadas as análises laboratoriais.

Avaliou-se o dano oxidativo do tecido pulmonar pelas espécies reativas de oxigênio (EROS) pela análise da formação de produtos citotóxicos como o malonaldeído (MDA), pela concentração das enzimas antioxidantes Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD). Na Tabela 1, é possível observar uma diferença de mmol de MDA/mg proteína na prole dos animais que fazem parte do Grupo POL, na comparação com o Grupo CTRL ($P=0,0257$), assim como a ausência de diferença entre os dois grupos para a enzima SOD, tanto como à enzima CAT. Já com base nos dados observados em relação aos efeitos biométricos, a porcentagem de tecido pulmonar/peso corporal das proles, do Grupo POL ($0,85\pm 0,13g$) quando comparado ao Grupo CTRL ($1,00\pm 0,25g$) apresentou diferença ($P=0,0081$).

Tabela 1. Parâmetros de EO no tecido pulmonar da prole de ratas expostas ao $MP_{2,5}$.

PARÂMETROS	CTRL	POL	P
MDA (mmol MDA/mg proteína)	$0,0040\pm 0,0032$	$0,0015\pm 0,0012^*$	0,0257
SOD (U SOD/mg proteína)	$1,8945\pm 0,8448$	$1,9783\pm 0,6600$	0,7926
CAT (U CAT/mg proteína)	$0,0155\pm 0,0063$	$0,0176\pm 0,0072$	0,4638

Dados expressos em média \pm DP. ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Tukey.

A redução na quantidade de mmol de MDA/mg proteína do Grupo POL pode indicar uma menor lipoperoxidação no tecido pulmonar dos animais deste grupo, quando comparado ao Grupo CTRL, visto que a presença de espécies reativas ao oxigênio podem induzir à formação de produtos citotóxicos como o malonaldeído (Ferreira, A. L. A., & Matsubara, L. S., 1997).



No entanto, sabe-se que a autofagia é processo fundamental e altamente conservado de degradação lisossômica e reciclagem de proteínas mal dobradas ou organelas celulares citoplasmáticas danificadas para manter a homeostase celular (Saha et al., 2018). A exposição ao MP_{2,5} interrompe a via normal de formação de autolisossomos e induz autofagia defeituosa, o que resulta na obstrução da eliminação de resíduos (Wang et al., 2019). Assim, embora a indução de autofagia pareça ser um fator protetor contra a lesão celular causada por MP_{2,5}, a disfunção do fluxo autofágico é uma causa crucial para autofagia defeituosa e apoptose celular (Wang et al., 2019).

Com base nisso, a menor produção de MDA/mg proteína pelo Grupo POL pode estar relacionada com uma menor integridade pulmonar neste grupo, uma vez que a exposição ocorreu em um período de intenso desenvolvimento do tecido pulmonar. Conforme indicam os dados do peso de tecido pulmonar/peso corporal, ao final do estudo, houve redução de cerca de 15% no Grupo POL quando comparado ao Grupo CTRL. Desse modo, é possível que tenha ocorrido um processo apoptótico durante a formação fetal do Grupo POL, o que explica os dados evidenciados relativos à produção de malonaldeído.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observou-se uma possível relação entre a redução do peso do tecido pulmonar/peso corporal do Grupo POL, com a redução na produção de MDA/mg proteína quando comparado com o Grupo CTRL, indicando que o dano oxidativo possa ter conduzido a uma condição de apoptose e perda tecidual. Esses resultados destacam a complexidade das respostas biológicas à poluição atmosférica e a necessidade de mais investigações para entender melhor os mecanismos subjacentes e os impactos a longo prazo na saúde respiratória infantil.

Palavras-chave: ROFA. Apoptose. Malonaldeído. EROS.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos membros do Grupo de Pesquisa em Fisiologia pelos ensinamentos e pela supervisão, em especial a Dra. Pauline Brendler Goettems Fiorin, pela orientação. Agradeço também ao programa de bolsas PIBIC/CNPq pela concessão da bolsa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, [s. l.], v. 105, p. 121-126, 1984.
- AZEVEDO, Raymundo Soares. Qual o tamanho da amostra ideal para se realizar um ensaio clínico? *Revista da Associação Médica Brasileira*, [s. l.], v. 54, n. 4, p. 289, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-42302008000400007>
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. [30] Microsomal lipid peroxidation. Em: *Methods in Enzymology*. [s.l.] Elsevier, 1978. p. 302-310.
- COHEN, A. J. et al. The global burden of disease due to outdoor air pollution. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 68, n. 13-14, p. 1301-1307, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15287390590936166>
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S.. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n. 1, p. 61-68, jan. 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014>
- GURLEY, E. S. et al. Indoor exposure to particulate matter and the incidence of acute lower respiratory infections among children: A birth cohort study in urban Bangladesh. *Indoor air*, v. 23, n. 5, p. 379-386, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/ina.12038>.
- HWANG, B.-F. et al. Relationship between exposure to fine particulates and ozone and reduced lung function in children. *Environmental research*, v. 137, p. 382-390, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2015.01.009>.
- KAJEKAR, R. Environmental factors and developmental outcomes in the lung. *Pharmacology & therapeutics*, v. 114, n. 2, p. 129-145, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.01.011>
- LIM, S.S., et al., 2012. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380 (9859), 2224- 2260. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61766-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61766-8).
- MARKLUND, S; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry / FEBS*, [s. l.], v. 47, p. 469-474, 1974. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>
- POPE, C. A., III. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, v. 287, n. 9, p. 1132, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jama.287.9.1132>
- SAHA, P. et al. Impact of maternal air pollution exposure on children's lung health: An Indian perspective. *Toxics*, v. 6, n. 4, p. 68, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxics6040068>
- SENGUPTA, P. The laboratory rat: Relating its age with human's. *International Journal of Preventive Medicine*, v. 4, n. 6, p. 624, 2013.
- TANG, W. et al. Maternal exposure to fine particulate air pollution induces epithelial-to-mesenchymal transition resulting in postnatal pulmonary dysfunction mediated by transforming growth factor- β /Smad3 signaling. *Toxicology letters*, v. 267, p. 11-20, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.12.016>
- WANG, Y.; TANG, M. PM2.5 induces autophagy and apoptosis through endoplasmic reticulum stress in human endothelial cells. *The Science of the total environment*, v. 710, n. 136397, p. 136397, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136397>.