



## **ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM AORTAS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS À POLUIÇÃO<sup>1</sup>**

**Júlia Fursel Pacheco<sup>2</sup>, Ana Laura Toquetto<sup>3</sup>, Lucas Machado Sulzbacher<sup>4</sup>, Lílian Corrêa Costa-Beber<sup>5</sup>, Jade de Oliveira<sup>6</sup>, Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma<sup>7</sup>, Vitor Antunes de Oliveira<sup>8</sup>**

<sup>1</sup> Pesquisa desenvolvida na Unijuí; financiado pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Tecnológica e Inovação da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - PIBITI/UNIJUÍ.

<sup>2</sup> Bolsista UNIJUÍ; estudante do curso Medicina da UNIJUÍ.

<sup>3</sup> Bolsista UNIJUÍ; estudante do curso Biomedicina da UNIJUÍ.

<sup>4</sup> Mestre em Atenção Integral à Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde PPGAIS - UNIJUÍ/UNICRUZ/URI.

<sup>5</sup> Doutora em Bioquímica pelo Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas e Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

<sup>6</sup> Doutora em Bioquímica. Professora no Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas e Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

<sup>7</sup> Doutora em Bioquímica. Professora no Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas e Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

<sup>8</sup> Professor orientador da UNIJUÍ.

### **INTRODUÇÃO**

A poluição atmosférica é um grave risco ambiental para a saúde, uma vez que, segundo a Organização Mundial da Saúde, é a causa de morte prematura de 4,2 milhões de pessoas por ano no mundo (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2021). Tanto a exposição aguda ou crônica à poluição relaciona-se com aumento de atendimentos de saúde e de hospitalizações por doenças cardiorrespiratórias: redução de capacidade pulmonar, exacerbação de sintomas respiratórios, infarto, acidente vascular cerebral e câncer de pulmão (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2021).

Dentre os poluentes, há o material particulado fino (MP2.5), que é composto por partículas finas em suspensão de diâmetro inferior a 2,5 µm (Souza, et al. 2010). Formado pela condensação de vapores quentes e por reações entre gases, seu pequeno tamanho possibilita que, ao ser inalado, penetre os tecidos e se instale nas vias nasais e no pulmão, configurando-se como um risco para doenças cardiorrespiratórias (Souza, et al. 2010). Ao induzir inflamação pulmonar, o MP2.5 pode gerar efeitos sistêmicos, associados ao comprometimento da função cardíaca e vascular (Fernandes et al, 2009).

Nesse sentido, devido ao intenso fluxo sanguíneo, a aorta é um vaso em que as lesões vasculares costumam aparecer. A artéria aorta é constituída por três túnicas: íntima, média e adventícia. A túnica íntima corresponde ao endotélio, camada de células que reveste o lúmen



do vaso, revestido por uma fina camada de tecido conjuntivo, a lâmina basal; a túnica média é composta por células do músculo liso vascular (CMLV), as quais produzem fibras colágenas, e lâminas elásticas; a túnica adventícia é a mais externa, constituída por tecido conjuntivo. A aorta é classificada como uma artéria elástica devido à grande quantidade de fibras elásticas entre as camadas de músculo liso, essencial para a distensibilidade desse vaso, que precisa se adequar à pressão sanguínea resultante do ciclo cardíaco, distendendo e retornando à sua conformação (Abrahamsohn, 2016). Essa estrutura vascular pode sofrer modificações que sucedem a disfunção endotelial, e que pode envolver infiltração leucocitária, proliferação de CMLV, deposição de lipídeos e de matriz extracelular, que comprometem o lúmen e fluxo vascular e caracterizam o desenvolvimento da aterosclerose.

Portanto, como a dilatação ou retração da parede vascular pode ser identificada na análise histológica por meio da medição da espessura da aorta, esse estudo tem por objetivo verificar se a exposição ao MP2.5 altera a parede da aorta de camundongos.

## **METODOLOGIA**

Esse estudo seguiu todas as normas éticas estabelecidas pela Lei Arouca (Lei Federal 11794/2008) e pelo Guia de Cuidado e Uso de Animais Experimentais, publicado pelo National Institutes of Health (publicação NIH nº85-23, revisado em 1996). Este protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da UFRGS (CEUA 38492).

Foram utilizados 8 camundongos machos CF-1, com seis semanas de idade. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: Controle (CTRL) e Exposto ao MP2.5 (MP2.5). O grupo CTRL recebeu solução salina (NaCl 0,9%), enquanto o grupo MP2.5 recebeu instilação intranasal de MP2.5 (30 µg/10 µL) uma vez ao dia, cinco dias por semana, durante duas semanas. Ao final dessas duas semanas, os camundongos foram eutanasiados, as aortas coletadas e armazenadas em solução fixadora com formaldeído 4% por 24 horas e, em seguida, transferidas para álcool 70% até o processamento histológico.

O processamento histológico foi composto por várias etapas, as quais foram seguidas a partir da retirada das aortas do álcool 70%:

1. Desidratação, cujo objetivo é a retirada de água dos tecidos, de modo que seja um processo gradativo, com a porcentagem do álcool iniciando em 70% e finalizando em 100%.



2. Clarificação, importante para substituir o álcool presente nos tecidos por um produto pelo qual a parafina, utilizada em sequência, tenha mais afinidade.
3. Infiltração, em que as amostras devem ser impregnadas pela parafina.
4. Inclusão, etapa de montagem. Usa-se um molde para formar um bloco de parafina contendo o tecido, essencial para a microtomia a seguir.
5. Microtomia, que consiste no corte dos blocos de parafina com tecido, a fim de que uma secção bem fina da amostra seja disposta na lâmina, possibilitando a observação microscópica, de modo que a espessura ideal seja 5  $\mu\text{m}$ .
6. Coloração com Hematoxilina e Eosina, em que as lâminas precisam ser diafanizadas – imersas em Xilol para retirada da parafina – e hidratadas – imersas em álcool e água – para propiciar que, ao serem imersas nos corantes, os tecidos presentes na lâminas sejam corados.
7. Montagem, última etapa antes da lâmina estar pronta para análise microscópica. Importante que a lamínula, que serve como uma cobertura para o tecido sobre a lâmina, seja bem posicionada e que possíveis bolhas de ar sejam retiradas.

Com as lâminas prontas para análise por microscopia óptica, mensurou-se a espessura média da parede da artéria aorta em mm, utilizando o software ImageJ. Para obtenção da espessura média, foi medido desde o início do endotélio (mais interno na túnica íntima, reveste o lúmen do vaso) até o final da túnica média (camada muscular) em 10 pontos da artéria aorta e, em seguida, foi feita a média dos valores encontrados. Para a análise estatística, foram usadas a espessura média e a espessura máxima – referente ao maior ponto de espessura entre os 10 pontos medidos em diferentes regiões da aorta. As medições foram feitas por dois avaliadores cegados.

Os dados obtidos a partir das medições das aortas foram analisados no software GraphPad Prism 8. Inicialmente, foi realizado teste de ROUT 5% para identificação de possíveis outliers, para sua exclusão. Em seguida, os dados foram submetidos ao Teste de Normalidade por Shapiro-Wilk e comparados pelo Teste T não pareado, considerado  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO





Quando analisamos a espessura média das aortas, percebemos que não há diferença entre os grupos (Figura 1 – A). Contudo, o grupo que recebeu poluição apresentou maior espessura máxima em comparação ao grupo controle (Figura 1 – D).

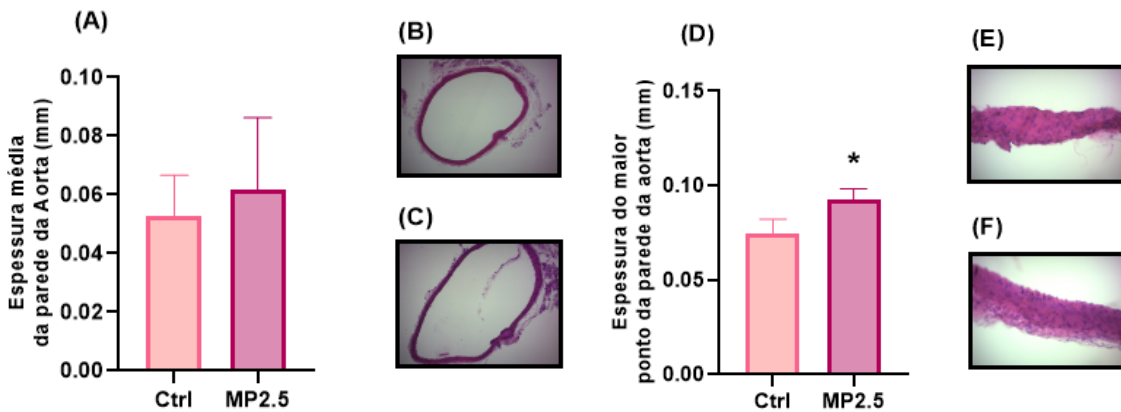


Figura 1. (A) Comparação entre espessura média da aorta do grupo CTRL (n=4) e do grupo MP2.5 (n=4). Foi realizado Teste T não pareado,  $p = 0,5471$ . Representação histológica da aorta de camundongo exposto à solução fisiológica (B) ou a MP2.5 (C). Coloração de hematoxilina e eosina (H&E). Microscopia óptica, com aumento de 100x. (D) Comparação entre maior ponto de espessura da aorta do grupo CTRL (n=4) e do grupo MP2.5 (n=4). Foi realizado Teste T não pareado,  $p = 0,0205$ . Representação histológica da aorta de camundongo exposto à solução fisiológica (E) ou a MP2.5 (F). Coloração de hematoxilina e eosina (H&E). Microscopia óptica, com aumento de 400x. Fonte: próprios autores.

Já existe comprovação de que a poluição atmosférica, a longo prazo, pode acelerar o enrijecimento das paredes arteriais em adultos jovens (Lentes, 2010). A partir dos nossos resultados, é possível observar que a exposição subaguda à poluição também altera a morfologia vascular da aorta, tornando-a mais espessa. A integridade da parede vascular, sobretudo da túnica média com a presença das fibras elásticas, é essencial para a manutenção contínua do fluxo sanguíneo (Abrahamsohn, 2016). Desse modo, a modificação observada é prejudicial, podendo gerar obstrução do lúmen que diminui a perfusão sanguínea e resulta em isquemia.

Nesse sentido, os resultados corroboram estudos que associam a poluição a complicações cardiovasculares e ao aumento do risco de mortalidade por doença cardíaca isquêmica e acidente vascular cerebral (Hayes et al, 2019). Embora a espessura média da aorta não tenha sofrido alteração, houve aumento em pontos específicos nos camundongos expostos à poluição, indicando lesão vascular local por aumento da camada muscular da parede da aorta.

