Sônia de Fátima Soto

**Alterações placentárias em resposta à exposição de ratas
Wistar à poluição atmosférica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Joel Claudio Heimann

Coorientadora: Dra. Mariana Matera Veras

SÃO PAULO

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Soto, Sônia de Fátima

Alterações placentárias em resposta à exposição de ratas Wistar à poluição atmosférica / Sônia de Fátima Soto. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Nefrologia.

Orientador: Joel Claudio Heimann.

Coorientadora: Mariana Matera Veras.

Descritores: 1.Poluição do ar 2.Placenta 3.Sistema renina-angiotensina
4.Fator de crescimento transformador beta 1 5.Fator A do crescimento do
endotélio vascular 6.Ratos, Wistar 7.Fêmea

USP/FM/DBD-457/14

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Médica 16 (LIM-16) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e recebeu apoio financeiro e bolsa de doutorado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

A Daluz, minha mãe, luz na minha vida.

A João, meu pai, minha fortaleza.

A Gisella, minha irmã, minha dádiva.

Com todo meu amor...

Agradecimentos

A **Deus**, autor de toda vida.

Aos meus pais **João e Daluz**, exemplo de vida. Por caminharem comigo cada passo da minha existência, pelos carinhos que me aquecem o coração e por me incentivarem a perseverar na caminhada para a concretização deste sonho.

A minha irmã **Gisella**, minha companheira para todas as horas, minha inspiração profissional. Por me mostrar todos os dias que a humildade e a determinação são as principais qualidades do ser humano.

Aos meus **familiares e amigos**, que compreenderam minhas ausências e que estiveram sempre dispostos a me ajudar de alguma forma no decorrer deste trabalho.

Ao **Dr Rogerio Pazetti**, meu orientador de iniciação científica, por ser o principal responsável pelo meu interesse na pesquisa científica.

Ao meu orientador, **Prof Dr Joel Claudio Heimann**, pela proposta deste estudo, por todos os ensinamentos, dedicação, atenção e disponibilidade durante a construção deste trabalho.

A minha coorientadora, **Dra Mariana Matera Veras**, pela colaboração e por participar do meu aprendizado em morfologia placentária.

As especialistas **Ms Ivone de Oliveira**, que anima nosso laboratório com toda sua alegria, otimismo e espontaneidade e a **Dra Luzia Furukawa**, que tem sempre muito a nos ensinar. Obrigada pela disponibilidade em ajudar nos experimentos.

A **Dra Isis Akemi Katayama**, por me apresentar ao Prof Dr Joel e me ensinar muitas coisas durante sua permanência no laboratório. Obrigada também pela companhia nos congressos, pelos passeios e pelos experimentos de Western Blotting. Guardarei sua amizade com muito carinho.

A **Dra Karen Lucasechi Lopes**, grande companheira de experimentos e congressos. Pela amizade, pelos experimentos de bioquímica, por todos os ensinamentos.

A **Guilherme Marchesi**, aluno de iniciação científica vinculado a este projeto e pessoa importante na escrita deste trabalho. Obrigada pela companhia, pelas risadas diárias, pelos ensinamentos sobre VEGF-A e pela disposição em ajudar.

A **Ms Carolina Romão** que, nos últimos tempos, tem tornado meus dias neste laboratório mais animados e por toda ajuda na escrita deste trabalho.

Aos companheiros queridos de grupo **Priscila Seravalli**, por toda sua ansiedade, **Rafael Canavel**, por toda a sua calma, **Breno Zago**, pela trilha sonora nas tardes do nosso laboratório e **Dra Maria Angélica Peres** pela empolgação e discernimento na ciência.

A **Ms Regiane Machado**, **Dra Juliana de Melo Oliveira**, **Letícia Pereira**, **Jéssica Gaião Leão Araújo**, **Dra Camilla Ferreira Wenceslau**, **Dra Flávia Siqueira** e **Ms Carina de Fátima Guimarães**, que colaboraram neste trabalho, seja nos experimentos, nas exposições das ratas à poluição atmosférica, nas ideias novas para os protocolos, nas análises estatísticas e nas burocracias.

A **Walter Campestre**, que sempre se preocupou com o bem-estar dos animais e que deixa seu perfume por onde passa.

A **Denise** e **Solange**, secretárias do nosso laboratório pela ajuda sempre que necessária.

Aos **colegas do LIM 16** pela companhia ao longo destes quatro anos.

Ao **Laboratório de Fisiopatologia Renal (LIM 16)** da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela oportunidade e por disponibilizar todo o suporte necessário para o desenvolvimento deste projeto.

Ao **Laboratório de Poluição Atmosférica** (LIM 05) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela colaboração neste trabalho.

A **Faculdade de Medicina da universidade de São Paulo** e ao programa de pós-graduação da **Nefrologia** pelo estudo desenvolvido.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) pelo apoio financeiro e concessão da bolsa.

*“O tempo amadurece todas as coisas.
Nenhum homem nasce sábio.”*

Miguel de Cervantes

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de quadros

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	11
3. MÉTODOS	13
3.1. Protocolo de exposição	14
3.2. Grupos experimentais	15
3.3. Exposição às partículas atmosféricas	15
3.4. Animais	17
3.4.1. Gestação	18
3.5. Desfechos gestacionais	19
3.6. Atividade de renina e ECA maternas	20

3.7. Expressão proteica	21
3.8. Análise estatística	22
4. RESULTADOS	23
4.1. Mães	24
4.1.1. Desfechos gestacionais	27
4.2. Placentas	28
4.2.1. Massa placentária	28
4.2.2. Diâmetros placentários	30
4.2.3. Volumes das frações placentárias	32
4.3. Expressão proteica de TGF β 1	33
4.4. Fatores angiogênicos	33
4.5. Sistema renina-angiotensina	35
4.5.1. Atividade enzimática	38
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
8. APÊNDICES	

LISTA DE ABREVIATURAS

AGTO	angiotensinogênio
Ang I	angiotensina I
Ang II	angiotensina II
AT ₁ R	receptor AT ₁ para angiotensina II
AT ₂ R	receptor AT ₂ para angiotensina II
BPN	baixo peso ao nascimento
CO	monóxido de carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CPA	concentrador de partículas ambientais
ECA	enzima conversora de angiotensina
ECA 2	enzima conversora de angiotensina, tipo 2
Flk-1	<i>fms-related tyrosine kinase 1</i>
Flt-1	<i>fetal liver kinase 1</i>
MP	material particulado
O ₃	ozônio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAc	pressão arterial caudal
PTS	partículas totais em suspensão
RCIU	restrição de crescimento intrauterino
SO ₂	dióxido de enxofre
SRA	sistema renina angiotensina
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
VEGF-A	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema de placenta madura de camundongo composta de três camadas principais: labirinto, espongiotrofoblasto e decídua materna. 6
- Figura 2.** Múltiplos sistemas efetores do SRA. AGTO: angiotensinogênio; ANG I: angiotensina I; ANG II: angiotensina II; ECA: enzima de conversão da angiotensina I; ECA 2: enzima conversora tipo 2 de angiotensina I; ANG 1-9: angiotensina 1-9; ANG 1-7: angiotensina 1-7; Mas-R: receptor Mas. 9
- Figura 3.** Representação da localização da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) (Miranda et al, 2002 - adaptado). 16
- Figura 4.** Ganho percentual semanal de massa corpórea das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. 24
- Figura 5.** Índice HOMA das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. 26
- Figura 6.** Massa média dos fetos das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP. 28
- Figura 7.** Massa placentária das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP. 29
- Figura 8.** Diâmetro longitudinal e diâmetro transversal das porções materna e fetal da placenta das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a

gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p<0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP. 30

Figura 9. Área da superfície das porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p<0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP. 31

Figura 10. Espessura das porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p<0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP. 32

Figura 11. Volume das decíduas (porção materna da placenta), zonas juncionais, labirintos e placas coriônicas (porção fetal da placenta) das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p<0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP. 32

Figura 12. Expressão proteica de TGF β 1 nas porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p<0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP. 33

Figura 13. Expressão proteica de VEGF-A nas porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p<0.05$ ¹vs FF; ²vs 34

FP; ³vs PF; ⁴vs PP.

Figura 14. Expressão proteica de VEGF-A nas porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP. 34

Figura 15. Expressão proteica de AGTO nas porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP. 35

Figura 16. Expressão proteica de renina nas porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP. 36

Figura 17. Expressão proteica de ECA nas porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP. 36

Figura 18. Expressão proteica de Ang II nas porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP. 37

Figura 19. Expressão proteica de AT₁R e AT₂R das porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a

gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP. 38

Figura 20. **A** - Atividade de ECA sérica **B** – atividade de ECA nas porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP. 39

Figura 21. Atividade da renina plasmática das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP. 40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Consumo médio de ração e ingestão hídrica das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). 24
- Tabela 2.** Pressão arterial caudal das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). 25
- Tabela 3.** Glicemia e insulinemia ao final dos períodos pré-gestacional e gestacional das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). 26
- Tabela 4.** Massa dos órgãos corrigidos pelo comprimento da tíbia e índice de adiposidade das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). 27

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Padrões nacionais de qualidade do ar	2
Quadro 2. Valores-guia para emissão de material particulado	4
Quadro 3. Períodos de exposição dos grupos de animais que receberam ar filtrado (F) ou ar poluído (P).	15

Resumo

Soto SF. *Alterações placentárias em resposta à exposição de ratas Wistar à poluição atmosférica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: A exposição à poluição atmosférica durante a gestação provoca alterações nas características da placenta e pode resultar em restrição de crescimento intrauterino. Sabe-se que o *transforming growth factor beta 1* (TGF β 1), o sistema renina-angiotensina uteroplacentário (SRA) e os fatores angiogênicos, tais como *vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A) participam do processo de placentação e regulação do fluxo sanguíneo uteroplacentário. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da exposição à poluição do ar sobre a morfologia, função e SRA placentários.

Métodos: Ratas Wistar fêmeas foram expostas ao ar filtrado (F) ou ao material particulado 2.5 μ m (P) durante 15 dias. Depois o cruzamento, as ratas foram divididas em 4 grupos e novamente expostas a F ou P (FF, FP, PF, PP). No 19º dia de gestação, as porções maternas e fetais das placentas foram coletadas. Estrutura da placenta, TGF β 1, VEGF-A e seus receptores e os componentes do SRA foram avaliados.

Resultados: A exposição ao material particulado diminuiu massa, tamanho e área de superfície placentária, um indicativo da interação materno-fetal. As concentrações placentárias de TGF β 1, VEGF-A e Flk-1 e os componentes do SRA foram alterados e isso pode indicar um prejuízo na invasão do trofoblasto, angiogênese placentária e troca de nutrientes e gases entre mãe e fetos.

Discussão: Os resultados indicam que a exposição a partículas compromete a interação materno-fetal e pode refletir sobre a nutrição e crescimento fetal.

Descritores: 1. Poluição do ar 2. Placenta 3. Sistema renina-angiotensina 4. Fator de crescimento transformador beta 1 5. Fator A do crescimento do endotélio vascular 6. Ratos, Wistar 7. Fêmea

Abstract

Soto SF. *Placental alterations in response to exposure of Wistar rats to air pollution* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introduction: Exposure to air pollution during pregnancy causes alterations in placental characteristics and may result in intrauterine growth restriction. It was suggested that transforming growth factor beta 1 (TGFβ1), the uteroplacental renin-angiotensin system (RAS) and angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) participates of the placentation process and regulation of the uteroplacental blood flow. Thus, the aim of the present study was to investigate the effect of exposure to air pollution on the placental morphology, function and placental RAS.

Methods: Female Wistar rats were exposed to filtrated air (F) or to concentrated particulate matter 2.5μm (P) for 15 days. After mating, rats were divided in 4 groups and again exposed to F or P (FF, FP, PF, PP). At 19th day of pregnancy, maternal and fetal portions of placenta were collected. Placental structure, TGFβ1, VEGF-A and its receptors and RAS components were evaluated.

Results: Exposure to particulate matter decreased placental mass, size and surface area, an indicative of maternal-fetal interaction. Placental TGFβ1, RAS components and VEGF-A and receptors Flk-1 concentrations were altered and this may indicate a prejudice in the trophoblast invasion, placental angiogenesis and maternal-fetal nutrients and gases exchange.

Discussion: These findings indicate that exposure to particulate matter compromises the maternal-fetal interaction and may reflect on fetal nutrition and growth.

Descriptors: 1. Air pollution 2. Placenta 3. Renin-angiotensin system 4. Transforming growth factor beta 1 5. Vascular endotelial growth factor A 6. Rats, Wistar 7. Female

1. Introdução

A poluição atmosférica representa grande preocupação da saúde pública, pois é um fenômeno ocasionado à partir do desenvolvimento econômico gerado nos últimos séculos (Saldiva PHN, 2010). Com a progressão da urbanização há aumento significativo na emissão de poluentes atmosféricos que contribuem significativamente para a deterioração da qualidade do ar (Miranda et al., 2012; CETESB, 2008).

Entende-se por poluição do ar alterações da composição atmosférica que resultam em danos reais ou potenciais. Dentro deste conceito, pressupõe-se a existência de níveis de referência para diferenciar a atmosfera poluída da atmosfera não poluída. O nível de referência sob o aspecto legal é denominado Padrão de Qualidade do Ar.

No Brasil, os Padrões de Qualidade do Ar vigentes foram estabelecidos pela resolução Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Os atuais limites aceitos foram estabelecidos na década de 1980, traduzindo o conhecimento científico disponível na década de 1970 e mantem esses padrões inalterados até os dias atuais (quadro 1). Foram estabelecidos pela resolução os padrões primários, destinados à proteção da saúde pública, e os padrões secundários, para proteção do meio ambiente e do bem-estar da população (Saldiva PHN, 2010; CONAMA, 1990).

Quadro 1. Padrões Nacionais de Qualidade do Ar

Poluente	Tempo de Exposição	Padrão Primário ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Padrão Secundário ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Partículas Totais em Suspensão (PTS)	24 horas	240	150
Partículas Inaláveis (MP_{10})	24 horas	150	150
Fumaça	24 horas	150	100
Dióxido de Enxofre (SO_2)	24 horas	365	100
Monóxido de Carbono (CO)	1 hora	40.000	40.000
Ozônio (O_3)	1 hora	160	160
Dióxido de Nitrogênio (NO_2)	1 hora	320	190

Fonte: Resolução CONAMA nº3 (1990)

Dentre os poluentes atmosféricos, as consequências do material particulado (MP) vêm sendo amplamente estudadas. É um poluente formado a partir de uma complexa mistura de partículas sólidas e líquidas extremamente pequenas, incluindo ácidos, sulfatos, nitratos, metais e partículas de poeira e do solo, além de outros compostos orgânicos e seu tamanho está inversamente associado a efeitos adversos à saúde (Dreher et al., 1997; Glorennec e Monroux, 2007). De acordo com Pope III e Dockery (2006), o MP pode ser classificado em três principais frações:

- Partículas inaláveis grossas, com diâmetro aerodinâmico entre 2,5 e 10 μm (MP₁₀): derivadas primariamente de suspensão ou ressuspensão de poeira, solo, e outros materiais provenientes de rodovias, agricultura, minerais, vulcões e assim por diante. Nestas partículas também estão sal marinho, grãos de pólen, esporos e outras partes de plantas.
- Partículas inaláveis finas, com diâmetro aerodinâmico entre 2,5 e 0,1 μm (MP_{2,5}): derivadas de processos de combustão, como veículos à gasolina e diesel, queima de madeira e carvão e processos industriais.
- Partículas inaláveis ultrafinas, com diâmetro aerodinâmico menores que 0,1 μm (MP_{0,1}): derivadas de escapamentos de veículos e reações fotoquímicas atmosféricas. Estas partículas têm vida curta e crescimento rápido, consistindo parte do MP_{2,5}. Além disso são capazes de ultrapassar as barreiras pulmonares chegando ao sangue e a outras partes do corpo.

Recentemente o MP_{2,5} tem merecido maior atenção devido ao seu grande potencial para causar efeitos adversos à saúde como alterações do ritmo cardíaco, aumento da pressão arterial, trombose venosa e infarto agudo do miocárdio (Araújo et

al., 2008; CETESB, 2008). Em vista disso e com base nas resoluções do CONAMA, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu valores numéricos e tempo de exposição considerados seguros para a população humana (quadro 2), embora atualmente e as concentrações de poluentes sejam superiores a este valor (SALDIVA PHN, 2010).

Quadro 2. Valores-guia para emissão de material particulado

Poluente	Média em 24 horas
MP₁₀	50 µg/m ³
MP_{2,5}	25 µg/m ³

Fonte: WHO, 2005.

A exposição de humanos adultos a poluentes atmosféricos pode resultar em alterações em sua função reprodutiva, fertilidade, desenvolvimento gestacional e saúde fetal (Veras et al., 2010). Estudos realizados em humanos na cidade de Nova York mostraram que a exposição pré-natal a poluentes atmosféricos dobra o risco de partos prematuros (Gouveia et al., 2004), aumenta o risco de atrasos no desenvolvimento cognitivo dos filhos, aumenta o risco de câncer e asma na vida adulta (Choi et al., 2008; Whyatt et al., 1998; Perera et al., 2009). Além disso, a exposição à maioria dos poluentes atmosféricos (CO, SO₂, NO₂ e partículas) já foram associados com baixo peso ao nascimento (BPN) (Gouveia et al., 2004).

Nos anos 1980, Barker e colaboradores constataram uma associação entre BPN e doenças cardiovasculares na vida adulta (Barker et al., 1989). De acordo com a hipótese de Barker, o período gestacional e o desenvolvimento intrauterino são cruciais para a determinação de desenvolvimento de doenças na vida adulta como hipertensão (Barker et al., 1990; Law et al., 1993; Eriksson et al., 2007) e diabetes tipo 2 (Hales et al., 1991; McCance et al., 1994; Lithell et al., 1996; Rich-Edwards et al., 1999).

Estudos revelam que a exposição gestacional à poluição atmosférica causa distúrbios na estrutura e funções da placenta (Veras et al., 2008; Rocha e Silva et al., 2008). Estas alterações podem afetar o transporte de nutrientes e gases para o feto (Watson e Cross, 2005; Adamson et al., 2002) e podem induzir restrição de crescimento intrauterino (RCIU) em resposta à deficiência na perfusão uteroplacentária (Lee et al., 2003; Leandro et al., 2008).

A placenta desempenha funções fundamentais como transporte de nutrientes essenciais ao feto, funções metabólicas e funções endócrinas (Bauer et al., 1998; Cross, 1998). Em humanos e roedores, uma placenta completamente desenvolvida possui três grandes camadas (figura 1) (Watson e Cross, 2005):

- Camada exterior materna (decídua), que inclui células uterinas decíduais, assim como vasos maternos que transportam sangue para ou do sítio de implantação.
- Zona juncional (espongiotrofoglasto), camada intermediária que liga a placenta fetal ao útero e contém células trofoblásticas (fetoplacentárias) que invadem a parede uterina e os vasos maternos.
- Camada interna (labirinto) composta por vilosidades altamente ramificadas responsáveis por garantir uma troca eficiente de nutrientes.

Figura 1. Esquema de placenta madura de camundongo composta de três camadas principais: labirinto, espongiotrofoblasto e decídua materna. (Watson e Cross, 2005 – adaptado).

Sabe-se que a nutrição fetal depende da habilidade placentária em transferir nutrientes do sangue materno para o feto. Em algumas situações, a placenta pode ter a sua função prejudicada, podendo refletir na saúde fetal e na predisposição ao desenvolvimento de hipertensão na vida adulta (Eriksson et al., 2011). Durante a formação placentária ainda podem ocorrer alguns defeitos como diminuição do número de vilosidades, do lúmen e das ramificações arteriais decorrentes da diminuição do diâmetro e da área de superfície placentária, comprometendo a nutrição fetal (Adamson et al., 2002; Watson e Cross, 2005; Regnaut et al., 2002).

De acordo com Barker e colaboradores (2011), a diferença entre os diâmetros pode ocorrer devido à polarização do crescimento placentário a partir do momento da implantação. O diâmetro do eixo maior está alinhado com o crescimento rostro-caudal do embrião, enquanto que a medida ao longo do eixo menor é um sensor de nutrientes,

apresentando maior importância na transferência de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto.

Para garantir o crescimento e desenvolvimento normal do feto, o transporte de nutrientes entre o fluxo sanguíneo materno e fetal ocorre em contracorrente no labirinto, maximizando o transporte de nutrientes (Adamson et al., 2002). Se o labirinto não estiver apropriadamente vascularizado com modelamento, ramificações e dilatação adequadas, a perfusão placentária fica comprometida, resultando em pobre difusão de oxigênio e nutrientes (Watson e Cross, 2005).

A invasão bem sucedida do sistema vascular materno pelo trofoblasto é um pré-requisito para o estabelecimento de uma placenta normal e continuação da gravidez. Vários estudos sugerem que o *transforming growth factor beta* (TGF β) tem papel importante na invasão do endométrio pelo trofoblasto. O TGF β 1 pode regular uma variedade de funções celulares, incluindo a proliferação celular, diferenciação, invasão e a apoptose de células placentárias (Lafontaine et al., 2011; Lash et al., 2005; Caniggia et al., 1999).

Outro fator que tem papel fundamental na placentação é o *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) é um dos principais mediadores da homeostase vascular. O genoma dos mamíferos codifica cinco membros da família VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e PlGF (*placental growth factor*) responsáveis pela regulação da angiogênese, vasculogênese e embriogênese. Dentre estas isoformas, o VEGF-A é considerado o mais importante, pois desempenha papel crucial na formação de vasos sanguíneos no início da embriogênese (Holmes e Zachary, 2005; Koch et al., 2011).

O VEGF-A se liga a dois receptores *fetal liver kinase 1* (Flk-1) e, *fms-related tyrosine kinase 1* (Flt-1). O Flk-1 é um regulador pró-angiogênico, estimulando sobrevivência e crescimento de células endoteliais vasculares e tem menor afinidade

com o VEGF-A se comparado ao receptor Flt-1 que atua como supressor e controlador de sinalização do receptor Flk-1, evitando crescimento exagerado e desorganizado de células endoteliais (Shibuya, 2012).

Para expansão e diferenciação adequada das células endoteliais, é necessário que a ativação dos receptores Flk-1 e Flt-1 ocorra de forma coordenada (Shibuya e Claesson-Welsh, 2005). Fong e colaboradores (1995) estudaram ratas com mutação para Flt-1 e verificaram que os fetos morriam no nono dia de gestação devido à desorganização e disfunção do sistema vascular. Outros estudos mostraram que ratas que tiveram um ou os dois alelos de VEGF-A inativados, apresentaram prejuízo na angiogênese, causando anomalias e até morte do embrião (Ferrara et al., 1996; Carmeliet et al., 1996).

Van den Hooven e colaboradores (2012) demonstraram que a exposição materna a altas concentrações de MP_{10} e NO_2 estão relacionadas a baixa massa placentária, podendo alterar proporções entre fatores pró e anti-angiogênicos.

O sistema renina-angiotensina (SRA) tecidual também participa do processo de placentação (Nielsen et al., 2000), podendo induzir RCIU se funcionalmente comprometido.

Diversos estudos comprovaram que o SRA tecidual exerce ações diferentes de acordo com os órgãos em que é encontrado e atua de forma paralela ao SRA circulante. Enquanto este sistema é um regulador de balanço hídrico e de pressão sanguínea (figura 2), o SRA tecidual tem efeitos locais, como proliferação, crescimento, síntese proteica e funções dos órgãos, como por exemplo, de rins, coração, pulmões, cérebro, órgãos reprodutivos e pâncreas (Paul et al., 2006).

Figura 2. Múltiplos sistemas efetores do SRA. AGTO: angiotensinogênio; ANG I: angiotensina I; ANG II: angiotensina II; ECA: enzima de conversão da angiotensina I; ECA 2: enzima conversora tipo 2 de angiotensina I; ANG 1-9: angiotensina 1-9; ANG 1-7: angiotensina 1-7; Mas-R: receptor Mas. (Castrop et al., 2010 – adaptado).

Estudos sugerem que o SRA exerce papel importante na decidualização (Squires and Kennedy, 1992) e já foi demonstrado que a angiotensina II (Ang II) placentária atua como importante regulador na migração e invasão do trofoblasto nos estágios iniciais da gestação (Hering et al., 2011).

Classicamente, a Ang II pode se ligar a dois receptores, receptor AT₁ (AT₁R) – receptor de membrana em que a Ang II se liga desencadeando em vasoconstrição, secreção de aldosterona, reabsorção de sódio renal, respostas pressóricas e taquicardia (Lijnen et al., 2001; Touys, 2003) – ou receptor AT₂ (AT₂R) – receptor de membrana em que a Ang II se liga e parece ter uma ação contrabalanceada da sua ação sobre o AT₁R, desempenhando, portanto, um papel protetor (Horiuchi et al., 1999; Levy, 2005).

Já foram encontrados AT₁R e AT₂R em membranas fetais e placentas de humanos, coelhos, ratos e porcos. A estimulação do AT₁R causa vasoconstrição e promove processos de crescimento, enquanto que o AT₂R medeia diferenciação celular, inibição de proliferação celular, apoptose e possivelmente vasodilatação (Hein, 1998; Ardaillou, 1999).

Em placenta humana, AT₁R são predominantes e estão localizados no citotrofoblasto e sinciotrofoblasto, trofoblasto extraviloso e em volta dos vasos sanguíneos das vilosidades placentárias (Knock et al., 1994; Li et al., 1998). Enquanto que a expressão genica e proteica de AT₂R é alta nos tecidos fetais, participando nos processos de diferenciação e morte celular (Sánchez et al., 2008).

Estudos mostraram uma relação entre alterações do SRA e a ocorrência de pré-eclâmpsia. Alguns estudos ainda associam a ocorrência desta condição gestacional à exposição à poluição atmosférica. Contudo, é possível que haja uma íntima relação entre os efeitos dos poluentes sobre o SRA e a morfologia placentária.

Estas evidências indicam que a exposição à poluição do ar pode influenciar a morfologia, função e peso da placenta, assim como causar modificações no SRA uteroplacentário. Estas alterações podem repercutir nos fetos, ocasionando baixo peso e alterações no desenvolvimento.

Desta forma, este é um estudo sobre as possíveis interferências que a exposição de ratas Wistar à poluição atmosférica de São Paulo podem causar sobre a morfologia placentária e sobre o SRA deste órgão, levando em consideração os diferentes períodos de exposição.

2. Objetivos

O objetivo do presente estudo foi verificar se a exposição materna à poluição atmosférica, dentro dos limites considerados seguros pela Organização Mundial de Saúde, induz modificações placentárias. Para isso foi avaliado:

- Se há alterações estruturais nas porções materna e fetal de placentas de ratas Wistar expostas à poluição atmosférica nos períodos pré-gestacional e gestacional;
- A expressão proteica e atividade do sistema renina-angiotensina sérico materno e dos tecidos placentários;
- A expressão proteica do fator de invasão trofoblástica TGF β 1 e dos fatores angiogênicos VEGF-A e Flk-1 nas porções materna e fetal da placenta.

3. Métodos

Os experimentos propostos nesse projeto de pesquisa foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa – CAPPesq - do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), protocolo número 0381/10.

3.1. Protocolo de exposição

Ratas Wistar com nove semanas de idade foram expostas diariamente ao MP_{2,5} por meio de um Concentrador de Partículas Atmosféricas (CPA) (Batalha et al., 2002; Sioutas et al., 1995). As ratas foram expostas cinco vezes por semana durante três semanas antes da gestação e/ou sete vezes por semana durante o período gestacional, iniciado à partir do 6º dia de gestação, após o período de implantação do embrião (Cross et al., 1994). O acasalamento ocorreu na 12ª semana de vida e foi considerado o 1º dia de gestação quando foram encontrados espermatozoides no esfregaço vaginal.

Os animais foram expostos diariamente a um ambiente com concentração de 600 µg/m³ de MP_{2,5} (Davel et al., 2012) por uma hora. Se a concentração inicial fosse menor que 600 µg/m³, o tempo de exposição era proporcionalmente aumentado; se a concentração fosse maior que 600 µg/m³, o tempo de exposição era proporcionalmente diminuído. O tempo de exposição não foi menor que 30 minutos e não ultrapassou o período de 90 minutos. Os animais do grupo controle foram submetidos ao mesmo protocolo, porém receberam ar filtrado durante as exposições.

A concentração ambiental a qual os animais foram expostos (MP_{2,5} = 600 µg/m³/dia) foi determinada com base nas exposições ambientais reais ao MP_{2,5} autorizada pela OMS, e representa a concentração média diária total (24 horas) a que estamos sujeitos na cidade (CETESB, 2008).

Entre os períodos de exposição, os animais foram mantidos em caixa plástica (40x33 cm) com temperatura e ciclo claro-escuro controlados, recebendo ar limpo, comida e água à vontade.

3.2. Grupos experimentais

Quadro 3. Períodos de exposição dos grupos de animais que receberam ar filtrado (F) ou ar poluído (P).

Grupo	Período pré-gestacional	Período gestacional
FF	Ar filtrado	Ar filtrado
FP	Ar filtrado	Ar poluído
PF	Ar poluído	Ar filtrado
PP	Ar poluído	Ar poluído

3.3. Exposição às partículas atmosféricas

A exposição à poluição foi realizada na Região Metropolitana de São Paulo, dentro da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) (figura 3). As mães foram expostas a uma atmosfera com material particulado concentrado com o auxílio de um concentrador de partículas atmosféricas (CPA), localizado dentro do Campus, na intersecção da Rua Teodoro Sampaio com a Av. Doutor Arnaldo.

Figura 3. Representação da localização da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) (Miranda et al, 2002 - adaptado).

O CPA é um equipamento desenvolvido pela Escola de Saúde Pública de Harvard (EUA) e utiliza a tecnologia de impactadores virtuais, com o propósito de concentrar em até 30 vezes as partículas ambientais presentes na atmosfera sem modificá-las química ou fisicamente (<http://www.inaira.org/br/intoxicacao/concentrador.shtml>).

O ar com uma concentração determinada de partículas alimenta uma câmara onde animais são expostos. Ao mesmo tempo e sob as mesmas condições de pressão, fluxo, temperatura e umidade relativa, outra câmara disposta paralelamente é alimentada com ar filtrado para exposição do grupo controle. Os animais foram acondicionados em gaiolas apropriadas e permaneceram livres para respirar naturalmente nas duas câmaras. Para acompanhar a quantidade de poluente a qual os animais estavam expostos, foi acoplado às câmaras um equipamento chamado Data Ram que marca concentração de MP, umidade relativa do ar e temperatura dentro da câmara poluída.

Nos períodos em que não estavam recebendo poluição atmosférica, os grupos de animais foram mantidos em biotério, acondicionados em gaiolas de plástico (40x33cm)

com um número máximo de quatro animais por gaiola, mantidos em ambiente com temperatura de 23°C, com ciclos claro-escuro fixos de 12 horas e recebendo ar limpo, ração (Nuvilab CR-1, Colombo, PR, Brasil) e água *ad libitum*.

3.4. Animais

O ganho de massa corpórea, consumo de ração e água e pressão arterial caudal (PAC) foram acompanhados semanalmente durante todo o período experimental.

Para a verificação do peso corpóreo foi utilizada uma balança digital específica para pesagem de animais (modelo AS5500, Marte Balança, São Paulo, Brasil). Para a análise estatística, foi considerada a média do ganho de peso total em cada grupo.

Para a medida de consumo de ração e ingestão hídrica foi oferecida uma quantidade conhecida de dieta e água. Semanalmente, sempre no mesmo dia da semana e horário, foi pesado o que sobrou da ração fornecida e quantificada a ingestão hídrica. Este resultado foi subtraído do valor inicial oferecido aos animais para obtenção do valor da quantidade consumida. Foi considerada a média do consumo de cada grupo durante todo o período experimental.

A aferição da PAC das ratas foi realizada semanalmente em animais acordados e previamente aquecidos, desde a 9ª semana de vida até a 14ª semana, com exceção apenas da 12ª semana, período de acasalamento. Para esta medida, foi utilizado um equipamento acoplado a um transdutor de pressão (RTBP 2000; Kent Scientific Corporation, Torrington, Connecticut, EUA), o qual fornece um sinal analógico que é digitalizado e registrado utilizando-se um sistema computadorizado de aquisição e análise dos dados (DASYTec, National Instruments Company, Amherst, New Hampshire, EUA).

Os níveis de glicemia foram determinados ao final dos períodos pré-gestacional e gestacional por meio de glicosímetro (Advantage; Eli Lilly do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil), com limite de detecção entre 10 e 600 mg/dL. Ao mesmo tempo, amostras de sangue foram coletadas em tubos limpos, centrifugadas e estocadas a -20°C até a determinação da insulinemia pelo método de radioimunoensaio através de kit (Rat Insulin RIA kit; LINCO Research Inc., St. Charles, MO, EUA).

Os resultados obtidos de glicemia e insulinemia foram usados para calcular o índice HOMA, um indicador de resistência / sensibilidade à insulina, por meio do cálculo:

$$\frac{\text{Glicemia [mg/dL]} \times \text{insulina [\mu UI/mL]}}{22,5}$$

3.4.1. Gestação

Ao completarem 12 semanas de idade, as ratas foram acasaladas com machos adultos provenientes do Biotério Central da FMUSP. Para o acasalamento, duas fêmeas e um macho permaneceram na mesma gaiola de plástico até ocorrer a cópula, que foi constatada através do exame diário de lavado vaginal realizado pela infusão de 50-80µl de soro fisiológico intravaginal com auxílio de uma pipeta automática. Depois de infundido, o soro foi imediatamente aspirado e o lavado colocado em lâmina e corado com corante de Leishman para visualização de espermatozoides. Quando encontrados, as ratas foram separadas em gaiolas individuais (40x33cm) e considerou-se o primeiro dia de gestação. As ratas foram mantidas com os machos na mesma gaiola por, no máximo, cinco noites. Não ocorrendo cópula, foram excluídas do protocolo.

3.5. Desfechos gestacionais

Ao 19º dia de gestação, as ratas prenhes foram anestesiadas por injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (100mg/kg). A parede abdominal foi aberta, os vasos uterinos ligados, o útero cuidadosamente removido e os fetos e as placentas (juntamente com a decídua subjacente) foram dissecados e pesados.

Uma placenta selecionada randomicamente de cada ninhada foi dissecada para a remoção das membranas extra-embriônicas e fixada em paraformaldeído 4% por imersão por 24 horas e transferida para etanol 70% para estudo dos volumes dos compartimentos placentários.

As placentas foram separadas em porção materna (decídua) e porção fetal e estocadas em tubos plásticos em freezer -80°C.

Duas ratas por grupo foram randomicamente selecionadas para verificação da espessura, diâmetros longitudinais e transversais do tecido placentário. Esta medida representa um índice de saúde fetal e função placentária. Os valores foram verificados por meio de um paquímetro digital (King Tools - Digital Caliper, 0 - 150 mm) levando-se em consideração a posição fetal no interior da bolsa amniótica para determinar os diâmetros transversal e longitudinal, bem como a espessura das porções materna e fetal da placenta.

A partir destes dados, foi calculada a área de superfície (Barker et al., 2010) da porção materna e porção fetal das placentas utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Diâmetro longitudinal} \times \text{diâmetro transversal} \times \pi}{4}$$

As placentas fixadas em paraformaldeído e álcool 70% foram preparadas lâminas histológicas e coradas com hematoxilina - eosina. Por meio de um programa (Image J) foram feitas contagem de pontos sobre as quatro principais estruturas placentárias: decídua, zona juncional, labirinto e placa coriônica. Com estes valores foi calculada a fração de volume correspondente de cada estrutura sobre o volume placentário total.

Após a coleta das placentas, foram coletados e pesados o coração, rins, pulmões, tecido adiposo marrom (BAT) e tecido adiposo branco para cálculo de índice de adiposidade.

3.6. Atividade da renina e ECA maternas

Para a quantificação da atividade da renina plasmática, foi utilizado kit comercial de radioimunoensaio da marca DiaSorin (CA-1533, MN, USA).

A atividade da ECA foi determinada em 10 μ L de soro ou em 20 μ L do sobrenadante de homogenato de placenta. O soro foi incubado com 490 μ L de substrato da ECA, Hippuril-Histidil-Leucina (Hip-His-Leu 5mM), a 37°C durante 15 minutos. O sobrenadante do homogenato das placentas foi incubado com 470 μ L de substrato e 10 μ L de inibidor de peptidases por 40 minutos. Esta reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de solução de NaOH 0,34 N. Em seguida foram acrescentados 100 μ L da solução de o-ftaldialdeído 2%, protegido da luz e em temperatura ambiente. Esta substância liga-se ao produto da reação enzimática, o His-Leu, e permite a sua leitura fluorimetricamente. Após 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 200 μ L de HCl 3N, sempre sob agitação. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi então submetido à leitura da intensidade de

fluorescência em espectrofluorímetro usando um comprimento de onda 365 nm para excitação e 495 nm para emissão.

A atividade específica da ECA é expressa em μ moles His-Leu/min/mL no soro e μ moles His-Leu/min/mg de proteína nos tecidos.

3.7. Expressão proteica

A expressão proteica de TGF β 1, VEGF-A, Flk-1, angiotensinogênio, renina, ECA, Ang II, AT $_1$ R e AT $_2$ R foi realizada via ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) indireto de acordo com o seguinte protocolo:

Amostras de tecidos foram pesadas e depois homogeneizadas em tampão de extração proteica (RIPA lysis buffer, fluorido de fenilmetilsulfonil 100mM, pirofosfato de sódio 10mM, ortovanadato 100mM, coquetel inibidor de protease SIGMA, fluoreto de sódio 100mM). A concentração de proteínas foi determinada usando kit (BCA protein assay – Pierce Protein Research).

Quantidades iguais de proteína (10 μ g) foram misturadas ao tampão RIPA pH 7,4 a fim de completar um volume de 100 μ L que foi colocado em placas de poliestireno para ELISA (Costar 3590 – 96 well – flat bottom without lid, high binding). As placas com as amostras foram deixadas em local limpo com temperatura ambiente por 24 horas até a secagem da placa por evaporação.

Após este processo, as placas foram tratadas com PBS (fosfato de sódio dibásico 100mM, cloreto de sódio 1370mM, cloreto de potássio 27mM, fosfato de potássio monobásico 20mM) pH7,4, tampão de tratamento (tris-base 50mM) pH7,4, formaldeído 3,7%, tampão de bloqueio (BSA 1%, sacarose 5%, ázida sódica 0,05%, PBS), e incubadas com anticorpo primário e armazenadas a 4°C, overnight.

No dia seguinte, as placas foram incubadas com anticorpo secundário ligado a fosfatase alcalina por 2 horas e após lavagem final, foi adicionado tampão de desenvolvimento (tris-base 100mM, substrato fosfatase Sigma 104) e realizada leitura em leitor de ELISA a um comprimento de onda de 420 nm.

Foram usados os seguintes anticorpos:

TGFβ1	anti-TGFβ1 C-146, Santa Cruz Biotechnology, Wembley, Middlesex, UK
VEGF-A	anti-VEGF-A, Novus Biologicals Antibody, Colorado, USA
Flk-1	anti-Flk-1, Santa Cruz Biotechnology, Wembley, Middlesex, UK
AGTO	anti-Angiotensinogen, Immuno-Biological Laboratories, Minneapolis, USA
Renina	anti-Renin, Bioss, Massachusetts, USA
ECA	anti-ACE H-170, Santa Cruz Biotechnology, Wembley, Middlesex, UK
Ang II	anti-angiotensin II, Gene Tex International Corporation, Irvine, CA, USA,
AT ₁ R	anti-AT ₁ N-10, Santa Cruz Biotechnology, Wembley, Middlesex, UK
AT ₂ R	anti-AT ₂ H-143, Santa Cruz Biotechnology, Wembley, Middlesex, UK

3.8. Análise estatística

Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os resultados dos diversos grupos foram comparados utilizando análise de variância de um fator (one-way ANOVA) com pós-teste adequado (Newman-Keuls ou Tukey). Também foi utilizada a análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA) com pós-teste de Bonferroni. Foi considerado erro α menor do que 5% para aceitar diferenças como sendo significantes.

4. Resultados

4.1. Mães

O ganho semanal de massa corpórea (Figura 4) e consumo médio de ração e ingestão hídrica (tabela 2) não foi diferente entre os grupos.

Figura 4. Ganho percentual semanal de massa corpórea das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

Tabela 1. Consumo médio de ração e ingestão hídrica das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP).

FF (n = 9)	FP (n = 9)	PF (n = 9)	PP (n = 7)
Ração (g/grupo)			
165,3 $\pm$ 15	167,8 $\pm$ 12	152,8 $\pm$ 14	151,1 $\pm$ 13
Água (mL/grupo)			
265,9 $\pm$ 30	259 $\pm$ 24	252,6 $\pm$ 21	234,3 $\pm$ 25

Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

A pressão arterial caudal foi aferida semanalmente durante todo o período experimental e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Tabela 2. Pressão arterial caudal das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP).

Semana	FF (n = 9)	FP (n = 10)	PF (n = 9)	PP (n = 7)
9 ^a	110,1±2,73	118,1±2,00	118,2±1,30	112,4±3,51
10 ^a	114,8±2,31	111,5±2,22	115,9±2,21	116,4±2,78
11 ^a	113,1±2,50	111,8±2,26	116,6±2,00	118,3±1,80
12 ^a	113,4±1,66	118,7±3,00	119,3±4,03	115,7±2,85
13 ^a	121,0±2,51	115,3±2,19	114,1±2,64	116,3±4,41
14 ^a	112,9±3,83	114,3±3,17	112,4±4,25	119,3±2,67

Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média.

A glicemia e insulinemia não foram diferentes entre os grupos, mas foram observadas diferenças entre os períodos pré-gestacional e gestacional em cada grupo. A glicose sérica foi menor durante a gestação enquanto a insulina plasmática foi maior durante o mesmo período (tabela 4). O índice HOMA foi maior durante a gestação em todos os grupos, entretanto não foram encontradas diferenças entre os grupos (figura 5).

Tabela 3. Glicemia e insulinemia ao final dos períodos pré-gestacional e gestacional das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP).

	FF	FP	PF	PP
Glicemia (mg/dL)				
Pré-gestacional	102,7±5,4 (7)	98,6±2,1 (9)	98,7±3,4 (8)	105,4±2,1 (8)
Gestacional	88,4±2,8 (7)*	88,2±2,3 (9)*	85,5±2,5 (8)*	89,2±3,2 (8)*
Insulinemia (ng/mL)				
Pré-gestacional	0,36±0,06 (5)	0,35±0,07 (5)	0,40±0,05 (5)	0,36±0,10 (3)
Gestacional *	0,93±0,33 (5)*	0,72±0,28 (6)*	0,85±0,18 (6)*	0,64±0,17 (6)*

*p<0,05 vs Pré-gestacional. Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média.

Figura 5. Índice HOMA das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média.

4.1.1. Desfechos gestacionais

A massa dos órgãos maternos foi corrigida pelo comprimento da tíbia e não foi diferente entre os grupos (Tabela 4). O valor da massa de tecido adiposo branco foi utilizado para o cálculo de índice de adiposidade e também não houve diferenças entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4. Massa dos órgãos corrigidos pelo comprimento da tíbia e índice de adiposidade das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP).

Órgãos maternos (g/cm de tíbia)				
	FF (9)	FP (9)	PF (8)	PP (8)
Coração	25,85±0,98	26,63±0,94	24,43±0,89	25,81±1,40
Pulmões	40,73±1,15	39,40±1,33	39,08±1,54	40,01±2,17
Rim esquerdo	24,48±0,70	24,87±0,92	23,47±0,58	25,16±1,30
Rim direito	25,42±0,60	25,72±0,83	24,11±0,88	26,17±1,03
BAT	9,501±0,59	9,186±0,60	10,31±0,72	9,93±0,99
Índice de Adiposidade (%)				
	5,362±0,38	5,523±0,35	5,387±0,41	5,622±0,30

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média.

A massa dos fetos não foi diferente entre os grupos (figura 6).

Figura 6. Massa média dos fetos das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP.

4.2. Placentas

4.2.1. Massa placentária

As ratas PF e PP apresentaram massa placentária menor em comparação às ratas dos grupos FF e FP (Figura 7). A porção materna da placenta das ratas PF e PP foram menores em comparação às ratas FP. Já na porção fetal da placenta, a massa do grupo PP teve um possível mecanismo compensatório e a diferença foi mantida apenas no grupo PF em relação às ratas dos grupos FF, FP e PP (Figura 7).

Figura 7. Massa placentária das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP.

4.2.2. Diâmetros placentários

Observou-se que o diâmetro longitudinal da porção materna da placenta foi menor no grupo FP quando comparado a FF, porém esta medida foi menor na porção fetal da placenta das ratas FP e PF quando comparado a FF (Figura 8).

Já os diâmetros transversais tanto das porções materna e fetal da placenta foram menores nos grupos FP, PF e PP quando comparados a FF (Figura 8).

Figura 8. Diâmetro longitudinal e diâmetro transversal das porções materna e fetal da placenta das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP.

À partir dos dados de diâmetro placentário foi calculada a área de superfície nas duas porções da placenta e observou-se que todas as ratas que foram expostas à poluição atmosférica durante o período pré-gestacional e/ou gestacional tiveram menor área de superfície (figura 9).

Figura 9. Área da superfície das porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP.

A espessura da porção fetal das placentas das ratas do grupo PF foi menor quando comparada aos grupos FF e PP, enquanto que na porção materna, a espessura da placenta no grupo FP foi menor do que no grupo FF (Figura 10).

Figura 10. Espessura das porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP.

4.2.3. Volumes das frações placentárias

A análise de volume fracionário da decídua, zona juncional, labirinto e placa coriônica não foi diferente entre os grupos (figura 11).

Figura 11. Volume das decíduas (porção materna da placenta), zonas juncionais, labirintos e placas coriônicas (porção fetal da placenta) das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP.

4.3. Expressão proteica de TGF β 1

A expressão de TGF β 1 (figura 12) na porção materna da placenta foi menor nas ratas dos grupos FP, PF e PP, quando comparadas a FF e foi ainda menor nas ratas dos grupos PF e PP quando comparadas a FP. Já na porção fetal da placenta, as ratas dos grupos FP e PF tiveram menor concentração desta proteína quando comparadas aos grupos FF e PP.

Figura 12. Expressão proteica de TGF β 1 nas porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP.

4.4. Fatores angiogênicos

A expressão proteica de VEGF-A na porção materna a placenta foi menor em todos os grupos expostos à poluição atmosférica, sendo menor ainda no grupo PP em relação à FP e PF (figura 13). Na porção fetal da placenta, a expressão desta proteína foi menor nos grupos expostos à poluição durante a gestação em comparação a FF.

Figura 13. Expressão proteica de VEGF-A nas porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP.

A expressão proteica de Flk-1 na porção materna da placenta foi menor em PP em comparação aos demais grupos (figura 14). Já na porção fetal, a expressão foi menor em todos os grupos expostos ao MP_{2,5}, sendo menor ainda nos grupos expostos antes da gestação.

Figura 14. Expressão proteica de VEGF-A nas porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante

a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP.

4.5. Sistema Renina-Angiotensina

A concentração de AGTO não foi diferente nas porções materna e fetal da placenta em todos os grupos. (figura 15).

Figura 15. Expressão proteica de AGTO nas porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP.

A concentração de renina na porção fetal da placenta foi menor nos grupos FP, PF e PP quando comparados ao grupo FF (figura 16). Na porção materna da placenta, não houve diferença entre os grupos.

Figura 16. Expressão proteica de renina nas porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP.

A concentração de ECA, tanto na porção materna quanto na porção fetal da placenta das ratas PF e PP foi menor quando comparadas aos grupos FF e FP (figura 17).

Figura 17. Expressão proteica de ECA nas porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP.

Na porção materna da placenta das ratas do grupo PP, a quantidade de Ang II é menor quando comparada aos grupos FF, FP e PF (figura 18), enquanto que na porção fetal da placenta, este peptídeo é menor em todos os grupos, indicando que a exposição à poluição atmosférica, em algum momento do ambiente perinatal, pode alterar a produção de Ang II neste tecido.

Figura 18. Expressão proteica de Ang II nas porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP.

A expressão proteica de AT₁R na porção fetal da placenta foi maior no grupo FP em comparação aos demais grupos (figura 19). Em contrapartida, na porção materna da placenta, este receptor está em menor concentração nos grupos expostos ao MP_{2.5} antes da gestação (PF e PP).

Nos grupos PF e PP da porção fetal da placenta e no grupo PP da porção materna da placenta, a expressão de AT₂R foi menor (figura 19).

Figura 19. Expressão proteica de AT₁R e AT₂R das porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP.

4.5.1. Atividade enzimática

No soro, a atividade de ECA foi menor em todos os grupos expostos à poluição atmosférica em algum momento do ambiente perinatal (Figura 20A).

A atividade da ECA também foi quantificada nas porções materna e fetal da placenta dos grupos experimentais (Figura 20B). Na porção materna a atividade foi menor nos grupos PF e PP, comparado ao grupo FF. Já no grupo PP não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Figura 20. A - Atividade de ECA sérica **B** – atividade de ECA nas porções materna e fetal das placentas das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP.

No plasma coletado ao final do período gestacional, a atividade da renina foi maior nos grupos expostos à poluição atmosférica antes ou durante a gestação (Figura 21).

Figura 21. Atividade da renina plasmática das ratas expostas ao ar filtrado antes e durante a gestação (FF), ar filtrado antes da gestação e ar poluído durante a gestação (FP), ar poluído antes da gestação e ar filtrado durante a gestação (PF) e ar poluído antes e durante a gestação (PP). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $p < 0.05$ ¹vs FF; ²vs FP; ³vs PF; ⁴vs PP.

5. Discussão

Este estudo teve por objetivo verificar se a exposição ao material particulado, dentro dos limites estabelecidos como seguros pela OMS preserva as características placentárias e algumas variáveis maternas, tendo em vista que a poluição atmosférica pode causar diversos prejuízos na qualidade de vida da população, sendo associada com diferentes distúrbios na saúde dos indivíduos, como aumento da incidência de doenças respiratórias e cardiovasculares e interferências na gestação desde a formação dos gametas até o período pós-natal.

No presente estudo a exposição de ratas Wistar à poluição atmosférica não alterou o ganho de massa corpórea e os hábitos alimentares dos animais em todos os grupos ao longo do experimento. Também são indicativos de adequada saúde materna os níveis de glicemia e insulinemia e sabe-se que durante a gestação há resistência fisiológica à insulina (Damm et al., 2007) que, nestas condições experimentais, não foi modificada pela exposição ao MP_{2,5}.

Estudos afirmam que a exposição à poluição atmosférica pode causar alterações no sistema cardiovascular (Mills et al., 2009), entretanto em nosso estudo não foram encontradas alterações na pressão arterial caudal, fator diretamente ligado a distúrbios neste sistema. Nossos resultados corroboram com os achados de Madsen e Nafstad (2006).

Curiosamente, a elevada atividade de renina plasmática e reduzida atividade de ECA sérica encontrada em mães expostas a MP_{2,5} indica alterações do SRA circulante. Não há uma explicação plausível para esse achado. Pode-se conjecturar que a maior atividade da renina plasmática aumenta a formação de angiotensina I e sabe-se que a atividade da enzima é estimulada pela maior oferta de substrato. Assim, a constatação de menor atividade da ECA é, possivelmente, devido a menor concentração circulante desta enzima. Sabe-se também que a ECA é produzida principalmente na circulação

pulmonar (Franke et al., 1997) que pode ter sido alterada em resposta à exposição ao MP_{2,5}, porém são necessários estudos adicionais para desvendar os mecanismos destes achados em resposta à poluição do ar.

Já foi demonstrado que a Ang II placentária é um fator importante na regulação da invasão e migração do trofoblasto (Hering et al., 2011). No presente estudo, a Ang II placentária foi mais baixa em resposta a exposição ao material particulado, o que sugere uma possível diminuição da invasão trofoblástica e interação materno-fetal.

Ang II agindo via AT₁R desempenha papel importante no controle da circulação feto-placentária e consequentemente, no crescimento fetal (Bédard et al., 2005). O aumento da expressão proteica de AT₁R, juntamente com o aumento da concentração de Ang II contribui para RCIU caracteristicamente observado na pré-eclampsia (Mistry et al., 2013). No presente estudo, foi observada uma baixa expressão de Ang II e concomitante elevada expressão de AT₁R na porção fetal da placenta no grupo FP, indicando que a exposição ao MP_{2,5} pode ativar este receptor nesta porção do órgão, podendo resultar em invasão rasa de trofoblasto (Xia et al., 2002) e RCIU. A baixa expressão proteica de AT₂R na placenta também pode comprometer o fluxo sanguíneo úteroplacentário, de acordo com Lumbers e Pringle (2013). Estes resultados sobre o SRA estão em conformidade com os achados sobre a área de superfície da placenta.

Neste estudo, observou-se que a exposição à poluição do ar diminui os diâmetros longitudinais – relacionados ao crescimento rostro-caudal do feto – e os diâmetros transversais – relacionados à troca de nutrientes entre mãe e feto - placentários. Estes resultados influenciaram a área de superfície da placenta, indicando uma diminuição da interação materno-fetal, já que a área de superfície da placenta é um indicador desta função (Barker et al., 2010).

Tanto o tamanho quanto a massa placentária estão relacionados ao peso ao nascimento. Placentas mais leves ou mais pesadas, em relação ao peso fetal, são indicativos de possível desenvolvimento de hipertensão e doenças coronárias na vida adulta (Eriksson et al., 2011). Uma possível explicação para o efeito da exposição ao MP_{2,5} na massa placentária é que mães expostas no período pré-gestacional já podem estar contaminadas por material particulado nas etapas iniciais da gestação e isso pode prejudicar o desenvolvimento da placenta. No grupo FP, a exposição ocorreu após a implantação do embrião e, conseqüentemente à decidualização, e poderia explicar a ausência de alteração da massa placentária neste grupo. A porção fetal da placenta no grupo PP não foi influenciada pela exposição ao MP_{2,5} possivelmente devido a um crescimento compensatório desta porção em resposta à menor massa da porção materna da placenta neste grupo.

A menor área de superfície e alterações na massa dos tecidos placentários podem ter ocorrido devido a invasão insuficiente de trofoblasto e vascularização placentária prejudicada resultando em hipóxia fetal e RCIU (Lee et al., 2003). Os estudos *in vitro* sugerem que o TGFβ1 pode desempenhar um papel crucial na invasão e diferenciação morfológica, molecular e funcional de células de trofoblasto (Lafontaine et al., 2011; Selesniemi et al., 2005). Desta forma, menor expressão proteica de TGFβ1 placentário nos grupos expostos à poluição atmosférica pode indicar deficiência na diferenciação e invasão de trofoblastos.

Acompanhando a invasão trofoblástica, há a formação de vasos no tecido placentário que participam da interação materno-fetal. De acordo com Holmes e Zachary (2005), VEGF-A e os seus receptores desempenham papéis-chave na formação de estruturas vasculares. A baixa concentração placentária de VEGF-A e Flk-1 nos grupos expostos ao ar poluído pode sugerir vascularização deficiente do tecido

placentário e comprometimento no desenvolvimento fetal devido a possível alteração na troca de nutrientes e gases entre a mãe e feto. Entretanto, são necessários estudos complementares para entender melhor a atividade destes fatores angiogênicos neste protocolo.

A integridade placentária é fundamental para o adequado desenvolvimento fetal, pois garante eficiência na interação materno-fetal. Os achados do presente estudo indicam que a exposição ao MP_{2,5}, mesmo dentro dos limites estabelecidos como seguros pela OMS, levam a um possível comprometimento da interação materno-fetal podendo refletir na nutrição e crescimento do feto. Estes achados podem estar relacionados com a ocorrência de BPN, RCIU e outras alterações maternas e fetais.

6. Conclusões

Conclui-se que a exposição perinatal de ratas Wistar ao MP_{2,5} mesmo dentro dos limites considerados seguros pela Organização Mundial de Saúde:

- Influencia a massa placentária, podendo levar ao desenvolvimento de doenças, como hipertensão, nas proles adultas;
- Diminui a área de superfície placentária, fator indicador de uma adequada interação materno-fetal;
- Modifica a expressão proteica e a atividade enzimática dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina no soro materno e nos tecidos placentários;
- Diminui as concentrações de TGF β 1 e dos fatores angiogênicos VEGF-A e Flk-1 placentários, podendo resultar em deficiente invasão trofoblástica e formação de vasos neste tecido.

Tendo em vista estes achados, o presente estudo poderá servir de base para posteriores experimentos para estabelecimento de uma associação entre emissão de material particulado e alterações placentárias que podem potencialmente comprometer a interação materno-fetal, refletindo na nutrição e crescimento fetal, além de poder programar alterações cardiovasculares na vida posterior. Um aspecto importante deste estudo indica a possível necessidade de uma reavaliação dos limites máximos de exposição ao MP_{2,5} propostos pela OMS.

7. Referências bibliográficas

Adamson SL, Lu Y, Whiteley J, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross Jc. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Developmental biology*. 2002; 250: 358-373.

Araujo J, Barajas B, Kleinman M, Wang X, Bennett B, Gong K, Navab M, Harkema J, Sioutas C, Lusa A & Nel A. 2008. Ambient particulate pollutants in the ultrafine range promote early atherosclerosis and systemic oxidative stress. *Circ Res*. 2008; 102: 589-96.

Ardaillou R. Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10: s30-s39.

Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ*. 1989; 298: 564-567.

Barker D, Bull A, Osmond C & Simmonds S. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ*. 1990; 301: 259-62.

Barker DJP, Thornburg KL, Osmond C, Kajantie E, Eriksson JG. Beyond birthweight: the maternal and placental origins of chronic disease. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 2010; 1(6): 360-364.

Barker DJP, Eriksson JG, Kajantie E, Alwasel SH, Fall CHD, Roseboom TJ, Osmond C. The maternal and placental origins of chronic disease. Burton GJ, Barker DJP, Moffett A, Thornburg K. *The placenta and human developmental programming*. Cambridge University Press; 2011. Cap. 2, p.5-16.

Batalha JR, Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, Koutrakis P, Godleski JJ. Concentrated ambient air particles induce vasoconstriction of small pulmonary arteries in rats. *Environ Health Perspect*. 2002; 110: 1191–1197.

Bauer MK, Harding JE, Basset NS, Breier BH, Oliver MH, Gallaher BH, Evans PC, Woodall SM, Gluckman PD. Fetal growth and placental function. *Mol Cell Endocrinol*. 1998; 140: 115-120.

Bédard S, Sicotte B, St-Louis J, Brochu M. Modulation of body fluids and angiotensin II receptors in a rat model of intra-uterine growth restriction. *J Physiol*. 2005; 562(3): 937-950.

Caniggia I, Grisaru-Gravnosky S, Kuliszewsky M, Post M, Lye SJ. Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J Clin Invest* 1999; 103: 1641–1650.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenshtein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996; 380: 435-439.

Castrop H, Höcherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C. Physiology of kidney renin. *Physiol Rev*. 2010; 90: 607-673.

Choi H, Rauh V, Garfinkel R, Tu Y, Pepera SP. Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of intrauterine growth restriction. *Environ Health Perspect*, 2008; 116: 658-665.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, CETESB. Material particulado inalável fino (MP_{2,5}) e grosso (MP_{2,5-10}) na atmosfera da região metropolitana de São Paulo (2000-2006). 2008. São Paulo: CETESB.

Cross, J.C., Werb, Z., Fisher, S.J., 1994. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 266, 1508-1518.

Cross JC. Formation of the placenta and extraembryonic membranes. *Morphogenesis: cellular interactions*. 1998; 827: 23-32.

Damm P, Breitowicz B, Hegaard H. Exercise, pregnancy, and insulin sensitivity – what is new? *Appl. Physiol. Nutr. Metab* 2007; 32: 537-540.

Davel AP, Lemos M, Pastro LM, Pedro SC, de André PA, Hebeda C, Farsky SH, Saldiva PH, Rossoni LV. Endothelial dysfunction in the pulmonary artery induced by concentrated fine particulate matter exposure is associated with local but not systemic inflammation. *Toxicology*. 2012; 295: 39-46.

Dreher KL, Jaskot RH, Lehmann JR, Richards JH, Mcgee JK, Ghio AJ, Costa DL. Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury. *J Toxicol Environ Health A*. 1997; 50: 285–305.

Eriksson J, Forsén T, Kajantie E, Osmond C & Barker D. Childhood growth and hypertension in later life. *Hypertension*. 2007; 49: 1415-21.

Eriksson JG, Kajantie E, Thornburg KL, Osmond C, Barker DJP. Mother's body size and placental size predict coronary heart disease in men. *European Heart Journal*. 2011; 32: 2297-2303.

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996; 380: 439-442.

- Fong G, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995; 376: 66–70.
- Franke FE, Metzger R, Bohle R-M, Kerkman L, Alhenc-Gelas F, et al. Angiotensin I-Converting Enzyme (CD 143) on endothelial cells in normal and in pathological conditions. Kishimoto T. et al. editors. Leucocyte Typing VI: White Cell Differentiation Antigens. Garland Publishing Inc. New York 1997; 749–751.
- Glorennec P and Monroux F. Health impact assessment of PM10 exposure in the city of Caen, France. *J Toxicol Environ Health A*. 2007; 70: 359–364.
- Gouveia N, Bremner SA, Novaes HMD. 2004. Association between ambient air pollution and birth weight in São Paulo, Brazil. *J Epidemiol Community Health*, 58:11-17.
- Hales C, Barker D, Clark P, Cox L, Fall C, Osmond C, Winter P. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ*. 1991; 303:1019-22.
- Hein L. Genetic deletion and overexpression of angiotensin receptors. *J Mol Med*. 1998; 766: 756-763.
- Hering L, Herse F, Geusens N, Verlohren S, Wenzel K, Staff AC, Brosnihan KB, Huppertz B, Luft FC, Muller DN, Pijnenborg R, Cartwright JE, Dechend R. Effects of circulating and local uteroplacental angiotensin II in rat pregnancy. *Hypertension*. 2011; 56: 311-318.
- Holmes DIR, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biology*. 2005; 6: 209.
- Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension*. 1999; 33 (2): 613-21.
- Knock GA, Sullivan MHF, McCarthy A, Elder MG, Polak JM, Wharton J. Angiotensin II (AT1) vascular binding sites in human placentae from normal-term, preeclamptic and growth retarded pregnancies. *J Pharmacol Exp Therapeutics*. 1994; 271: 1007-1015.
- Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochemical Journal*. 2011; 437: 169–183.
- Lafontaine L, Chaudhry P, Lafleur MJ, Themsche CV, Soares MJ, Asselin E. Transforming growth factor beta regulates proliferation and invasion of rat placental cell lines. *Biology of reproduction*. 2011. 84:553-559.

Lash GE, Otun HA, Innes BA, Bulmer JN, Searle RF, Robson SC. Inhibition of trophoblast cell invasion by TGFB1, 2, and 3 is associated with a decrease in active proteases. *Biol Reprod.* 2005; 73: 374–381.

Law C, De Swiet M, Osmond C, Fayers P, Barker D, Cruddas A, Fall C. Initiation of hypertension in utero and its amplification throughout life. *BMJ.* 1993; 306: 24-7.

Leandro SM, Furukawa LN, Shimizu MH, Casarini DE, Seguro AC, Patriarca G, Coelho MS, Dolnikoff MS, Heimann JC. Low birth weight in response to salt restriction during pregnancy is not due to alterations in uterine-placental blood flow or the placental and peripheral renin-angiotensin system. *Physiol Behav.* 2008; 95(1-2): 145-51.

Lee BE, Ha EH, Park HS, Kim YJ, Hong YC, Kim H, Lee JT. Exposure to air pollution during different gestational phases contributes to risks of low birth weight. *Human Reproduction.* 2003; 18 (3): 638-643.

Levy BI. How to explain the differences between renin angiotensin system modulators. *Am J Hypertens.* 2005; 18 (9): 134-141.

Li X, Shams M, Zhu J, Khalig A, Wilkes M, Whittle M, Barnes N, Ahmed A. Cellular localization of AT1 receptor mRNA and protein in normal placenta and its reduced expression in intrauterine growth restriction. *J Clin Investig.* 1998; 101: 442-454.

Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Angiotensin II-induced stimulation of collagen secretion and production in cardiac fibroblasts is mediated via angiotensin II subtype 1 receptors. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2001; 2(2): 117-22.

Lithell H, Mckeigue P, Berglund L, Mohsen R, Lith LLU, Leon D. Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50-60 years. *BMJ.* 1996; 312: 406-10.

Lumbers ER, Pringle KG. Roles of the circulating renin-angiotensin-aldosterone system in human pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013; 306: R91-R101.

Madsen C and Nafstad P. Associations between environmental exposure and blood pressure among participants in the Oslo Health Study (HUBRO). *Eur J Epidemiol.* 2006; 21: 485-91.

Mccance D, Pettitt D, Hanson R, Jacobsson L, Knowler W, Bennett P. Birth weight and non-insulin dependent diabetes: thrifty genotype, thrifty phenotype, or surviving small baby genotype? *BMJ.* 1994; 308: 942-5.

Mills NL, Donaldson K, Hadoke PW, Boon NA, MacNee W, Cassee FR, Sandström T, Blomberg A, Newby DE. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nat Clin Prac – Cardiovascular Medicine*. 2009; 6(1): 36-44.

Miranda RM, Andrade MF, Fornaro A, Astolfo R, Andre PA, Saldiva P. Urban air pollution: a representative survey of PM_{2,5} mass concentrations in six Brazilian cities. *Air quality, atmosphere & health*. 2012; 5: 63-77.

Miranda RM, Andrade MF, Worobiec A, Grieken RV. Characterisation of aerosol particles in the São Paulo Metropolitan Area. *Atmospheric Environment*. 2002; 36: 345-352.

Mistry HD, Kurlak LO, Pipkin FB. The placental renin-angiotensin system and oxidative stress in pre-eclampsia. *Placenta*. 2013. 34:182-186.

Nielsen AH, Schauser KH, Poulsen K. The uteroplacental renin-angiotensin system. *Placenta*. 2000; 21: 468-477.

Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*. 2006; 86: 747-803

Perera F, Tang WY, Herbstman J, Tang D, Lavin L, Miller R, Ho SM. Relation of DNA methylation of 5'-CpG island of ACSL3 to transplacental exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and childhood asthma. *PLoS One*. 2009; 4:e4488.

Pope III CA and Dockery DW. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 2006; 56: 709-742.

Regnault TRH, Galan HL, Parer TA, Anthony RV. Placental development in normal and compromised pregnancies - a review. *Trophoblast research*. 2002; 16: 5119-5129.

Resolução CONAMA nº3. Controle da poluição do ar. 1990.

Rich-Edwards, J., Colditz, G., Stampfer, M., Willett, W., Gillman, M., Hennekens, C., Speizer, F. & Manson, J. Birthweight and the risk for type 2 diabetes mellitus in adult women. *Ann Intern Med*. 1999; 130: 278-84.

Rocha E Silva I, Lichtenfels A, Amador Pereira L, Saldiva P. Effects of ambient levels of air pollution generated by traffic on birth and placental weights in mice. *Fertil Steril*. 2008; 90: 1921-4.

Saldiva PHN. O homem e o meio ambiente urbano. Saldiva PHN et al. Meio ambiente e saúde: o desafio das metrópoles. São Paulo: Ex libris comunicação integrada; 2010. Cap. 1, p.16-21.

Selesniemi K, Reedy M, Gultice A, Guilbert LJ, Brown TL. Transforming growth factor- β induces differentiation of the labyrinthine trophoblast stem cell line SM10. *Stem cells and development*. 2005; 14: 697-711.

Shibuya, M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *The Journal of Biochemistry*. 2012; 153: 13–19.

Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Experimental Cell Research*. 2005; 312: 549–560.

Sioutas C, Koutrakis P, Burton RM. A technique to expose animals to concentrated fine ambient aerosols. *Environ Health Perspect*. 1995; 103: 172–177.

Squires PM and Kennedy TG. Evidence for a role for a uterine renin-angiotensin system in decidualization in rats. *J Reprod Fert*. 1992; 95:791-802.

Touyz RM. 2003. The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2003; 5(2): 155-64.

Van den Hooven EH, Pierik FH, De Kluizenaar Y, Hofman A, Van Ratingen SW, Zandveld PYJ, Russcher H, Lindemans J, Miedema HME, Steegers EAP, Jaddoe VWV. Air pollution exposure and markers of placental growth and function: the generation R study. *Environmental Health Perspectives*. 2012; 120: 1753 – 1759.

Veras M, Caldini E, Dolhnikoff M, Saldiva P. Air pollution and effects on reproductive-system functions globally with particular emphasis on the brasilian population. *J Toxicol Environ Health B*. 2010; 13(1): 1-15.

Veras M, Damaceno-Rodrigues N, Caldini E, Maciel Ribeiro A, Mayhew T, Saldiva P, Dolhnikoff M. Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. *Biol Reprod*. 2008; 79: 578-84.

Watson ED, Cross JC. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology*. 2005; 20: 180-193.

Whyatt RM, Santella RM, Jedrychowski W, Garte SJ, Bell DA, Ottman R, Gladek-Yarborough A, Cosma G, Young TL, Cooper TB, Randall MC, Manchester DK, Perera FP. Relationship between ambient air pollution and DNA damage in Polish mothers and newborns. *Environ Health Perspect*. 1998; 106: 821-826.

- World Health Organization. Working together for health. The world health report.
- Wu Q, Kuo HC, Deng GG. Serine proteases and cardiac function. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1751 (1): 82-94.
- Xia Y, Wen HY, Kellems RE. Angiotensin II inhibits human trophoblast invasion through AT1 receptor activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277(27): 24601-24608.

8. Apêndices

a. Concentrador de Partículas Atmosféricas

Container que abriga o concentrador de partículas atmosféricas (CPA). Na parte superior observa-se a Cabeça Anderson, equipamento através do qual o ar ganha entrada no CPA selecionando o diâmetro aerodinâmico das partículas em $2.5\mu\text{m}$.

Entrada de ar ambiente para o interior do concentrador

Área interna do CPA. Duas câmaras de exposição (ar filtrado e ar ambiente concentrado), estágios para concentração das partículas e sistema de tubulações por onde o ar ambiente entra para o container.

Câmaras para exposição de animais de laboratório

b. Data Ram

Data-Ram: equipamento que marca a concentração de poluentes, umidade relativa do ar e temperatura dentro e fora do CPA.

c. Transdutor de pressão

Pressão arterial caudal - método osciloscópio

d. Paquímetro digital

Ferramenta utilizada para mensurar os diâmetros e espessuras placentárias.