Sandra Regina Castro Soares

**Efeito Aterogênico da Poluição
Atmosférica: Associação aos Anticorpos
anti LDLox e anti peptídeo D da apo B e
aos Aspectos Morfométricos e
Inflamatórios**

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

Área concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Bueno Garcia

São Paulo

2006

RESUMO

SOARES, S.R.C. **Efeito Aterogênico da Poluição Atmosférica: Associação aos anticorpos anti LDLox e anti peptídeo D da apoB e aos aspectos morfométricos e inflamatórios-** São Paulo, 2006, pg.131
Dissertação de Doutorado - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

A poluição atmosférica de grandes centros urbanos é relacionada com o aumento dos índices de mortalidade e morbidade, principalmente em indivíduos com predisposição às doenças cardiovasculares e progressão da aterosclerose. Com o objetivo de verificar o potencial aterogênico da poluição atmosférica da cidade de São Paulo avaliamos o comportamento do estresse oxidativo e produção de auto-anticorpos em modelo murino experimental "in vivo". Foram analisados os seguintes parâmetros: quantidade de lipídeo e espessura da placa aterosclerótica por analisador de imagens, oxidação da LDL sérica (TBARS) e tecidual e imunohistoquímica (8-isoprostano), ativação macrófágica (imunohistoquímica MAC2) e produção de anticorpos anti-LDL oxidada (LDLox) e anti-peptídeo D da apoB-100 (ELISA). Os dados foram estudados na emergência, arco e porção descendente da aorta em 40 camundongos LDLR ^{-/-} knockout, machos, 30 dias de idade expostos às câmaras de intoxicação seletiva não filtrada e filtrada para material particulado e gases tóxicos, no período de Maio/Setembro de 2004. Nesse período não houve ultrapassagem dos níveis aceitáveis de poluição. Os animais foram divididos em 4 grupos: Filtrada-Padrão (FP), Filtrada-E.Col.(FEcol), Poluída-Padrão (PP) e Poluída-E.Col.(PEcol). Obtivemos os seguintes resultados: maior aumento dos níveis de colesterol total nos grupos FEcol e PEcol ($p<0,05$); triglicérides séricos menores no grupo PEcol ($p<0,05$); aceleração de oxidação LDL sanguínea apenas no grupo PEcol; índices aumentados de anticorpos anti-LDLox e anticorpos anti-peptídeo D nos grupos PP e PEcol em relação aos demais ($p<0,05$); maior quantidade de gordura na raiz da aorta nos grupos com dieta Ecol ($p<0,05$) porém com espessura da placa superior apenas no grupo PEcol ($p<0,05$). A região descendente e o arco (núcleo necrótico e placa aterosclerótica) não apresentaram diferenças na análise de estresse oxidativo. A quantificação de macrófagos na aorta descendente foi maior no grupo FEcol em relação aos animais com dieta padrão ($p<0,05$). O núcleo necrótico e placa aterosclerótica do arco aórtico apresentaram o mesmo comportamento: FEcol maior que PP e FP ($p<0,05$). Concluímos que a poluição atmosférica urbana, mesmo em níveis considerados aceitáveis, potencializa a progressão da aterosclerose.

ABSTRACT

SOARES, S.R.C. **Atherogenic Effect of Air Pollution: Association to anti-oxLDL and anti peptide D- ApoB and imorphometric and inflammatory aspects** São Paulo, 2006, pg 131-Tesis of philosophic doctor- Faculty of Medicine, University of São Paulo

Epidemiologic studies have shown important relationship between atherogenic cardiovascular morbid-mortality and acute or chronic exposure to air pollution. We aim to study the atherogenic potential of São Paulo urban air pollution analyzing the plaque formation and its physiopathology through oxidative stress and auto-antibody production in a murine experimental model in vivo. We quantified the lipid deposit in the atherosclerotic plaque and its thickness by Image Analyzer, LDL oxidation in blood by TBARS and tissue by 8-isoprostane, production of anti oxLDL and anti peptide D of apoB-100 antibodies by ELISA and macrophage activation through MAC2 staining. We analyzed three regions of the aorta: emergency, arch and descendent in 40 LDLR ^{-/-} knockout mice, male, 30 days old exposed to selective intoxication chambers with filters or not for particulate matter and toxic gases, during May to September 2004, when pollution did not overpass standard limits of air quality. Mice were divided in four groups: Filtered-Normal diet (FN), Filtered-enriched cholesterol diet (FEchol), Polluted-Normal diet (PN) and Polluted-enriched cholesterol diet (PEchol). Our results were: the highest amount of total cholesterol levels in FEchol and PEchol groups ($p < 0,05$); the lowest triglycerides in PEchol mice ($p < 0,05$); increment of oxLDL in blood only in PEchol animals; higher anti oxLDL and anti-peptide D antibodies in PN and PEchol than other groups ($p < 0,05$); similar amounts of lipids in atherosclerotic plaque in Echol diet groups, but higher than mice submitted to Normal diet ($p < 0,05$); PEchol mice presented the highest aorta thickness ($p < 0.05$); oxidative stress showed similar results in both aortic regions in all groups; macrophage activation in descent region of the aorta showed that FEchol mice presented higher values than animals submitted to normal diet ($p < 0,05$) and PEchol group reached higher values than PN animals ($p < 0,05$); macrophage activation in the atherosclerotic necrotic core and plaque of the aortic arch showed similar pattern: FEchol higher than normal diet mice ($p < 0,05$). We concluded that urban air pollution, even within standard limits of air quality, is able to potentate atherosclerosis progression.

INTRODUÇÃO

I- INTRODUÇÃO GERAL

Após a Revolução industrial em meados do século XX, em todos os países desenvolvidos e em desenvolvimento, os centros urbanos, tornaram-se maiores e mais populosos, marcados pelo uso intenso e crescente de veículos automotores, empurrando as indústrias, para as regiões mais distantes.

A industrialização representa o início da intensificação da poluição atmosférica, onde as maquinarias da época eram baseadas na queima de grandes quantidades de carvão, lenha e, posteriormente, óleo combustível.

Com a modernidade erguem-se as metrópoles, onde a poluição atmosférica atinge o seu topo. Em decorrência disso, tornaram-se mais freqüentes os episódios críticos de poluição do ar, alterando o perfil da saúde dos habitantes locais. Em decorrência a qualidade do ar deixou de ser um problema de bem-estar e passou a representar efetivamente um risco à população (Pope e col., 1992).

Ao mesmo tempo em que poluentes do ar afetam os sistemas de saúde, também prejudicam a economia. O aumento dos gastos monetários relacionados às doenças causadas pela poluição atmosférica inclui os custos de medicamentos, ausências no trabalho e tratamento infantil.

No Brasil, a situação em relação à poluição atmosférica não é diferente, principalmente nas grandes cidades como São Paulo e Rio de Janeiro.

A cidade de São Paulo está localizada a 800m do nível do mar e é o terceiro conglomerado urbano do mundo. A região metropolitana conta com uma frota de carros em torno de 7,4 milhões de veículos automotores e uma população em torno de 14,7 milhões de habitantes e 2000 indústrias com elevado potencial de poluentes (CETESB). As características climáticas e a poluição atmosférica são comparáveis ao Norte da América e Europa.

Alguns estudos mostram aumento de visitas a setores de emergência hospitalar por problemas cardiovasculares, como angina e infarto agudo do miocárdio, em dias de elevados índices de poluição (Lin e col., 2003, Sharosky e col., 2004).

Miraglia e col. (2005) em seu estudo epidemiológico estimou em US\$ 3.000.000,00/ano (três milhões de dólares anuais) o custo indireto causado por visitas hospitalares de adultos, idosos e crianças, em decorrência da exposição dos picos de poluição atmosférica de São Paulo.

Desta forma tornam-se imprescindíveis mais estudos que aponte a real situação de nosso Estado em relação à saúde pública.

Antes de decorrer sobre o nosso estudo, faremos uma breve revisão dos constituintes da poluição atmosférica de São Paulo.

1- Componentes da Poluição

Em regiões urbanas, mais precisamente em metrópoles a poluição do ar baseia-se em emissões atmosféricas de toneladas de substâncias químicas e gases oriundos de industriais e veículos automotores e influenciada por variações climáticas, direção dos ventos e topografia da região... A ação dos ventos, umidade, temperatura, luz solar e tempo de permanência dos poluentes na atmosfera tornam um ambiente propício para diversas reações químicas originando novos outros componentes tóxicos no ar.

Entretanto, por convenção dos órgãos competentes nacionais (CONAMA, CETESB) e internacionais (EPA, OMS), os componentes básicos mais comuns analisados são: monóxido de carbono, nitratos, dióxido de enxofre, ozônio, chumbo, fumaça de tabaco e material particulado.

A seguir serão descritas algumas características dos componentes da poluição atmosférica.

a) Dióxido de Enxofre

O SO₂ é inodoro, incolor, em contato com a água, este se forma em ácidos sulforosos. É altamente irritante aos olhos, membrana mucosa e pele.

A oxidação de dióxido sulfúrico na atmosfera origina vários compostos, incluindo os sulfatos ácidos. Na atmosfera a principal origem do

SO₂ é a combustão de fósseis sulfurados, especialmente plantas geradoras de energia, diesel e torrefação de minérios de ferro que contenham sulfatos.

Dióxido sulfúrico é oxidado a tri-óxido sulfúrico, pois tem afinidade com água, e pode ser rapidamente hidratado para a forma de ácido sulfúrico (Brook e col., 2004, Geocites.com).

b) Monóxido de Carbono

Monóxido de carbono é um gás incolor, inodoro, e altamente tóxico. Origina-se principalmente da combustão de veículos, mas também é encontrado nos cigarros e derivados que requerem combustível fóssil, etc... Em áreas urbanas, a combustão originada do diesel e estações geradoras de energia é relativamente pequena em relação aos que são produzidas pela gasolina.

O dióxido de carbono é o principal responsável pelo fenômeno do efeito estufa (Brook e col, 2004, Geocites.com.).

O efeito estufa é ocasionado por os gases com a propriedade de absorver ondas infravermelhas, impedindo que estas se dissipem pelo espaço. São eles: Dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), óxido nitroso (N₂O), os hidrofluocarbonos (HFCs), os perfluorcarbonos (PFCs) e o hexafluoreto de enxofre (SF₆). O efeito estufa caracteriza-se pelo fenômeno natural causado pela presença de nuvens e alguns gases na atmosfera, sobretudo o vapor de água e o dióxido de carbono, que provocam o aquecimento da superfície do planeta. Esses gases e nuvens funcionam

como redoma. Retém na atmosfera a radiação emitida pela superfície terrestre, mantendo a temperatura média da Terra em torno de 16° C, que com as atuais emissões mundiais deste gás, acarretam um aquecimento global da Terra, alterando inclusive mudanças climáticas importantes.

No Brasil, os maiores responsáveis por emissões de gases de efeito estufa são os desmatamentos, o setor energético e a criação de animais ruminantes. Em média, estima-se que 6% de todo o alimento consumido pelo gado no mundo seja convertido em gás metano, que é liberado por eructação (arrotos dos bois). (Claudia Izique, 2005;ciência hoje on line 2002).

O país é responsável pela produção anual de 250 milhões de toneladas de carbono (10 vezes menos que os EUA).

O Brasil é o quinto maior responsável pelas emissões mundiais de gases de efeito estufa, atrás apenas dos Estados Unidos, Rússia, China e Japão. O país participa do protocolo de Kyoto, documento que propõe um acordo ambiental que envolve medidas de controle ao aquecimento do planeta (Claudia Izique, 2005;ciência hoje. on line 2002).

O monóxido de carbono fisiologicamente tem uma afinidade de 250 vezes maior de ligar-se a hemoglobina do que ao oxigênio, interferindo desta forma no sistema de transporte de oxigênio aos tecidos.

Alem disso, através da ligação de CO com a hemoglobina, obtemos uma alteração alostérica na conformação do complexo oxihemoglobina que aumenta a afinidade no sítio e dificulta ainda mais a liberação do O₂ para o tecido.

Em adição, a ligação de CO ao citocromo oxidase, exacerba a hipóxia celular, além de, ligar-se á outras proteínas extra-vasculares que incluem mioglobina, citocromo P-450, catalases, e peroxidases. Pesquisadores sugerem que as concentrações de CO nos Estados Unidos, são principalmente secundárias ao nível de poluição elevado, tornando-se mais um bom indicador de poluição de combustão fóssil do que um tóxico direto (Brook e col., 2004).

Entretanto, em algumas situações (lugares com ventilação deficiente, por exemplo), o CO pode alcançar níveis suficientes para levar a um significativo aumento não fisiológico de carboxihemoglobina , efeito este danoso em pessoas com aterosclerose e outras condições cardíacas. Em altíssimas concentrações,este efeito deletério pode levar a morte.

O nível de monóxido de carbono no sangue de indivíduos não fumantes varia dependendo da qualidade do ar respirado. Os níveis são usualmente 0-8 ppm (parte por milhão) (Brook e col., 2004).

c) Dióxido de Nitrogênio

Dióxido de nitrogênio é precursor do ozônio (O₃). Pesquisadores tentam reduzir os níveis de ozônio e conseqüentemente redução dos níveis

de NO_2 . Em contraste ao ozônio, o NO_2 é freqüentemente encontrado em níveis mais elevados em ambientes fechados (poluição indoor) do que poluição do ar externo (outdoor). Os locais que apresentam maiores níveis são os que usam querosene, e/ou fogão a lenha e chaminés (Geocites. com).

A origem do NO e NO_2 na atmosfera ocorre em decorrência de veículos, planta geradoras de energia e outro produtos industriais de origem fóssil. As concentrações de NO_2 variam conforme a densidade de tráfego na região.

As pessoas com problemas respiratórios são especialmente vulneráveis ao efeito agudo de exposição ao NO_2 , entretanto pessoas saudáveis, não percebem as alterações pulmonares quando expostos a variação dos níveis de NO_2 (Brook e col., 2004).

Os óxidos de nitrogênio são substâncias reativas dentre as quais podemos citar: óxido nítrico (NO), dióxido de nitrogênio (NO_2), trióxido de nitrogênio, tetróxido de nitrogênio (N_2O_4) e dinitrogênio pentóxido (N_2O_5), ácido nítrico gasoso (HNO_3). Estes compostos são referidos como NO_x . A maior origem de particulado do nitrato ocorre em dois momentos: quando NO_2 reage com radical hidroxil durante o dia e quando N_2O_5 reage com vapor de água à noite.

Outros membros da família de óxidos de nitrogênio incluem ácido nitroso, óxido nitroso, peroxiacetil nitrato (responsável por alguns efeitos irritantes da fumaça fotoquímica). Algumas pesquisas toxicológicas e epidemiológicas têm focado o poluente NO_2 por ser um dos padrões

reguladores da poluição atmosférica pelo qual são avaliados pelo mundo todo (Brook e col., 2004).

O NO originado da exaustão veicular e plantas é largamente convertido em NO₂, o qual tem função primária de formar ozônio na troposfera (O₃) (Geocites. com; CETESB)

Emissões veiculares próximos às ruas de comércio podem resultar em aumento local de NO_x.

A típica captação de NO_x diuturna (início da manhã e final de tarde) é resultado de picos formados no horário de “rush” no tráfego de carros (Geocites. com; CETESB).

A exposição humana significativa pode ocorrer em locais fechados não ocupacionais. Queima de gás, em lugares não ventilados, como fumaças em geral e aquecedores são as principais fontes de NO_x em ambientes fechados.

Em áreas urbanas, a infiltração de NO₂ de origem veicular pode também influenciar a exposição no ambiente fechado.

Em condições normais ambientais o acúmulo de O₃ (ozônio) é pequeno. Entretanto, alguns reativos de compostos orgânicos podem facilitar a oxidação de NO para NO₂ por mecanismos alternativos. Estas reações reduzem o NO “scavenger”, seguido do aumento de concentração O₃. (Brook e col., 2004).

d) Ozônio

O Ozônio é um gás altamente reativo, apresentando cor com uma variação entre incolor a azulado. É formado na estratosfera por ação da radiação solar na presença de O_2 , e na troposfera é iniciado com fotólise de NO_2 onde age como “scavenger” liberando ozônio e reativos de hidrocarbonos (ambos liberados por veículos e indústrias) (Brook e col., 2004).

A formação de ozônio tende a ser maior no inverno e dias ensolarados, sendo os picos maiores pela manhã e final de tarde.

Outro fenômeno que ocorre ligado ao ozônio é a inversão térmica (Geocites. com; CETESB).

A inversão térmica é um fenômeno meteorológico que ocorre principalmente em metrópoles e principais centros urbanos.

Normalmente as radiações solares aquecem o solo e o calor fica retido; como consequência, as camadas mais baixas da atmosfera se aquecem, por sua vez ficam menos densas e tendem a subir, formando correntes de convecção do ar. Os poluentes contidos nessas camadas, agora aquecidas, tornam-se menos densas, sobem e irão se dispersar nas camadas altas da atmosfera. Entretanto quando a camada de ar quente se fixa acima do ar frio, também aprisiona o ar frio entre duas camadas aquecidas (acima da camada quente e solo), formando-se na intersecção do ar quente e frio, uma capa que não permite que os gases poluentes e tóxicos

passem para as camadas mais altas da atmosfera. Essa situação é denominada de Inversão Térmica (Geocites. com; CETESB).

Assim, esses gases dispersam-se na atmosfera, criando uma névoa sobre a cidade ou município. Essa névoa é composta de gases tóxicos e poluentes, que são prejudiciais à saúde.

Quando ocorrem ventos nas horizontais, esse quadro é revertido, pois a camada fria é deslocada e o ar quente desce.

Os problemas de saúde causados pela inversão térmica são, entre outros: pneumonia, bronquite, enfisema, agravamento das doenças cardíacas, mal-estar, irritação nos olhos e de vias aéreas superiores como nariz, faringe (Brook e col., 2004).

e) Material Particulado

Material particulado urbano consiste de uma mistura heterogênea de partículas sólidas e líquidas suspensas no ar, variando em tamanho e composição no espaço e tempo.

As partículas primárias são emitidas diretamente na atmosfera e as partículas secundárias são criadas pela transformação físico-química de gases, como a formação de nitratos e sulfatos originados do ácido nítrico e dióxidos de enxofre na forma gasosa, respectivamente.

A maior fonte de material particulado está na emissão de fumaças dos veículos. Outras fontes conhecidas são a fragmentação de pneus e poeiras suspensas nas rodovias (partículas totais suspendidas–PTS),

geradores de energia e combustão industrial, derretimento e/ou outro processo de metal, agricultura, construção e demolição, queima de madeira residencial, polens, incêndios e etc... (CETESB).

Todavia milhares de substâncias químicas têm sido detectada no material particulado originário de diferentes fontes. Algumas mais comuns incluem nitratos, sulfatos, compostos orgânicos (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), compostos biológicos como endotoxina, células fragmentadas e a vários metais como ferro, cobre, níquel, zinco e vanádio.

O material particulado é classificado conforme o seu tamanho. Toda partícula suspensa que possua a capacidade de penetrar e depositar na árvore traqueobrônquica apresenta tamanho aerodímetro em torno de 10 μm ou menor denominado de PM_{10} (material particulado 10 μm diâmetro aerodinâmico). O $\text{PM}_{2,5}$ (diâmetro aerodinâmico de $\leq 2,5 \mu\text{m}$) atinge as vias aéreas mais profundas e as partículas ultra finas ($\leq 0,1 \mu\text{m}$), têm sido alvo de mais atenção, por sua capacidade de translocar-se para a circulação (Brook e col., 2004, Nemmar e col, 2004).

Recentes pesquisas sugerem uma possível ligação entre a exposição aguda ao material particulado, morte súbita e na variabilidade do ritmo cardíaco (de Paula Santos e col., 2005; Rivero e col, 2005, Brook e col., 2004).

2- Relação da Poluição Atmosférica e Doença Cardiovascular

Durante a última década, estudos epidemiológicos associaram consistente aumento da morbi/mortalidade do risco cardiovascular, tanto a episódios curtos como longos de concentrações de índices de poluição, relacionando-os principalmente com o material particulado.

Pacientes idosos, pessoas com susceptibilidade a doenças cardíacas e pulmonares, baixo poder socioeconômico, diabetes, obesidade são geralmente de maior risco (Schlesinger e col. 2006, Brook e col, 2004, Dockrey e col, 1993)

Muitos outros episódios caracterizados por elevados índices de poluição atmosférica foram registrados nos grandes centros urbanos do mundo, como: Cidade do México, Los Angeles, Detroit, São Paulo, Londres, Tóquio e Osaka. Nessas concentrações urbanas, mesmo quando não são registrados episódios críticos, os níveis de qualidade do ar são ruins, expondo os habitantes permanentemente a poluentes e por consequência ocasionando maior frequência de doenças cardiorespiratórias (Bell e col., 2005).

Estima-se que o aumento de 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM_{10} na atmosfera aumenta a mortalidade total diária em 1,8%, doenças respiratórias em 3,4% e mortalidade por doenças cardiorespiratórias em 1,4% (Committee of the Environmental and Occupational Health Assembly of the American Thoracic Society, 1996, Dockery e col., 1993).

Brook e col. (2002) demonstrou que o material particulado fino PM_{2,5}, e o ozônio em determinadas concentrações semelhantes ao encontrado nos de pico de poluição atmosférica, alteram a reatividade e o tônus arterial em humanos expostos.

Vermeylen e col., 2005, em revisão, sugerem algumas implicações patofisiológicas do infarto do miocárdio e poluição atmosférica. Nela constam alguns estudos em algumas cidades da Europa, relacionando períodos de picos agudos de poluição atmosférica, com isso aumentando a mortalidade cardiovascular por até 40 dias após exposição.

Outros autores relacionam a poluição diretamente com o infarto do miocárdio, onde elevadas concentrações de partículas finas mostraram que após o período de 2hs à 24hs, obtiveram-se elevados índices de infartos (Vermeylen e col, 2005, Brook e col, 2002; Peters e col, 2001).

Em relação à fase crônica, 3 (três) estudos referentes a cidades dos Estados Unidos e Holanda, mostraram relação direta entre mortalidade por doenças cardiovasculares e poluição atmosférica (Dockrey e col, 1993; Hoek e col, 2002)

3- Poluição e Aterosclerose

Nos últimos anos, muitos trabalhos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado a participação direta e/ou indireta da poluição na progressão da aterosclerose (Lippmann e col., 2005; Sun e col., 2005; Goto e col., 2004; Suwa e col., 2002, Donaldson e col, 2001).

A doença da artéria coronária destaca-se nos dias atuais como a principal causa de morbidade e mortalidade na sociedade industrializada (Wick e col., 2001). Na América Latina, é responsável por um terço de todas as mortes (Piegas e col., 2003). No Brasil, é considerada a principal causa de mortalidade na população adulta, sendo responsável atualmente por cerca de 30% dos óbitos no país (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2004).

Antes de iniciarmos a discussão a respeito da relação poluição atmosférica e aterosclerose, lembraremos alguns conceitos.

3.1- Aterosclerose

A aterosclerose é atualmente considerada uma doença inflamatória, com perfil patofisiológico complexo (Ross, 1999; Libby 2002, Hansson, 2005).

É caracterizada por lesões ateroscleróticas que podem levar ao comprometimento de artérias de grande e médio calibre.

Na fase inicial, a lesão é assimétrica e focal, originada por acúmulo de lipídeos, denominada de estrias gordurosas, na íntima das artérias, ocorrendo principalmente nos jovens (Ross, 1999).

A evolução das estrias gordurosas caminha-se para placas fibrosas ou ateromas, cuja lesão é mais característica da doença. São lesões de forma e tamanhos variados, amareladas, também localizadas na íntima das artérias fazendo uma protrusão para a luz. São formadas por

macrófagos, células musculares lisas, linfócitos e alguns fibroblastos, tecido conjuntivo e células espumosas.

3.2- Resposta Inflamatória da aterosclerose

Geralmente esta resposta ocorre nas regiões de bifurcações e ramificações das artérias, onde o fluxo sanguíneo é turbulento, principalmente em regiões onde possuem força hemodinâmica (repetida pressão pulsátil) e shear stress (força friccional agindo na superfície do endotélio)(Kensey, 2003).

O processo aterosclerótico tem início quando o endotélio dos vasos sofre algum tipo de lesão, induzindo um processo inflamatório. Como consequência, ocorre alterações na permeabilidade vascular, levando à saída de macromoléculas e à migração de monócitos e linfócitos T e B para a região subendotelial (Roos, 1999, Hansson, 2005). O enrijecimento da parede arterial é devido ao depósito de várias moléculas na placa, incluindo lipídios, cristais de colesterol e sais de cálcio. A consequente alteração na estrutura da parede endotelial leva ao aumento da adesão plaquetária, contribuindo para a formação de trombos. Além disso, células musculares lisas e fibroblastos, que são produtoras de matriz extracelular, também passam a proliferar na área da lesão, constituindo o maior volume da placa ateromatosa no estado avançado (Libby, 2002). Embora a proliferação de células musculares lisas ocorra de forma gradual, pequenas rupturas de placas em formação, podem gerar sítios proliferativos, desencadeados pela

trombina ou pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor* - PDGF). Esta proliferação também é observada nos macrófagos presentes nas placas de ateroma, sendo este efeito ocasionado por fatores de crescimento como fator estimulador de colônia de macrófagos (*macrophage - colony stimulating factor* - M-CSF) (Libby, 2002).

No estado avançado da placa aterosclerótica estão presentes dois componentes estruturais distintos: um núcleo lipídico pouco denso e a capa fibrosa. O núcleo lipídico é rico em lipídios extracelulares, principalmente cristais e ésteres de colesterol. Por outro lado, a capa fibrosa, a qual compreende cerca de 70% do tamanho total da placa, é formada basicamente por células musculares lisas, matriz extracelular e células inflamatórias, colágeno e fibroblastos (Witztum,& Steinberg 2001).

As lisofosfatidilcolinas e os esteróis oxidados podem ativar macrófagos e células endoteliais para gerarem radicais de oxigênio e expressarem moléculas de adesão.

Várias moléculas de adesão vêm sendo investigadas como fundamentais nesse processo, dentre as quais podem ser citadas: *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), e *intercellular adhesion molecule-1*(ICAM-1) (Frostegard e col., 1991; Collins e col., 2000). A oxLDL (LDL oxidada) também pode induzir a expressão de moléculas quimiotáticas nas células endoteliais como *monocyte chemotatic protein-1* (MCP-1, proteína quimiotática do monócito) (Tabata e col., 2003) a qual pode interagir com *C-C chemokine receptor 2* (CCR2, receptor quimiocina 2 C-C), que está expresso em monócitos de pacientes hipercolesterolêmicos (Wigren e col., 2003).

Além disso, algumas enzimas foram encontradas nas lesões ateroscleróticas, podendo estar envolvidas neste processo, dentre elas, estão as lipases e proteases, como mieloproteases, esfingomielinases (Lusis, 2000) e lipoxigenases (Heinecke, 1997).

Estas áreas mostram aumento da permeabilidade para macromoléculas como a LDL (Lusis, 2000) e um aumento na expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais (Ross, 1999), possibilitando a migração de monócitos e linfócitos T e B para a área da lesão (Lusis, 2000).

As lipoproteínas LDL plasmáticas são atualmente muito estudadas, pois são as responsáveis pela formação de células espumosas na íntima do vaso, sendo um dos principais eventos na aterosclerose. Entretanto não se conhece ainda quais os mecanismos que levariam as LDL plasmáticas serem atraídas para a íntima dos vasos.

As células espumosas sintetizam enzimas proteolíticas capazes de degradar componentes macromoleculares da matriz extracelular como proteoglicanos, elastina e fibronectina (Libby, 2002). As enzimas que mais participam deste processo são as metaloproteinases (MMP). A participação das MMP é um evento importante observado desde a formação da placa, contribuindo para o infiltrado de células inflamatórias, até o estágio final, onde ocorre a ruptura da mesma, trombose local, obstrução vascular, levando a um quadro clínico de angina, infarto do miocárdio e podendo promover choque hemodinâmico (Libby, 2002; Lusis, 2000).

a) Lipoproteína LDL (low density lipoprotein)

A LDL é uma lipoproteína constituída principalmente por lipídios, vitaminas lipossolúveis e uma parte protéica, a apolipoproteína B-100 (apoB-100) (Havel, 1984).

A partícula de LDL contém cerca de 2.700 moléculas de ácidos graxos, onde a maior parte é poli-insaturada com predominância de ácido linoléico e ácido araquidônico (Esterbauer et al., 1987). O antioxidante associado mais abundante é o α -tocoferol, com cerca de 6 a 8 moléculas por partícula de LDL. Outros antioxidantes também estão presentes como o γ -tocoferol, ubiquinol-10, α -caroteno, β -caroteno, licopeno e criptoxantina. Entretanto estes estão presentes em baixas concentrações na partícula de LDL (Esterbauer et al., 1992).

A explicação mais freqüente associada à oxidação da molécula LDL relaciona-se a um excesso de LDL plasmática circulante, que ao chegar à região da íntima arterial, oxidaria secundária à pela presença de radicais livres no local e induziria a migração de monócitos fagocitose da LDL e conseqüentemente formação das células espumosas (foam cells) (Getz, 2005).

Um outro fator muito importante para a aterogênese são as modificações das lipoproteínas LDL que poderiam gerar um prejuízo maior na artéria lesada. São elas: processos enzimáticos (Ferri e col, 2005), por metilação (LDLmet), por glicação (gliLDL), por acetilação (Witztum, &

Steinberg 2001; Carvalho e col., 2002), por agregação (agLDL) (Khoo e col., 1988) e por oxidação (Gidlund, e col. 1996).

Toshima e col (2000), sugerem em seus resultados, que a LDLox pode servir como marcador bioquímico para o risco de doenças cardíacas.

Daremos mais ênfase ação da LDL oxidada, por ser considerada a mais importante para o desenvolvimento da aterosclerose.

b) LDL Oxidada

A participação da LDL oxidada (LDLox) na aterogênese ocorreria através do recrutamento de monócitos circulantes para o espaço subendotelial, com conseqüente diferenciação em macrófagos, que se acumulariam na camada íntima arterial. Estes macrófagos aumentariam a captação da LDLox, levando à formação de células espumosas (*foam cells*). Além disso, a citotoxicidade da LDLox levaria à perda da integridade endotelial.

As LDL interagem com receptores específicos presentes na superfície celular que são os receptores do tipo B/E. Estes receptores regulam a captação do colesterol exógeno. Desta forma, quando o conteúdo de colesterol intracelular está acima do normal, ocorre a inativação dos receptores para LDL (Moghadasian et al., 2001) Por outro lado, no macrófago, a captação de LDL modificadas ocorre pelos “scavenger receptors” (SR) (SRA, CD36, CD68, LOX-1 e SR-PSOX) (Lucas & Greaves, 2001)

Ao contrário do que ocorre com os receptores para LDL, os SR não são regulados pelas concentrações intracelulares de colesterol, permitindo a captação de altas quantidades de LDLox favorecendo a formação de células espumosas (Jessup e col., 2002).

Além de reagir com receptores presentes na membrana, os produtos da oxidação lipídica têm sido atribuídos como reguladores de fatores de transcrição, agindo numa família de receptores nucleares que controlam o metabolismo lipídico, são eles: *liver X receptor* (LXR) e o PPAR γ (Joseph e col, 2002; Bishop-Bailey & Wray, 2003).

Acrescentando a isto, resultados obtidos no pelo prof. Magnus Gidlund, responsável pelo Laboratório de Imunofisiopatologia do Instituto de Ciências Biomédicas IV da Universidade de São Paulo, mostram que a LDLox não é uma entidade única, mas formada por diversos produtos que surgem durante o processo oxidativo e ausentes na partícula de LDL não oxidada. Quando esses componentes são estudados de forma individualizada, observa-se que existem compostos que podem interagir com outros receptores de membrana como o receptor para o *platelet-activating factor* (PAF, fator de ativação plaquetário) promovendo respostas inflamatórias, tais como o aumento da permeabilidade vascular (Svensjo e. col 2003).

Este aumento de LDL oxidada leva ao recrutamento de células imunes para a íntima arterial.

3.3- Resposta Imune da Aterosclerose

No momento em que os macrófagos internalizam as LDLox via receptores scavenger e transformam-se em células espumosas, ocorre o recrutamento das células T quando há aumento de expressão de moléculas de adesão. Com isto, as células presentes na lesão, como os macrófagos, células endoteliais e células dendríticas, rapidamente são capazes de ativar as células T efectoras de memória e virgens presentes na lesão que passam a secretar principalmente citocinas da subpopulação T *helper* – 1 (Th1), como interferon- γ (IFN- γ) e Interleucina (IL)-2 (Frostegard et al. 1999). Estas citocinas causam ativação de macrófagos e células vasculares. Células musculares lisas são quimiotaticamente atraídas da camada média para a camada íntima, passando a proliferar devido à presença de LDLox e das citocinas secretadas.

A resposta imune contra a LDL oxidada resulta na produção de anticorpos.

Altos títulos de anticorpos de LDLox são encontradas em pacientes com aterosclerose e em modelos animais com hipercolesterolemia.

Ambos os anticorpos IgM e IgG são gerados, sugerindo que as vias dependentes e independentes de células T para ativação das células B estão envolvidas na resposta imune contra a LDLox (Zhou e col, 1998, Zhou e col. 2005).

Ylä-Herttuala e col. (1994) mostraram que a LDLox e anticorpos específicos contra LDLox estão presentes em placas ateroscleróticas humanas e de coelhos hiperlipêmicos, justificando assim a existência de componentes para a formação de imunocomplexos (IC) em placas ateroscleróticas. Foi demonstrado também que IC-oxLDL podem acelerar a internalização de ésteres de colesterol em macrófagos (Virella et al. 2002). Em outros estudos Wu & Lefvert (1995) mostraram que anticorpos contra LDLox podem por si só aumentar a internalização de LDLox por monócitos da linhagem U937. Estudos em modelos animais e clínicos mostram que anticorpos contra LDLox estão correlacionados com a modulação do processo aterosclerótico e/ou do risco de desenvolvimento de patologias por consequência da aterosclerose de diferentes maneiras. Entretanto, ainda não está clara qual a função destes anticorpos, uma vez que há estudos que mostram sua correlação tanto com eventos pró-aterogênicos quanto anti-aterogênicos.

Estudos mostram que concentrações aumentadas de anticorpos contra LDLox são preditivos para a progressão de aterosclerose de carótida (Salonen e col., 1992) e ocorrência de infarto do miocárdio e mortalidade (Wu e col., 1997). Altas concentrações de anticorpos contra LDLox são encontrados em camundongos *knock out* para o gene da Apo-E (Apo-E^{-/-}), susceptíveis a aterosclerose após alimentação rica em colesterol (Palinski e col. 1994).

Por outro lado, anticorpos IgM (imunoglobulina M) em camundongos (Apo-E^{-/-}) são capazes de inibir a captação de LDLox e com

isso prevenir a formação de células espumosas (Horkko e col., 1999). Em modelos animais, imunização com LDL modificada aumenta a concentração de anticorpos contra LDLox e são capazes de reduzir lesões ateroscleróticas (George, e col., 1998). Situações similares foram também observadas em coelhos hipercolesterolêmicos imunizados com LDLox (Nilsson; e col., 1997). IgG monoclonal contra LDL ligada a malondialdeído (MDA) são capazes de inibir a captação de LDLox por macrófagos (Shaw e col., 2001).

Portanto o papel dos auto-anticorpos na aterosclerose ainda está longe de ser esclarecido. Entretanto, pode-se especular a existência de diferentes “famílias” de anticorpos contra LDLox (Sherer & Shoenfeld, 2002). Neste sentido é possível que os estudos apresentados até hoje na literatura possam estar analisando respostas contra diversos compostos diferentes, o que de certa forma explicaria os resultados contraditórios encontrados.

3.4- Anticorpo anti Peptídeo D da LDL- B 100

Os pesquisadores do Laboratório imunofisiopatologia do ICBIV (Instituto de Ciências Biomédicas IV da Universidade de São Paulo) sob coordenação do prof. Magnus Gidlund, analisaram vinte e cinco seqüências peptídicas da LDL que foram sintetizadas na fase sólida, cada uma com vinte e cinco resíduos de aminoácidos e amidas na extremidade “C-terminal”. Dados obtidos pelo grupo de pesquisa mostraram que um peptídeo, denominado “D” (peptídeo D) possui

características imunogênicas particulares e que pode ser utilizado para uso nos testes de ELISA, possuindo também uma correlação com os anticorpos anti-LDLox (Zaratin e col., 2002).

O peptídeo D é altamente imunogênico e parece ser um epítopo universal associado à degradação da LDL. O mais interessante é que além de suas propriedades antigênicas, este peptídeo possui atividades vasoativas (Svensjo et al, 2002). Estudos recentes do grupo mostraram que anticorpos anti-peptídeo D foram encontrados no homem, camundongos, coelhos, hamsteres e bois (Cazita e col., 2003).

O comportamento do peptídeo D em relação à poluição atmosférica ainda não foi estudado.

Brook e col., 2004 propõe hipóteses para as possíveis interações entre a poluição atmosférica e o envolvimento direto dos poluentes no sistema cardiovascular, sangue, receptores pulmonares e/ou indiretamente mediados através do estresse oxidativo pulmonar e resposta inflamatória *in situ* e sistêmica.

Efeitos diretos podem ocorrer via agentes que facilmente cruzam o epitélio pulmonar e avançam para circulação (como gases, MP ultrafino, metais solúveis). Somado a isso, pode ocorrer uma resposta secundária à interação de receptores pulmonares e poluentes, produzindo ativação do reflexo neuronal pulmonar. Subseqüentemente, alterações no tônus autônomo podem contribuir para a instabilidade do equilíbrio vascular ou iniciar uma arritmia cardíaca. Dependendo da concentração do poluente e do tempo de exposição, a contribuição subsequente ao estado inflamatório,

pode alterar as vias hemostáticas, desequilibrando a função celular e acelerando a aterosclerose.

4- Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes na célula e fluido extracelular (Gilmour e col., 2002), induzindo uma resposta inflamatória.

A prevenção e defesa ocorre através do sistema de antioxidantes composto pelo sistema enzimático e não enzimático. O sistema enzimático anti-oxidante abrange a superóxido dismutase (SOD), glutathione oxidase, catalase-peroxisomal-ligase (CAT), que também são chamadas de “scavenger” enzimático. O sistema não enzimático (“scavenger” não enzimáticos”) incluem as vitaminas A, C, E, β caroteno, ácido úrico, cisteína, coenzima Q, e outras (Dalla e col, 2000).

A AP-1 (ativador de plasminogênio tipo 1) e NF- κ B (fator de nuclear κ B) são fatores de transcrição diretamente ligados ao processo de redox (redução, ganho de elétron) e de oxidação (perda de elétron). AP-1 está envolvida no processo inflamatório envolvendo moléculas de adesão. Este é composto de produtos gênicos como Jun e Fos, e estas são ativadas pelo estresse oxidativo e pelas citocinas inflamatórias como TNF- α e a IL-1. Quando ativados, estes fatores de transcrição produzem aumento da transcrição gênica das IL-1, 6 e 8, TNF- α , induzindo a síntese de NO e de

moléculas de adesão-1 vascular (VCAM) e moléculas de adesão intercelular (ICAM)-1.

Outro mediador de estresse oxidativo são as espécies reativas de oxigênio (ROS).

Décadas passadas, pesquisas têm sido realizadas para o entendimento da função da toxicidade da molécula de oxigênio, como os chamados espécies reativas de oxigênio (ROS) principalmente quando relacionadas à disfunção cardíaca e nas condições patofisiológicas envolvidas.

O aumento da formação de ROS é geralmente associado com o estresse oxidativo e subsequente prejuízo no tecido cardiovascular (Dalla e col, 2000).

As espécies reativas de oxigênio são compostos químicos reativos provenientes de diversas reações químicas normais e induzidos pelo microambiente tecidual e/ou celular. São classificadas em duas categorias: radicais livres (O_2^- e OH^-) e derivados sem ser na forma de radicais (H_2O_2 e $HOCl$).

Estes agentes em baixa concentração servem como mediadores de sinalização, porém quando em excesso, apresentam o efeito deletério.

Os estudos mostraram que alguns metais de transição (como Fe) contidos na superfície das partículas induzem uma resposta inflamatória por gerar altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) no pulmão (Dalla e col, 2000).

Sun e col, 2005 estudaram a influência da poluição atmosférica e aterosclerose, na tentativa de esclarecer a associação entre a inflamação vascular e poluição atmosférica. Sugeriram que a inflamação ocorre por um aumento de produção da ROS, pelos macrófagos e formação de radicais tóxicos como a peroxinitrito.

Por outro lado, outra maneira de indicação de estresse oxidativo é através de produção não enzimática.

Os derivados do ácido araquidônico são metabolizados para a forma de prostaglandinas e isoprostanos. A sua oxidação por via não enzimática (peroxidação lipídica) produz a família de isoprostano F_2 e podem agir como ligantes de receptores TP e desta forma promover a aterosclerose.

O 8-epi PG $F_{2\alpha}$ e o IP $F_{2\alpha}$ são isoprostanos produzidos nos humanos e são encontrados no plasma e excretados pela urina (Praticó e col,1997). Estes marcadores são considerados bons indicadores de estresse oxidativo *in vivo*, por serem um método de diagnóstico não invasivo e estarem sabidamente envolvidos com espécie reativas de oxigênio.

5- Modelo Animal Experimental

Muitos estudos experimentais fazem uso de animais geneticamente modificados como os conhecidos como animais knockout.

Macacos e porcos são animais excelentes para estudar lesões ateroscleróticas, mas com alto custo de manutenção (inclusive local adequado, etc...), tempo de experimentação, dificultando assim sua utilização na maioria dos laboratórios atuais. Ratos e cachorros não são bons modelos para esse tipo de estudo pois não desenvolvem lesões ateroscleróticas espontâneas, necessitando modificações intensas na dieta e muito tempo de exposição, refletindo em lesões muito ínfimas. Coelhos são mais indicados, mas necessitam de espaço adequado. Camundongos são resistentes a ateroscleroses, entretanto os da raça C57BL/6 quando alimentados com ácido cólico e altas concentrações de colesterol em sua dieta, apresentam lesões vasculares, mas diferem do humano em sua localização e histologia (Jawien e col., 2004).

Portanto, o animal escolhido para o nosso experimento foi originado do camundongo C57BL/6, com linhagem geneticamente manipulada dando origem a animais com deleção do gene para receptores para LDL (LDLR^{-/-}). Esses animais desenvolvem um grau menor de lesões ateroscleróticas e mais lentamente em relação ao camundongo apoE, mas quando alimentados com dieta enriquecida de colesterol respondem bem à dieta com pronunciadas lesões vasculares. Estes animais assim tratados apresentam um pronunciado aumento de colesterol sanguíneo com complicações cardiovasculares, semelhantes à hipercolesterolêmia familiar humana (Jawien e col, Ohashi e col., 2004).

Com essas características específicas tornaram-se ideais para o nosso experimento aliado aos conhecimentos adquiridos pelos

pesquisadores pertencentes ao Laboratório de Lípidos desta Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Catanozzi e col, 2003). Em conjunto com este grupo, adequamos a idade e o tempo de exposição desses animais à formação de placas ateroscleróticas para os nossos experimentos.

Assim sendo, objetivamos estudar o potencial aterogênico cardiovascular do ar atmosférico da cidade de São Paulo, em camundongos geneticamente modificados, com predisposição a hiperlipemia e com formação de placas de aterosclerose semelhante a do ser humano. Neste escopo, enfocaremos não só a presença de aterogênese, mas também os mecanismos fisiopatológicos dessa formação.

No mundo todo, estão estudando esta ligação, mas em nosso país, mais precisamente São Paulo, existem poucos estudos relacionando aterosclerose e poluição atmosférica.

Necessitamos explorar os conhecimentos na composição, na concentração, no tempo de exposição e principalmente o comportamento da poluição e seus reflexos na saúde pública.

II- OBJETIVOS

O objetivo primordial é avaliar o potencial aterogênico da poluição atmosférica da cidade de São Paulo, em camundongos LDLR^{-/-}

O objetivo secundário é avaliar a agressão da poluição na aterogênese através dos seguintes parâmetros:

- Morfométrico: Conteúdo lipídico nas placas ateroscleróticas; espessura do vaso arterial.
- Fisiopatológico: LDL oxidada sangüínea e tecidual; atuação dos auto-anticorpos anti LDL e anti-peptídeo D da apo B-100 plasmático, estresse oxidativo e atividade macrofágica.

III- MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido nos seguintes laboratórios: Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da USP, Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical e Laboratório de Imunofisiopatologia do Instituto de Ciências Biomédicas IV da Universidade de São Paulo e seguiu-se as recomendações do Guide for the Care and use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D.C. (1996) e aos Princípios Éticos na Experimentação Animal da Legislação Brasileira e Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA).

1- Período e Local de Exposição

A exposição dos animais de experimentação em câmaras de topo aberto, foram realizados no pátio da Faculdade de Medicina USP, entre o cruzamento da Av. Dr. Arnaldo e Rua Teodoro Sampaio, a 500 m da estação de monitoramento da CETESB. Local este, caracterizado por elevado tráfico de veículos predominantemente automotivos.

Os animais permaneceram nas câmaras de intoxicação por 24hs/dia/semana/mês durante todo o período de exposição.

Os meses escolhidos foram de Maio a Setembro, percorrendo um total de 120 dias.

2- Câmaras de Exposição

As câmaras são estruturas cilíndricas, revestidas com plásticos e com proteção aos raios ultravioletas, medindo 1,5m. de diâmetro e 2,5m. de altura. A entrada de ar nas câmaras ocorre em sua base e é distribuído uniformemente em um fluxo de 50L. por segundo e a saída de ar ocorre através de grande abertura no seu topo, daí a denominação de câmara tipo Topo Aberto. São essencialmente um sistema normobárico, onde a pressão interna não excede a 3cm de H₂O. A câmara de ar Filtrado, denominada no experimento de Câmara Filtrada, recebeu um sistema de quatro filtros alinhados em série.

O primeiro filtro em contato com o ar ambiente, elimina as partículas grandes (poeiras, folhas, etc. (Purafil, São Paulo, modelo TB); o segundo, absorve gases, através de leitos químicos como carvão ativado, óxido de Alumínio (AL₂O₃), permanganato de potássio (KMNO₄); o terceiro retém partículas finas MP₁₀ (Purafil, São Paulo, modelo JFL-90); o quarto filtro retém partículas com diâmetros aerodinâmicos até 0,3 µm, constituído por um filtro do tipo HEPA (Purafil, São Paulo), segundo Mohallem col., 2005

O controle diário das medidas internas das câmaras foi obtido através de amostragens dos óxidos de nitrogênio e do Black Carbon (que reflete indiretamente a concentração de material particulado) realizadas por Sistemas de Amostradores de Pequenos Volumes (Trigas/Opsoms-Energética, Indústria e Comércio Ltda). A concentração dos óxidos de nitrogênio foi medida através do método proposto por Lodge em 1989, e o Black Carbon, pelo método de Reflectância da Luz (ABNT, 1989).

A segunda câmara (câmara Poluída) não recebeu nenhum tratamento de filtragem, apenas o filtro de partículas grandes (retém poeiras, folhas.), portanto o ar sugado para a câmara é integro e idêntico ao ar externo.

Os controles de temperatura interna e externa e umidade interna foram monitoradas por termohigrômetro digital (soil control, Tecnologia em Instrumento de solo, Ltda.) durante todo o experimento (ANEXO 1)

O monitoramento diário dos níveis de NO₂, PM₁₀ CO e SO₂ do ar atmosférico foram mensurados pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB)

3- Modelo Animal e Grupos de Experimentação

O animal escolhido foi o camundongo com deleção de receptor para LDL, o LDLR ^{-/-} knockout, geneticamente modificado do C57BL/6j,

cedidos pelo Laboratório de Lípidos desta Faculdade, os quais foram importados pela Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). O CQB (Controle de Qualidade Biológica) é 0084/98, publicado no DOE de 03/12/98.

As características desses animais correspondem às nossas expectativas, pois desenvolvem aterosclerose quando alimentados com dieta rica em colesterol, e no período de tempo necessário para a nossa exposição (em torno de 5 meses).

Foram inseridos 41 camundongos LDLR γ/γ nas câmaras de intoxicação, com 30 dias de idade, machos e subdivididos em 4 grupos da seguinte forma:

- Grupo **Filtrada- Padrão**- (N=10) camundongos LDLR γ/γ expostos a câmara filtrada e receberam dieta padrão em pellets (NUVITAL),
- Grupo **Poluída- Padrão** (N= 11) camundongos LDLR γ/γ expostos a câmara sem sistema de filtros e dieta padrão em pellets (NUVITAL),
- Grupo **Filtrada- E.Col**- (N=10) camundongos LDLR γ/γ expostos a câmara filtrada e dieta (AIN-93, Reeves e col.,1993) enriquecida a 1,25% de colesterol em pellets,
- Grupo **Poluída- E.Col**- (N=10) camundongos LDLR γ/γ expostos a câmara sem sistema de filtros e dieta (AIN-93, Reeves e col.,1993) enriquecida a 1, 25% de colesterol em pellets.

Durante todo o experimento os animais receberam alimento e água *ad libitum*, mantidos em caixas convencionais, receberam manutenção adequada e ciclo de luz 12hs dia/noite.

4- Análise Laboratorial

a) análise bioquímica

Após o período de exposição os animais foram pesados e anestesiados com pentobarbital intraperitoneal (50mg/kg/ peso animal).

Realizada punção cardíaca, com a finalidade de obter sangue total para análise de colesterol e triglicérides totais, LDL oxidada, análise de autoanticorpos.

A dosagem de colesterol total e triglicérides foram obtidos pelos métodos enzimáticos e colorimétricos em Kits convencional (Lab Test Diagnostica)

b) Isolamento da lipoproteína e análise da Suscetibilidade das LDL

A LDL foi obtida a partir do pool de plasma fresco de cada grupo por ultracentrifugação vertical-spin (L7 Beckman-rotor SW41), e ajustando a densidade (1.019-1.063 g/ml) como previamente descrito por Heinecke e col., 1986,

As frações isoladas (VLDL, HDL, fração protéica, denominada de infranadante) foram estocadas a 4°C. A incubação padrão de LDL para a susceptibilidade para oxidação foi de 120 µg de LDL/mL na presença de 1.25 µmol/L CuCl₂ a 37°C.

A leitura da susceptibilidade de peroxidação lipídica foi realizada em duplicata em absorbância de 234 nm em espectrofotômetro (Stectronic) com intervalo de tempo de 3 minutos, por um período de 4 horas à 37°C.

As amostras foram aliqüotadas no fundo da cuveta de quartzo e condicionadas no carrossel de leitura do espectrofotômetro, após este procedimento foram adicionados 1,5ml de PBS sem EDTA no branco e 1,5 ml da solução de CuSO₄ nas amostras.

O lag-phase é determinado pelo tempo decorrido entre o início da reação e a intersecção do tempo com a reta extrapolada de fase de propagação. Além disso, foi analisada a máxima razão de formação, que é determinada pela absorbância/min entre o início da fase de propagação até o ponto máximo de absorbância da curva (Esterbauer e col.,1989).

Infelizmente a análise final desta metodologia não será apresentada por problemas técnicos, assim como não foi possível fazer as comparações, pois só o grupo Poluída- E.Col.respondeu adequadamente ao método. Os demais grupos não responderam possivelmente em decorrência da concentração de LDL ser muito pequena ou não responderam ao tratamento de CuSO₄.

No procedimento de separação sangüínea em frações, os anticorpos por serem mais pesados ficaram na fração infranadante, sendo necessário utilizar esta fração como alternativa (fonte de anticorpos) para os subseqüentes de análises de ELISA anticorpos anti-oxLDL e anticorpos anti-peptídeo D.

c) Análise de TBARS

Na fração restante de LDL de cada grupo, foi possível a dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), uma medida indireta de oxidação lipídica.

Inicialmente verificamos a concentração protéica de LDL de cada grupo, pelo Kit BCA (Biorad) para posterior oxidação com CuSO_4 .

Em seguida, as amostras foram encubadas com CuSO_4 , cuja concentração final é 20 μmol de CuSO_4 / mL de 1 mg/mL de LDL a 37°C.

Os tempos analisados para a oxidação foram 0, 2, 3,4 e 5 horas.

Alíquotas de 50 μL de cada grupo de cada tempo analisado foi adicionado 200 μL de ácido tricloroacético a 10% . Após incubar em água fervente por 15 minutos, e obter a cor rosa, as amostras foram submetidas a leitura de absorbância em filtro de emissão de 540 nm (Tecan Magellan)

d) dosagem de proteína total

A determinação de concentração protéica de cada grupo do infranadante foi realizada segundo instruções do fabricante Kit BCA (Bio-rad Protein Assay) e adaptado para leitura em microplacas.

Foram selecionadas alíquotas de 10 µL de cada amostra em cada orifício da placa e adicionados 200 µL de reagente. Feita curva padrão de 8 pontos. Todas as amostras foram realizadas em triplicatas. Em seguida encubadas por 30 minutos a 37°C. A leitura foi realizada em absorbância a 450nm.

Após a obtenção das concentrações protéicas, todas as amostras foram ajustadas para 7,6mg/ml (ANEXO 2). A partir desse ponto seguiu-se para a realização do ensaio de ELISA para a medida de anticorpos anti- LDL oxidada e anticorpos anti peptídeo D.

e) Dosagem de anticorpos anti- LDLoxidada por ELISA

Plasma humano foi dializada em PBS para remover o EDTA. Posteriormente o plasma foi encubado com CuSO₄ (cuja concentração final é 20 µmol of Cuso4/ mL de 1 mg/mL de LDL) por 18 hs. à 37°C.

Em placas de ELISA foram adicionados 50 uL de LDL oxidada com cobre (7,5 ug/ml) em 4°C “overnight”. Depois as placas foram lavadas em PBS e bloqueadas com 1 % de gelatina (GIBCO, USA) por 2 horas em temperatura ambiente.

Em seguida, as amostras do infranadante foram igualadas em relação á concentração protéica.

Depois de normalizadas as amostras, foi adicionado em cada pocinho da placa a uma diluição de (1:400) e incubadas por 2hs., lavadas com PBS contendo 0,05 % de Tween (PA, FLUKA). Então foi adicionado HRP-cojugado de anticorpo de bode anti-camundongo IgG (DAKO co) e incubado por 1 hora. No final , usou TMB como substrato. Os resultados foram expressos em densidade óptica de filtro de emissão 450 (Tecan Megallan).

Cada ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizado em sextuplicata de cada amostra de cada grupo estudado, e as análises foram feitas pelas médias apresentadas na leitura de cada grupo correspondente.

f) Dosagem de anticorpos anti-peptídeo D

O peptídeo D foi encubado a 4°C “overnight” (3,5 ug/ml), em uma placa de 96 poços. Após foi seguido seqüência idêntica ao ensaio imunoenzimático (ELISA) da LDL oxidada. Os resultados foram expressos em absorbância 450 nm (Tecan Megallan)

Da mesma forma que a análise anterior, cada ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizado em sextuplicata de cada amostra, de cada grupo estudado, e as análises foram feitas pelas médias apresentadas na leitura de cada grupo correspondente.

No momento da padronização do ensaio imunoenzimático para o anticorpo anti LDLox. e anti peptídeo D, usou-se um soro de um animal de mesma idade e mesma linhagem recém-saído do biotério (habitat natural) como controle, com o objetivo de eliminar possíveis variações ambientais (som, iluminação, ausência de controle interno de temperatura) que pudessem alimentar qualquer dúvida sobre o comportamento das leituras encontradas até então.

5- Avaliação Histopatológica das Lesões Ateroscleróticas

Após a coleta de sangue pela punção cardíaca os animais foram sacrificados por exsangüinação.

A aorta foi delicadamente dissecada, desde a região superior da bifurcação renal até o coração; separadas as ramificações do tronco braquicefálico, as artérias carótidas, a subclávia esquerda e em seguida retirado o conjunto coração e aorta. Em seguida, foi perfundido cuidadosamente o ventrículo esquerdo com PBS para retirada de todo vestígio de sangue.

Posteriormente, foi separado arco da aorta do coração. A porção correspondente aos átrios (direita e esquerda) foram dissecados e aplicados tissue teck (Leica) para proteção dos tecidos e em seguida foram estocados em freezer -80° C até o momento do corte histológico.

a) Análise da Emergência da Aorta

Os átrios de cada animal de cada grupo foram seccionados 10 µm de espessura em criostato até o desaparecimento das válvulas e a emergência da aorta surgir.

Deste ponto em diante, os cortes consecutivos foram realizados contendo 2 secções por lâmina, numeradas pela seqüência de cortes até o desaparecimento da aorta.

Escolhidas 2 lâminas consecutivas, onde cada uma cobria toda a extensão do anel aórtico de cada animal e de cada grupo.

Em seguida, foi realizada a coloração em Oil Red O e contracorado em hematoxilina, montado em Aquamont. O conteúdo lipídico cora-se em vermelho (ANEXO 3)

A quantificação de gordura foi realizada pela captura de imagem, usando a câmera digital Leica e a leitura feita em software- Image Pro- Plus, em cinco pontos de cada aorta, de cada animal, de cada grupo e de cada lâmina, abrangendo a área total da aorta. Aumento de 20x. A análise estatística foi baseada na média encontrada na leitura das duas lâminas.

A análise da espessura vascular e a média ocorreu simultaneamente à análise da quantidade de gordura, no mesmo sítio de leitura.

A leitura foi realizada pelo teste “cego”. Os resultados foram expressos em gordura/área total e a espessura da emergência da aorta em μm .

b) Análise da aorta descendente e arco da aorta

O arco da aorta e sua descendente não foram separados, mas cortados juntos.

Cuidadosamente os cortes foram colocados em criostato, e realizadas secções de 5 μm , de maneira que as ramificações da aorta ficassem nítidas. Obtivemos duas secções em cada lâmina, fixadas em álcool/acetona e em seguida escolhemos a lâmina, a qual a árvore aórtica e aorta descendente estivesse claras e a seguir procedemos a imunohistoquímica.

As lâminas de cada animal e de cada grupo passaram por processo de hidratação em banhos de álcool. A seguir o processo de bloqueio, com objetivo de inativar as peroxidase endógena, com banho de leite desnatado (Molico) bloqueando, principalmente as “IgG”. O próximo passo então, foi à incubação com os anticorpos desejados:

c) Análise de estresse oxidativo

A diluição do policlonal anti-8 epi-PGF2 α (Oxford Biomedical Research) 1:100 (padronizado previamente) foi colocada em cada lâmina, de

cada animal, de cada grupo e incubado “overnight”. Foi usado anticorpo secundário biotinilado (Vector-PK610.5), durante 1 hora e por fim usado o complexo conjugado com peroxidase (Vector) como cromógeno e contracolorados com hematoxilina de Harris. A montagem seguiu-se conforme o procedimento convencional (ANEXO 4)

d) Análise de macrófagos

A diluição do anticorpo monoclonal Mac-2 1:25000 (padronizado previamente)(Cedarlane Lab.Ltda.) foi colocado em cada lâmina, de cada animal, de cada grupo e incubado overnight. Usamos anticorpo secundário biotinilado (Vector-PK610.4) durante 1 hora e por fim foi adicionado o complexo conjugado com peroxidase (Vector) como cromógeno e contracolorados com hematoxilina de Harris. A montagem seguiu-se conforme o procedimento convencional (ANEXO 4)

As leituras das análises de isoprostano 8 epi-PGF2 α e a marcação de Mac-2 foram realizadas pela captura de imagem usando a câmera digital Leica e a quantificação feita em software Image Pro- Plus. Em aumento de 20x. A leitura foi realizada pelo “teste cego” e analisado por um pesquisador.

Os resultados foram expressos em isoprostano/área total na região descendente da aorta e nas regiões do núcleo necrótico

aterosclerótico e placa aterosclerótica do arco aórtico. O mesmo procedimento foi realizado para a análise do macrófago.

IV- Análise Estatística

Os dados paramétricos foram analisados pelo teste ANOVA e a verificação da significância da diferença entre os grupos, e realizada pelo pós teste de Tukey de comparações múltiplas. Após, calculamos as médias e desvios padrão dos dados.

Os resultados não paramétricos foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis e a verificação da significância da diferença entre os grupos foram realizadas pelo pós teste de Tukey de comparações múltiplas. Após, calculamos as medianas e percentis de 25 e 75.

As análises foram realizadas utilizando-se os programas Graph-Prism, versão 4,0 e SPSS versão 13.

O nível de significância foi estabelecido em 5 % ($p < 0,05$).

V_ RESULTADOS

Neste modelo experimental de exposição à poluição atmosférica e aterosclerose, os animais apresentaram discreta irritação de pele, o que é uma característica comum desta espécie.

No curso do experimento ocorreram apenas três mortes, provavelmente relacionadas com o frio ambiente e não relacionada com a dieta enriquecida de colesterol.

Com relação ao peso corpóreo nota-se evolução natural onde não foram encontradas diferenças estatísticas de peso final nos grupos estudados, como demonstrados na tabela 01.

A tabela 02 mostra a eficiência dos filtros implantados na câmara denominada de Filtrada em relação a não filtrada (Poluída).

Com relação ao material particulado 10 μ m (MP), obteve-se resultado com redução de 98,55 % em relação a câmara de ar poluído ($p < 0,05$), e em relação a redução de NO₂ a eficácia de filtragem foi de 16,45 % ($p < 0,05$).

Nota-se também que os níveis de poluentes externos analisados pela CETESB não apresentaram concentrações acima dos níveis considerados bons padrões segundo as normas do EPA, com exceção do NO₂, que demonstrou discreta elevação junto ao órgão competente (CETESB).

As diferenças de medidas de NO₂ interna e externamente em ambas as câmaras deve-se provavelmente aos métodos de avaliação, diferentes aos aplicados pela CETESB.

A intenção de promover hipercolesterolemia nos animais que receberam dieta enriquecida de colesterol dos grupos expostos e não expostos à poluição foi obtida. Conforme análise da tabela 3a; nota-se claramente a grande diferença entre os grupos, independente do ar inspirado; entretanto a hipótese de que em nosso modelo experimental a exposição crônica na poluição urbana potencializaria o aumento de colesterol plasmático não foi comprovada, demonstrando que independentemente do tipo do ar inspirado e do tempo exposto, não ocorre alterações nos níveis de colesterol total plasmático (Fig. 1)

Por outro lado, os dados apresentados na tabela 3b, indicam ligeira queda dos níveis de triglicerídeos plasmático, embora significativa somente no grupo poluído com dieta enriquecida de colesterol (Poluído-ECOL)

Os resultados do lag time, mostraram que somente a fração LDL plasmático do grupo Poluído-E.COL. obteve a capacidade de oxidação ao cobre (dados não mostrados), confirmado através da formação de dienos conjugados reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), o período de 5 hs. pela cinética de oxidação da partícula LDL (gráfico 1)(As tabelas correspondentes aos gráficos estão nos anexos)

Quando analisamos a razão da gordura da placa pela área total da emergência da aorta, gráfico 2 observamos que a exposição à poluição

atmosférica não potencializou o depósito de gordura, ou seja, não contribuiu para o aumento da placa gordurosa nas aortas de animais alimentados com dieta enriquecida de colesterol.

O comportamento, entretanto não é o mesmo quando analisamos a espessura do vaso, pois o grupo Poluída-E.Col. apresentou índices significativamente maiores que os demais grupos, indicando uma possível inflamação e/ou proliferação celular (gráfico 3).

O gráfico 4 refere-se aos dados obtidos de anti LDLoxidada no plasma dos grupos experimentais. Há evidência indiscutível do aumento dos níveis de anticorpos para LDL oxidada nos grupos expostos à poluição independentemente da dieta administrada. Esses resultados sugerem que a poluição está agindo como um agente indutor de produção de anticorpos.

É importante salientar, que foi realizado o mesmo processo com um animal controle LDL-/- knockout e portanto este dado elimina qualquer dúvida sobre o possível stress ambiental que os outros grupos poderiam apresentar. O mesmo apresentou, níveis baixos de anticorpos, os mesmos níveis dos animais controle (Filtrada-Padrão),

No momento em que a LDL sofre modificação por oxidação, ocorre, como discutido anteriormente, a exposição de epítopos como por exemplo, o epítipo do peptídeo D da apolipoproteína B, estimulando assim a produção de anticorpos. Acredita-se que o anti-peptídeo D esteja ligado a doenças cardiovasculares. Em nosso experimento, os níveis de anti-peptídeo D são expressos no gráfico 5, revelando que a poluição também apresentou papel de agente indutor, aumentando os níveis deste anticorpo.

Este fato é interessante e inovador, pois este peptídeo nunca foi estudado em experimentos com enfoque nos efeitos da poluição atmosférica, apenas em estudos com seres humanos portadores de cardiopatia (Fernvik, 2004).

Analisaremos agora o estresse oxidativo pela via não enzimática do 8-isoprostano no tecido vascular. O gráfico 6 expressa essa atividade inflamatória na aorta descendente. Observa-se que não há diferença estatística entre grupos analisados, mostrando que o estresse oxidativo por essa via na região distal às placas de ateroma, ocorre de maneira uniforme.

Em contrapartida, na região do núcleo aterosclerótico (gráfico 8) no arco aórtico foram encontradas placas de ateromas nos grupos com dieta padrão independente do ar inspirado, mostrando que a espécie animal adotada é capaz de gerar placa ao longo do tempo mesmo com níveis não muito elevados de colesterol sérico. Os produtos gerados pelo estresse oxidativo local pelo 8-isoprostano se distribuíram de forma diferente sendo ligeiramente superior nos grupos dieta Padrão independente do ar inspirado, porém não significativo quando comparado aos grupos hipercolesterolêmicos e também entre os demais grupos estudados.

Quando se compara (gráfico 7) a placa aterosclerótica (núcleo necrótico aterosclerótico mais a participação da parede vascular até a região da íntima) do arco aórtico, observou-se uma tendência ligeiramente maior no grupo Poluída- E.Col. , porém não significativa quando comparado ao grupo Filtrada- E.Col. e também entre os demais grupos estudados.

A quantidade de macrófagos avaliados por imunohistoquímica na região descendente da aorta nos grupos, mostrou que o grupo câmara

Filtrada- E.Colesterol está aumentada estatisticamente em relação ao grupo Filtrada- Padrão e grupo Poluída- Padrão, mostrando uma intensa atividade macrofágica na região descendente da aorta, provavelmente secundária à dieta hipercolesterolêmica. (gráfico 9)

No entanto, em relação ao grupo Poluída- E. Colesterol, não se observou o mesmo comportamento, constatando-se diferença somente no grupo Poluída- Padrão, sugerindo diferentes mecanismos de ação. A queda de macrófagos no grupo Poluída- Padrão não é diferente do grupo controle- Padrão.

Por essa razão, podemos inferir um balanço entre dois mecanismos distintos: toxicidade macrofágica pela ação da poluição (grupo Poluída- Padrão) seguido de apoptose e/ou necrose e reação de estímulo de produção de macrófagos estimulado pela quantidade de LDL oxidada, para a formação de células espumosas.

Observando o gráfico de macrófagos presentes no núcleo aterosclerótico no arco aórtico (gráfico 11), percebemos que o grupo Filtrada- E.Col., mostrou tendência a níveis mais elevados que os demais, apenas estatisticamente diferente do grupo Poluída- Padrão. Isso mostra a ação clara da dieta rica em colesterol, que deflagrou o processo de aterosclerose. No entanto, o grupo Filtrada- Padrão, embora não seja diferente dos demais grupos, apresenta tendência à elevação, que poderia ser justificada pela ação do tempo, uma vez que esses animais simulam indivíduos de hipercolesterolemia familiar que desenvolvem aterosclerose ao longo do tempo. Já os grupos submetidos à poluição atmosférica, mostraram

queda (grupo Poluída-E.Col.), sugerindo a hipótese de toxicidade macrofágica pelos poluentes com conseqüente necrose e/ou apoptose.

O gráfico 10, mostra a análise da placa aterosclerótica com o mesmo comportamento gráfico e estatístico quando analisamos o núcleo necrótico aterosclerótico (gráfico 11).

Tabela 01- Evolução dos pesos corpóreos na fase inicial e final do experimento

	Filtrada- Padrão	Poluida-Padrão	Filtrada-E.Col	Poluida-E.Col
Peso inicial (g)	14,5± 1,0	14,6± 1,6	14,5± 0,8	16,5± 1,9
Peso Final (g)	24,4 ± 0,2	24,9± 0,8	23,50 ± 0,5	25,10 ± 0,46

*P<0,05- Não houve diferença estatística entre os pesos corpóreos finais nos grupos experimentais.

Tabela 02- Dados referentes aos níveis de poluentes analisados nas câmaras filtrada e não filtrada e no ar atmosférico.

Local	SO₂ µg/m³	MP₁₀ µg/m³	NO₂ µg/m³	CO ppm
CETESB	13,29 ± 3,9	40,66 ± 9,4	105,64 ± 17,5	2,18 ± 0,59
C. Ar Filtrado		0,65±1,72*	58,59 ± 9,5*	
C.Ar Poluído		44,80 ± 37,3*	70,13 ± 26,3*	
EPA	0- 80	0- 50	0- 100	0- 4,5

EPA- Environmental Protection Ambiental CETESB- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.

*p<0.005-Câmara ar filtrada apresentou dados significativamente diferentes em relação à câmara sem filtros.

Apresentação em média e desvio padrão referentes ao período de exposição dos grupos (Maio a Setembro de 2004)

Tabela 3a-Análise descritiva dos níveis de colesterol total plasmático

Grupo	Média mg/dL	DP	Mediana	Máximo	Mínimo
Filtrada-Padrão	349	62	361	230	425
Poluída-Padrão	319	82	259	259	562
Filtrada- E.Colesterol	1729*	189	1864	1448	1890
Poluída- E.Colesterol	1700*	211	1842	1290	1878

*P < 0.05

Aplicado teste de Kruskal-wallis e Tukey para comparações múltiplas.

Grupo Filtrada-E.Colesterol e grupo Poluída-E.Colesterol foi significativamente superior em relação aos grupos Filtrada Padrão e Poluída - Padrão

Grupos Filtrada-E.Colesterol e Poluída- E.Colesterol- não apresentaram diferenças estatísticas.

Grupo Filtrada- Padrão e Poluída-Padrão- não apresentaram diferenças estatísticas.

Tabela 3b- Análise descritiva dos níveis de triglicérides plasmático

Grupo	Média mg/dL	DP	Mediana	Máximo	Mínimo
Filtrada-Padrão	132	26	120	110	181
Poluída-Padrão	141	37	146	61	189
Filtrada- E.Colesterol	150	60	142	90	301
Poluída- E.Colesterol	101*	25	107	66	139

*P < 0.05

Aplicado ANOVA e Tukey para comparações múltiplas

Grupo Poluída- E.Colesterol diferente estatisticamente em relação aos demais grupos.

Grupos Filtrada-E.Colesterol, Filtrada- Padrão e Poluída- Padrão- não apresentaram diferenças

Gráfico 1- TBARS dos grupos estudados

Curva de formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (tbars), onde o grupo Poluída- E. Col. Apresentou maior susceptibilidade a oxidação ao CuSO_4

Gráfico 2- Conteúdo lipídico na emergência da aorta

Análise quantitativa da razão gordura/área total dos grupos expostos e não expostos a poluição atmosférica na emergência da aorta.

Valores expressos em mediana e percentis 25 e 75.

Aplicado Krukal-wallis e Tukey para comparações múltiplas.

* $P < 0,05$ - Grupo Filtrada-E.Col é significante maior que o grupo

Poluída-Padrão e Filtrada-Padrão. ** $P < 0,05$ - Grupo Poluída-E.Col

é significante maior que o grupo Poluída-Padrão e Filtrada- Padrão.

Os grupos que receberam dieta enriquecida de colesterol não apresentaram diferenças entre si.

Gráfico 3- Espessura vascular na emergência da aorta

Análise quantitativa da espessura vascular dos grupos expostos e não expostos a poluição atmosférica na emergência da aorta
Valores expressos em mediana e percentis 25 e 75%.

Aplicado Kruskal-wallis e Tukey para comparações múltiplas.

* $P < 0,05$ -Grupo Poluída- E.Col. foi estatisticamente maior aos demais grupos.

Os demais grupos não apresentaram diferenças

Gráfico 4- Anticorpos anti-LDL oxidada sérica

Análise quantitativa dos níveis de anti-LDL oxidada (mediana e percentis 25 e 75%) do pool de soro dos grupos expostos e não expostos a poluição atmosférica.

Aplicado Teste de Kruskal-wallis e Tukey para comparações múltiplas.

*Grupo Poluída- E. Col. Foi estatisticamente maior em relação aos demais grupos

**Grupo Poluída- Padrão foi estatisticamente maior aos grupos Filtrada- E.Col., Filtrada-Padrão e sôro-LDL-/-knockout

*p<0.01 **p<0.05

Gráfico 5- Anticorpos anti peptídeo D da apoB 100 obtida pelo método de ELISA dos grupos estudados

Análise quantitativa dos níveis de peptídeos D-da apB-100 (mediana e percentis 25 e 75%) do pool de soro dos grupos expostos e não expostos a poluição atmosférica.

Aplicado Teste de Kruskal-wallis e Tukey para comparações múltiplas

*Grupo Poluída- E. Col. foi estatisticamente maior aos demais grupos

**Grupo Poluída- Padrão foi estatisticamente maior aos grupos Filtrada-E.Col., Filtrada-Padrão e Sôro-LDL-/knockout

* $p < 0.01$ ** $p < 0.05$

Gráfico 6- Estresse Oxidativo na Aorta Descendente

Análise quantitativa de formação de isoprostano (média e e desvio padrão) nos grupos expostos e não expostos a poluição atmosférica na aorta descendente Aplicado ANOVA e Tukey para comparações múltiplas

*P<0,05- Os grupos estudados não apresentaram diferenças estatísticas

Gráfico 7- Estresse Oxidativo na placa aterosclerótica do arco da aorta

Análise quantitativa de formação de isoprostano na placa aterosclerótica da região do arco aórtico (média e desvio padrão) nos grupos expostos e não expostos a poluição atmosférica

Aplicado ANOVA e Tukey para comparações múltiplas

*P<0,05- Os grupos estudados não apresentaram diferenças estatísticas.

Gráfico 8- Estresse Oxidativo no núcleo necrótico aterosclerótico do arco aórtico

Análise quantitativa de formação de isoprostano no núcleo necrótico aterosclerótico da região do arco aórtico (média e desvio padrão) nos grupos expostos e não expostos a poluição atmosférica.

Aplicado ANOVA e Tukey para comparações múltiplas.

* $P < 0,05$ -Os grupos estudados não apresentaram diferenças estatística.

Gráfico 9- Análise da quantidade de macrófago (Mac-2) presentes na região descendente da aorta

Análise quantitativa da presença de macrófagos (Mac-2) na placa aterosclerótica da região do arco aórtico (mediana e percentis 75) nos grupos expostos e não expostos a poluição atmosférica na região descendente da aorta.

Aplicado Teste de Kruskal-wallis e Tukey para para comparações múltiplas

*P<0,05- O grupo Filtrada- Padrão é menor que o grupo Filtrada- E.Col.

O grupo Poluída-Padrão é menor que o Filtrada-E.COI. e Poluída E. Col

Os demais grupos não apresentaram diferenças.

Nota-se também uma tendência queda de macrófagos presentes na região descendente do arco aórtico nos grupos expostos a poluição, quando comparados aos animais que receberam a mesma dieta.

Gráfico 10- Análise da quantidade de macrófago (Mac-2) presentes na placa aterosclerótica da região do arco aórtico

Análise quantitativa da presença de macrófagos na placa aterosclerótica da região do arco aórtico (mediana e percentis 25 e 75) nos grupos expostos e não expostos a poluição atmosférica

Aplicado Teste de Kruskal-wallis e Tukey para para comparações múltiplas

* $P < 0,05$ -O grupo Filtrada- E.Col. foi significativamente maior ao grupo Poluída- Padrão. Os demais grupos não apresentaram diferenças

Nota-se tendência a queda de macrófagos presentes na placa aterosclerótica do arco da aorta dos grupos expostos a poluição quando comparados aos animais que receberam a mesma dieta.

Gráfico 11- Análise da quantidade de macrófago (Mac-2) presentes no núcleo necrótico aterosclerótico da região do arco aórtico

Análise quantitativa da presença de macrófagos no núcleo necrótico aterosclerótico da região do arco aórtico (média e desvio padrão) os grupos expostos e não expostos a poluição atmosférica.

ANOVA e Tukey para comparações múltiplas

* $P < 0,05$ - O grupo Poluída- Padrão é menor ao grupo Filtrada- E.Col. Os demais grupos não apresentaram diferenças.

Nota-se tendência a queda de macrófagos presentes na placa aterosclerótica do arco da aorta dos grupos expostos a poluição quando comparados aos animais que receberam a mesma dieta.

Placa Aterosclerótica na emergência da aorta- (oil red O, 20x)

Placa aterosclerótica na região do arco aórtico- estresse oxidativo (8-isoprostano,20x)

Placa aterosclerótica na região do arco aórtico- Macrófago (Mac-2, 20x)

Região descendente da Aorta Macrófago (Mac-2, 20x)

Fig. 1-Fotomicrografias das regiões da emergência da aorta, arco aórtico e aorta descendente

VI - Discussão

O desenho do experimento com o modelo animal com deleção para receptor LDL, o camundongo LDLR ^{-/-} knockout, exposto à poluição atmosférica em câmaras de topo aberto, mimetizando a exposição real de um indivíduo que vive na cidade urbana de São Paulo, demonstrou eficácia e exequibilidade. Salientamos que o experimento se restringe à observação da exposição da poluição atmosférica urbana como um todo e sua influência na aterosclerose mimetizada por animais geneticamente modificados, cuja função é de assemelhar aos seres humanos com hipercolesterolemia familiar.

Analizamos morfo-fisiopatologicamente a aterogênese avaliando-se a extensão e componentes do espessamento vascular, formação de auto-anticorpos, ativação macrofágica e de estresse oxidativo. Essa análise foi executada em quase toda a extensão da aorta, particularmente em três pontos selecionados a saber, emergência justa-atrial na raiz da porção ascendente, arco com suas bifurcações e região torácica antes da saída das artérias renais.

Resumidamente, mensuramos os seguintes parâmetros em todos os grupos experimentais: níveis séricos de lípides (colesterol total e triglicérides), oxidação de LDL plasmático, auto anticorpos anti-LDL oxidada e anti- peptídeo D da apolipoproteína B100; no tecido quantificamos teor de gordura e espessura da parede vascular na placa aterosclerótica na

emergência da aorta ascendente e imunohistoquímica avaliando-se estresse oxidativo e infiltração macrófagica tanto nas placas de gordura do arco como ao longo da região descendente da aorta.

Os resultados demonstraram que a poluição acelera a aterogênese, sendo um fator potencializador deste processo em camundongos com predisposição à hipercolesterolemia.

Os experimentos em câmara de topo aberto já estão validados e são usados frequentemente em experimentos pelo Laboratório de Poluição Atmosférica (Mohallem e col., 2005). Essa técnica de exposição torna os achados do nosso experimento mais consistentes, pois a exposição em câmara de topo aberto possibilita 24hs./dia de exposição dos animais de experimentação ao ambiente real de ar atmosférico com as mesmas concentrações, umidade e temperatura que os habitantes da cidade de São Paulo respiram.

Este é um ponto interessante de nosso modelo quando comparado a outros estudos com câmara de intoxicação tipo “fechada”, nos quais o pesquisador estuda um tipo de componente do ar atmosférico na concentração desejada, com temperatura e umidade controladas artificialmente, distanciando as condições experimentais da similaridade com o mundo real.

Lembrando que as câmaras de topo aberto utilizadas em nosso estudo, impediam exposição às chuvas e ventos ambientais, deixando a mercê da variabilidade meteorológica, a umidade e temperatura. No entanto, esses fatores não causaram nenhuma

alteração referente aos dados de mortalidade e/ou de peso, pois todos os camundongos utilizados evoluíram bem, evidenciando a adaptabilidade desses animais ao ambiente exposto.

As dosagens dos poluentes internos nas câmaras demonstraram bloqueio importante do material particulado (98%) e apenas parcial do NOx (16%) na câmara limpa. Esses resultados mostram confiabilidade das câmaras e sugere associação dos resultados com a poluição atmosférica, mais precisamente com o material particulado. Essa associação não exclui a participação de outros poluentes não dosados nos efeitos vasculares encontrados.

Escolhemos os meses de Maio a Setembro para submeter os animais às câmaras de exposição, pois este período corresponde a elevados níveis de poluição e como consequência climática de nossa cidade, favorecedor ao fenômeno do efeito estufa. Verificamos que, mesmo não ultrapassando os níveis críticos de poluentes estabelecidos pelos órgãos competentes (CETESB e EPA), nossos resultados demonstraram que há intenso prejuízo do vaso arterial, sugerindo analogamente, o surgimento ou mesmo agravamento dessas lesões nas pessoas portadoras ou susceptíveis a doença cardiovascular expostos à mesma atmosfera. Esses efeitos ficaram claros em nosso protocolo de pesquisa onde apresentaram relação direta com a poluição atmosférica, mais provavelmente pelo material particulado, pois ocorreram predominantemente nos camundongos expostos à câmara sem o sistema de filtros.

Alguns pesquisadores sugerem que a poluição urbana, em

especial o material particulado, é tão ou mais prejudicial que o tabaco, tanto para aqueles que fumam passivamente como para os que o fazem ativamente. Esses autores propõem que a diferença existente aponta para um menor efeito deletério secundário à poluição seria devido à concentração dos poluentes no ar inspirado que é muito menor em relação à fumaça do cigarro aspirada (Janson e col., 2006; Hunninghake, 2005; Kuzili e col, 2005; Pope III e col., 2004; Pope III e col., 2001).

A linhagem LDLR ^{-/-} knockout (originada do C57BL/6j), foi escolhida por apresentar características essenciais para este projeto de pesquisa. Primeiro como já foi discutido na introdução, pela similaridade com indivíduos portadores de hipercolesterolemia familiar (Jawien e col, 2006. Ohashi e col., 2004); segundo, pelo tempo de exposição escolhido, o qual corresponde ao período considerado crítico referentes aos níveis de poluentes atmosféricos; terceiro, devido ao nível basal elevado de colesterol que esses animais desenvolvem, obtemos em menor tempo o quadro histológico de aterosclerose, principalmente associado com dieta enriquecida em colesterol.

Ao estudarmos a influência da poluição atmosférica sobre a concentração dos níveis de colesterol total plasmático, percebemos que o grupo que recebeu a dieta Enriquecida de Colesterol (E Col) e exposto à poluição atmosférica (Poluída) não foi diferente estatisticamente do grupo submetido à câmara filtrada com a mesma dieta (Filtrada-E.Col.), sugerindo não haver interferência da poluição na colesterolemia total destes animais (tabela 3).

O mesmo comportamento é observado quando comparamos os grupos que receberam dieta padrão, onde os níveis de colesterol foi semelhante independente da câmara de exposição. Portanto, os níveis de poluição atmosférica apresentados neste projeto não intensificaram a concentração de colesterol total dos animais.

Um dado que chama a atenção está relacionado ao nível de triglicérides plasmático encontrado no grupo Poluída-E.Colesterol que apresentou queda significativa quando comparados aos outros grupos experimentais. Dando suporte a esses dados, Sun e col. (2005) com experimentos de exposição a poluentes urbanos em camundongos apo E^{-/-} knockout e Yamaguchi e col. (2001) com coelhos Watanabe, mostraram tendência à queda de triglicérides nos grupos submetidos aos poluentes. A explicação fisiopatológica para este comportamento ainda não está elucidada, necessitando para tal estudos posteriores.

Da mesma forma, não houve diferença entre os níveis de colesterol sérico nos dois grupos que receberam a dieta Enriquecida de Colesterol (E.Col.).

Interessante resultado encontrado refere-se á quantidade de gordura corrigida pela área da parede vascular. Os animais que receberam dieta enriquecida de colesterol apresentaram grandes placas de ateroma na raiz da aorta independentes da câmara que estavam expostos. A quantidade de gordura encontrada na emergência da aorta nos camundongos que receberam dieta padrão foi menor que a encontrada nos grupos com dieta enriquecida, porém iguais entre si. Portanto, não houve nesses animais,

alteração na quantidade de gordura obtida e corrigida pela área total na emergência da aorta, indicando que o depósito quantitativo de gordura na placa aterosclerótica não foi influenciado pelo tipo de ar inspirado.

Nota-se que embora se tenha pouco depósito de gordura na emergência da aorta nos grupos que receberam dieta padrão, ela está presente, sugerindo que ao longo do tempo, estes animais podem desenvolver placa aterosclerótica independente da dieta, ou mesmo do ar inspirado (Jawien e col, 2006, Ohashi e col., 2004).

Estes dados estão de acordo com os de Chen & Nadziejko (2005), usando câmaras de exposição com PM 2,5 e camundongos apoE^{-/-} knockout, onde também não encontrou diferenças na quantidade de gordura nas placas ateroscleróticas nos animais que receberam dieta enriquecida de colesterol.

Um dado que consideramos muito importante e interessante no nosso estudo, foi o encontro de maior hipertrofia do vaso da emergência da aorta no grupo Poluída e E. Col., quando comparado aos outros grupos experimentais (gráfico2).

Esses resultados corroboram com a hipótese de que a vasculopatia aterosclerótica aumenta a espessura de sua parede não só por depósito de gordura e infiltração de células espumosas e também neste experimento principalmente, por aumento de outras estruturas da parede vascular, provavelmente matriz extra-celular e proliferação de células como fibroblastos e miócitos e presença de células inflamatórias, mas principalmente pela influência da poluição atmosférica.

Esses dados são concordantes com os resultados de Chen & Nadziejko, 2005; Kunzili e col., 2005; Tani e col, 2004, Anazawa e col., 2004; Davis e col.,2004; Gairola e col., 2001) e em estudo em humanos fumantes (Mack e col, 2003).

Virchow (Marson e col., 2004) há mais de 100 anos referiu que a aterosclerose é um processo inflamatório crônico. Atualmente esse fato é aceito mundialmente, acreditando-se que inflamação é iniciada pela disfunção endotelial, com alteração da íntima vascular, envolvendo infiltração de leucócitos, acúmulo de macrófagos e células espumosas, proliferação de células da musculatura lisa, acúmulo da matriz celular (Getz, 2005; Katsuda & Kaji, 2003; Suwa e col., 2002).

Estes processos podem estar exacerbados quando expostos à poluição. Possivelmente, as características físico-químicas dos componentes do ar atmosférico urbano como metais solúveis, material particulado (MP) e gases tóxicos, associados à temperatura e umidade do ar, contribuem para o desequilíbrio fisiológico do indivíduo após episódios agudos de poluição, promovendo em pessoas predispostas a/ou portadoras de doenças cardíacas, estimulação e/ou agravamento de doenças cardiovasculares como alterações na pressão arterial, disritmias e alterações plasmáticas de fibrinogênio (de Paula Santos e col., 2005; Precott e col., 2005, Lin e col, 2003).

Os poluentes do ar atmosférico inspirado penetram pelo sistema respiratório até atingir os alvéolos pulmonares e, por serem capazes de

translocar diretamente para a corrente sangüínea, principalmente as denominadas de partículas ultrafinas (menos que 2,5 nm), atingem o sistema circulatório, promovendo inflamação sistêmica (Meiring e col., 2005).

A poluição atmosférica, mais precisamente o material particulado causa inflamação sistêmica, incluindo estimulação da medula e macrófagos pulmonares. Produz *in vitro* TNF α e citocinas como IL1 β , IL6 e GMCSF (fator de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos van Eeden e col, 2001). Suwa e col., 2002 sugerem que a IL1 β é um reguladora de secreção de MCP-1 (proteína de quimiotaxia de monócito -1) que por sua vez age nas células endoteliais, no recrutamento de macrófagos e linfócitos.

Matthys e col., 1997, sugerem que o aumento da espessura vascular aterosclerótica em coelhos seja decorrência do aumento de LDL oxidada nas células endoteliais. De fato, um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de lesões vasculares é o aumento de colesterol que é transportado pelas lipoproteínas LDL e VLDL. As lipoproteínas LDL circulantes, principalmente quando aumentadas no sangue, penetram nas células endoteliais através de mecanismos de endocitose. No interior das células endoteliais, induzem maior consumo de NO (óxido nítrico) e aumento da produção de radicais livres. Esses radicais livres promovem a peroxidação dos ácidos graxos das lipoproteínas LDL e também da apolipoproteína B. A LDL oxidada estimula a expressão de receptores de “scavenger” dos macrófagos e é por eles reconhecida e internalizada formando as células espumosas.

Os próprios macrófagos nativos e circulantes podem oxidar as LDL assim contribuindo para a manutenção e intensificação da disfunção endotelial (Getz, 2005)

Sendo assim, verificamos aceleração de oxidação da LDL sérica, onde se observou que o grupo Poluida- E. Colesterol foi o único a gerar sensivelmente TBARS no tempo de 5hs, significando que a poluição atmosférica associada à dieta enriquecida de colesterol, acelera a oxidação plasmática das lipoproteínas LDL.

Esses dados demonstram também que apesar das concentrações do colesterol total circulante não se alterarem com a exposição à poluição, a oxidação do colesterol oxidado e não oxidado é modulada pela qualidade do ar inspirado, em especial pelo Material Particulado.

O Material Particulado contém metais de transição, aldeídos e semiquinonas, conhecidos que atuam no ciclo redox e produzindo as radicais hidroxilas, radical superóxido, peróxido de hidrogênio (Dellinger e col., 2001; Squadrito e col., 2001; Shi e col., 2003).

Estes radicais são capazes de iniciar a peroxidação lipídica gerando estresse oxidativo que está implicado na aterosclerose (Heinecke, 1997, Uchida, 1999). Além disso, os radicais livres gerados pelo material particulado em células fagocíticas podem causar danos ao DNA e induzir apoptoses e/ou necrose.

Corroborando com esses dados, Sharman e col., 2002, verificaram que mecânicos de garagem de automotivos apresentavam

maior susceptibilidade para oxidar a LDL plasmático em menor tempo quando comparados aos que não trabalhavam em garagem, evidenciando a presença de substâncias oxidativas na poluição automotiva.

A oxidação das LDL induz alteração de sua parte protéica, a apolipoproteína B 100, predispondo ao aparecimento de epítomos como o peptídeo D e similares que são capazes de estimular o sistema de defesa com geração de auto-anticorpos, pois são imunogênicos.

O papel dos auto-anticorpos de LDL oxidada no processo da aterosclerose é ainda incerto. Alguns autores sugerem que a sua ação seria de proteção facilitando o clareamento das partículas de LDL oxidada da circulação e, desta maneira, impedindo a sua ligação aos receptores scavenger dos macrófagos e, conseqüentemente, diminuindo a sua internalização e retardando a formação de células espumosas (Fernvik e col., 2004).

Em nosso trabalho os grupos expostos à poluição, independentemente da dieta, apresentaram elevação de anticorpos anti-LDL oxidada da classe IgG, mostrando que o sistema imune envolvido está estimulado pela presença dos componentes da poluição e sua conseqüente inflamação (gráfico3).

Esse fator demonstrou ser um sensível marcador de inflamação secundária à poluição, sugerindo a associação dos efeitos deletérios dos poluentes atmosféricos e disfunção endotelial e oxidação da LDL. Porém, seus níveis ou sua presença não foram suficientes para traduzir o grau de aterogênese instalada nos vasos.

Nemmar e col. (2004) demonstrou que as nanopartículas translocam do pulmão para a circulação, atingindo as células endoteliais dos vasos, onde são fagocitadas pelos macrófagos causando toxicidade local. Giovanni e col, (1997) citam que indivíduos com moderada elevação de colesterol podem pertencer ao grupo de risco se apresentar elevados níveis séricos de LDL oxidada. Desta forma, poder-se-ia justificar a presença de auto-anticorpos nesse grupo.

Acredita-se que os anticorpos anti-LDLox mediados pelas citocinas liberadas por células T helper que estão presentes nas lesões ateroscleróticas, impedem a internalização da LDLox nos macrófagos, dificultando a formação das células espumosas. Porém, na presença de poluentes atmosféricos, a fagocitose pode se intensificar e se tornar um fator de toxicidade celular, pois os macrófagos não internalizam somente as LDL oxidadas, mas também as partículas atmosféricas.

Esses processos tenderiam a se auto-perpetuar, pois o estresse oxidativo gerado pelos poluentes aumentaria a disfunção endotelial e a oxidação de LDL, que induziria maior fagocitose de partículas agora com componentes tóxicos de poluentes. Em consequência, ocorre incremento da liberação de neoepítomos da apoproteína B e indução de produção maior de anticorpos específicos, talvez como tentativas de defesa do organismo.

Tani e col., 2004, estudando a influência da exposição de camundongos ApoE à fumaça de cigarros, mostrou correlação positiva entre a espessura da aorta e concentração de anticorpos anti-LDL

pertencentes à classe IgM, portanto de fase aguda, sendo os títulos para IgG não significante. Esses resultados poderiam ser explicados pelo pouco tempo de exposição destes animais de apenas de 8 semanas (56 dias).

Diferentemente, o protocolo experimental do nosso estudo apresenta período de ininterrupta exposição dos camundongos de duração de 120 dias, que propiciaria a produção e permanência de anticorpos de fase mais tardia como os anticorpos de classe IgG.

Nós estudamos a reatividade ao peptídeo D, em estudo pelo grupo do prof. Magnus Gidlund, responsável pelo Laboratório de Imunofisiopatologia do Instituto de Ciências Biomédicas IV da Universidade de São Paulo. Este peptídeo D estudado neste protocolo revela a presença de anticorpo anti-LDL oxidada que detecta epítipo desse peptídeo e que, nos trabalhos anteriores, tem mostrado correlação inversa ao desenvolvimento de aterosclerose, sugerindo ser o anticorpo anti-peptídeo D com atividade protetora (Fernvik e col., 2004, Casquero e col., 2006).

À semelhança dos anticorpos anti-LDL, o papel dos anticorpos anti-peptídeo D da apoB ainda não está determinado, mantendo-se dúvidas perante sua ação protetora ou agressora no processo de aterogênese cardiovascular (gráfico4)

Em nosso experimento, o anti-peptídeo D apresentou elevado nível, revelando claramente associação entre a LDL oxidada, anticorpos anti-LDLox, e o grau de lesão apresentado na emergência da aorta do grupo Poluída com dieta Enriquecida de Colesterol.

A sua presença no grupo Poluída - dieta Padrão, assim como a LDL oxidada, mais uma vez reforça que os componentes da poluição possuem substâncias oxidantes e pró-inflamatórias capazes de induzir e modular esta intensa resposta imune-inflamatória.

Alguns autores sugerem que a ação do anticorpo anti-LDLox. E antipeptídeo D seria de proteção, facilitando o “clareamento” dos receptores Fc dos macrófagos, portanto sendo ultimamente usado como marcador de doenças cardiovasculares.(Fernvik e col., 2004; Sutterwala & Noel, 1998)

A correlação estatística entre os anti LDLox e o peptídeos D com a espessura da emergência da aorta em nosso protocolo seria muito interessante, porém, optamos por não fazê-la pois seria incorreto cientificamente. A dosagem dos níveis séricos de anti- LDLoxidada e auto-anticorpos foi executado com pool de amostras sanguíneas obtidas dos animais de experimentação enquanto que a espessura da aorta foi feita individualmente para cada camundongo, impedindo sua análise estatística pareada.

Como podemos observar até o momento, o desenvolvimento da aterosclerose depende de um frágil balanço entre o estímulo pro-inflamatório e mecanismos anti-inflamatório e anti- oxidante.

Um dado interessante que devemos salientar é a respeito das análises na região da aorta descendente. Esta região não revelou placas ateroscleróticas bem definidas, apenas presença de “infiltrados” heterogêneos de gordura e de células inflamatórias. Possivelmente estes

infiltrados se tornarão placas ateroscleróticas posteriormente.

Em contrapartida, observamos que todos os grupos experimentais formaram placas na região do arco aórtico, confirmando serem esses os locais mais críticos de formação de aterogênese. Atribuímos esses resultados às características físicas do fluxo turbilhonado e maior atrito endotelial encontrado no arco da aorta que facilitaria a deflagração de fenômenos de “shear” estresse e conseqüente disfunção endotelial (Kensey, 2003)

Na presença de células endoteliais, células da musculatura lisa ou dos macrófagos, a oxidação da LDL é processada por três prováveis mecanismos que podem acontecer simultaneamente como: produção e liberação de espécies reativas de oxigênio no micro ambiente (superóxido ou peróxido de hidrogênio), geração de peróxido lipídico, os quais são transferido para a LDL e liberação de enzimas que agem diretamente nas moléculas lipídicas (Gopaul e col. 1994)

Diversos estágios da oxidação lipídica, a transformação ou depleção de certas moléculas podem servir como monitoramento ou índices de peroxidação, entre elas estão 8-epi PGF 2 α .

A medida imuno-histoquímica de 8-isoprostano tecidual aponta para um índice quantitativo de geração de radicais livres, via peroxidação lipídica originada do ácido araquidônico e a produção de 8-epi PGF 2 α , sendo esta via ciclooxygenase independente.

Estudamos a atividade imunohistoquímica do estresse oxidativo

através da coloração imunohistoquímica de via 8-isoprostano na região distal ao arco aórtico. Essas medidas foram positivas em toda extensão vascular estudada, porém não apresentaram diferenças entre os grupos estudados em nenhuma das análises realizadas (núcleo necrótico e placa no arco aórtico e na região descendente da aorta (gráficos 6,7 e 8). Esses dados sugerem que mesmo distalmente na porção torácica da aorta ocorre peroxidação lipídica por via não enzimática, indicando que a produção natural de formação de radicais livres no interior do vaso serve como substrato para este processo, porém em menor escala, quando comparadas com a raiz e arco arterial, devido a diferenças de pressão e turbilhonamento intraluminal.

A análise de isoprostano nas placas ateroscleróticas e núcleo necrótico aterosclerótico do arco aórtico mostrou estar aumentado em todas as placas analisadas de todos os grupos (figura 7 e 8)

Entretanto, análise do núcleo necrótico aterosclerótico no arco da aorta evidenciou discreta diminuição de 8-isoprostano nos grupos submetidos à dieta enriquecida de colesterol inferindo que o mecanismo de ação predominante neste protocolo experimental não seja apenas o estresse oxidativo através da via não enzimática do 8-isoprostano, mas talvez que o processo inflamatório esteja sendo direcionado preferencialmente para as outras vias enzimáticas clássicas da cascata inflamatória como as vias COX1, COX 2 e lipooxigenase dependentes (Leite e col, 2004, Burleigh e col., 2005).

Outra hipótese para justificar a queda do 8-isoprostano nos grupos submetidos à dieta enriquecida de colesterol seria a coexistência e o equilíbrio entre a atividade oxidante e anti-oxidante durante todo processo. Neste caso, ocorreria predominância da atividade anti-oxidante sobre a disfunção endotelial, ocasionando menor expressão da atividade oxidativa no local, pois os antioxidantes endógenos e síntese de SOD, também estão sendo requeridos e ativados, na tentativa de minimizar e controlar o processo agressor (Dhalla e col, 2000; Getz, 2005).

A terceira hipótese que poderia ser feita nesse aspecto é que as placas ateroscleróticas possam estar caminhando para característica de placa em grau o tipo avançada, sendo mais difícil de serem analisadas, sob o ponto de vista da via não enzimática do 8-isoprostano, como por exemplo lipo-oxigenase. Entretanto outros produtos formadores por contínuos estímulos podem gerar produtos avançados de glicolisação, de oxidação protéica, de lipoperoxidação e reativos compostos de carboxil que agem diretamente na matrix extracelular via receptor específico. Por exemplo, as proteínas glico-oxidadas (AGE-proteins) que podem induzir a resposta de estresse oxidativo em células que as expressem via endotélio vascular, células da musculatura lisa e macrófagos (Baynes & Thope, 2005). Portanto, como descrito acima, diversos outros mecanismos de estresse oxidativo podem estar ocorrendo simultaneamente impedindo a diferenciação entre os grupos.

Enfim, neste modelo experimental, a técnica empregada não

conseguiu diferenciar a intensidade do processo oxidativo nas placas ateroscleróticas dos grupos estudados, embora alguns pesquisadores tenham obtido resultados que se contrapõem aos nossos dados (Gniwotta e col, 1997, Praticó e col, 1997),

Kumar e col, 2005, em seu estudo *in vitro* com células endoteliais encontraram resultados indicando atuação do isoprostano em duas vias diferentes, ora protetora ora indicadora de injúria na microvasculatura, sugerindo que o papel do isoprostano como marcador de estresse oxidativo ainda é controverso.

De qualquer maneira, os resultados sobre estresse oxidativo obtidos em nosso protocolo experimental merecem atenção, pois podem sugerir outras vias alternativas de indução inflamatória deflagradas pelas condições ambientais a que os animais LDLR^{-/-} deste protocolo foram submetidos.

Por outro lado, o desequilíbrio endotelial é bem visível, quando analisamos a expressão de macrófagos no vaso arterial.

A marcação imunohistoquímica que permite quantificar a expressão de macrófagos viáveis (mac-2) foi analisada na região do arco aórtico e aorta torácica. Os resultados apresentados nos gráficos 9,10 e 11 estão em concordância com os outros achados neste estudo onde ocorreu infiltrado de lipíde e atividade de estresse oxidativo (gráficos 6,7 e 8) em todo o material analisado independente da região arterial. Porém, observamos que esse infiltrado não é homogêneo em toda amostra analisada.

Analisando arco aórtico, obtivemos maiores valores de Mac-2 quando comparamos com a região distal, sugerindo maior atividade desse fagócito nas regiões de maior turbilhonamento e atrito e maior incidência de placas ateroscleróticas. Esse resultado confirma a associação entre a formação e gravidade da placa com a atividade macrofágica.

Fazendo-se uma análise global entre os gráficos 9,10 e11, as análises estatísticas das 3 regiões analisadas da aorta demonstraram que os animais submetidos às dietas normais apresentaram menores índices de atividade macrofágica que os grupos receberam a dieta enriquecida de colesterol independentemente do ar inspirado. Estes resultados podem ser explicados devido à grande oferta de LDL circulante aos grupos com dieta enriquecida de colesterol. Por outro lado, percebemos tendência de menores valores de Mac-2 nos grupos expostos à poluição quando comparados aos animais que receberam o mesmo tipo de dieta. Sugerimos que esses dados refletem maior inflamação local deflagrada pela poluição com predomínio de apoptose macrofágica nos grupos expostos. Essa diferença se torna mais sensível na região descendente da aorta onde provavelmente ocorreu menor saturação do marcador imunohistoquímico utilizado.

Ao analisarmos o gráfico 9, notamos que embora os grupos Filtrada-E.col e Filtrada-Padrão sejam diferentes estatisticamente, ambos grupos exibem valores expressivos maiores que o grupo poluída normal, induzindo à hipótese de que temos um estímulo da oferta de colesterol e dos

níveis das lipoproteínas LDL circulantes (Filtrada- E.Col) e/ou fator genético (Filtrada-Padrão), promovendo a iniciação inflamatória vascular, formação de células espumosas, sem a interferência do ambiente poluído.

Em continuidade com a análise do gráfico 9, podemos observar que os grupos expostos à poluição, independente da dieta, tendem a atingir níveis de Mac2 menores em relação aos demais grupos não expostos, sendo o grupo Poluída-Padrão significativamente menor em relação aos grupos que receberam dieta enriquecida de colesterol. Pressupondo que, o marcador Mac-2 liga-se apenas a macrófagos viáveis, esses resultados podem sugerir uma supressão ou morte celular do macrófago pela citotoxicidade produzida pela poluição atmosférica e/ou associada à LDL oxidada, além do fator tempo de exposição a ambos (material particulado e as LDL oxidadas).

Essa associação de fatores agressores pode causar e potencializar apoptoses e/ou necrose celular mais precocemente, fatos que não são evidenciados por este marcador (Galle e col, 2005, Hiura e col., 1999)

Estes resultados são extremamente interessantes, pois afastados do grande ponto de formação de placas ateroscleróticas, também ocorre modificações intensas ao longo da região distal da artéria, que mesmo sem expressar evidentes placas ateromatosas, apontam possível comprometimento de toda extensão do vaso arterial, evidenciados pelas imunohistoquímicas tanto do estresse oxidativo através do 8-isoprostano, como pela viabilidade e ativação macrofágica pelo Mac-2.

Quando analisamos a placa aterosclerótica e o núcleo necrótico aterosclerótico do arco da aorta nos gráficos 10 e 11, percebemos que o mesmo fenômeno se repete, onde o grupo Poluída-Padrão expressa menor índice que os grupos que receberam dieta enriquecida de colesterol, sendo possível sugerir a mesma explicação.

O aumento na quantidade de macrófagos nos animais pertencentes ao grupo Poluída– E. Col. em relação ao grupo Poluída-Padrão na placa aterosclerótica e núcleo necrótico aterosclerótico pode ser atribuído ao processo aterogênico onde as células espumosas e o endotélio ativados podem também estimular a MCP-1 para aumentar o influxo de monócitos como demonstrado por Getz e col. 2005. Além disso, Yamawaki & Iwai, 2006, demonstrou que a intoxicação de cultura células endoteliais por poluentes induz a ativação de MCP-1, corroborando para todo o processo. Também nesse mesmo estudo, os autores evidenciaram que a partícula é citotóxica, pró-inflamatória e tem efeito anti- proliferativa.

Squadrito e col, 2001, estudando o ciclo redox e a poluição atmosférica, mostraram duas hipóteses interessantes referentes ao tamanho das partículas inspiradas e possíveis mecanismos de toxicidade celular.

Os autores propõem que as partículas grandes, devido a sua superfície de contato, possuem concentração maior de substâncias tóxicas, que em menor volume, poderiam causar maiores danos ao micro ambiente quando englobadas pelos macrófagos, podendo atingir até a expressão gênica da célula. Por sua vez, as partículas menores teriam em sua superfície concentrações menores de substâncias tóxicas, as quais

poderiam causar menos danos; se não fosse o fato de serem englobadas em maior quantidade e mais facilmente tranlocadas para a circulação sanguínea, causando citotoxicidade devido à quantidade de partículas inseridas nas células ocasionando maiores danos e acelerando o processo de necrose ou apoptose celular.

Hiura e col., 1999, por sua vez incubando duas linhagens de macrófagos com material particulado, mostrou que geração de espécies reativas de oxigênio podem causar danos até apoptose, envolvendo o sistema enzimático das caspases 8 e 9.

Simplificando, a ação dos poluentes atmosféricos pode acelerar a necrose ou apoptose dos macrófagos, mas não necessariamente diminuir a placa aterosclerótica (como demonstrado nos gráficos 10 e 11), isto porque, as próprias células da musculatura lisa, fibroblastos podem originar as células espumosas além de serem responsáveis pela síntese das proteínas da matrix, dos proteoglicanos. (Getz, 2005), essas e outras dinâmicas celulares mantêm esse ciclo recrutamento de novas células e morte celular.

Em síntese, no período crítico de poluição atmosférica na cidade de São Paulo, as conseqüências da exposição em animais knockout LDLR^{-/-} alimentados com dieta enriquecida de colesterol promoveram hipertrofia da espessura vascular da emergência da aorta, sem alterar o conteúdo lipídico da placa aterosclerótica e aumento da oxidação das lipoproteínas LDL no sangue. Entretanto, a poluição atmosférica nos grupos expostos independentemente da dieta ingerida, ocasionou níveis elevados de anticorpos anti-LDL oxidada, e conseqüentemente, presença de elevado

nível de autoanticorpos anti peptídeos D apo-B gerados, decorrente da toxicidade das substâncias poluentes do ar ambiente.

Paralelamente, não encontramos diferenças na avaliação do estresse oxidativo na região do arco aórtico e aorta ascendente (distal) pelo marcador 8 isoprostano, provavelmente por não ser a única via requerida.

Dados interessantes também foram observados em relação à análise dos macrófagos nas áreas do núcleo necrótico, e placas ateroscleróticas no arco aórtico e aorta descendente, onde o grupo, Poluída-dieta Padrão foi significativamente menor que os grupos que receberam dieta rica em colesterol, sugerindo uma citotoxicidade celular acentuada, provavelmente pelos poluentes inspirados.

Evidente citotoxicidade celular, foi observada também na região ascendente da aorta, onde apresentaram dois pontos interessantes: primeiro, os grupos que receberam dieta Padrão apresentaram menores índices de macrófagos viáveis quando comparados ao grupo Filtrada-E.Col,. Entretanto, o grupo Poluída-E.Col foi apenas significativamente menor quando comparado aos animais pertencentes ao grupo Poluída-Padrão. O segundo ponto a ser analisado seria referente aos grupos expostos que independente da dieta mostraram uma queda tendenciosa (não estatística) dos macrófagos, Estes dados salientam a ação tóxica dos poluentes atmosféricos, em particular ao material particulado.

A aterosclerose tem sido estudada sob os mais variados enfoques, e agora nas últimas décadas, o foco volta-se para a contribuição do meio ambiente, no caso a poluição atmosférica urbana, na evolução

desta doença que aflige milhões no mundo inteiro.

A nossa contribuição neste estudo foi caracterizar o potencial agressor da poluição urbana da cidade de São Paulo, a maior cidade urbana do Brasil e da América do Sul, onde se mostrou um poder de ação profundo, silencioso e intrigante, com níveis ambientais abaixo dos limites considerados de boa qualidade do ar. Esses resultados estimulam cada vez mais pesquisas tendo como elo meio ambiente versus doença e sugerem que os padrões de qualidade do ar assim como meios de maior controle ambiental de poluentes devem ser revistos e prontamente executados por órgãos governamentais e sociais.

VII- Conclusão

O estudo sobre a influência da exposição à poluição atmosférica urbana da cidade de São Paulo, na evolução da aterosclerose em animais knockout LDLR^{-/-} revelou que os poluentes do ar urbano,

- Induz em aumento da espessura vascular independente do conteúdo lipídico da placa aterogênica,

- Exercem ação oxidativa na LDL circulante e tecidual,

- Induzem a produção de auto-anticorpos anti-LDLox e anti-peptídeo D plasmáticos;

- Os mecanismos fisiopatológicos da aterogênese por estresse oxidativo, via 8-isoprastano e estímulo da atividade macrofágica, não foram potencializados pela exposição à poluição

- A aterogênese cardiovascular foi potencializada pela poluição em especial ao material particulado mesmo com níveis de poluentes atmosféricos dentro dos padrões considerados de boa qualidade do ar.

ANEXO 1

Tabela referente à temperatura e interna e externa das câmaras.
Dados apresentados em média e dp correspondente ao período de exposição

Câmara	Temp. Interna		Temp. Externa	
	Min	Máx.	Min.	Máx
Filtrada	17 ± 3	26 ± 3	15 ± 3	24 ± 3
Poluída	14 ± 2	27 ± 4	14 ± 3	25 ± 4

Tabela referente à Umidade e interna e externa das câmaras.
Dados apresentados em média e dp correspondente ao período de exposição

Umidade Interna		
Câmara	Mínima	Máxima
Fittrada	48 ± 11	78 ± 8
Poluída	41 ± 12	77 ± 11

ANEXO 2

Tabela referente a dosagem de proteínas totais da fração infranadante dos grupos

Grupos	Proteínas Totais (mg/ml)
Filtrada-Padrão	142
Poluída- Padrão	69
Filtrada- E.Col.	135
Poluída- E.Col.	7,6

ANEXO 3

Coloração de Oil red

Material

Oil red O

-0,5 g de Oil red O
200 mL de isopropil
Dissolver o oil red em 200 ml de ispropileno glicol
Aquecer em banho maria a 56 ° C por 1 hora. Esfriar

Hematoxilina de Carazzi

Hematoxilina- 0,5 g
Água dest.- 400 mL
Glicerina- 100 mL
Alumen de Potássio- 25 g
Iodato de Potássio - 0,1 g.

-Preparo do oil red

4 partes de água destilada p/ 6 partes de corante deixar descansar por 10 min. Filtrar (processo demorado).
Dissolver os ingredientes de hematoxilina um a um, aos poucos, com glicerina e por último a água destilada.

Procedimento

As lâminas deverão submeter-se ao:
-clorofómio- éter(50-50%) por 1 min. em seguida
-Lavar em Água destilada –05 min.- e novamente
- Lavar pela 2ª vez Água destilada –05 min.- jogar fora
- Secar as lâminas em papel filtro
- Fixar no álcool 70% ± por 3 min.- escorre o álcool
- Por as lâminas no copplin com oil red por 5 min
- Tirar o corante e lavar com água destilada até tirar o excesso de corante das lâminas
- Secar com papel filtro e contra corar com hematoxilina de Karasi por 1 min.

-
- Lavar as lâminas com água destilada.
 - Voltar a lavar com álcool 70% por 1 seg.

ANEXO 4

Imunohistoquímica, procedimento em material congelado.

Hidratação

- Colocar as lâminas em 2 banhos de álcool absoluto, em torno de 1 minuto cada
- Um banho de álcool 95°, $\pm$ 1 minuto
- Um banho de álcool 70°, $\pm$ 1 minuto
- Lavar bem em água corrente
- Lavar com água deionizada

Bloqueio

- Colocar as lâminas em água oxigenada de 10V, durante 5 min.
- Repetir a operação por 5 a 7 vezes
- Lavar bem em água corrente
- Lavar com água deionizada
- Lavar com PBS (tampão salina/fosfato) por 3 vezes
- Deixar 20 min em leite desnatado diluído em PSA

Incubação com os anticorpos

- Diluir adequadamente ao anticorpo primário previamente titulado em BSA

-
-
- Secar a lâmina ao redor dos cortes e colocando-as em câmara úmida
- Pipetar o anticorpo diluído sobre os cortes, utilizando-se uma micropipeta
 - Lavar 3 vezes com PBS, por 5 minutos
 - Incubar as lâminas em câmara úmida com anticorpo secundário biotinilado durante 1 hora à 37°C
 - Lavar 3 vezes com PBS, por 5 min.
 - Incubar as lâminas em câmara úmida com Complexo conjugado com peroxidase, por 30 min. à 37°C,
 - Lavar 3 vezes com PBS, por 5 min.
 - Colocar as lâminas em solução de cromógeno (70 mg de DAB por 70 ml de PBS com ml de água oxigenada)
 - Esperar a revelação por 5 min.
 - Lavar em água corrente por 10 min.
 - Contra corar em Hematoxilina de Harris, por 25-30 segundos
 - Lavar em água corrente por 5 min.

Montagem

- Colocar as lâminas em suporte
- Desidratar em banho de álcool 70°, por $\pm$ 1 min.
- Colocar em banho de álcool 95°, por $\pm$ 1 min.
- Diafanizar em 3 banhos de xilol, por $\pm$ 1 min. cada
- Montar com lamínula e resina sintética e rotular

ANEXO 5

Dados descritivos da área de lipídes/área total na emergência da aorta

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	95% Intervalo de Confiança Média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
Filtrada-Padrão	8	,070	,0701	,0241	.0123	.129	,00	,17
Poluída-Padrão	9	,084	.115	.0383	-,00435	.172	,00	,37
Filtrada-E.Col.	6	,577	,546	,223	,004	1.15	,12	1,63
Poluída-E.Col.	8	.530	.326	,115	,257	.803	.26	1,25

Anexo 6

- Dados descritivos da espessura/área total na emergência da aorta

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	95%Intervalo de Confiança Média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
Filtrada-Padrão	8	43,737	19,0590	6,7384	27,803	59,671	12,4	65,1
Poluída-Padrão	9	44,064	16,3143	5,4381	31,523	56,604	20,2	67,3
Filtrada-E.Col.	6	74,656	31,5887	12,8960	41,506	107,807	32,5	125,5
Poluída-E.Col.	8	165,847	43,2717	15,2988	129,671	202,023	100,1	207,4

Anexo 7

Dados descritivos dos anticorpos anti LDL oxidada

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	95%Intervalo de Confiança Média		Mínimo	Máximo
					Limite Inferior	Limite superior		
Filtrada-Padrão	6	-,0183	,0211	,008	-,04053	,0038	-,04175	,0211
Poluída-Padrão	6	,173	,052	,021	,117746	,2287	,08945	,2332
Filtrada-E.Col.	6	-,027	,025	,010	-,05431	-,0007	-,05185	,0173
Poluída-E.Col.	6	1,031	,134	,054	,89041	1,1722	,7797	1,1711
sôro knockout	6	-,060	,014	,005	-,07567	-,0459	-,07655	-,04685

Anexo 8

Dados descritivos dos anticorpos anti peptídeo D da apolipoproteína B-

100

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	95%Intervalo de Confiança Média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
Filtrada-Padrão	6	-,052	,026	,010	-,080	-,025	-,099	-,019
Poluída-Padrão	6	,077	,035	,014	,039	,114	,036	,132
Filtrada-E.Col.	6	-,015	,024	,010	-,040	,010	-,036	,024
Poluída-E.Col.	6	,340	,086	,035	,249	,431	,198	,438
sôro knockout LDL-/-	6	-,010	,017	,007	-,029	,007	-,032	,012

Anexo 9

Dados descritivos da medida de estresse oxidativo (via isoprostano) na aorta descendente

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	95%Intervalo de confiança Média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
Filtrada-Padrão	6	,042	,026	,010	,015	,092	,01	,08
Poluída-Padrão	11	,057	,051	,015	,023	,070	,00	,16
Filtrada-E.Col.	6	,038	,024	,009	,012	,063	,01	,08
Poluída-E.Col.	7	,056	,039	,014	,020	,093	,02	,13

Anexo 10

Dados descritivos da medida de estresse oxidativo (via isoprostano) no núcleo necrótico aterosclerótico da região do arco da aorta.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	95% Intervalo de Confiança Média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
Filtrada-Padrão	4	,562	,061	,030	,464	,660	,515	,653
Poluída-Padrão	6	,442	,161	,065	,272	,612	,155	,603
Filtrada-E.Col.	6	,386	,088	,036	,294	,479	,307	,552
Poluída-E.Col.	7	,436	,165	,062	,282	,589	,250	,667

Anexo 11

Dados descritivos da medida de estresse oxidativo (via isoprostano) no placa aterosclerótica da região do arco da aorta.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	95% Intervalo de Confiança Média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
Filtrada-Padrão	4	,319	,069	,034	,208	,430	,270	,421
Poluída-Padrão	6	,289	,119	,048	,164	,414	,087	,414
Filtrada-E.Col.	6	,239	,059	,024	,176	,301	,154	,328
Poluída-E.Col.	7	,298	,071	,027	,232	,365	,183	,390

Anexo 12

Dados descritivos da medida da presença de macrófagos na região descendente da aorta.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	95% Intervalo de Confiança Média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
Filtrada-Padrão	7	,035	,019	,007	,017	,052	,0	,06
Poluída-Padrão	10	,014	,032	,010	-,008	,037	,00	,1
Filtrada-E.Col.	8	,147	,097	,034	,065	,228	,00	,27
Poluída-E.Col.	9	,133	,114	,038	,045	,220	,00	,27

Anexo 13

Dados descritivos da medida da presença de macrófagos na região da placa aterosclerótica do arco da aorta.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	95% Intervalo de Confiança Média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
Filtrada-Padrão	5	.234	,131	.058	,071	.397	.10	,39
Poluída-Padrão	6	.095	.102	,042	-,0125	,203	,00	,27
Filtrada-E.Col.	8	,473	,152	,053	,346	,600	,28	.68
Poluída-E.Col.	9	,310	,214	,071	,145	,475	,03	,54

Anexo 14

Dados descritivos da medida da presença de macrófagos na região do núcleo necrótico aterosclerótico do arco da aorta.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	95% Intervalo de Confiança Média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
Filtrada-Padrão	5	,374	,169	,075	,163	,584	,15	,61
Poluída-Padrão	5	,133	,190	,085	-,102	,370	,01	,46
Filtrada-E.Col.	8	,593	,148	,052	,469	,717	,45	,81
Poluída-E.Col.	9	,38	,244	,081	,196	,572	,03	,67

ABNT- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – Material particulado em suspensão na atmosfera- determinação da concentração de fumaça pelo método da reflectância da luz. **NBR (Norma Brasileira Registrada)**, 10736 Set., 1989.

ANAZAWA T, DIMAYUGA PC, LI H, TANI S, BRADFIELD J, CHYU KY, KAUL S, SHAH PK, CERCEK B.- Effect of exposure to cigarette smoke on carotid artery intimal thickening: the role of inducible NO synthase. **Arterioscler Throm. Vasc. Biol.**, 24 (9), p.1652-8, 2004

BAYNES, J. W. & THORPE, S. R. Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. **Free Radical Biology and Medicine** v. 28 (12), p. 1708- 1716, 2000.

BELL, M. L.; DAVIS, D. L.; GOUVEIA, N.; BORJA-ABURTO; V. H.; CIFUENTES, L. A. The avoidable health effects of air pollution in three Latin American cities: Santiago, São Paulo, and México City. **Environ Res.** Mar, v. 100 (3), p.431-40, 2006.

BISHOP-BAILEY, D; WRAY, J. Peroxisome proliferator activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation. **Prostaglandins other lipid Mediat.** Apr, v. 71 (1-2), p. 1-22, 2003

BROOK, R. D.; BROOK, J. R.; URCH, B.; VINCENT, R.; RAJAGOPALAN, S.; SILVERMAN, F. Inhalation of fine particulate air pollution and ozone causes acute arterial vasoconstriction in healthy adults **Circulation**, v. 105, p. 1534-1536, 2002.

BROOK, R. D.; FRANKLIN, B.; CHAIR, W. C.; HONG, Y.; OWARD, G.; LIPSETT, M.; LUEPKER, R.; MITTLEMAN, M.; SAMET, J.; SMITH JR., S.C.; TAGER, I. Air pollution and cardiovascular disease. a Statement for Healthcare Professionals from the expert panel on population and prevention science of the American Heart Association. **Circulation** v. 109, p. 2655-2671, 2004

BURLEIGH, M. E.; BABAIEV, V. R.; YANCEY, P. G.; MAJOR, A. S.; MCCAULEY, J. L.; OATES, J. A.; MORROW, J. D.; FAZIO, S.; LINTON, M. F. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in apo E deficient and C57BL/6 mice. **J. Mol. Cell. Cardio.**, Sep. v. 39 (3), p. 443-52, 2005.

CARVALHO, M. D.T.; HARADA, L. M.; GIDLUND, M.; KETELHUTH, D. F. J.; BOSCHCOV, QUINTÃO, C. R. Macrophages take up triacylglycerol-rich emulsions at a faster rate upon co-incubation with native and modified LDL: Na investigation on the role of natural chylomicrons in atherosclerosis. **J. Cell. Biochem.** v. 84, p. 309-323, 2002

CASQUERO AC, BERTI JA, SALERNO AG, BIGHETTI EJ, CAZITA PM, KETELHUTH DF, GIDLUND M, OLIVEIRA HC. Atherosclerosis is enhanced by testosterone deficiency and attenuated by expression in transgenic mice. **J. Lipid Res.** Apr 7; 2006

CATANOZI,S.; ROCHA, J.C.; PASSARELLI, m.; Guzzo, M.L.; Alves, C.; Furukawa, L.N.S.; Nunes, V. S.; Nakandakare, E.; Heimann, J.C.; Quintão, E.C.R. Dietary sodium chloride restriction enhances aortic wall lipid storage and raises plasma lipid concentration in LDL receptor knockout mice. **J. Lipid Res.** v 44, p. 727-732, 2003

CAZITA, P.M.; BERTI, J. A.; AOKI, C.; GIDLUND, M.; HARADA, L. M.; NUNES ,V.S.; QUINTAO, E. C.; OLIVEIRA, H. C. Cholesteryl ester transfer protein expression attenuates atherosclerosis in ovariectomized mice. **J Lipid Res.** Jan, v. 44(1), p. 33-40, 2003

CETESB- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
www.cetesb.sp.gov.br/ar

CHEN, C. L. & NADZIEJKO,C.- Effects of subchronic exposures to concentrated ambient particles (CAPs) in mice:V. CAPs exacerbate aortic plaque development in hyperlipidemic mice. **Inhalation Toxicology** v. 17, p.217-224, 2005

CIÊNCIA HOJE ON LINE- Brasil versus aquecimento global www.cienciahoje.uol.com.br/matéria/view/2382

CLAUDIA IZIQUE- O mundo depois de Kyoto. **Revista Pesquisa Fapesp**, p 22-23 Dez, 2005

COBEA- Princípios éticos na experimentação animal da legislação brasileira e Colégio Brasileiro de Experimentação. www.cobea.org.br/etica.htm

COLLINS, R. G.; VELJI, R.; GUERARA, N. V.; HICKS, M. J.; CHAN, L.; BEAUDET, A. L. P-selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. **J. Exp. Med.** Jan. , v. 191(1), p. 189-94, 2000

COMMITTEE OF THE ENVIRONMENTAL AND OCCUPATIONAL HEALTH ASSEMBLY OF THE AMERICAN THORACIC SOCIETY , Health effects of outdoor air pollution. Part 2. Committee of the Environmental and Occupational Health Assembly of the American Thoracic Society. **Am J Respir Crit Care Med.** Feb; v. 153(2), p. 477-98, 1996

DHALLA, N. S.; TEMSAH, R.M.; NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **J. Hypertension** v. 18, p.655-673, 2000.

DAVIS JA, BROWN AT, CHEN H, WANG Y, POIRIER LA, EIDT JF, CRUZ CP, MOURSI MM Cigarette smoke increases intimal hyperplasia and homocysteine in a rat carotid endarterectomy. **J Surg Res.** Sep, v. 121(1), p. 69-75, 2004

DELLINGER, B.; PRYOR, W. A., CUETO, R.; SQUADRITO, G. L.; HEGDE, V.; DEUTSCH, W.- Role of free radicals in the toxicity of airborne fine particulate matter. **Chem. Res. Toxicol.** v.14, 1371-1377, 2001

DOCKERY, D.W.; POPE, C.A 3 RD.; XU, X.; SPENGLER, J.D.; WARE, J. H.; FAY, M. E.; FERRIS, B. G. JR; SPEIZER, F. E. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. **N. Engl. Med**, Dec, v. 329 (24), p. 1753-9, 1993.

DONALDSON, K.; STONE, V.; SEATON, A.; MacNee, W. Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. **Environ. Health Perspect.** V.109(4), p. 523-527, 2001

ESTERBAUER, H.; STRIEELE G, PUHL, H; ROTHENEDERM- Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein- **Free Radic Res. Commun.** 6, 67-75, . 1989.

ESTERBAUER,H.; PUHL; H.; WAEG, G.; KREBS, A.; TATZBER, F.;; RABL,
H. Vitamin E and atherosclerosis an overview. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**
Tokyo, p 177 – 82, 1992

FERNVIK, E. C.; KETELHUTH, D.F.J.;RUSSO, M.; GIDLUND, M. The
autoantibody repertoire against cooper- or macrophage-modified LDL
differs in normolipidemics and hypercholesterolemic patients. **J.**
Clin..Immunol. 24(2), 170-176. 2004

FERRI, N.; PAOLETTI, R.; CORSINI, A. Lipid modified proteins as biomarkers
for cardiovascular disease: a review. **Biomarkers**, Jul-Aug., v. 10(4), p.
219-37, 2005

FROSTEGARD, J. Biologically modified LDL increases the adhesive
properties of endothelial cells. **Atherosclerosis**, v.90 (2-3), p. 119-26,
1991

FROSTEGARD J, ULFGREN AK, NYBERG P, HEDIN U, SWEDENBORG J,
ANDERSSON U, HANSSON GK. Cytokine expression in advanced
human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and

macrophage-stimulating cytokines. **Atherosclerosis** v. 145 (1), p. 33-43, 1999.

GAIROLA C.G.; DRAWDY, M.L.; BLOCK, A. E.; DAUGHERTY, A.
Sidestream cigarette smoke accelerates atherogenesis in
apolipoprotein E-/- mice. **Atherosclerosis**, May, v.156(1), p. 49-55,
2001

GALLE, J.; HANSEN-HAGGE,T.; WANER,C.; SEIBOLD, S. Impact of
oxidized low density lipoprotein on vascular cells. **Atherosclerosis**
v.185 (2), p.219-26, 2006

GEOCITES.COM- www.geocites.com.br/collegepark

GEORGE, J.; AFEK, A.; GILBURD, B.; LEVKOVITZ, H.; SHAISH,
A.;GOLDBERG, I; KOPOLOVIC, Y.;; WICK, G.; SHOENFELD,
Y;HARATS, D Hyperimmunization of apo-E-deficient mice with
homologous malondialdehyde low-density lipoprotein suppresses early
atherogenesis. **Atherosclerosis**. May; v.138(1), p. 147-52, 1998

GETZ, G. S.- Immune function in atherogenesis. **J. Lipid Res.**, v. 46 p. 1-10,
2005

GIDLUND, M.; DAMASCENO, N. R.; LINDOSO, J. A.; ABDALLA, D. S. ;
GOTO, H. Monoclonal antibodies against low density lipoprotein with
various degrees of oxidative modifications. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.
29(12), p. 1625-8, 1996.

GIOVANNI DAVI; PAOLA ALESSANDRINI; ANDREA MEZZETTI; GIORGIO
MINOTTI; TONINO BUCCIARELLI; FABRIZIO COSTANTINI;
FRANCESCO CIPOLLONE; GABRIELE BITTOLO BON; GIOVANNI
CIABATTONI; ; CARLO PATRONO. Formation of 8-Epi Prostaglandin
F₂ Is Increased in Hypercholesterolemia In Vivo. **Arteriosclerosis,
Thrombosis, and Vascular Biology**, . v. 17, p. 3230-3235, 1997;

GNIWOTTA, C.; MORROW, J. D; ROBERTS II, L.J.; KÜLHN; H.-
Prostaglandin F₂-like compounds, F₂--Isoprostanes, are present in
increased amounts in human atherosclerotic lesions. **Arteriosclerosis,
Thrombosis, Vascular Biology** v. 17, 3236-3241, 1997

GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS,
INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES, National
Academy of Sciences, Washington, D.C.,
www.nap.edu/books/0309053773/html

GOPAUL, N. K.; NOUROOZ-ZADEH, J.; MALLET, A.I.;ÄNGGÅRD, E. E.

Formation of F₂- isoprostanes during aortic endothelial cell-mediated oxidation of low density lipoprotein. **FEBS Letters** v. 348, p. 297-300, 1994

GOTO,Y.; HOGG, J.C.; SHIH, C-H; ISHII, H.; VINCENT, R.; van EEDEN, S.

F. Exposure to ambient particles accelerates monocyte release from bone marrow in atherosclerotic rabbits. **Am. J. Physiol. Lung Cell, Mol. Physiol.**, v. 287, p. L 79-L85, 2004.

HANSSON, G. inflammation, Atherosclerosis and Coronary Artery Disease.

N. Engl. J. Med, April, v. 353, p.1685-95, 2005

HAVEL, R. J. The formation of LDL: mechanisms and regulation. Review. J

Lipid Res. Dec v. 25(13) p.1570-6, 1984

HEINECKE J.W.; BAKER L.; ROSEN H.; CHAIT A. - A superoxide-

mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. **J. Clin. Invest.** v.77, p. 757-61. 1986

HEINECKE, J.W. Mechanisms of oxidative damage of low density

lipoprotein in human atherosclerosis. **Curr Opin Lipidol.** Oct; v. 8(5), p.268-74, 1997.

HIURA, T.S.; KASZUBOWSKI, M. P.; LI, N.; NEL, A. E. Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. **J. Immunology** v. 163, p.5582-5591, 1999.

HOEK, G.; BRUNEKREEF,B.; GOLDBOHN,S.; FISCHER, P.; vanden BRANDT, P. A. Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in The Netherlands: a cohort study. **Lancet** v. 360, p. 1203-9, 2002.

HORKKO S.; BIRD, D. A. ; MILLER, E.; ITABE, H.; LEITINGER, N.; SUBBANAGOUNDER, G.; BERLINER, J. A.; FRIEDMAN, P.; DENNIS, E. A. ; CURTISS, L. K. ; PALINSKI, W.; WITZTUM, J. L.. Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of oxidized low-density lipoproteins. **J. Clin Invest** jan v 103910, p. 117-28, 1999

HUNNINGHAKE, D.B.-Cardiovascular disease in chronic obstructive pulmonary disease. **Proc.Am. Thorac Soc.**v.2, p 44-49, 2005

JANSON, C; KUNZILI, N; DE MARCO, R, CHINN, S.;JARVIS, D.; SVANES, C.; HEINRICH, J.;JOGI, R.; GISLASON ,T.;SUNVER,J.;ACKERMANN-LIEBRICH, U; Anto,J. M.; Cerveri, I; Kerhof, M.; Leynaert, B.; Luczynska, C.; Neukirch, F.; Vermeire, P.; Wist, M; Burney, P.-Changes

in active and passive smoking in the European Community Respiratory Health Survey. **Eur. Respir. J.**, mar, v.27(3), p. 517-24, 2006

JAWIEN, J.; NASTALEK, P.; KORBUT, R.- Mouse models of experimental atherosclerosis- **J. Physiol. Pharmacol**, Sep., V. 55 (3) p. 503-17, 2004.

JESSUP, W.; WILSON, P.; GAUS, K.; KRITHARIDES, L. Oxidized lipoproteins and macrophages. **Vascul. Pharmacol**, Apr., v. 389(4), p. 239-48, 2002

JOSEPH, S. B.; LAFFITTE, B.A.; PATEL, P.H.; WATSON, M.A.; MATSUKUMA, K. E.; WALCZAK, R.; COLLINS, J. L.; OSBORNE, T. F.; TONTONOZ, P. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. **J. Biol. Chem.**, Mar v. 277(13), p. 11019-25, 2002.

KATSUDA, S. & KAJI, T. A. Atherosclerosis and Extracellular matrix. **J. Atheroscler Throm.**, v. 10, p. 267-274, 2003

KENSEY, K. R., The mechanistic relationships between hemorheological characteristics and cardiovascular disease. **Current Medical Res. and Opinions** v.19 (7) p. 587-596, 2003

KHOO, J. C.; MILLER, E.; McLOUGHLINp.; STEINBERG, d.; Enhanced macrophages uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. **Atherosclerosis** v. 8, p. 348-358, 1988.

KUMAR, A.; KINGDON, E.; NORMAN, J. The isoprostane 8-iso-PGF_{2α} supresses monocyte adhesion to human microvascular endothelial cells via two independent mechanisms. **FASEB Journal** v. 19(3), p. 443-5, 2005.

KÜNZILI, N; Jerret, M.; Mack, W.J.; Beckerman, B.; LaBrae, L.; Gilliland, F.; Thomas, D.; Peters, J.; Hodis,H.- Ambient air pollution and atherosclerosis in Los Angeles-**Environm. Health Perspect.** V.113, p. 201-206, 2005.

LEITE, P. F.; LIBERMAN, M.; DE BRITO, F. S.; LAURINDO, F. R. M.- Redox processes underlying the vascular repair reaction. **World J. Surg.** 28, p.331-326,2004

LIBBY,P.; Inflammation in atherosclerosis. **Nature** dec, v. 420 (6917), p. 868-74., 2002.

LIN, C. A.; AMADOR PEREIRA, L. A.; de SOUZA CONCEIÇÃO, G. M.; KISHI,H. S.; MILANI, R. JR.; FERREIRA BRAGA,A. L.; NASCIMENTO SALDIVA, P.H. Association between air pollution and ischemic cardiovascular emergency room visits. **Environ. Res.** May, v. 92 (1), p. 57-63, 2003

LIPPMANN, M.; HWANG, J-S; MACIEJCZYK. CHEN, L-CHIN. PM source apportionment for short term cardiac function changes in apoE^{-/-} mice. **Environ Health Perspect.** V. 113 (11), 2005.

LODGE, J .P.-Methods of air sampling and analysis. **Intersociety Committee, Lewis Publishers**, Inc., p. 399-402, 1989.

LUCAS, A. D.; GREAVES, D. R.; Atherosclerosis: role of chemokines and macrophages. **Expert. Rev. Mol. Med.**, p. 1-18, 2001

LUSIS, A. Atherosclerosis. **Nature**, Sep. v. 407(6801), p. 233-41, 2000

MACK, W.J.; ISLAM, T., LEE, Z.; SELZER, R.H.; HODIS, H.N.
Environmental tobacco smoke and carotid arterial stiffness. **Prev Med.**
Aug; v. 37(2), p. 148-54. 2003

MARSON, P.; ZANCHIN, G.; STEFANUTTI, C. Some historical
considerations on the inflammatory theory of atherosclerosis
Reumatismo, Jul-Sep, v. 56(3), p. 215-9, 2004

MATHYS,K.E.; VAN HOVE, COR E.; KOCKX, M.M.;ANDRIES, L. J.; VAN
OSSELAER, N.; HERMAN, A. G.; BULT, H.- Local application of LDL
promotes intimal thickening in the collared carotid artery of the rabbit
Arteriosclerosis,Thrombosis, Vascular Biology, v. 17, p. 2423-2429

MEIRING, J.J.; BORM, P. J. A.; BAGATE, K.; SEMMLER, M.; SEITZ, J.;
TAKENAKA, S.; KREYLING, W. G.- The influence of hydrogen peroxide
and histamine on lung permeability and translocation of iridium
nanoparticles in the isolated perfused rat lung. **Particle and Fibre
Toxicology**, v.2:3, 2005

MIRAGLIA, S. G.; SALDIVA, P. H.; BOHM, G. M. An evaluation of air
pollution health impacts and costs in Sao Paulo, Brazil. **Environ
Manage**, May, v. 35(5), p. 667-76, 2005

MOGHADASIAN, M. H.; McMANUS, B. M.; NGUYEN, L. B.; SHEFER, S.;
NADJI, M.; GODIN, D.V.; GREEN, T. J.; HILL, J.; YANG, Y.;
SCUDAMORE, C. H.; FROHLICH, J. J. Pathophysiology of apoprotein
E deficiency in mice, relevance to apo E- related disorders in humans.
FASEB J. dec, v. 15(140, p. 2623-30, 2001

MOHALLEM,S.V.; ARÚJO-LOBO,D.J., PASQUERO,C.R; ASSUNÇÃO, J.V.,
ANDRÉ, P.A.; SALDIVA,P.H.N.; DOLNIKOFF,M. Decreased fertility in
mice exposed to environmental air pollution in the city of São Paulo.
Environ.Research, v. 98 p. 196-202, 2005.

NEMMAR, A.; HOYLAERTS, M. F., HOET ,P.H., NEMERY, B. Possible
mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles:
systemic translocation and prothrombotic effects. **Toxicol Lett** Apr,.v.
149 (1-3), p. 243-53, 2004

NILSSON J, CALARA F, REGNSTROM J, HULTGARDH-NILSSON A,
AMELI S, CERCEK B, SHAH PK. Immunization with homologous
oxidized low density lipoprotein reduces neointimal formation after
balloon injury in hypercholesterolemic rabbits. **J Am Coll Cardiol.** Dec;,
v. 30(7), p. 1886-91. 1997

OHASSHI, R.; MU, H.; YAO, Q.; CHEN, C.- Cellular and molecular mechanisms of atherosclerosis with mouse models- **Trends Cardiovasc. Med**, v. 14,p. 187- 190, 2004.

PALINSKI, W.; ORD, V.A.; PLUMP, A. S.; BRESLOW, J. L.; STEINBERG, S.; WITZTUM, J. I. Apo E deficient mice are a modelo f lipoprotein oxidation in atherosclerosis. Demonstration of oxidation specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde lysine in serum. **Arteriocler. Throm.** Apr., n. 14(4), p.605-16, 1994

de PAULA SANTOS, BRAGA, U.; GIORGI, D. M.; PEREIRA, L. A.; GRUPI,C. J.; LIN, C.A.; BUSSACOS, M. A.; ZANETTA, D. M.; do NASCIMENTO SALDIVA, P.H.; FILHO,M. T. effects of air pollution on blood pressure and heart rate variability: a panel study of ventricular traffic controllers in the city of Sao Paulo, Brazil. **Eur. Heart J.** jan., v. 26 (2), p. 193-200, 2004

PETERS, A.; FROHLICH, M.; DORING,A.; IMMERVOLL,T.; WICHMANN, H.E.; HUTCHINSON, W.L.; PEPYS, M. B.; KOENIG, W. Particulate air pollution is associated with an acute phase response in men; results from the MONICA-Ausburg study. **Eur. Heart J.** v.22, p. 1198-204, 2001.

PIEGAS, L. S.; AVEZUM, A.; PEREIRA, J. C.; NETO, J. M.; HOEPFNER, C.;
FARRAN, J. A.; RAMOS, R. F.; TIMERMAN, A.; ESTEVES, J. P.; .
AFIRMAR STUDY INVESTIGATORS. Risk factors for myocardial
infarction in Brazil. **Am. Heart J.** Aug, v. 146(2), p.331-8

POPE III, C. A.; SCHWARTZ, J.; RANSOM, M. R.; Daily mortality and PM₁₀
pollution in Utah Valley. **Arch. Environ. Health**, v. 47, p. 211-17,
1992.

POPE 3RD, C.A.; EATOUGH, D.J.; GOLD, D.R.; PANG, Y.; NIELSEN, K.R.;
NATH, P.; VERRIER, R.L.; KANNER, R.E.- Acute exposure to
environmental tobacco smoke and heart rate variability. **Environ.**
Health Perspect, Jul, v.109 (7)p. 711-6, 2001

POPE 3RD, C.A.; BURNETT, R. T.; THURSTON, G.D.; THUN, M.J; CALLE,
E.E.; KREWSKI, D.; GODLESKI, J. J.- Cardiovascular mortality and
long-term exposure to particulate air pollution- Epidemiological
evidence of general pathophysiological pathways of disease.
Circulation v. 109, p. 71-77, 2004.

PRATICÓ, D.; IULIANO, L.; MAURIELLO, SPAGNOLI, L.; LAWSON, J. A. ;
MACLOUF, J.; VIOLI, F.; FITZGERALD, G. A.- Localization of
distinct F₂-Isoprostanes in human atherosclerotic lesions. **J. Clin.**
Invest, v.100 (8), p. 2028-2034, 1997.

PRESCOTT, G.J.; LEE, R.J.; COHEN, G.R.; ELTON, R.A.; LEE, A. J.;
FOWKES, F. G. R.; AGIUS, R. M. Investigation of factors which might
indicate susceptibility to particulate air pollution. **Occup Environ
Med** v. 57, p. 53-57, 2000

REEVES, P.G.; NILSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93-Purified diets for
laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad
Hoc writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent
Diet. **J. Nutr.**, v. 123 p. 1939-1951, 1993

RIVERO, D.H.; SOARES, S.R.; LORENZI-FILHO, G.; SAIKI, M.;
GOLDLESKI, J.J.; ANTONANGELO, I; DOLHNIKOFF, M; SALDIVA,
P.H.- Acute cardiopulmonary alterations induced by fine particulate matter
of Sao Paulo, Brazil- **Toxicol. Sci.** v. 85 (2), p. 898-905, 2005.

ROSS, R. Mechanisms of Disease: Atherosclerosis- An inflammatory
disease. **N. Engl. J. Med.** v.340 (2), p. 115-126, 1999

SALONEN JT, YLA-HERTTUALA S, YAMAMOTO R, BUTLER S, KORPELA
H, SALONEN R, NYSSONEN K, PALINSKI W, WITZTUM JL.
Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid
atherosclerosis. **Lancet.** Apr, v.; 339(8798), p. 883-7, 1992

-
-
- SHERER, Y; SHOENFELD, Y. Immunomodulation for treatment and prevention of atherosclerosis. **Autoimmun Rev.** Feb; v. 1(1-2), p. 21-7, 2002
- SHARMAN, J. E.; COOMBES, J. S.; GERAGHTY, D. P.; FRASER, D. I. Exposure to automotive pollution increases plasma susceptibility to oxidation **Arch. Environ. Health**, Dec v. 57 (6), 536-40, 2002
- SHAROVSKY, R.; CÉSAR, LAM, C.; RAMIRES, J .A . F. Temperature, air pollution, and mortality from myocardial infarction in São Paulo, Brazil . **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 37 (11), 1651-1657.
- SHAW, P. X.; HORKKO, S.; TSIMIKAS, S.; CHANG, M. K.; PALINSKI, W.; SILVERMAN , G. J.; CHEN, P. P.; WITZTUM, J. L. Human-derived anti-oxidized LDL autoantibody blocks uptake of oxidized LDL by macrophages and localizes to atherosclerotic lesions in vivo. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** Aug; v. 21(8), p.1333 2001
- SHI, T., KNAAPEN, A.M.; BEGEROW, J.; BIRMILI, W.; BORM, P.J.; SCHINS, R.P, Temporal variation of hydroxyl radical generation and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation by coarse and fine particulate matter. **Occup Environ Med.** May, v. 60(5), p. 315-21, 2003

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2004- **www. cardiol.br.**

SQUADRITO,G. L.; CUETO, R.; DELLINGER, B.; PRYOR, W. A. Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31 ((9), p. 1132-1138, 2001

SCHLESINGER, R. B.; KUNZILI, N.; HIDY, G. M.; GOTSCHI, T.; JERRETT, M. The health relevance of ambient particulate matter characteristics: Coherence of toxicological and epidemiological inferences. **Inhalation Toxicology**, v. 18, p.95-125, 2006

SVENSJO, E.; BOSCHCOV, P.; KETELHUTH, D.F.; JANCAR, S.; GIDLUND, M. Increased microvascular permeability in the hamster cheek pouch induced by oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and some fragmented apolipoprotein B proteins. **Inflamm. Res.** may, v. 52(5), p. 215-20, 2003

SUN , Q.; WANG, A.; JIN,x.; NATANZON, A.; DUQUAINE, D.; BROOK, R.D.; AGUINALDO, J. G.; FAYAD, Z. A.; FUSTER, V.; LIPPMANN, M.; CHEN, L.C.; RAJAGOPALAN, S.-Long- term air pollution exposure and acceleration of atherosclerosis and vascular inflammation in an animal model- **JAMA** v. 294, p. 303-3010, 2005

SUTTERWALA, F. S. & NOEL, G. J.; Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fc gamma receptor type I – **J,Exp. Med** v.188 (1), 217-22, 1998.

SUWA, T.; HOGG J. C.; QUINLAN, K. B.; OHGAMI, A.; VICENT, R.; van EEDEN, S.F.- Particulate air pollution induces progression of atherosclerosis. **J. Am.Coll. Cardiol.** v.39, p 935-42, 2002

TABATA, T.; MINE, S.; KAWAHARA, C.; OKDA, Y.; TANAKA, Y. Monocyte-chemoattractant protein-1 induces scavenger receptor expression and monocyte differentiation into foam cells. **Biochem Biophys Res. Commun**, May, v. 30, p. 305(2), p. 380-5, 2003

TANI, S.; DIMAYUGA, P.C.; ANAZAWA, T.; CHYU, K-Y; LI, H.; SHAH, P.K.; CERCEK, B. – Aberrant antibody responses to oxidized LDL and increased intimal thickening in apoE τ/τ mice exposed to cigarette smoke. **Atherosclerosis** v.175, p.7-14, 2004.

TOSHIMA, S., HASEGAWA, A.; KURABAYASHI, M.; ITABE, H.; TAKANO, T.; SUGANO, J.; SHIMAMURA, K.; KIMURA, J.; MICHISITA, I.; SUZUKI, T.; NAGAI, R. Circulating oxidized low density lipoprotein levels. A biochemical risk marker for coronary heart disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 20, p. 2243-47, 2000.

UCHIDA, K. Current status of acrolein as a lipid peroxidation product.

Trends cardiovasc. Med. jul, v. 9 (5), p 109-13, 1999

Van EEDEN, S. F.; TAN, W.C.; SUWA, T.; MUKAE, H.; TERASHIMA, T.; FUJII, T.; QUI, D.; VINCENT, R.; HOGG, J.C.- Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM₁₀). **Am. J. Resp. Crit. Care Med.** V.164 (5), p.826-830, 2001.

VERMYLEN, J.; NEMMAR, A.; NEMERY, B.; HOYLAERTS, M. F. Ambient air pollution and acute myocardial infarction. **J. Thrombosis and Haemostasis**, v.3, 1955-1961, 2005.

VIRELLA, G.; ATCHLEY, D.; KOSKINEN, S.; ZHENG, D.; LOPES-VIRELLA, M.F.; Proatherogenic and proinflammatory properties complexes prepared with purified human oxLDL antibodies and human oxLDL. **Clin Immunol**, Oct., v.105(1), p.81-92, 2002

YAMAGUCHI Y, MATSUNO S, KAGOTA S, HAGINAKA J, KUNITOMO M. - Oxidants in cigarette smoke extract modify low-density lipoprotein in the plasma and facilitate atherogenesis in the aorta of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. **Atherosclerosis** v. 156 (1) p. 109-17, 2001

YAMAWAKI, H. & IWAI, N.-Mechanisms underlying nano-sized air pollution-mediated progression of atherosclerosis- Carbon black causes cytotoxic injury/inflammation and inhibits cell growth in vascular endothelial cells. **Circ.J.** v. 70, p.129-140, 2006

YIA-HERTTUALA, S.; PALINSKI, W.; BUTLER, S. W.; PICARD, S.; STEINBERG, D. Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. **Arterioscler Thromb.**, Jan, v. 14 (1), p.32-40, 1994.

WIGREN, J.; SURAPUREDDI, S.; OLSSON, A. G.; GLASS, C.K.; HAMMARSTROM, S.; SODERSTROM, M. Differential recruitment of the coactivator proteins CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1 to peroxisome proliferator-activated receptor gamma/9-cis-retinoic acid receptor heterodimers by ligands present in oxidized low-density lipoprotein. **J. Endocrinol**, May, 177 (2), p.207-14, 2003

WICK, G.; PERSCHINKA, H.; MILLONIG, G. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update.**Trends Immunol**, dec., v.22(12), p.665-9, 2001

WITZTUM, J. L. & STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis : does it hold for humans ? **Trends Cardiovasc. Med.** Apr-May, v. 11 (3-4), p. 93-102, 2001

WU, R. & LEFVERT, K. Antibodies against oxidized low density lipoproteins oxLDL: characterization of antibody isotype, subclass, affinity and effect on the macrophage uptake of oxLDL. **Clin. Exp. Immunol** v. 102 (1), p. 174-80.

WU, R.; NITYANAND, S.; BERGLUND, L.; LITHELL, H.; HOLM, G.; LEFVERT, A.K, Antibodies against cardiolipin and oxidatively modified LDL in 50-year-old men predict myocardial infarction. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** Nov; v. 17(11), p. 3159-63, 1997

ZARATIN, A.; GIDLUND, M.; BOSCHCOV, P.; CASTILHO, L.; de FARIA, E. C. Antibodies against oxidized low-density lipoprotein in normolipidemic smokers. **Am J Cardiol. Sep** , v. 90(6), p. 651-3, 2002

ZHOU, X.; PAULSSON, G.; STEMME, S.; HANSSON, G. K. Hypercholesterolemia is associated with a T helper (TH) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E- Knockout mice. **J. Clin. Invest.** v.101, p.1717-1725, 1998.

ZHOU, X.; ROBERTSON, A-K. L.; RUDLING, M.; PARINI, P.; HANSSON, G.

K. Lesion development and response to immunization reveal a complex role for CD4 in atherosclerosis. **Circ. Res** v. 96, p. 427-434, 2005