

HSP70 CARDIOPULMONAR DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS CRONICAMENTE À INGESTÃO DE DIETA HIPERLIPÍDICA E À EXPOSIÇÃO AO MATERIAL PARTICULADO¹

**Guilherme Wildner², Pauline Brendler Goettems Fiorin³, Bethânia Salamoni Grochanke⁴,
Fernanda Giesel Baldissera⁵, Thiago Gomes Heck⁶, Mirna Stela Ludwig⁷.**

¹ Pesquisa Institucional desenvolvida do Departamento de Ciências da Vida, pertencente ao Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), no laboratório de Ensaios Biológicos da UNIJUI, durante o período de bolsa PROBIC/FAPERGS 2014-2015.

² Acadêmico do curso de Ciências Biológicas - UNIJUI, Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF, Bolsista de Iniciação Científica PROBIC/FAPERGS, wildner.gw@gmail.com

³ Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF, Professora do Departamento de Ciências da Vida - UNIJUI, Doutoranda em Ciências da Saúde - UFCSPA

⁴ Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF, Mestre em Ciências da Saúde - UFCSPA

⁵ Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF, Doutoranda em Ciências da Saúde - UFCSPA

⁶ Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS), Departamento de Ciências da Vida (DCVida), Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI)

⁷ Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS), Departamento de Ciências da Vida (DCVida), Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI)

INTRODUÇÃO

Exposição crônica à poluição atmosférica, especialmente ao material particulado (MP), é fator de risco importante para morbidade e mortalidade (POPE III et al., 2002). A prevalência de altos níveis de MP no ar é um sério problema de saúde pública, evidenciado pela associação entre concentrações elevadas de MP e aumento da incidência de doenças e mortes causadas por problemas cardiopulmonares (POPE III, 2000). Partículas do MP com diâmetro menor que 2,5 µm (MP_{2,5}) apresentam potencial risco de deposição nos alvéolos, podendo causar danos pulmonares, bem como atingir demais tecidos, assim, promover ação sistêmica (KIM et al., 1994). Estudos atuais têm relacionado a exposição aguda à poluição atmosférica com o aumento da taxa de admissão em hospitais por eventos cardiovasculares. A exposição à curto prazo ao MP_{2,5} está relacionada à hospitalização por insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio e síndrome coronariana aguda (SANCINI et al., 2014; FRANCHINI; MANUCCI, 2011).

Atualmente, além dos fatores nocivos ambientais, a população também está exposta aos efeitos nocivos dos seus hábitos comportamentais, nos quais destacam-se, principalmente, os fatores alimentares e o sedentarismo. Sobrepeso e obesidade são os principais fatores de risco para um grande número de doenças crônicas, incluindo as doenças cardiovasculares, câncer, e também doenças metabólicas, como o diabetes. Antes considerados problemas apenas de países com alta

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

renda, o sobrepeso e a obesidade apresentam-se, atualmente, sob dramática ascensão em países de média e baixa renda, especialmente nas regiões urbanas (WHO, 2015).

Os indivíduos obesos estão particularmente mais suscetíveis à problemas cardiovasculares causados por poluição atmosférica, uma vez que ela contribui para o aumento da morbidade por doenças associadas ao estresse oxidativo, além do que, obesos tem sua capacidade de defesa antioxidante debilitada. Em adição, evidências recentes sugerem que indivíduos obesos inalam mais ar por dia do que indivíduos de peso normal (BROCHU; BOUCHARDE; HADDAD, 2013).

A exposição à poluição atmosférica associada à condições de sobrepeso e obesidade configuram um quadro de desbalanço redox e inflamatório no organismo. Este quadro pode prejudicar a capacidade antioxidante das células, tornando-se insuficientes no combate à situações pró-oxidantes e, assim, pode desencadear dano oxidativo em suas estruturas. Esse desequilíbrio exige que o organismo ative vias de defesa, como o aumento da síntese de proteínas de choque térmico (HSPs), especialmente as da família HSP70. As proteínas da família HSP70 foram altamente conservadas na evolução das espécies, encontradas tanto em organismos eucarióticos como em procarióticos (ROBERT; BARNARD, 2005). Foram descritas primeiramente como proteínas cuja expressão é induzida por aumento na temperatura e necessárias para o dobramento das proteínas (ALBERTS et al., 2010), sendo posteriormente descritas como proteínas expressas também em diferentes condições de estresse (FIETTO et al., 2007). Há uma infinidade de evidências experimentais de que a expressão de HSP70, tanto em cultura de células cardíacas in vitro, como no coração intacto, promove efeito protetor (LATCHMAN, 2001). Exposição ao MP causa inflamação sistêmica e do tecido pulmonar que foram ambas associadas à disfunção endotelial (TAMAGAWA et al., 2008). As consequências da exposição acumulada a longo prazo incluem efeitos adversos em crescimento pulmonar, bronquite crônica, câncer de pulmão e probabilidade de desenvolvimento de asma e aterosclerose. (KÜNZLI; TAGER, 2005)

Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar o conteúdo de HSP70 dos tecidos cardíaco e pulmonar de camundongos obesos expostos cronicamente ao MP_{2,5}.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 25 camundongos machos da linhagem B6129SF2/J (B6), com 21 dias, no período pós-desmame, provenientes do Biotério da UNIJUI. Os animais foram mantidos em gaiolas semi-metabólicas em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) com ciclos de 12 horas claro/escuro. Este trabalho foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIJUI, sob Parecer Consubstanciado n. 008/2013.

Delineamento experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais ($n = 6 - 7$): Controle (C), os quais receberam ração padrão (RP, 4% de gordura em kcal) e foram submetidos à instilação intranasal de solução fisiológica SF; Poluído (P), os animais receberam ração padrão e foram submetidos à instilação intranasal de suspensão de MP_{2,5} ($5 \text{ mg}/10 \text{ mL}$, qual a dose (mg/kg ?); Dieta (D), com animais que receberam dieta hiperlipídica (DHL, 60% de gordura em kcal) e instilação intranasal de SF; e Dieta Poluído (DP), onde os animais receberam DHL e instilação intranasal de

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

suspensão de MP2,5. A intervenção alimentar e a exposição à poluição, bem como seus respectivos controles, ocorreram durante 24 semanas, logo após o desmame dos animais. Ao final do estudo os animais foram mortos por decapitação para a coleta do pulmão e coração.

Dieta hiperlipídica e instilação de material particulado (MP2,5)

A DHL consistiu de 60% de gordura em kcal [40,4% de ração padronizada para animais de laboratório (Nuvilab CR-1), 37,4% de banha de porco, 13,7% de albumina, 7,4% aminomix (vitaminas e minerais) e 1,1% de pó-bi (farinha de osso e ostra). A RP (Nuvilab CR-1) foi moída e adicionada na forma de pó aos demais componentes, sendo armazenada em refrigerador (2-8°C) mantendo a mesma forma de apresentação. Ambas as dietas (RP e DHL) foram oferecidas aos animais (ad libitum) durante as 24 semanas de experimentação.

O processo de instilação intranasal (i.n.) foi realizado diariamente, uma vez ao dia, nos quais os grupos C e D receberam SF e os grupos P e DP receberam suspensão de MP2,5 (5μg/10μL/dose (mg/kg)). O poluente utilizado foi contido em filtro de policarbonato, por meio de um coletador gravimétrico instalado na Faculdade de Medicina da USP, na cidade de São Paulo, Brasil (ano?). O local de exposição estava próximo a um centro de monitoramento do Centro de Vigilância Sanitária de São Paulo. A estimativa é de que no mínimo 100.000 veículos circulavam diariamente na rua principal e lateral. Não havia indústrias ou fontes significantes de biomassa nos arredores. A determinação de traços de elementos do MP foi feita por meio de análise por ativação de nêutrons e a concentração foi expressada por ng/m³ de ar: As, 12.91±0.53; Br, 8.88±0.39; Cl, 8.88±0.39; Co, 1.14±0.04; Fe, 1.15±0.03; La, 2.33±0.29; Mn, 27.5±2.2; Sb, 8.73±0.08; Sc, 0.141±0009; Th 0.351±0.050. Da mesma forma, a concentração de enxofre, determinada por análise de fluorescência de raio-X, foi de 1.424±0.08 µm/m³. Após a exposição à poluição (24 horas) o filtro foi retirado e a coleta das partículas aderidas no mesmo foi realizada por meio de sonicação em banho de ultrassom. As partículas foram ressuspensas na concentração de 5μg/10μL, em SF.

Conteúdo de HSP70

A mensuração do conteúdo de HSP70 nos tecido pulmonar e cardíaco foram realizadas por análises de imunoblotting (LAEMMLI, 1970). Quantidades equivalentes de proteína de cada amostra foram preparadas em tampão de amostra. As amostras foram fervidas durante 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. Após, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por eletrotransferência e, subsequentemente, as bandas transferidas foram visualizadas com 0,3% (w / v) de Red Ponceau S. Os procedimentos foram realizados com SNAP i.d., sistema de vácuo para imunoblot rápido. As membranas foram lavadas com água destilada e, em seguida, blotadas com 0,5% (w/v) de leite em pó em tampão de lavagem. Após, as membranas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e incubadas durante 15 minutos com os respectivos anticorpos. Para a imunodeteção foi utilizado anticorpo monoclonal anti-HSP70 (Sigma H5147; diluído 1:1000) e anticorpo policlonal anti-mouse contendo peroxidase (Sigma A9044; diluído 1:15.000), ambos revelados por quimiluminescência em filme (Amersham Hyperfilm ECL; GE, Health Care) após incubação da membrana em solução ECL (GE, Health Care). As imagens (bandas) referentes à expressão de HSP70 foram quantificadas por meio do software ImageJ, e os resultados expressos em unidades arbitrárias de HSP70.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tecido cardíaco apresentou maior conteúdo de HSP70 nos animais submetidos à instilação de suspensão de MP2,5, quando comparados aos animais controle (Fig. 1-B). Não foi observado resposta semelhante no tecido pulmonar (Fig. 1-A). Não foi observado alteração no conteúdo desta proteína nos animais submetidos à ingestão de dieta hiperlipídica em ambos os tecidos.

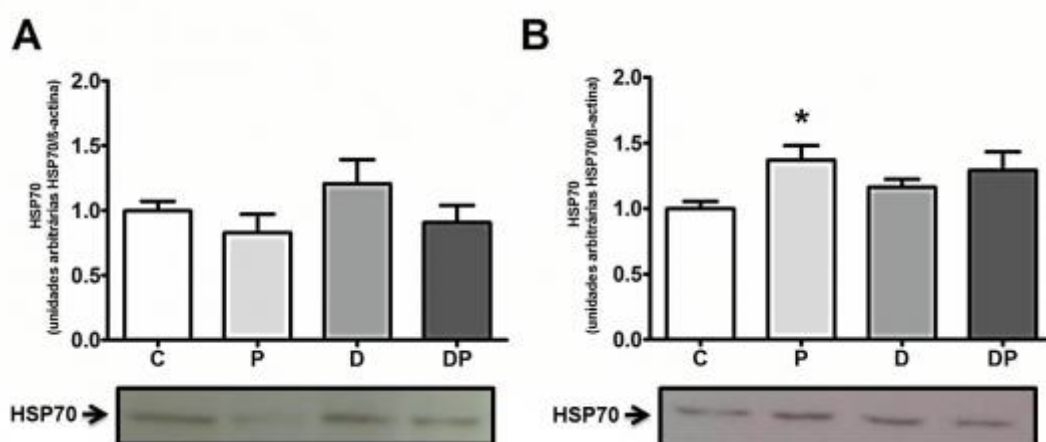


Figura 1. Expressão de HSP70 no tecido pulmonar (A) e cardíaco (B) de camundongos B6 submetidos à dieta hiperlipídica e exposição a material particulado fino durante 24 semanas. *P vs C, P=0,032.

A exposição ao MP2,5 é um fator de risco para mortalidade por doenças cardiovasculares por meio de mecanismos que geralmente incluem estresse oxidativo e inflamação pulmonar e sistêmica, aterosclerose acelerada e alteração da função autonômica cardíaca (POPE III et al., 2002).

Após a passagem pelas vias respiratórias superiores e inferiores, o MP2,5 é capaz de percorrer a circulação sanguínea e atingir vários tecidos do organismo. Aliada a isso, a inflamação desencadeada nos pulmões pode, por meio de mediadores circulantes, causar efeitos cardiovasculares sistêmicos (FERNANDES et al., 2009).

Estudos realizados por Sancini et al. (2014) demonstraram que a exposição aguda ao MP2,5 eleva os níveis de HSP70 no tecido cardíaco, todavia com menor impacto sobre o tecido pulmonar. Da mesma forma, nosso estudo demonstra que a exposição a longo prazo também eleva o conteúdo de HSP70 no coração, sugerindo a ocorrência de efeitos prejudiciais neste tecido, porém não demonstra alteração dos níveis desta proteína no pulmão.

Esta resposta (aumento de HSP70) pode estar associada a ação de metais presentes no poluente utilizado. Hampel et al. (2015) demonstrou a ocorrência de efeitos inflamatórios cardiovasculares relacionados a presença de ferro e cobre. Já Markiewicz-Górka et al. (2015) destaca um aumento dos níveis de peroxidação lipídica no coração associados aos efeitos do cádmio, fósforo e manganês por exposição crônica. Damiani et al. (2012) encontrou em seu trabalho, ao expor ratos ao ROFA (Residual Oil Fly Ash), que é um poluente produto da queima de combustíveis fósseis, maior

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

parâmetro de estresse oxidativo em tecido pulmonar do que em relação ao tecido cardíaco. Sabe-se que a HSP70 apresenta efeitos citoprotetores ao dano oxidativo e à condições pró-inflamatórias (ALBERTS et al., 2010), nesse sentido, é importante destacar que o MP2,5 utilizado em nosso estudo tem na sua composição altas concentrações de manganês, o que pode ter promovido danos no tecido cardíaco, e potencializado a resposta citoprotetora da HSP70.

CONCLUSÃO

A exposição crônica de camundongos ao MP2,5 desencadeou resposta ao estresse no coração, biomarcado pelo aumento do conteúdo de HSP70 neste tecido. Não foi identificada alteração na expressão desta proteína no tecido pulmonar e na condição de associação entre os fatores ambientais (obesidade e exposição ao MP2,5), sugerindo distinção tecidual quanto a resposta ao estresse, com possível implicação na suscetibilidade a dano nestes tecidos.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. *Biologia Molecular da Célula*. 5a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

BROCHU, P.; BOUCHARD, M.; HADDAD, S. Physiological daily inhalation rates for health risk assessment in overweight/obese children, adults, and elderly. *Risk Analysis*, v. 34, n. 3, p. 567–582, 2014.

DAMIANI, R. M. et al. Is cardiac tissue more susceptible than lung to oxidative effects induced by chronic nasotropic instillation of residual oil fly ash (ROFA)? *Toxicology Mechanisms and Methods*, v. 22, p. 533–539, 2012.

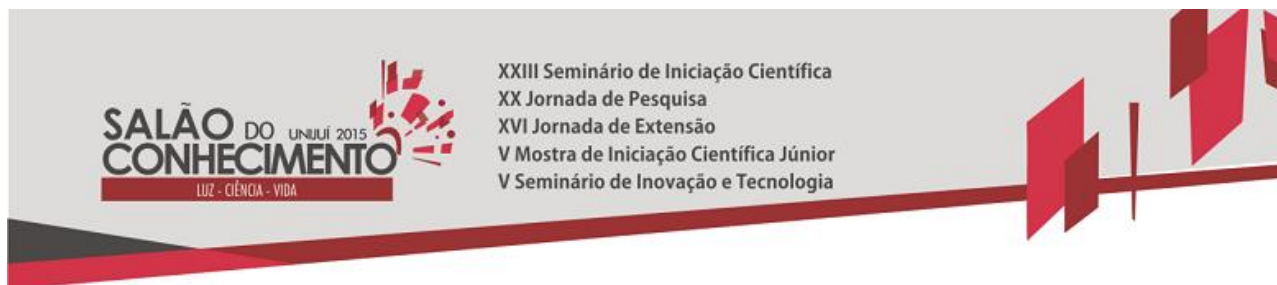
FERNANDES, J. S. et al. Poluição atmosférica e efeitos respiratórios , cardiovasculares e reprodutivos na saúde humana. *Rev Med Minas Gerais*, v. 20, n. 1, p. 92–101, 2010.

FRANCHINI, M.; MANNUCCI, P. M. Thrombogenicity and cardiovascular effects of ambient air pollution. *Blood*, v. 118, n. 9, p. 2405–2412, 2011.

FIETTO, L. G. et al. Identification and in silico analysis of the Citrus HSP70 molecular chaperone gene family. *Genetics and Molecular Biology*, v. 30, n. 3 SUPPL., p. 881–887, 2007.

HAMPEL, R. et al. Long-term effects of elemental composition of particulate matter on inflammatory blood markers in European cohorts. *Environment International*, v. 82, p. 76–84, 2015.

KIM, C. S. et al. Particle deposition in bifurcating airway models with varying airway geometry. *Journal of Aerosol Science*, v. 25, n. 3, p. 567–581, 1994.



Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

KÜNZLI, N.; TAGER, I. B. Air pollution: From lung to heart. *Swiss Medical Weekly*, v. 135, n. 47-48, p. 697–702, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, n.259, p.680-685, 1970.

LATCHMAN, D. S. Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovascular Research*, v. 51, n. 4, p. 637–646, 2001.

MARKIEWICZ-GÓRKA, I. et al. Effects of chronic exposure to lead, cadmium, and manganese mixtures on oxidative stress in rat liver and heart. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, v. 66, n. 1, p. 51–62, 2015.

POPE III, C. A. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: Biologic mechanisms and who's at risk? *Environmental Health Perspectives*, v. 108, n. SUPPL. 4, p. 713–723, 2000.

POPE III, C. A. et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Jama*, v. 287, n. 9, p. 1132–1141, 2002.

ROBERT, C.K.; BARNARD, .R.J. Effects of exercise and diet on chronic disease. *J Appl Physiol.*, v.98, n.1, p.3-30, 2005

SANCINI, G. et al. Health Risk Assessment for Air Pollutants: Alterations in Lung and Cardiac Gene Expression in Mice Exposed to Milano Winter Fine Particulate Matter (PM2.5). *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, p. e109685, 2014.

TAMAGAWA, E. et al. Particulate matter exposure induces persistent lung inflammation and endothelial dysfunction. *American Journal of physiological Lung Cellular Molecule Physiology*, v. 295, p. 79–85, 2008.

WHO, World Health Organization. Obesity. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/obesity/en/>>. Acesso em: 29 de Junho de 2015