NILSA REGINA DAMACENO RODRIGUES

Medidas de indicadores de estresse oxidativo e de remodelamento cardíaco em camundongos expostos à poluição atmosférica ambiental durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Elia Garcia Caldini

São Paulo
2007

À minha família com infinito amor,

*Ao Jorge e à Talita,
pelo carinho, incentivo e compreensão nos momentos de ausência.*

*A meus pais, Antonio e Maria Damaceno,
pelo afeto, por tudo que me ensinaram e pela presença constante.*

*À Profa. Dra. Elia Garcia Caldini, minha orientadora,
a quem admiro pelo vasto conhecimento do mundo
microscópico e pela seriedade com que conduz a pesquisa,
agradeço pelos ensinamentos, pela confiança e pela infinita paciência.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Paulo Hilário Nascimento Saldiva, Chefe do Laboratório de Poluição Atmosférica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela confiança com que me recebeu, pelo incentivo e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho que faz parte do Projeto Temático “Impacto das exposições intra-uterina e nas fases iniciais do desenvolvimento pós-natal aos poluentes atmosféricos no desenvolvimento de alterações adversas na vida adulta: estudo experimental em camundongos com ênfase nos sistemas reprodutor e respiratório”, financiado pela Fapesp nº 2003/10772-9, sob sua Coordenação.

Às Professoras Doutoras Marisa Dolhnikoff e Thaís Mauad, do Departamento de Patologia da FMUSP, que participam ativamente da Coordenação do Projeto Temático, pelo constante incentivo.

À Professora Doutora Elnara Márcia Negri, do Instituto de Laboratórios de Investigação Médica do HCFMUSP, pelo apoio desde o início da minha carreira científica e por ter me apresentado para trabalhar junto ao Projeto Temático. Ela foi minha Orientadora nos primeiros meses do Mestrado.

À Professora Doutora Cláudia Naves Battlehner, do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP, pela orientação no desenho metodológico do estudo morfométrico.

Ao Doutorando Marcelo Alves Ferreira, do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP, pela orientação e dedicação na análise estatística.

Ao Doutorando Rodolfo de Paula Vieira do Programa de Pós-graduação em Patologia da FMUSP, pelos valiosos conselhos para a realização do estudo do estresse oxidativo.

À Doutoranda Mariana Matera Veras, minha amiga e colega de Pós-graduação no Programa de Fisiopatologia Experimental da FMUSP, por estar presente em todos os momentos, pela ajuda científica e pelas palavras de confiança nos momentos difíceis.

Às Doutoradas Heloisa Maria Bueno Guimarães, Dolores Helena Rodriguez Ferreira Rivero, Mariângela Macchione e às biólogas Adriana Pires e Angélica Baganha Ferreira do Laboratório de Poluição Atmosférica da FMUSP, pelo companheirismo durante toda a manipulação dos animais experimentais, desde sua exposição aos poluentes até a coleta de material para o estudo. Sem a sua dedicação, este trabalho não seria possível.

Às Doutoradas Ana Júlia Lichtenfels e Regiani Carvalho de Oliveira, do Laboratório de Poluição Atmosférica da FMUSP, pela dedicação nos procedimentos de monitoramento das câmaras de exposição à poluição atmosférica e por compartilharem comigo seus conhecimentos.

Ao Professor Doutor Francisco Garcia Soriano e ao Doutor Hermes Vieira Barbeiro, do Laboratório de Emergências Clínicas do Departamento de Clínica Médica da FMUSP, por nos introduzir no mundo dos radicais livres durante a elaboração do projeto piloto e pelo importante apoio no decorrer do trabalho.

À Professora Doutora Cláudia Ramos Rhoden e à farmacêutica Ana Cláudia Tedesco Zanchi, do Laboratório de Estresse Oxidativo do Departamento de Ciências Fisiológicas da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, pelo profissionalismo e carinho com que me receberam para a realização de parte dos métodos de detecção de estresse oxidativo no miocárdio.

Ao Professor Doutor Roger Chammas do Departamento de Radiologia da FMUSP, pela excelência de suas Disciplinas que frequentei durante o Mestrado; suas aulas me ajudaram para o entendimento de alguns aspectos deste trabalho e contribuíram de modo essencial para minha formação como pesquisadora; seu constante interesse pelo meu trabalho foi fonte de incentivo durante todo este tempo.

À Bióloga Ângela Batista Gomes dos Santos e à Maria Cristina Medeiros, do Setor de Imunohistoquímica do Departamento de Patologia da FMUSP, pelo carinho com que realizaram as técnicas imunohistoquímicas.

Aos funcionários Hélio Correa, Maria Cecília dos Santos Lobo Marcondes, Maria Margarida Teixeira Monteiro e Maria do Rosário Loureiro Aguiar do Centro Multiusuário de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP, pela presteza na realização de preparados simplesmente perfeitos para o estudo ultra-estrutural.

À Secretária Valéria Veiga Sales, do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP, pelo carinho e profissionalismo com que conduziu a diagramação digital da dissertação.

A Loris Calzolari, pela paciência no tratamento digital das imagens apresentadas nesta Dissertação.

Às estagiárias do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP, estudantes de Ciências Biológicas da Universidade Mackenzie, Aline Borges dos Reis e Juliana Braga Furtado pelo carinho com que colaboraram nas técnicas de microscopia de luz.

A todo pessoal do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP, Adão Caetano Sobrinho, Cristina Viveiros Cordeiro da Fonseca, Gildásio Vieira Rocha, Gisele Miozzo Fink, Ivone Silva Santos, Maria Íris Amorim Mendes e Miriam Regina Pelleschi Tabora Simone, pela colaboração em diferentes tarefas durante este trabalho.

À Doutora Maria Heloisa Massola Shimizu do Laboratório de Pesquisa Básica em Doenças Renais do Departamento de Clínica Médica FMUSP pelos esclarecimentos sobre métodos de estudo do estresse oxidativo.

Às minhas irmãs Angela e Ana Luísa, aos meus cunhados Reinaldo e Aluir e aos meus sobrinhos Rafael, Carlos, Ravi e Nara, pela presença carinhosa e pelo constante incentivo ao meu trabalho.

Aos meus sogros Luiz e Jane, aos meus cunhados Silvia e Carlos pelo apoio e compreensão e às minhas sobrinhas Amanda e Júlia pelo carinho e pela alegria que contagia.

À Deus, por todas estas pessoas e outras não citadas aqui, tão sábias e generosas que participaram na realização deste trabalho.

*“A vida é generosa e, a cada sala que se vive, descobre-se tantas outras portas.
E a vida enriquece quem se arrisca a abrir novas portas”
Içami Tiba*

*“Para adquirir conhecimento, é preciso estudar; mas para adquirir
sabedoria, é preciso observar”
Marilyn vos Savant*

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	i
Resumo	iii
Abstract	iv
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Aspectos gerais sobre a poluição atmosférica	03
1.2. Alguns importantes estudos em poluição ambiental e saúde	04
1.3. Estresse oxidativo	07
1.4. Peroxidação lipídica	08
1.5. Malondialdeído e isoprostano como marcadores de peroxidação lipídica	09
1.6. Estresse oxidativo na lesão cardiovascular	11
1.7. Poluição atmosférica, doenças cardiovasculares e estresse oxidativo	13
1.8. Remodelamento arterial	14
1.9. Objetivo	16
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1. Câmaras de exposição e medidas de poluentes do ar	17
2.2. Grupos experimentais	19
2.3. Obtenção e processamento do material para o teste TBA, microscopia de luz e eletrônica	20
2.4. Avaliação de peroxidação lipídica	21
2.4.1. Quantificação de malondialdeído tecidual pelo método do TBA	21
2.4.2. Quantificação morfométrica de isoprostano tecidual	23
2.5. Estudo morfométrico do remodelamento arterial coronariano	24
2.6. Análise estatística	27
3. RESULTADOS	29
3.1. Níveis de poluição, temperatura e umidade das câmaras	29
3.2. Coloração pelo Picrossírius-hematoxilina	30
3.3. Quantificação de MDA tecidual	32
3.4. Marcação imunohistoquímica para F2-isoprostano	33
3.5. Análise ultra-estrutural	36
3.6. Análise morfométrica do remodelamento arterial no coração	38

3.6.1. Fração de área ocupada por artérias no ventrículo esquerdo	38
3.6.2. Fração de área de colágeno periarterial no ventrículo esquerdo	39
3.6.3. Área média de colágeno periarterial segundo categorias de área luminal	40
3.6.4. Área média de parede arterial segundo categorias de área luminal.....	42
3.6.5. Espessura média de parede arterial segundo categorias de área luminal	44
3.6.6. Distribuição das artérias segundo categorias da área luminal	45
4. DISCUSSÃO	48
5. CONCLUSÕES	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

Lista de abreviaturas

CL – Câmara Limpa
CP – Câmara Poluída
CO – Monóxido de carbono
DAB - Diaminobenzidina
eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial
NOS - Óxido nítrico sintase
ERO – Espécies reativas de oxigênio
 Fe^{2+} - Íon ferroso
GSH-Px – Glutathione peroxidase
 H_2O – Molécula da água
 H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio (água oxigenada)
HC - Hidrocarbonetos
HClO – Ácido hipocloroso
 H_2SO_4 – Ácido sulfúrico
KCl – Cloreto de Potássio
KPi – Tampão fosfato e potássio
LL - gestados e crescidos em câmara com ar filtrado
LP - gestados na câmara limpa e crescidos na poluída
PL - gestados na câmara poluída e crescidos na limpa
PP - gestados e crescidos em câmara com ar poluído
MDA - Malondialdeído
MP – Material Particulado
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO – Óxido nítrico
 NO_2 – Molécula do nitrogênio
 NO_x – Óxidos de nitrogênio
 O_2 – Oxigênio
 O_2^- - Superóxido
 O_3 - Ozônio
 $\text{OH}^\cdot$ - Radical hidroxila
 ONOO^- – Peroxinitrito
PBS – Tampão fosfato de sódio
PM10 – Material particulado entre 2,5 e 10 μm

PM_{2,5} - Material particulado 2,5µm

PMSF - fluoreto de fenilmetanosulfonil

SOD – Superóxido dismutase

SO_x – Óxidos de enxofre

SP – São Paulo

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

UV – Radiação ultra-violeta

Resumo

Medidas de indicadores de estresse oxidativo e de remodelamento cardíaco em camundongos expostos à poluição atmosférica ambiental durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal.

A poluição atmosférica de São Paulo (SP) pode provocar alterações cardiovasculares em seres humanos e animais experimentais, com maior vulnerabilidade em crianças e fetos. O mecanismo fisiopatológico que explicaria a relação entre a exposição aos poluentes e doenças cardiovasculares não está totalmente estabelecido, sendo que o estresse oxidativo pode estar ligado ao dano e morte celular. Há evidências de que o dano oxidativo pelo mecanismo da peroxidação lipídica pode estar relacionado às causas de diversas cardiovasculopatias. Estudamos o efeito da exposição ao ar ambiental nos níveis de peroxidação lipídica no coração de camundongos nos períodos pré e pós-natal. Os animais foram mantidos em duas câmaras de exposição, uma recebendo ar ambiente e outra ar filtrado, em quatro diferentes grupos: 1) LL: gestados e crescidos em câmara com ar filtrado, 2) PP: gestados e crescidos em câmara com ar poluído de SP, 3) PL: gestados na câmara poluída e crescidos na limpa, e 4) LP: gestados na câmara limpa e crescidos na poluída. A peroxidação lipídica do miocárdio foi avaliada tanto pelo método TBA como por imunohistoquímica para 15-F2t-isoprostano. As concentrações de malondialdeído (MDA, indicador de peroxidação lipídica) foi maior nos animais PP quando comparados aos LL ($p = 0,004$) e PL ($p = 0,026$), e não mostrou diferença significativa em relação ao grupo LP ($p = 0,894$). Os valores de MDA para animais PL e LP mostraram-se equivalentes ($p = 0,168$). Chama a atenção que o grupo PL apresentou um valor de MDA maior que o LL ($p = 0,026$). A fração de volume de miocárdio marcada imunohistoquimicamente para 15-F2t-isoprostano apresentou valores maior em PL ($p = 2,884 \times 10^{-5}$), LP ($p = 6,632 \times 10^{-6}$) e PP ($p = 5,45 \times 10^{-8}$) que em LL. O valor de PP foi maior que os de PL e LP ($p = 3,661 \times 10^{-4}$ e $1,058 \times 10^{-3}$, respectivamente), sendo esses últimos equivalentes entre si ($p = 0,624$). A análise ultra-estrutural mostrou de maneira consistente a presença de lisossomos secundários contendo estruturas lipídicas membranosas nos grupos LP e PP. A porcentagem média de arteríolas com área entre 200 e 1000 μm^2 em relação ao número total de vasos de cada grupo foi maior no grupo PP do que nos grupos LL e PL ($p=0,0387$ e $p=0,0362$, respectivamente). Estes resultados sugerem que existem altos níveis de peroxidação lipídica no tecido cardíaco dos animais expostos ao ar ambiental de SP. Chama a atenção o fato de que a exposição intra-uterina ter implicado em níveis maiores de estresse oxidativo na fase adulta, mesmo com a melhoria das condições ambientais. Compararam-se estes achados no miocárdio a outros resultados da literatura.

Descritores: Poluição do ar/efeitos adversos, Estresse oxidativo, Peroxidação de lipídeos, Colágeno, Miocárdio, Desenvolvimento embrionário e fetal, Camundongos/crescimento & desenvolvimento.

Abstract

Measurements of oxidative stress indicators and of cardiac remodeling in mice exposed to urban air pollution during embryonic and postnatal development.

It is well known that air pollution exposure in São Paulo can elicit cardiovascular injuries in humans and experimental animals and that children and fetuses appear to be particularly vulnerable. However, the mechanisms involved in this cardiovascular damage are not well understood. It has been suggested that the oxidative stress generated by air pollution exposure can trigger tissue injury. There is evidence supporting the idea that injury caused by lipid peroxidation may be related to the causes of several cardiovascular diseases. The aim of this study was to investigate the effects of prenatal and postnatal exposure to urban air pollution on the *myocardium* lipid peroxidation levels of adult mice. *Myocardium* lipid peroxidation was determined by the TBA method and by the detection of 15-F2t-isoprostan by immunohistochemical technique. The animals were placed in two chambers: one received air that passed through an air filter (clean) and the second received ambient air (polluted), according to four different exposure procedures: 1) Clean (CC): prenatal and postnatal in the clean chamber (control group), 2) Polluted (PP): prenatal and postnatal in the polluted chamber, 3) Polluted-clean (PC): prenatal in the polluted and postnatal in the clean chamber and 4) Clean-polluted (CP): prenatal in the clean and postnatal in the polluted chamber. The concentration of malondialdehyde (MDA, a indicator of lipid peroxidation) was higher in group PP compared to CC ($p = 0.004$) and to PC ($p = 0.026$), and was not different of group CP ($p = 0.894$). The values of MDA for groups PC and CP turned to be equal ($p = 0.168$). Interestingly, group PC had a higher value of MDA than group CC ($p = 0.026$). The volume fraction of myocardium with detection of 15-F2t-isoprostan is higher in PC ($p = 2.884 \times 10^{-5}$), CP ($p = 6.632 \times 10^{-6}$) and PP ($p = 5.45 \times 10^{-8}$) than in CC. The value of PP is higher than those of PC and CP ($p = 3.661 \times 10^{-4}$ and 1.058×10^{-3} , respectively), while the latter two were equal to each other ($p = 0.624$). The mean ratio of arterioles with lumen area between 200 and $1000 \mu\text{m}^2$ to the total number of vessels in each group was higher in PP than in CC and PC ($p=0.0387$ and $p=0.0362$, respectively). These results, which suggest that exposure to air pollution is associated to higher levels of lipid peroxidation in the myocardium, are compared to other results previously published about respiratory and reproductive alterations related to pollution. Interestingly, the increased levels of lipid peroxidation in the PC group gives evidence that the prenatal exposure to urban air pollution can be linked to cardiovascular effects in adult life.

Descriptors: Air pollution/adverse effects, Oxidative stress, Lipid peroxidation, Collagen, Myocardium, Embryonic and fetal development, Mice/growth & development.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A poluição atmosférica pode ser definida como o resultado da alteração das características físicas, químicas ou biológicas normais da atmosfera, de forma a causar danos ao ser humano, à fauna, à flora e aos materiais.

Em São Paulo, como em muitas metrópoles, o crescimento industrial e urbano desencadeou um dos fatores mais graves que interferem na qualidade de vida da população, a poluição atmosférica. Os veículos automotores leves e pesados são os principais causadores desta situação, cerca de 7,4 milhões de veículos, 1/5 da frota brasileira se concentra em São Paulo. As emissões lançadas no ambiente pelos veículos contêm diversas substâncias tóxicas que podem causar danos à saúde. A segunda maior causa de poluição atmosférica em São Paulo são as cerca de 2000 indústrias de alto potencial poluidor.

Estudos epidemiológicos estabeleceram que há um aumento de morbidade e mortalidade associadas a doenças cardiovasculares em populações expostas a material particulado menor ou igual a $PM_{2.5}$ e que as internações hospitalares aumentam nos períodos de maior nível de poluentes. No entanto, o mecanismo fisiopatológico que governa a relação entre a exposição aos poluentes e o aumento de mortes por doenças cardiovasculares não está totalmente estabelecido, tendo sido proposto que o estresse oxidativo, que é provocado pelo excesso de radicais livres no organismo, desempenha um papel fundamental neste processo.

Os radicais livres são moléculas muito reativas produzidas durante o metabolismo que, fisiologicamente, são neutralizadas por reações do sistema antioxidante. Quando acontece o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e o sistema antioxidante ocorre o estresse oxidativo.

Uma vez que os lipídeos são alvos da ação de radicais livres, o estresse oxidativo promove aumento de uma série de reações químicas envolvendo a deterioração oxidativa dos ácidos graxos polinsaturados. Esta peroxidação lipídica é um fenômeno autopropagativo, que leva a alterações

nas propriedades biofísicas das membranas, com perda de função, ruptura e até morte celular, estando envolvido em inúmeras doenças, como arterosclerose, insuficiência cardíaca, diabetes, síndrome do desconforto respiratório no adulto e alguns tipos de câncer.

A literatura contém muitos estudos epidemiológicos e experimentais que correlacionam poluição e estresse oxidativo com doenças cardiovasculares, mostrando que a exposição na fase pré-natal pode estar envolvida neste processo. Uma revisão apurada da literatura permite concluir que: a) os mecanismos moleculares que estão na base das alterações cardiovasculares causadas pela poluição do ar ainda não estão esclarecidos; b) a exposição prolongada aos níveis ambientais da poluição do ar de São Paulo tem potencial para promover alterações cardiovasculares; c) a fase embrionária e o início do desenvolvimento pós-natal possuem uma maior vulnerabilidade à ação dos poluentes e) a magnitude das alterações promovidas pela poluição no período de desenvolvimento intra-uterino pode ser suficiente para provocar disfunções significativas na fase adulta.

Levando estas idéias em consideração, este trabalho propõe-se a avaliar, através de uma investigação experimental controlada, o efeito da exposição de camundongos ao ar ambiental da cidade de São Paulo nos níveis de peroxidação lipídica no coração (como marcador do estresse oxidativo) e na organização histológica das artérias coronárias; o desenho experimental proposto permite avaliar se a exposição aos poluentes atmosféricos durante o desenvolvimento embrionário teria potencial para promover alterações nestes parâmetros também na vida pós-natal.

Esta Introdução pretende fazer uma breve revisão dos tópicos mais importantes relacionados aos temas que interessam diretamente a esta investigação como um subsídio para a compreensão das bases científicas desta proposta, sem a intenção de esgotar o assunto.

1.1. Aspectos gerais sobre a poluição atmosférica

De acordo com o relatório da CETESB (2005) sobre a qualidade do ar em São Paulo, as fontes de poluição na cidade são responsáveis pela emissão dos seguintes poluentes: 1,46 milhão de toneladas anuais de monóxido de carbono (CO), 354 mil toneladas anuais de hidrocarbonetos, 317 mil toneladas anuais de nitrogênio (NO_x), 28 mil toneladas de material particulado total (MP) e 12 mil toneladas anuais de óxidos de enxofre (SO_x). Desses totais os veículos são responsáveis por 97% das emissões de CO, 97% de HC, 96% NO_x , 40% de MP e 42% de SO_x .

Nas grandes cidades os principais poluentes atmosféricos relacionam-se com o tráfego de veículos automotores e são compostos por material particulado fino, respirável, associado a óxidos de nitrogênio (NO_x), ozônio (O_3) e compostos orgânicos voláteis.

A expressão “material particulado” denomina uma mistura de partículas sólidas e gotas de líquidos suspensas no ar, com tamanho variável de poucos nanômetros a dezenas de micrômetros. Originárias de fontes naturais (poeira espalhada pelo vento) ou artificiais (fumaça de cigarro, queima incompleta do combustível em veículos, setor industrial, construção civil e processos agrícolas), podem ser grandes e escuras (fumaça e fuligem) ou muito pequenas, visíveis apenas no microscópio.

O ser humano retém as partículas maiores nas vias superiores de seu aparelho respiratório. Já as menores podem atingir os alvéolos pulmonares, onde ocorrem as trocas gasosas. Em termos práticos, classifica-se o material particulado em:

PM₁₀, partículas entre 2,5 e 10 μm micrômetros de diâmetro (podem penetrar no trato respiratório inferior);

PM_{2,5}, partículas respiráveis menores que 2,5 μm (podem penetrar na região da parede do alvéolo pulmonar), e

PM_{0,1}, partículas ultrafinas menores que 100nm.

Partículas finas e ultrafinas são produzidas pela combustão de veículos automotores, enquanto que a PM₁₀ se forma por processos mecânicos que produzem uma poeira sutil de origem não combustível.

Ainda que as partículas finas e ultrafinas possam se depositar nas vias aéreas superiores, dependendo do fluxo de ar e das taxas de difusão, estas partículas penetram no interior das vias aéreas inferiores e alvéolos e lá permanecem por dias, meses ou mais tempo (Brauer et al., 2001).

Todo material particulado contém material biológico, hidrocarbonos, íons, gases reativos e metais adsorvidos a um núcleo de natureza carbônica. PM10 consiste basicamente de material biológico (pólen, bactérias), poeira grossa e sal marinho, enquanto PM2,5 constitui-se por metais, hidrocarbonetos e partículas formadas por reações químicas entre os gases poluentes. As partículas ultrafinas contribuem pouco em termos de massa, porém tem um grande poder de penetração e são as mais numerosas.

Ainda que existam descrições da relação entre níveis de PM10 e aumento de mortalidade, a maior parte dos estudos indicam que PM2,5 e PM0,1 são as frações bioativas do material particulado e, por isso, são as mais estudadas para aplicação em saúde (Stone, 2000).

1.2. Alguns importantes estudos em poluição ambiental e saúde

A exposição à poluição atmosférica em São Paulo pode provocar alterações inflamatórias das vias aéreas em animais e humanos, alterações no transporte mucociliar, alterações no perfil secretor de mucinas do epitélio respiratório e alterações do parênquima e vasos pulmonares (Böhm et al., 1989; Lemos et al., 1994; Macchione et al., 1999; Batalha et al., 2002; Saldiva et al., 2002). Sabe-se que, em curto prazo, os efeitos da poluição são mais sentidos por idosos, crianças e pessoas com problemas cardíacos e pulmonares pré-existentes (Pope & Dockery, 1992; Schwartz & Neas, 2000; Goldberg et al. 2001) e que, em longo prazo, a exposição pode reduzir a longevidade (Dockery et al., 1993; Pope et al., 1995; Schwartz, 2000) e diminuir a expectativa de vida em 1 a 2 anos para diferenças reais de exposição (Brunekreef, 1997).

Até por volta de 1990, os estudos que relacionavam os efeitos adversos da poluição na saúde populacional eram realizados a partir de

episódios determinados que levavam a um aumento dos níveis de poluentes. A partir de então, começaram a surgir estudos realizados em séries temporais, levando em consideração as estações climáticas e a variação da concentração diária dos poluentes, durante um determinado período de tempo e correlacionando-as com as taxas de mortalidade, de admissões hospitalares e outros indicativos (Brubekreef & Holgate, 2002).

Existe uma grande quantidade de estudos epidemiológicos descrevendo os riscos potenciais para a saúde devidos à exposição aos poluentes da atmosfera, tanto em adultos como em crianças, mostrando que há um aumento da mortalidade e morbidade por doenças cardiovasculares e respiratórias.

Muitos estudos correlacionam o aumento do número de admissões hospitalares e atendimentos de emergência relativos a problemas respiratórios e cardiovasculares à elevação das concentrações do material particulado no ar atmosférico de grandes cidades, como Londres (Hajat et al., 1999), São Paulo (Lin et al., 1999; Saldiva et al., 1994), Los Angeles (Ostro et al., 2001), Boston (Peters et al., 2001) e muitas outras (para revisão ver Brubekreef & Holgate, 2002).

Estas estatísticas mostram que, dentre toda a população exposta, é possível caracterizar grupos que apresentam riscos mais altos de desenvolverem manifestações clínicas relativas a esta exposição. Estes grupos são: crianças, idosos, indivíduos com doenças respiratórias e com doenças cardiovasculares. (Saldiva et al, 1995; Saldiva et al., 1998; Popler & Fanucchi, 2000).

As crianças e os fetos são particularmente vulneráveis aos agentes tóxicos. Crianças expostas a ambiente de fumaça de cigarros tem maior incidência de sintomas relacionados a doenças respiratórias como a asma. É interessante observar que o fato da mãe fumar durante a gestação ou no período perinatal parece ser mais importante para a função respiratória do filho do que o fato da mãe fumar ou não após o primeiro ano de vida da criança (Cunningham et al., 1994; Tager et al., 1993). As conclusões destes estudos sugerem que o período intra-uterino pode ser crítico, afetando, de

modo adverso, a função respiratória mais tardiamente na criança e contribuindo para o desenvolvimento da asma.

Nesta mesma linha, mas estudando os efeitos da exposição fetal no aparelho cardiovascular, Ritz et al. (2002) avaliaram neonatos entre 1987 e 1993, no sul da Califórnia, realizando o monitoramento do ar para CO, NO₂, O₃ e PM10. Os resultados mostram que mulheres expostas a altos níveis de CO, durante o segundo mês de gestação, apresentam um risco três vezes maior de gerar crianças com defeitos na septação ventricular do que mulheres submetidas a níveis menores de poluentes. Além disso, houve um aumento do risco para defeitos na aorta, nas artérias pulmonares e nas válvulas aórtica e pulmonares relacionado ao nível de O₃.

No que se refere às doenças respiratórias, sabe-se que aqueles indivíduos com doenças pulmonares infecciosas ou inflamatórias (como a asma) são mais susceptíveis que os indivíduos saudáveis, apresentando uma resposta pró-inflamatória exacerbada aos poluentes atmosféricos, o que explica o resultado obtido em relação ao aumento de morbidade e mortalidade por doenças respiratórias (Menzel, 1994).

Um dos mecanismos apontados para as lesões teciduais por poluentes é mediado pela ação de substâncias oxidativas. O dióxido de nitrogênio (NO₂) e o ozônio (O₃) ocorrem como poluentes primários. Estas substâncias são reativas e induzem a formação de espécies reativas de oxigênio. Assim sendo, a poluição determina um estresse oxidativo no tecido pulmonar levando a alterações inflamatórias e lesão celular (Menzel, 1994). As consequências secundárias desse processo, como aumento da reatividade de vias aéreas e diminuição da função pulmonar, são maiores em indivíduos com doenças pulmonares pré-existentes, como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (Kelly, 2003).

1.3. Estresse oxidativo

Radicais livres são moléculas que contêm um ou mais elétrons desapareados no seu orbital e, portanto, apresentam altíssima avides para reagir com átomos de outras moléculas. Duram miléssegundos, porém este tempo é suficiente para sua ação oxidante, tóxica para as células.

O oxigênio desempenha um papel fundamental na formação de radicais livres, pois dá origem às espécies reativas de oxigênio (ERO). As EROS mais estudadas estão listadas abaixo:

$\cdot\text{OH}^-$	Radical hidroxila
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Radical superóxido (ânion superóxido)
$\cdot\text{NO}$	Óxido nítrico
HClO	Ácido hipocloroso
ONOO^-	Peroxinitrito

Em células de mamíferos, as fontes potenciais de ERO são: respiração mitocondrial, enzimas lipoxigenase e ciclooxygenase (da via do ácido aracdônico), citocromo P450s, NO sintetase, xantina oxidase, NAD(P)H oxidases, peroxidases e enzimas de neutrófilos e macrófagos.

Durante a produção de energia na mitocôndria, 95% do oxigênio consumido pelas células é metabolizado, sendo reduzido de 4 elétrons pela citocromo oxidase. Contudo, 3 a 5% do O_2 é reduzido por menos de 4 elétrons, gerando EROs. Estas são inativadas por substâncias antioxidantes existentes tanto no meio extracelular (albumina, ceruloplasmina, vitamina A, vitamina E, vitamina C, betacaroteno, superóxido dismutase extracelular e transferrina) como no meio intracelular (glutathione peroxidase, superóxido dismutase intracelular e catalase). O equilíbrio entre os processos pró-oxidantes e anti-oxidantes constitui a condição normal da vida aeróbica. O desequilíbrio favorável ao estado pró-oxidante desencadeia o chamado estresse oxidativo. Quando uma cadeia de reações oxidativas não é

devidamente contrabalançada pelos antioxidantes, resulta em estresse oxidativo para o organismo (Halliwell, 1994).

Quando em excesso, as EROs promovem várias alterações no metabolismo de proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos, a saber: desagregam os filamentos citoplasmáticos que compõem o citoesqueleto, interferem nos mecanismos reguladores do fluxo iônico através das membranas celulares, danificam as membranas através da oxidação dos seus lipídios, podem inativar enzimas e impedir processos metabólicos, oxidam as bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos, fragilizando as cadeias de DNA e promovendo mutações.

1.4. Peroxidação lipídica

Os lipídeos constituem uma grande variedade de diferentes compostos hidrofóbicos que incluem ácidos graxos, fosfolipídeos, esteróides, e outras substâncias. Os ácidos graxos são a maior fonte de combustível metabólico, além de serem moléculas estruturais da membrana celular. Os ácidos graxos são particularmente vulneráveis à peroxidação pelo ataque por $\cdot\text{OH}^-$.

É importante saber que a peroxidação lipídica é um fenômeno que ocorre continuamente em baixos níveis nos organismos vivos; durante a respiração, o corpo produz radicais livres de oxigênio que interagem com ácidos graxos polinsaturados nas membranas celulares, iniciando o processo de peroxidação lipídica. Os ácidos graxos são convertidos em peroxilipídeos, além de originar alguns metabólitos secundários tóxicos.

São reações controladas por mecanismos biológicos de compensação através de anti-oxidantes como enzima superóxido dismutase e as vitaminas C e E. No entanto, a peroxidação descontrolada leva ao dano e morte celular (Little & Garden, 1999).

A peroxidação lipídica descontrolada é a maior fonte de produtos citotóxicos, como os aldeídos, produzidos pela decomposição de hidroperóxidos. Os principais ácidos graxos que sofrem peroxidação lipídica

na célula são o linoleico, o aracdônico, e o docosahexanóico, além de outros ácidos graxos poliinsaturados.

As reações de peroxidação são tóxicas para as membranas celulares, tornando-as mais hidrofílicas e alterando a função de transportadores, enzimas e receptores celulares aí localizados. Além disso, podem afetar lipídeos importantes para a síntese hormonal, como por exemplo, no caso da peroxidação incontrolada do ácido aracdônico; este último é precursor de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, que, entre outras coisas, atuam localmente nos vasos arteriais controlando o fluxo sanguíneo.

1.5. Malondialdeído e isoprostano como marcadores de peroxidação lipídica

Os compostos produzidos pela peroxidação lipídica atuam como biomarcadores e os métodos de quantificação destes marcadores se desenvolveram como um modo de avaliar o estresse oxidativo. Existem dois métodos básicos para a avaliação de peroxidação lipídica: avaliar os hidroperóxidos (produtos primários da reação) e avaliar os produtos de degradação secundários como o malondialdeído (MDA) ou produtos oxidativos do ácido aracdônico como os isoprostanos (Halliwell & Chirico, 1993).

Além de outros compostos de várias naturezas, a peroxidação lipídica dá origem a aldeídos insaturados que podem sofrer clivagem gerando cadeias menores de aldeídos, algumas vezes associados a outros grupamentos químicos. Alguns destes aldeídos voláteis são encontrados comumente em óleos já utilizados para frituras e em alimentos fritos, assim como são responsáveis pelo odor dos locais onde se realizaram frituras. Quando presentes em baixas concentrações fornecem o agradável odor das batatas fritas, porém em concentrações excessivas causam o desagradável odor de “ranço”.

Dentre estes aldeídos originários da peroxidação lipídica encontra-se o malondialdeído (MDA) que tem sido objeto de grande interesse apesar de sua origem complexa e ainda não totalmente esclarecida. O MDA tem sido

amplamente utilizado como marcador para estresse oxidativo (Draper & Hadley, 1990), inclusive em afecções cardíacas relacionadas ao tabagismo (Tangiverdi et al., 2006).

Outro marcador para a peroxidação lipídica, com ampla utilização nos estudos de estresse oxidativo no sistema cardiovascular (Cracowski et al., 2000; Nonaka-Sarukawa et al., 2003), é o 15-F2t-isoprostano (8-epi-PGF2 α), pertence à família de isômeros das prostaglandinas.

Entre 1975 e 1981 foram descritas várias moléculas semelhantes a prostaglandinas (PG) originadas a partir da peroxidação do ácido aracdônico “in vitro” e através de mecanismos relacionados a radicais livres independentes da ação da enzima cicloxigenase. Em 1990, os compostos semelhantes a PG-F2 foram descritos em humanos (Morrow et al., 1990). Uma vez que estes compostos são isômeros das PGF2 α formadas pela via das ciclooxygenases, foram denominados F2-isoprostanos (F2-IsoP) ou ainda isoprostaglandinas e, ao contrário das prostaglandinas são formados *in situ* em regiões esterificadas de fosfolipídeos e, posteriormente liberados por fosfolipases (Morrow et al., 1990).

A Figura abaixo ilustra a estrutura do 8-epi-PGF2 α , um dos isoprostanos mais estudados (e utilizado neste trabalho para os testes imunohistoquímicos).

Estas moléculas despertaram o interesse pelo fato de constituírem um marcador valioso para a peroxidação lipídica induzida por radicais livres. Assim, o 8-epi PGF2 α , um produto do ácido aracdônico, é um marcador importante para peroxidação lipídica em membranas. A última norma para classificação dos isoprostanos foi publicada em 1999 (Lawson et al., 1999) e recomendou-se que 8-epi-PGF2 α seja denominado 15-F2t-isoprostano.

1.6. Estresse oxidativo na lesão cardiovascular

Existem evidências crescentes de que o dano oxidativo pelo mecanismo da peroxidação lipídica pode estar relacionado aos mecanismos etiológicos de muitas doenças do envelhecimento, câncer, algumas doenças neurodegenerativas e inflamação crônica. Diversas cardiovasculopatias (como a insuficiência cardíaca congestiva, aterosclerose, hipertensão e reestenose após angioplastia) têm sido associadas ao estresse oxidativo. As células da parede vascular produzem diversas espécies reativas de oxigênio que, atuando individualmente ou em combinação, contribuem para muitas das anormalidades associadas a doenças vasculares (Nonaka-Sarukawa et al., 2003).

Os estudos em artérias *in situ* e *in vitro* têm demonstrado que as EROs podem promover tanto a vasoconstrição como a vasodilatação, através de uma ação direta nas células musculares lisas ou através de uma ação indireta, provocando alteração na produção ou na atuação dos mediadores vasoativos (Rubanyi, 1988).

A Figura abaixo mostra as principais espécies reativas de oxigênio presentes nos vasos: enzimas oxidases convertem O_2 a $O_2^{\cdot-}$, que é dismutado a H_2O_2 pela superóxido dismutase (SOD). H_2O_2 pode ser convertida a H_2O pela catalase ou pela glutathiona peroxidase (GSH-Px) ou ainda, pode ser convertida à hidroxila ($\cdot OH$) após reação com Fe^{2+} . Além disso, $O_2^{\cdot-}$ reage rapidamente com óxido nítrico ($\cdot NO$) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$).

Portanto, na fisiopatologia arterial os quatro radicais livres mais importantes são: $\cdot\text{NO}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e OONO^- .

O $\cdot\text{NO}$ é produzido normalmente no endotélio, pela enzima óxido nítrico-sintetase endotelial (eNOS); nos estados inflamatórios, a enzima NOS é expressa também nas células musculares lisas e nos macrófagos arteriais, aumentando sua produção. O $\cdot\text{NO}$ é responsável pela capacidade de vasodilatação dependente do endotélio e desempenha um importante papel no controle da agregação plaquetária e no controle da proliferação e diferenciação das células musculares lisas na túnica média.

A diminuição da biodisponibilidade de $\cdot\text{NO}$ provoca perda da capacidade de vasodilatação nas artérias (disfunção vascular de origem endotelial), o que tem graves implicações quando se trata de coronárias ou carótidas. Esta diminuição de atividade de $\cdot\text{NO}$ está associada, na maioria dos casos, a um aumento na produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ vascular.

O $\text{O}_2^{\cdot-}$ resulta da redução de um elétron do O_2 realizada por uma variedade de oxidases. Se sua produção for concomitante ou muito vizinha à produção de NO , estes se combinam rapidamente e formam (OONO^-), que é extremamente reativo, provocando a peroxidação de lipídios e adição de nitratos às proteínas.

Na ausência de $\cdot\text{NO}$ imediatamente acessível, o $\text{O}_2^{\cdot-}$ é rapidamente dismutado pela superóxido dismutase, dando origem a H_2O_2 que é mais estável. A reação do $\cdot\text{NO}$ com o $\text{O}_2^{\cdot-}$ é cerca de 3 vezes mais rápida do que com a superóxido dismutase, de modo que, em condições fisiológicas, existe sempre o consumo de $\cdot\text{NO}$ pelo $\text{O}_2^{\cdot-}$. Os anti-oxidantes minimizam esta interação e mantêm um ténue equilíbrio entre $\cdot\text{NO}$ e $\text{O}_2^{\cdot-}$.

O $\text{O}_2^{\cdot-}$ também deriva da NADPH oxidase dos macrófagos e neutrófilos. Isto explica o aumento de $\text{O}_2^{\cdot-}$ em quadros inflamatórios. Além disso, $\text{O}_2^{\cdot-}$ é produzido em células endoteliais, em células musculares lisas, fibroblastos e em células mesangiais glomerulares, por uma via semelhante àquela encontrada em neutrófilos e macrófagos, porém com uma taxa de produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ menor e constante (Berry et al., 2000). Já em tecidos

reperfundidos o radical $O_2^{\cdot-}$ deriva principalmente da enzima xantina-oxidase localizada nas células endoteliais.

1.7. Poluição atmosférica, doenças cardiovasculares e estresse oxidativo

Grandes estudos epidemiológicos estabeleceram que há um aumento de morbidade e mortalidade associadas a doenças cardiovasculares em populações expostas a material particulado menor ou igual a $PM_{2,5}$, incluindo: decréscimo na variação do ritmo cardíaco (Gold et al., 2000; Devlin et al., 2003), aumento da pressão sangüínea (Ibald-Mulli et al., 2001), arritmias cardíacas (Peters et al., 2000), progressão da arterosclerose (Suwa et al., 2002; Kunzli et al., 2005) e infarto do miocárdio (Peters et al., 2001).

Em relação somente à cidade de São Paulo, estudos epidemiológicos confirmam uma correlação entre os níveis de poluição atmosférica e o aumento da morbidade por doenças cardiovasculares em adultos (Gouveia & Fletcher, 2000; Lin et al., 2003; de Paula Santos et al., 2005; Martins et al., 2006).

No entanto, o mecanismo fisiopatológico que governa a relação entre a exposição aos poluentes e o aumento de mortes por doenças cardiovasculares não está totalmente estabelecido, tendo sido proposto que o estresse oxidativo desempenha um papel fundamental neste processo. Esta hipótese baseia-se no fato que substâncias reativas, como o dióxido de nitrogênio (NO^2) e o ozônio (O^3), com capacidade de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio, ocorrem como poluentes atmosféricos. Assim, a poluição determina um estresse oxidativo primariamente no tecido pulmonar levando a alterações inflamatórias e lesão celular (Menzel, 1994).

Ao mesmo tempo, foram feitas observações mais restritas que correlacionam afecções cardiovasculares, como a fibrilação ventricular (Peters et al., 2000), infarto do miocárdio e estreitamento da artéria braquial (Brook et al., 2003) a poluentes atmosféricos.

Os estudos mostraram ainda diversas alterações (que contribuem para maior risco de evento adverso cardiovascular) associadas a episódios

de aumento da poluição atmosférica, como por exemplo: maior viscosidade do sangue, aumento de fibrinogênio, aumento da proteína C-reativa, aumento da frequência cardíaca e aumento da arritmia cardíaca (para revisão ver Dockery, 2001; Donaldson et al., 2001; Schwartz, 2001).

Há evidências, obtidas em hamsters, de que partículas ultra-finas, encontradas na atmosfera das grandes cidades (como o amino-poliéstereno e partículas de exaustão de diesel) quando inaladas, são transportadas pelo sangue promovendo um aumento da formação de trombos (Nemmar et al., 2002). Estes achados também podem explicar a causalidade, em humanos, entre morte por infarto do miocárdio e picos ou aumento de poluentes atmosféricos.

No entanto, o mecanismo fisiopatológico que governa a relação entre a exposição aos poluentes e o aumento de mortes por doenças cardiovasculares não está totalmente estabelecido, tendo sido propostas algumas possibilidades: 1. mecanismos que envolvem aumento de substâncias pró-coagulantes como desencadeadores de infarto do miocárdio ou de acidente vascular-cerebral; 2. envolvimento do sistema nervoso autônomo provocando mudanças na frequência cardíaca e conseqüente infarto do miocárdio; 3. mecanismos que envolvem o aumento de espécies reativas de oxigênio provocando lesão endotelial.

Brook et al. (2003) propuseram que a inflamação pulmonar aguda causada pela PM_{2.5} provoca um estresse oxidativo sistêmico. A subsequente resposta inflamatória sistêmica poderia ser o elo entre a exposição ao ar poluído e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

1.8. Remodelamento arterial

O termo remodelamento arterial foi usado anteriormente para descrever qualquer alteração na estrutura da parede vascular. Mais recentemente, este termo tem sido usado para referir-se a uma mudança no tamanho de sua seção transversal, o que inclui área luminal e a parede vascular, compreendida a célula endotelial e a lâmina limitante elástica externa (Ward et al., 2000).

Se o remodelamento arterial se dá em resposta a um aumento de fluxo observa-se um aumento na produção de NO e de metaloproteinases; também observa-se apoptose das células musculares lisas e inibição de sua proliferação. Por outro lado, se ocorre uma diminuição de fluxo, observa-se uma acentuada produção de fatores mitogênicos, como o PDGF e TGF-beta, o que provavelmente estimula a proliferação de células musculares lisas e a deposição de fibras da matriz extracelular (Ward et al. 2000).

Além da mudança de número e tamanho das células, os processos de remodelamento apresentam também alterações da matriz extracelular. Por exemplo, a manutenção da espessura do vaso se deve, em grande parte, ao seu conteúdo de elastina e há evidências de alteração na sua síntese durante o remodelamento arterial (Di Stefano et al., 1998).

Em relação à matriz, a remodelamento se faz através de estímulos de síntese e degradação. As EROs são responsáveis por parte destes estímulos, provocando aumento na produção de metaloproteinases de matriz (MMP-2, que degrada o colágeno IV das lâminas basais, e MMP-9 que degrada o colágeno tipo I).

O papel do estresse oxidativo na geração, manutenção e ruptura da lesão aterosclerótica já foi descrito pormenorizadamente por muitos pesquisadores (para revisão ver Suwa et al., 2002), porém poucos se referem às modificações estruturais dos vasos decorrentes do estresse oxidativo provocado pelos poluentes atmosféricos.

Em um modelo experimental usando coelhos ateroscleróticos, Suwa et al. (2002) demonstraram que a exposição a PM10 leva a uma progressão mais rápida da placa ateromatosa em lesões coronarianas e aórticas. Estes achados podem justificar a relação existente entre poluição e aumento de mortes por causas cardiovasculares, uma vez que os vasos estão extremamente fragilizados nas regiões de placas bem estabelecidas.

Lemos et al. (2006) encontraram que, nos segmentos de maior calibre das artérias coronárias de camundongos expostos por 4 meses ao ambiente poluído de São Paulo, existe uma diminuição da relação entre a área luminal e área da parede do vaso, em secção transversa (quando comparados com

as artérias de animais que permaneceram em ambiente com ar filtrado). Estes dados são indicativos de um processo de remodelação vascular desencadeado pela exposição aos poluentes, levando a uma modificação do fluxo sanguíneo.

1.9. Objetivo

A literatura contém muitos estudos epidemiológicos e experimentais que correlacionam poluição e estresse oxidativo com doenças cardiovasculares, mostrando que a exposição na fase pré-natal pode estar envolvida neste processo. Uma revisão apurada da literatura permite concluir que: a) os mecanismos moleculares que estão na base das alterações cardiovasculares causadas pela poluição do ar ainda não estão esclarecidos; b) a exposição prolongada aos níveis ambientais da poluição do ar de São Paulo tem potencial para promover alterações cardiovasculares; c) a fase embrionária e o início do desenvolvimento pós-natal possuem uma maior vulnerabilidade à ação dos poluentes e) a magnitude das alterações promovidas pela poluição no período de desenvolvimento intra-uterino pode ser suficiente para provocar disfunções significativas na fase adulta.

Levando estas idéias em consideração, este trabalho propõe a avaliação, através de uma investigação experimental controlada, do efeito da exposição de camundongos ao ar ambiental da cidade de São Paulo nos níveis de peroxidação lipídica no coração (como indicador do estresse oxidativo) e na organização histológica das artérias coronárias; o desenho experimental proposto permite avaliar se a exposição aos poluentes atmosféricos durante o desenvolvimento embrionário teria potencial para promover alterações nestes parâmetros também na vida pós-natal.

Para tanto, foram usados métodos de identificação histoquímica e imunohistoquímica associados a métodos morfométricos em fragmentos de ventrículo esquerdo de camundongos expostos ou não a níveis ambientais de poluição atmosférica durante os períodos pré- e/ou pós-natal do desenvolvimento.

MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

A exposição dos animais foi realizada em câmaras de topo aberto localizadas no jardim da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, situado no cruzamento entre a Rua Teodoro Sampaio e a Avenida Dr. Arnaldo. Esta localização, na região central de São Paulo, caracteriza-se pela alta densidade de tráfego de automóveis e ônibus (200 ônibus por hora, em média).

2.1. Câmaras de exposição e medidas de poluentes do ar

Compreendem duas câmaras com atmosfera diversa: uma recebia ar ambiente com fluxo de 50l/min (Câmara Poluída) enquanto a outra, mantida na mesma localização, recebia ar filtrado (Câmara Limpa) com a mesma taxa de fluxo. Nas câmaras, os camundongos *Balb/c* foram mantidos nas mesmas condições de temperatura e umidade (avaliadas periodicamente), recebendo ração comercial (Nuvital-Nutrientes Ltda. Colombo, Brasil) e água *ad libitum*, 24 horas por dia, 7 dias por semana, pelo tempo de realização do experimento.

As câmaras de exposição são estruturas cilíndricas de 1,50m de diâmetro e 2,50m de altura, cobertas com plástico com proteção UV (Figura M1).

Figura M1 - Aspecto geral das câmaras de exposição localizadas no jardim da Faculdade de Medicina da USP. Fotografia cedida pelo Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, Departamento de Patologia, FMUSP.

A entrada e distribuição do ar ocorrem pela base da estrutura que possui um revestimento duplo com orifícios de distribuição. O ar é forçado para dentro das câmaras por ventiladores, e sai por uma grande abertura localizada no seu topo (Figura M2).

Figura M2 – Representação esquemática das câmaras de exposição mostrando a circulação do ar e a disposição dos filtros. Adaptado a partir de composição gráfica de autoria do Prof. Dr. Paulo Silveira, Departamento de Patologia, FMUSP.

Trata-se de um sistema normobárico, onde a pressão interna não excede a pressão atmosférica em mais que 3cm de H₂O. Na Câmara Limpa existe um sistema de filtragem do ar, próximo aos ventiladores, que contém três séries de filtros alinhados: o primeiro para as partículas grandes (Purafil São Paulo, modelo TB), o segundo para partículas finas (Purafil São Paulo, modelo JFL-90) e o último que serve para adsorver substâncias químicas (Al₂O₃ e KMnO₄). Com o uso destes filtros, pretendeu-se reduzir a presença tanto de partículas como de componentes gasosos na Câmara Limpa.

Amostras diárias da atmosfera interna das câmaras e do ambiente externo foram coletadas para a avaliação da concentração de PM₁₀ e PM_{2,5} durante o período experimental de agosto de 2005 a abril de 2006. Para tanto o material particulado foi coletado em filtros de polycarbonato utilizando-se impactadores do tipo Harvard e analisados gravimetricamente.

2.2. Grupos experimentais

Todos os animais estudados foram gestados nas câmaras limpa ou poluída. Para tanto, seus genitores cresceram em cada uma das câmaras, desde os 10 dias de vida. Após 4 meses de exposição ao ar filtrado ou ar ambiente em cada câmara, 10 fêmeas que apresentaram 3 ciclos estrais regulares foram colocadas para acasalar. Após confirmação do acasalamento (pela observação do *plug* vaginal) os machos foram sacrificados e as fêmeas prenhas permaneceram nas respectivas câmaras durante o período de gestação (período de exposição pré-natal). Um dia após o nascimento os filhotes de 5 fêmeas de cada câmara (juntamente com suas mães) fizeram intercâmbio entre as câmaras enquanto que os filhotes de outras 5 fêmeas permaneceram nas câmaras de origem. Após o desmame, as fêmeas (mães e filhotes) foram separadas e a exposição dos filhotes machos continuou até 3 meses de idade (Figura M3).

Figura M3 – Representação esquemática da obtenção dos animais experimentais, com exposição diferencial aos poluentes ambientais nas fases pré- e/ou pós-natal.

Assim sendo, os grupos experimentais desta investigação foram constituídos por camundongos machos, assim distribuídos, de acordo com a exposição diferencial aos poluentes atmosféricos durante a gestação e o crescimento:

Grupo LL: camundongos gestados e crescidos na câmara limpa (n = 8);

Grupo LP: camundongos gestados na câmara limpa e crescidos na câmara poluída (n = 11);

Grupo PP: camundongos gestados e crescidos na câmara poluída (n = 9), e

Grupo PL: camundongos gestados na câmara poluída e crescidos na câmara limpa (n = 10).

2.3. Obtenção e processamento do material para o teste TBA, microscopia de luz e eletrônica

Para a coleta de material, os animais foram anestesiados com Tiopental sódico (0,5mg/15ml de solução fisiológica); a caixa torácica foi aberta e o coração foi dissecado. O coração foi dividido ao meio segundo um plano coronal: a porção dedicada para a avaliação bioquímica da peroxidação lipídica foi identificada, congelada em nitrogênio líquido e em seguida em freezer -70°C; da outra metade foram obtidos pequenos fragmentos para microscopia eletrônica (fixados com glutaraldeído a 2% em tampão fosfato de sódio e potássio 0,15M, pH 7,2 e processados segundo rotina do Centro Multiusuário de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Biologia Celular da FMUSP); o restante foi destinado à microscopia de luz sendo fixado em paraformaldeído 4% em tampão fosfato, pH 7,0, por 24 horas, desidratado em gradiente alcoólico (70° a 100°), diafanizado em xilol e embocado em parafina; foram obtidos cortes de 4µm (em micrótomo Leica RM2065) para a realização de estudos morfométricos e imunohistoquímicos.

2.4. Avaliação de peroxidação lipídica

2.4.1. Quantificação de malondialdeído tecidual pelo método do TBA

Princípio do método: este método baseia-se no fato que alguns produtos da peroxidação lipídica são reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBA); desta forma, quando se adiciona TBA a uma amostra de material biológico é possível detectar a presença destas substâncias conhecidas como TBARS (do inglês, *thiobarbituric acid-reactive substances*). Apesar de um grande número de substâncias apresentarem este tipo de reatividade, o malondialdeído (MDA) é a principal delas, sendo um dos produtos finais do processo de oxidação e decomposição de ácidos graxos polinsaturados. No teste TBA, cada molécula de MDA se complexa a duas de TBA resultando na formação de adutos que podem ser quantificados por espectrofotometria. Sua detecção no tecido ou plasma é um forte indicativo da ocorrência de peroxidação lipídica e, portanto, do estresse oxidativo (Buege & Aust, 1978). Uma vez que o teste TBA usa o MDA para se obter a curva-padrão de calibração, o resultado da leitura de TBARS no espectrofotômetro tem sido utilizado como equivalente ao MDA (Little & Gladen, 1999).

Procedimento técnico: todas as reações foram realizadas no Laboratório de Estresse Oxidativo do Departamento de Ciências Fisiológicas da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, sob supervisão da Profa. Dra. Claudia Ramos Rhoden.

Preparo dos homogenatos: fragmentos de coração foram descongelados, pesados em balança analítica e homogeneizados em tampão Kpi (KCl 1,15%), pH 7.4, na proporção de 7ml/g de tecido. As enzimas teciduais foram inativadas com a adição de fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) 0,5mM em álcool anidro (1µl de PMSF/ml de tampão KPi). A homogeneização foi realizada manualmente com pistilo de porcelana contando 30 movimentos de rotação e de compressão das estruturas (NEVES, 1997). A seguir, os homogenatos foram centrifugados a 1000 rpm, por 10 minutos, a 6°C e o sobrenadante foi colocado em tubos tipo *eppendorf*.

Dosagem de proteínas pelo método de Bradford: esta técnica baseia-se na interação entre o corante Comassie brilliant blue BG-250 e as macromoléculas proteicas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. A interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595nm (Bradford,1976). Para a dosagem protéica no tecido cardíaco, 10µl do homogenato foram diluídos em 190µl de água destilada. Foram colocados 20µl desta solução em cubetas contendo 1,0ml do reagente de Bradford. Duas cubetas, contendo 20µl de água destilada e 1,0ml do reagente, foram utilizadas como “branco” para calibração do aparelho. A absorbância foi lida a 595nm em espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 40 e os cálculos foram realizados, utilizando-se a equação $y = 0,0195 x + 0,1933$, gerada pela curva padrão obtida a partir de soluções com concentrações conhecidas de albumina em Reagente de Bradford, onde y = absorbância e x = concentração de proteínas.

Detecção e quantificação de MDA: a 125µl de homogenato tecidual foram adicionados 375µl de ácido tricloroacético (TCA) 10%, para promover a precipitação das proteínas. Após 5 segundos de agitação no Vórtex, os tubos permaneceram em banho de gelo por 30 minutos e foram centrifugados em centrífuga refrigerada a 3000 rpm, por 10 minutos, sob temperatura inferior à 10°C. Em tubos de vidro, foram colocados 250µl de sobrenadante e 250µl de ácido tiobarbitúrico 0,67% (Sigma, St. Louis, MO, USA), de acordo com Neves, 1997. A solução foi agitada no Vórtex por 5 segundos e, a seguir, aquecida em banho-maria a 100°C por 15 minutos. Após resfriamento em banho de gelo, acrescentaram-se 750µl de álcool n-butílico em cada tubo, promovendo a extração do produto corado (MDA+TBA) da solução aquosa. Após agitação (por 40 segundos) no Vórtex e centrifugação a 2000 rpm, por 5 min, o sobrenadante corado foi colocado em cubetas para a leitura em espectrofotômetro a 535 nm (Buege & Aust, 1978). A concentração de MDA em cada cubeta foi expressa em nmol de MDA/mg de proteína. Para o cálculo da concentração de MDA foi utilizada a

equação $y = 0,0086 x$, obtida a partir da curva padrão de absorvância gerada por concentrações conhecidas de padrão de 1,1,3,3-tetrametoxipropano 100nm/ml em solução de H_2SO_4 1%.

2.4.2. Quantificação morfométrica de isoprostano tecidual

Procedimento técnico de imunohistoquímica: cortes histológicos de 4µm foram recolhidos em lâminas silanizadas. A desparafinização deu-se em banho de xilol a quente, em estufa a 60 – 65°C, durante 20 minutos e 3 banhos de xilol frio, por 1 minuto em cada. A hidratação deu-se por banhos em álcool 95º e 70º por 1 minuto e lavagem em água corrente e depois em água deionizada. A peroxidase endógena foi inibida com banhos em água oxigenada 10 volumes durante 5 minutos (5 vezes). A seguir, os cortes histológicos foram lavados em água corrente, em água deionizada e em PBS. As reações inespecíficas foram bloqueadas através de banho de leite desnatado 6% por 30 minutos. As lâminas foram incubadas, em câmara úmida, por 18 horas, com anticorpo primário anti-8-epi-PGF2α de cabra (IS-20, Oxford Biomedical) previamente titulado em albumina bovina 5%, diluição 1:500; após lavagem em PBS, os cortes histológicos foram incubados com anticorpo secundário biotinilado (Vector IgG-goat) durante 1 hora, a 37°C. A seguir, foram lavados em PBS, deu-se a incubação com o complexo conjugado a peroxidase (Dako L120SAB+) e, finalmente, a reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos. Os núcleos foram evidenciados por contra-coloração com hematoxilina. Após desidratação em série alcoólica crescente e diafanização em xilol, as lâminas foram examinadas em microscópio de luz.

Procedimento para análise morfométrica: as células marcadas positivamente para 15-F2t -isoprostano foram avaliadas quantitativamente. Foram estudados preparados histológicos provenientes de 5 animais de cada grupo experimental. Em cada corte histológico foi analisada toda a extensão do tecido miocárdico representada. As contagens foram realizadas ao microscópio de luz com aumento de 400 vezes (objetiva 40x e ocular 10x), contendo um retículo de pontos acoplado à ocular microscópica. O

retículo consistia de 7 linhas horizontais e 7 linhas verticais, distando 50µm entre si, correspondendo a 49 pontos formados pelas intersecções das linhas. Determinou-se a quantidade de pontos sobrepostos sobre tecido cardíaco (de modo geral) e a quantidade de pontos sobrepostos a regiões de células musculares positivas para isoprosano; assim, a fração de área ocupada por regiões isoprostano positivas pode ser calculada pela relação:

$$\text{Fração de área positiva para isoprostano} = \frac{\text{Pontos incidentes em regiões marcadas}}{\text{Pontos incidentes em tecido cardíaco}}$$

2.5. Estudo morfométrico do remodelamento arterial coronariano

Foram avaliados morfometricamente fragmentos de coração provenientes de 5 animais de cada grupo experimental. Os preparados histológicos foram corados com Picrossírius-hematoxilina e o estudo foi realizado com auxílio do programa de análises de imagens digitais Image Pro-Plus (Media Cybernetics, USA) acoplado a um microscópio de luz Nikon Opitphot.

Princípio do método de coloração: o corante Sirius Red é uma molécula alongada, de PM 1372Da, com seis grupamentos sulfônicos ácidos e quatro grupamentos cromofóricos diazólicos. Demonstrou-se que os grupamentos sulfônicos do corante interagem fortemente com os aminoácidos básicos das moléculas dos diferentes tipos de colágeno, conferindo-lhe intensa cor vermelha, sendo assim muito apropriado para sua identificação em cortes histológicos de rotina (Montes & Junqueira, 1988).

Procedimento técnico: os cortes histológicos foram desparafinados em xilol, hidratados em gradiente alcoólico (100º a 70º) e água e corados durante uma hora em uma solução 0,1% de Sirius Red dissolvido em solução aquosa saturada de ácido pícrico. Os cortes foram então lavados em água

corrente e contracorados com hematoxilina de Harris fresca durante dois minutos; a seguir, foram lavados em água corrente, desidratados em gradiente alcoólico (70º a 100º), diafanizados em xilol e montados com lamínula e *entellan* para análise microscópica.

Procedimento para análise morfométrica: Para estimativa da área total de tecido cardíaco em cada preparado histológico, imagens de um retículo formado por linhas verticais e horizontais paralelas separadas por 112µm foram sobrepostas às imagens do corte histológico capturadas com aumento de 100 vezes (objetiva 10x e ocular fotográfica 10x). Foram contados pontos incidentes em tecido cardíaco e área correspondente é calculada por:

$$\text{Área de tecido cardíaco} = 112^2 \times \text{pontos incidentes no tecido cardíaco}$$

Com a objetiva de 40x foram obtidas imagens de todas as artérias e arteríolas presentes nos cortes histológicos. Um retículo formado por linhas verticais e horizontais paralelas separadas por 7µm foi sobreposto a cada uma das imagens. Desta forma, foram discriminados pontos incidentes na luz e na parede arterial (considerada somente como camadas íntima e média) e pontos incidentes no colágeno periarterial. Optou-se por medir todo colágeno perivascular devido ao fato que os limites entre a adventícia e o restante do tecido conjuntivo perivascular não são definidos. Com estes dados foi possível calcular a fração de área arterial e a fração de colágeno periarterial, para cada uma das artérias presentes em cada corte histológico, de acordo com as equações:

$$\text{Área arterial} = 7^2 (\text{pontos na luz e na parede arterial})$$

$$\text{Área de fibras de colágeno periarteriais} = 7^2 (\text{pontos incidentes nas fibras de colágeno})$$

Em seguida, foram calculadas a fração de área arterial e a fração de colágeno periarterial no tecido cardíaco, segundo as equações:

$$\text{Fração de área arterial} = \frac{\text{Área arterial}}{\text{Área de tecido cardíaco}}$$

$$\text{Fração de área de colágeno periarterial} = \frac{\text{Área de colágeno periarterial}}{\text{Área de tecido cardíaco}}$$

Uma vez que vasos arteriais de diferentes calibres apresentam propriedades hemodinâmicas diferentes, é necessário investigar sua distribuição no tecido, segundo a área luminal “real”. Esta última não pode ser estimada a partir de pontos incidentes, pois haveria um grande erro, uma vez que a luz de um mesmo vaso, em um corte histológico, pode aparecer maior ou menor dependendo, não somente do seu calibre “real”, mas também do plano de corte (transversal, longitudinal ou oblíquo) em que este vaso foi seccionado durante a microtomia. Para evitar este problema, as medidas do diâmetro “real” da luz (e por conseqüência da área “real”) deveriam ser tomadas somente de vasos seccionados transversalmente, o que diminuiria drasticamente a quantidade de vasos que poderiam ser analisados. Optou-se então pela estimativa da área da luz de cada perfil arterial, independente do plano de corte, a partir do valor do menor diâmetro (D) da luz, pois este valor é aquele que, teoricamente, mais se aproxima do diâmetro “real” do vaso (Figura M4).

Figura M4. Ilustração do efeito da orientação do plano de corte nos perfis arteriais (D: menor diâmetro da luz).

A partir destas medidas calculou-se a área “real” da luz de cada artéria, com a equação:

$$\text{Área de luz arterial} = \pi (D/2)^2$$

Os vasos foram, então, divididos em três categorias de acordo com a área da luz (obtida através do menor diâmetro do perfil histológico): até $200\mu\text{m}^2$, entre 200 e $1000\mu\text{m}^2$ e maiores que $1000\mu\text{m}^2$, em uma tentativa de se classificar de acordo com classes funcionais diferentes, respectivamente, arteríolas, artérias de pequeno calibre e calibres médios.

A partir desta classificação, calculou-se a distribuição dos vasos em cada categoria para todos os grupos experimentais.

Além disso, os parâmetros área de colágeno periarterial, área e espessura de parede arterial e a relação colágeno/parede foram analisados para cada uma das categorias de área arterial nos quatro grupos experimentais.

2.6. Análise estatística

Todas as medidas foram computadas e foram obtidos valores médios para cada animal. Assim sendo, cada ponto representa a média de um animal.

Na comparação dos níveis de poluição entre as câmaras foi utilizado o Teste *t* pareado.

Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade da distribuição dos dados por grupo. Se a distribuição era normal, foi feito o teste de análise de variância (ANOVA), seguido de comparações dois a dois de Tukey.

Nos casos em que os dados não apresentaram distribuição normal, conforme revelado pelo teste Shapiro-Wilk, optou-se pela aplicação de um

teste não-paramétrico (Mann-Whitney) para a comparação dos grupos dois a dois.

Foi utilizado um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). Assim sendo, os testes que apresentaram nível descritivo menor que 5% ($p<0,05$) foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Níveis de poluição, temperatura e umidade das câmaras

A variação nas concentrações de PM_{2,5} e PM₁₀ nas câmaras de exposição durante o período experimental está nos Gráficos 1 e 2.

Gráfico 1 – Variação na concentração de PM_{2,5} durante o período de agosto de 2005 a abril de 2006. A descontinuidade deveu-se a dados perdidos durante o mês de novembro de 2005. (CP: Câmara Limpa; CL: Câmara Poluída).

Gráfico 2 – Variação na concentração de PM₁₀ durante o período de agosto de 2005 a abril de 2006. (CP: Câmara Poluída; CL: Câmara Limpa).

A média dos valores da concentração de PM10 e PM2,5 durante a exposição estão mostrados na Tabela 1. A análise estatística, através do Teste *t* mostrou que há uma redução significativa nos níveis de PM2,5 na Câmara Limpa quando comparada com a Câmara Poluída ($p < 0,001$).

Tabela 1 - Descrição da análise estatística dos parâmetros de poluição atmosférica medidos durante o período de exposição nas câmaras limpa e poluída.

	PM2,5 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)		PM10 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	
	Câmara Poluída	Câmara Limpa	Câmara Poluída	Câmara Limpa
Média	24,69	9,09	32,40	6,63
DP	13,85	6,19	16,82	6,01
<i>p</i>	<0,001		0,039	

DP = desvio padrão; PM10 = material particulado com diâmetro superior a 10 μm . PM2,5 = material particulado com diâmetro entre 2,5 e 10 μm .

A filtração do PM2,5 não foi completa na Câmara Limpa, com eficiência de 68% em relação à Câmara Poluída (dado do Prof. Paulo Saldiva, do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da FMUSP).

Não houve diferença na temperatura e umidade entre as duas câmaras. As taxas de umidade máxima interna nas câmaras limpa e poluída foram, respectivamente, $80,06 \pm 7,36\%$ e $83,52 \pm 6,46\%$. As taxas de umidade mínima interna foram, respectivamente, $49,52 \pm 10,12\%$ e $48,23 \pm 13,37\%$. As temperaturas internas máximas foram $27,91 \pm 5,07$ e $27,75 \pm 3,36^\circ\text{C}$, respectivamente, enquanto que as temperaturas internas mínimas foram $18,47 \pm 2,88$ e $17,54 \pm 2,79^\circ\text{C}$, respectivamente.

3.2. Coloração pelo Picrosírius-hematoxilina

A coloração pelo Picrosírius-hematoxilina resultou em preparados histológicos representativos, nos quais foi possível distinguir o componente vascular. Os cardiomiócitos coraram-se fracamente enquanto que o colágeno corou-se de vermelho intenso (Figuras R1 a R4).

Figuras R1 a R4 – Imagens de cortes histológicos de coração dos animais experimentais. Os preparados foram corados com Picrossírius-hematoxilina e as imagens foram obtidas ao microscópio de luz. O Picrossírius se liga aos componentes tissulares de caráter básico, conferindo ao citoplasma uma coloração clara suficiente para a definição dos limites celulares. Observa-se que as fibras de colágeno presentes na matriz extracelular se destacam por sua intensa coloração vermelha. Os núcleos coram-se pela hematoxilina. Os limites entre células e matriz são nítidos, servindo a estudos morfométricos onde interessam tanto elementos celulares como de matriz extracelular, como neste trabalho. As imagens mostram elementos arteriais de diferentes calibres presentes no interstício cardíaco. Observa-se que à medida que o diâmetro da luz diminui (de R1 a R4), a contribuição da parede músculo e do colágeno periarterial é mais representativa, alcançando valores mais altos nas pequenas arteríolas (R4). O possível remodelamento coronariano, em reação às agressões da poluição atmosférica, poderia acarretar desajustes hemodinâmicos.

3.3. Quantificação de MDA tecidual

Para estimar o grau de estresse oxidativo, a concentração de MDA foi avaliada no tecido cardíaco dos animais experimentais através do teste TBA. Os resultados obtidos para média, desvio padrão e mediana na avaliação espectrofotométrica de TBARS estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 – Concentração de malondialdeído (MDA) no tecido cardíaco de animais dos grupos da segunda geração. Os valores estão expressos em nmolMDA/mg de proteína.

	Grupo LL	Grupo PL	Grupo LP	Grupo PP
Média ± DP	0,306 ± 0,245	0,767 ± 0,503	2,449 ± 2,375	2,687 ± 2,700
Mediana	0,251	0,557	1,601	1,559

DP = desvio padrão; LL = animais gestados e crescidos na câmara limpa; PL = animais gestados na câmara poluída e crescidos na limpa; LP = animais gestados na câmara limpa e crescidos na poluída; PP = animais gestados e crescidos na câmara poluída.

Estes dados foram analisados estatisticamente pelo Teste de Mann-Whitney e os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultado da análise estatística para os valores relativos à concentração de MDA no tecido cardíaco. Estão indicados os valores de *p*. As diferenças são significativas do ponto de vista estatístico quando o valor de *p* é menor que 0,05 (asterisco).

	PL	LP	PP
LL	0,02618*	0,008132*	0,00405*
PL	-	0,1684	0,0257*
LP	-	-	0,8940

LL = animais gestados e crescidos na câmara limpa; PL = animais gestados na câmara poluída e crescidos na limpa; LP = animais gestados na câmara limpa e crescidos na poluída; PP = animais gestados e crescidos na câmara poluída.

A concentração de MDA no tecido cardíaco dos animais do grupo LL é significativamente menor do que todos os outros grupos. Por sua vez, nos animais do grupo PP é significativamente maior que em LL e em PL e

equivale àquela do grupo LP. Os valores de MDA para animais PL e LP mostraram-se estatisticamente equivalentes entre si. Chama a atenção o fato de que animais do grupo PL apresentem um valor de MDA significativamente maior que animais LL.

O Gráfico 3 representa esquematicamente a distribuição destes valores.

Gráfico 3 - Box-plots representativos das medidas de MDA para os vários grupos experimentais. LL = animais gestados e crescidos na câmara limpa; PL = animais gestados na câmara poluída e crescidos na limpa; LP = animais gestados na câmara limpa e crescidos na poluída e PP = animais gestados e crescidos na câmara poluída. Grupos marcados com triângulo são diferentes de PP e grupos marcados com estrela são diferentes de LL.

3.4. Marcação imunohistoquímica para F2-isoprostano

A marcação imunológica para avaliar F2-isoprostano teve contraste suficiente para ser quantificada nos preparados histológicos em microscopia de luz. A marcação foi esparsa nos cortes correspondentes aos animais do grupo LL, enquanto que o miocárdio dos animais dos outros três grupos mostrou-se densamente marcados. As Figuras R5 a R8 ilustram estes aspectos.

Figuras R5 a R8 – Imagens de cortes histológicos de coração dos animais experimentais. Os preparados estão marcados positivamente pela reação imunohistoquímica para identificar F2-isoprostano. A marcação específica deu-se no citoplasma das células musculares cardíacas. A Figura R5 representa os resultados obtidos de um animal do grupo LL: apenas algumas células esparsas mostraram-se positivas para o marcador. Os animais dos grupos PL (Fig. R6) e LP (Fig. R7) mostraram níveis intermediários de marcação, enquanto que o grupo PP (Fig. R8) apresentou maior intensidade de células marcadas. Preparados como estes aqui apresentados foram utilizados para a quantificação da marcação para F2-isoprostano.

O estudo quantitativo da fração de área de miocárdio marcado para 15-F2t-isoprostano foi realizado em preparados histológicos provenientes de 7 animais de cada grupo. A Tabela 4 contém um resumo dos resultados obtidos.

Tabela 4 – Fração de área de miocárdio positiva para a reação imunohistoquímica para detecção de 15-F2t-isoprostano.

	Grupo LL	Grupo PL	Grupo LP	Grupo PP
Média ± DP	0,033 ± 0,055	0,136 ± 0,088	0,149 ± 0,090	0,293 ± 0,180

DP = desvio padrão; LL = animais gestados e crescidos na câmara limpa; PL = animais gestados na câmara poluída e crescidos na limpa; LP = animais gestados na câmara limpa e crescidos na poluída; PP = animais gestados e crescidos na câmara poluída.

A Tabela 5 corresponde ao resultado da análise estatística dos dados relatados na Tabela 4.

Tabela 5 – Descrição do resultado da análise estatística para os valores de fração de área de miocárdio marcada pelo 15-F2t-isoprostano. Estão indicados os valores de p obtidos através da aplicação do Teste de Mann-Whitney. As diferenças são significativas, do ponto de vista estatístico, quando o valor de p é menor que 0,05 (asterisco).

	Grupo PL	Grupo LP	Grupo PP
Grupo LL	2,884x10 ⁻⁵ *	6,632x10 ⁻⁶ *	5,450x10 ⁻⁸ *
Grupo PL	-	0,624	3,661x10 ⁻⁴ *
Grupo LP	-	-	1,058x10 ⁻³ *

LL = animais gestados e crescidos na câmara limpa; PL = animais gestados na câmara poluída e crescidos na limpa; LP = animais gestados na câmara limpa e crescidos na poluída; PP = animais gestados e crescidos na câmara poluída.

Verifica-se que a fração de área ocupada pela marcação para 15-F2t-isoprostano é significativamente menor nos animais do grupo LL (o que corresponde à Fig. R5) do que nos animais em PL, LP e PP. Por sua vez, a marcação em PP (Fig. R8) é maior que todos os outros grupos. PL e LP são equivalentes entre si. Estes resultados estão resumidos no Gráfico 4.

Gráfico 4 – Fração de área ocupada por marcação imunohistoquímica para 15-F2t-isoprostrano no miocárdio de animais experimentais. LL = animais gestados e crescidos na câmara limpa; PL = animais gestados na câmara poluída e crescidos na limpa; LP = animais gestados na câmara limpa e crescidos na poluída e PP = animais gestados e crescidos na câmara poluída. Grupos marcados com triângulo são diferentes de PP e grupos marcados com estrela são diferentes de LL.

3.5. Análise ultra-estrutural

O material estudado encontrava-se sem alterações artefactuais de fixação e microtomia. Não foi detectado nenhum aspecto que pudesse ser associado a alterações patológicas. As organelas se apresentavam íntegras, inclusive as mitocôndrias. A organização das miofibrilas estava íntegra, assim como as junções intercelulares típicas do músculo cardíaco. A análise mais pormenorizada mostrou que Grupos LP e PP possuíam indícios de alto metabolismo relacionado a lípides ou processos de digestão intracelular de membrana, apresentando lisossomos secundários com padrão de “figuras de mielina” e “corpos multivesiculares” localizados tanto junto ao núcleo como na região periférica do citoplasma. Também foram observadas vesículas irregulares perinucleares. Estes componentes foram identificados tanto nos cardiomiócitos como nos fibroblastos intersticiais. As figuras R9 a R12 ilustram estes aspectos.

Figuras R9 a R12 – Micrografias eletrônicas obtidas a partir do tecido cardíaco dos animais experimentais. Mio = miofibrilas; N = núcleo; asterisco = mitocôndrias. A Figura R9 corresponde a um cardiomiócito de um animal do grupo PP, onde é possível observar a presença de vesículas com perfil irregular delimitadas por membrana (setas) vizinhas ao núcleo da célula. Observar que as cristas e a matriz das mitocôndrias estão preservadas, assim como a organização das miofibrilas. A Figura R10 corresponde a um animal também do grupo PP. Observam-se dois cardiomiócitos vizinhos contendo estruturas membranosas, denominadas “figuras de mielina” que aparecem como resultado da digestão parcial de membranas celulares no interior dos lisossomos (setas). A Figura R11 mostra este mesmo tipo de estrutura em fase de formação mais precoce (seta), enquanto que a Figura R12 (de menor aumento) mostra que há regiões celulares nas quais é possível perceber maior densidade de alterações relacionadas ao metabolismo de membranas (setas). Estes achados foram consistentemente encontrados nos animais dos grupos PP e LP, sendo mais esporádicos nos grupos LL e PL.

3.6. Análise morfométrica do remodelamento arterial no coração

3.6.1. Fração de área ocupada por artérias no ventrículo esquerdo

A Tabela 6 mostra as médias obtidas para os cinco animais de cada grupo para fração de área de tecido ocupada por artérias, através do método da contagem de pontos. O Gráfico 5 ilustra estes dados.

Tabela 6 - Valores de média por animal para a fração de área ocupada por vasos arteriais no ventrículo esquerdo

	LL	PL	LP	PP
1	0,00009	0,00011	0,00028	0,00035
2	0,00016	0,00016	0,00009	0,00030
3	0,00043	0,00010	0,00019	0,00012
4	0,00039	0,00036	0,00036	0,00020
5	0,00047	0,00017	0,00009	0,00074
Média Geral por grupo	0,0309	0,0182	0,0202	0,0342
Desvio padrão	0,00017	0,00011	0,00012	0,00024

LL = animais gestados e crescidos na câmara limpa; PL = animais gestados na câmara poluída e crescidos na limpa; LP = animais gestados na câmara limpa e crescidos na poluída; PP = animais gestados e crescidos na câmara poluída.

Gráfico 5 – Fração de área ocupada por marcação ocupada por vasos arteriais no ventrículo esquerdo dos animais experimentais. LL = animais gestados e crescidos na câmara limpa; PL = animais gestados na câmara poluída e crescidos na limpa; LP = animais gestados na câmara limpa e crescidos na poluída e PP = animais gestados e crescidos na câmara poluída.

Os resultados da análise estatística destes dados estão na Tabela 7.

Tabela 7 – Comparação entre os 4 grupos de estudo através de Análise de Variância (ANOVA)

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	9,26E-08	3	3,09E-08	1,087642	0,38269	3,238867
Dentro dos grupos	4,54E-07	16	2,84E-08			
Total	5,47E-07	19				

O valor de p se mostrou maior que 0,05, o que levou a conclusão que não há diferença significativa entre os grupos.

3.6.2. Fração de área de colágeno periarterial no ventrículo esquerdo

Os valores médios obtidos para cada animal resultantes da contagem de pontos incidentes no colágeno perivascular de todas as artérias presentes nos cortes histológicos analisados estão representados na Tabela 8 e no Gráfico 6.

Tabela 8 - Valores da média das frações de área ocupadas pelo colágeno perivascular no ventrículo esquerdo.

	LL	PL	LP	PP
1	0,00008144	0,00009959	0,00014154	0,00036441
2	0,00010735	0,00012952	0,00004865	0,00018535
3	0,00018512	0,00006887	0,00017434	0,00008310
4	0,00031808	0,00023855	0,00028512	0,00019472
5	0,00037261	0,00011836	0,00009355	0,00034047
Média	0,00021	0,00013	0,00015	0,00023
desvio padrão	0,00013	0,00006	0,00009	0,00012

LL = animais gestados e crescidos na câmara limpa; PL = animais gestados na câmara poluída e crescidos na limpa; LP = animais gestados na câmara limpa e crescidos na poluída; PP = animais gestados e crescidos na câmara poluída.

Gráfico 6 – Média da fração de área ocupada por colágeno periarterial para cada grupo. LL = animais gestados e crescidos na câmara limpa; PL = animais gestados na câmara poluída e crescidos na limpa; LP = animais gestados na câmara limpa e crescidos na poluída e PP = animais gestados e crescidos na câmara poluída.

Os resultados da análise estatística destes dados estão na Tabela 9.

Tabela 9 - Comparação entre os 4 grupos de estudo através de Análise de Variância

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	3,67E-08	3	1,22E-08	1,152368	0,3584	3,238867
Dentro dos grupos	1,7E-07	16	1,06E-08			
Total	2,06E-07	19				

O valor de p se mostrou maior que 0,05, o que levou a conclusão que não há diferença significativa entre os grupos.

3.6.3. Área média de colágeno periarterial segundo categorias de área luminal

Conforme explicado no Material e Métodos, cada artéria foi classificada dentro uma das três categorias pré-estabelecidas de área luminal. A área luminal “real” de cada artéria foi calculada pela medida do seu menor diâmetro luminal.

Os valores médios de área de colágeno para cada categoria arterial estão mostrados na Tabela 10 e representados no Gráfico 7.

Tabela 10 – Valores, em μm^2 , da média da área ocupada por colágeno periarterial em cada categoria de artérias, de acordo com a área luminal.

		LL	PL	LP	PP
média	Categoria 1	1319,104	872,2198	1056,952	1542,956
média	Categoria 2	2345,467	3736,32	3131,707	3877,751
média	Categoria 3	12720,4	7576,8	11816,84	18060,93

LL = animais gestados e crescidos na câmara limpa; PL = animais gestados na câmara poluída e crescidos na limpa; LP = animais gestados na câmara limpa e crescidos na poluída; PP = animais gestados e crescidos na câmara poluída.

Gráfico 7 – Representação dos valores médios da área de colágeno periarterial para cada categoria de vaso (de acordo com a área luminal) nos diferentes grupos. LL = animais gestados e crescidos na câmara limpa; PL = animais gestados na câmara poluída e crescidos na limpa; LP = animais gestados na câmara limpa e crescidos na poluída e PP = animais gestados e crescidos na câmara poluída.

Comparando-se os 4 grupos de estudo entre si em cada uma das categorias através de Análise de Variância (ANOVA) pudemos verificar que

não há diferenças significativas para a área ocupada por colágeno entre os grupos em cada categoria (Tabela 11, 12 e 13, $p = 0,181$, $0,113$ e $0,33$, respectivamente).

Tabela 11 - Comparação entre os 4 grupos dentro da Categoria 1 de área luminal, através de Análise de Variância

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1298438	3	432812,6	1,8324	0,181903	3,238867
Dentro dos grupos	3779197	16	236199,8			
Total	5077635	19				

Tabela 12 - Comparação entre os 4 grupos dentro da Categoria 2 de área luminal, através de Análise de Variância.

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	9289012	3	3096337	2,325716	0,113497	3,238867
Dentro dos grupos	21301563	16	1331348			
Total	30590575	19				

Tabela 13 - Comparação entre os 4 grupos dentro da Categoria 3 de área luminal, através de Análise de Variância.

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2,78E+08	3	92782513	1,208081	0,338751	3,238867
Dentro dos grupos	1,23E+09	16	76801568			
Total	1,51E+09	19				

3.6.4. Área média de parede arterial segundo categorias de área luminal

Os valores médios de área de parede arterial para cada categoria, segundo a área luminal estão mostrados na Tabela 14 e representados no Gráfico 8.

Tabela 14 – Valores, em μm^2 , da média da área ocupada por parede arterial em cada categoria de artérias, de acordo com a área luminal.

		LL	PL	LP	PP
média	Categoria 1	872,8009	933,3956	906,3428	1286,522
	Categoria 2	2068,453	2730,933	2085,067	2829,369
	Categoria 3	9421,067	4794,533	7804,72	11603,2

LL = animais gestados e crescidos na câmara limpa; PL = animais gestados na câmara poluída e crescidos na limpa; LP = animais gestados na câmara limpa e crescidos na poluída; PP = animais gestados e crescidos na câmara poluída.

Gráfico 8 – Representação dos valores médios da área de parede arterial para cada categoria de vaso (de acordo com a área luminal) nos diferentes grupos. LL = animais gestados e crescidos na câmara limpa; PL = animais gestados na câmara poluída e crescidos na limpa; LP = animais gestados na câmara limpa e crescidos na poluída e PP = animais gestados e crescidos na câmara poluída.

Comparando-se os 4 grupos de estudo entre si na Categoria 3 através da Análise de Variância (ANOVA) pudemos verificar que não há diferenças significativas para a área de parede arterial entre os grupos (Tabela 15, $p = 0,33$). Dentro das outras categorias também não há diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 15 - Comparação entre os 4 grupos dentro da Categoria 3 de área luminal, através de Análise de Variância, para o parâmetro área de parede arterial.

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1,23E+08	3	41094462	1,228617	0,33179	3,238867
Dentro dos grupos	5,35E+08	16	33447750			
Total	6,58E+08	19				

3.6.5. Espessura média de parede arterial segundo categorias de área luminal

Os valores médios de espessura de parede arterial para cada categoria segundo a área luminal estão mostrados na Tabela 16 e representados no Gráfico 9.

Tabela 16 – Valores, em μm , da espessura média da parede em cada categoria de artérias, de acordo com a área luminal.

	LL	PL	LP	PP
1	7,336359	6,522826	6,674107	7,271444
2	9,977533	7,640686	8,104619	8,421444
3	13,58733	10,23136	11,993	14,44214

LL = animais gestados e crescidos na câmara limpa; PL = animais gestados na câmara poluída e crescidos na limpa; LP = animais gestados na câmara limpa e crescidos na poluída; PP = animais gestados e crescidos na câmara poluída.

Gráfico 9 – Representação dos valores médios de espessura de parede arterial para cada categoria de vaso (de acordo com a área luminal) nos diferentes grupos. LL = animais gestados e crescidos na câmara limpa; PL = animais gestados na câmara poluída e crescidos na limpa; LP = animais gestados na câmara limpa e crescidos na poluída e PP = animais gestados e crescidos na câmara poluída.

Comparando-se os 4 grupos de estudo entre si em cada uma das categorias através de Análise de Variância (ANOVA) pudemos verificar que não diferenças significativas para a espessura da parede arterial entre os grupos em cada categoria ($p = 0,79$).

3.6.6. Distribuição das artérias segundo categorias da área luminal

Foi calculada a porcentagem de vasos em cada categoria por animal e depois feita uma média por grupo.

Foi usada a porcentagem de distribuição dos vasos por categoria, pois como foram medidos todos os vasos presentes num corte de tecido por caso, e a quantidade de vasos encontrados em cada caso variou grandemente, como era de se esperar, uma comparação baseada no número dos vasos em si não teria significado (Tabela 17 e Gráfico 10).

Tabela 17– Valores para número de artérias (e porcentagem) em cada categoria de área luminal para todos os grupos.

	LL	PL	LP	PP
<200	70	95	96	53
200-1000	14	19	29	31
>1000	12	18	14	14
	LL	PL	LP	PP
<200	73%	72%	69%	54%
200-1000	15%	14%	21%	32%
>1000	13%	14%	10%	14%

LL = animais gestados e crescidos na câmara limpa; PL = animais gestados na câmara poluída e crescidos na limpa; LP = animais gestados na câmara limpa e crescidos na poluída; PP = animais gestados e crescidos na câmara poluída.

Gráfico 10 – Representação da porcentagem de artérias em cada uma das categorias de vaso (de acordo com a área luminal) nos diferentes grupos. LL = animais gestados e crescidos na câmara limpa; PL = animais gestados na câmara poluída e crescidos na limpa; LP = animais gestados na câmara limpa e crescidos na poluída e PP = animais gestados e crescidos na câmara poluída.

Comparando-se os 4 grupos de estudo em cada categoria através de Análise de Variância (ANOVA) obtiveram-se os resultados mostrados nas Tabela 18, 19 e 20.

Tabela 18 - Comparação entre os 4 grupos dentro da Categoria 1 de área luminal, através de Análise de Variância.

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0046170	3	0,0015390	0,4452398	0,7239875	3,238866
Dentro dos grupos	0,055305	16	0,0034565			
Total	0,0599225	19				

Tabela 19 - Comparação entre os 4 grupos dentro da Categoria 2 de área luminal, através de Análise de Variância.

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0039257	3	0,0013085	4,043705	0,0256684	3,238866
Dentro dos grupos	0,00517781	16	0,0003236			
Total	0,0091036	19				

Tabela 20 - Comparação entre os 4 grupos dentro da Categoria 3 de área luminal, através de Análise de Variância.

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,000206	3	6,87636E-05	0,2298140	0,8742645	3,238866
Dentro dos grupos	0,004787	16	0,0002992			
Total	0,00499	19				

Os resultados da análise estatística permitem concluir que:

1) na categoria 2 observou-se que existe diferença entre os grupos ($p = 0,026$). Após a comparação 2 a 2, notou-se que a porcentagem de vasos pertencentes à categoria 2 no grupo PP é maior que no grupo LL ($p = 0,039$) e que no grupo PL ($p = 0,036$); não houve diferença entre os grupos LL, PL e LP, assim como entre os grupos PP e LP.

2) não houve diferença entre os grupos nas categorias 1 e 3.

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho baseou-se na hipótese de que a exposição aos poluentes ambientais durante a gestação pudesse acarretar alterações fisiopatológicas no sistema cardiovascular, mais especificamente no coração. Os nossos resultados permitem duas conclusões importantes: 1) existem altos níveis de peroxidação lipídica no tecido cardíaco dos animais expostos ao ar ambiental da cidade de São Paulo, e 2) uma vez transcorrida a gestação em ambiente poluído, mesmo que o indivíduo mude para ambiente não poluído durante o período pós-natal, o seu nível de estresse oxidativo miocárdico é maior do que em indivíduos que foram gestados e vivem em ambientes não poluídos.

Uma outra alteração encontrada e que pode ser atribuída à exposição aos poluentes atmosféricos foi um aumento pequeno, mas estatisticamente significativo, da porcentagem de vasos arteriais com diâmetros de 200 a 1000µm nos animais que foram gestados e cresceram no ambiente poluído.

Demonstrações de que o ar atmosférico de São Paulo é bastante poluído para levar ao comprometimento cardiovascular (Gouveia & Fletcher, 2000; Lin et al., 2003; de Paula Santos et al., 2005) permitiram supor que nossa cidade poderia ser um ambiente adequado para se testar a possibilidade que o estresse oxidativo estivesse na base dos mecanismos fisiopatológicos que provocam as disfunções cardiovasculares relacionadas à poluição.

Um dos métodos escolhidos para avaliar o estresse oxidativo foi o método TBARS para quantificação de malondialdeído no tecido cardíaco. O malondialdeído é o principal produto da peroxidação lipídica e está envolvido na formação de adutos protéicos que inviabilizam a atividade de certas enzimas. Por exemplo, em modelos de aumento de peroxidação lipídica hepática induzida por administração de álcool, o malondialdeído forma um aduto com a subunidade IV da citocromo oxidase que, deste modo, se torna inativa (Chen et al., 2000). A formação de aldeídos endógenos aumenta com

a idade e em vários estados patológicos, como distrofia muscular, artrite reumatóide e aterosclerose (Chevion et al., 2000).

Recentemente tem sido colocada em discussão a especificidade do teste TBARS, uma vez que outras substâncias (que não o malondialdeído) podem reagir com o ácido tiobarbitúrico. Assim sendo, neste trabalho usamos também a identificação imunohistoquímica de 15-F2t-isoprostano, que se constitui em um método altamente específico, associada a medidas morfométricas. Este procedimento foi validado por Mehrabi et al. (2001) que, ao medir indicadores de peroxidação lipídica em válvula cardíaca, realizou a quantificação imunohistoquímica no tecido paralelamente à avaliação do 15-F2t-isoprostano isolado e observou uma correlação significativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos independentes. A principal limitação da leitura de lâminas marcadas pelo método imunohistoquímico para isoprostano é a diferença de intensidade de marcação entre os preparados, o que implica em interpretação caso a caso. Por isso, não utilizamos programas de análise de imagens e optamos pelo método de contagem de pontos diretamente ao microscópio, que permite a observação acurada e individualizada da estrutura sobre a qual o ponto incide.

Até o presente momento, os estudos que apontam para a correlação entre doenças cardiovasculares e poluição atmosférica são epidemiológicos ou retrospectivos em seres humanos; assim sendo estes estudos não permitem investigar os possíveis mecanismos fisiopatológicos envolvidos.

De fato, de maneira inédita, nosso trabalho mostrou que os animais que passaram os 3 meses iniciais de vida na câmara poluída apresentaram valores significativamente mais altos no teste TBA do que aqueles que viveram na câmara limpa. O mesmo ocorreu para a detecção de isoprostano, confirmando o aumento de peroxidação lipídica no músculo cardíaco dos animais expostos à poluição ambiental da cidade de São Paulo. Que seja do nosso conhecimento, esta é a primeira evidência de que o estresse oxidativo pode estar na base dos fenômenos moleculares através dos quais a poluição desencadeia doenças cardiovasculares.

Como já esperado, os níveis de estresse oxidativo são altos nos animais que foram gestados e viveram por 3 meses na câmara poluída; assim como naqueles que passaram o desenvolvimento fetal na câmara limpa, mas estão submetidos à poluição ambiental durante a vida pós-natal.

Uma questão que pode resultar deste desenho experimental é que, talvez, o grande aumento dos indicadores de peroxidação lipídica no grupo PP pudessem advir da exposição mais prolongada aos poluentes que o grupo que foi gestado na câmara limpa e somente crescido na câmara poluída (LP). Porém, a observação de que estes dois grupos (LP e PP) são semelhantes estatisticamente mostra que uma exposição de apenas 3 meses aos poluentes atmosféricos foi suficiente para que o miocárdio dos animais LP atingisse a mesma concentração de MDA (medida pelo teste TBARS) que o miocárdio dos animais do grupo PP. Esta equivalência pode ser explicada pelo fato de que a exposição aos níveis ambientais de poluição se deu em uma fase inicial da vida pós-natal, durante a qual o *clearance* promovido pelo seu aparelho muco-ciliar é menos eficiente, o que pode resultar em acúmulo de partículas no seu sistema respiratório com conseqüente aumento da dose de exposição relativa.

De modo muito interessante, os animais gestados em câmara poluída e crescidos em câmara limpa (grupo PL) apresentam níveis de estresse oxidativo significativamente maiores que aqueles animais gestados e crescidos em câmara limpa. Ou seja, de fato a exposição a níveis ambientais de poluição, na fase intra-uterina, teve o potencial de promover alterações funcionais relacionadas de maneira estreita à fisiopatologia de doenças cardiovasculares (como é o estresse oxidativo) que puderam ser observadas mesmo após 3 meses da mudança para uma atmosfera filtrada. Esta talvez seja a conclusão mais importante do nosso trabalho.

Nossa observação de aumento de estresse oxidativo pós-natal no coração de animais submetidos a níveis ambientais de poluição na vida intra-uterina concorda com aquela de Pinkerton & Joad (2000) referente à reatividade brônquica. Estes autores mostraram que a exposição a poluentes atmosféricos durante a vida intra-uterina associada à exposição

pós-natal leva a um aumento significativo da reatividade brônquica em ratos. Este experimento é interessante, pois mostrou que os animais que foram submetidos à exposição intra-uterina e pós-natal são aqueles que apresentam os maiores efeitos adversos, muito maiores que a exposição isolada somente pré-natal ou pós-natal. O mesmo resultado foi obtido por nós, uma vez que os animais PP apresentaram índices maiores de peroxidação lipídica no miocárdio.

Sabe-se que o feto é alvo das agressões ambientais. A placenta, tida no passado como uma barreira protetora, permite a passagem de contaminantes ambientais ao embrião; por exemplo, há uma relação diretamente proporcional entre a presença de carboxihemoglobina do sangue fetal, obtido de cordão umbilical humano no dia do parto, com os níveis ambientais de monóxido de carbono (Pereira et al., 1998).

O mecanismo biológico através do qual os poluentes interferem no desenvolvimento pré-natal ainda não foi esclarecido, porém as hipóteses apontam para fatores como a vulnerabilidade materna à infecção, a ocorrência de estresse oxidativo fetal com peroxidação de membrana (Tabacova et al., 1998) e ação direta de poluentes específicos nos processos de transcrição de DNA e síntese protéica (Sram et al., 1999).

Nosso desenho experimental não permite prever se o distúrbio no sistema oxidativo (avaliado pela peroxidação lipídica) permanecerá durante toda a vida adulta e se terá correlação com possíveis afecções cardiovasculares. No entanto, há evidências de que a exposição aos poluentes durante a infância pode acarretar um distúrbio no indivíduo adulto: Mohallem et al. (2005) demonstrou perda fetal precoce maior em fêmeas de camundongos que foram expostas à poluição atmosférica desde os primeiros dias de vida quando comparadas àquelas que passaram a respirar o ar poluído somente na idade adulta.

Acreditamos que as nossas observações sobre a correlação do estresse oxidativo cardíaco e níveis ambientais de poluição, somadas a outros achados no sistema respiratório e reprodutivo, devam ser levados em

consideração para uma avaliação mais cuidadosa de risco ambiental levando em conta a exposição de gestantes.

As evidências de Lemos et al. (2006) de que existe uma diminuição da relação luz/parede nos ramos coronarianos de maior diâmetro foi a inspiração para este estudo morfométrico detalhado aqui descrito. Infelizmente não foi possível reproduzir os achados anteriores, uma vez que os diversos parâmetros avaliados, exceto um deles, não tiveram resultados diferentes entre os grupos, nem mesmo entre LL e PP. São inúmeros os motivos que podem explicar este fato, desde o menor tempo de exposição nos nossos animais experimentais (4 meses em vez de 3 meses).

Em relação à organização histológica das artérias coronarianas no ventrículo, os nossos dados mostram que não há grandes alterações morfológicas, seja na constituição da parede vascular, seja na concentração de vasos ou no colágeno perivascular. No entanto, o nosso achado relativo a uma densidade maior de artérias de médio calibre pode ter alguma implicação funcional, ainda que nosso dado seja contraditório com os achados já publicados que apontam a vasoconstrição como um dos efeitos importantes da exposição à poluição ambiental e ao fumo.

O tempo de exposição deve ser um fator determinante no aparecimento de lesões que podem ser identificadas morfológicamente, uma vez que as alterações iniciais se dão a nível molecular. Fala a favor disso o fato de que, ao microscópio eletrônico, foi possível detectar alterações de membrana, na forma de vacúolos de autofagocitose localizados na periferia das células e na região perinuclear contendo grande quantidade de restos de membrana em processo de digestão intracelular. Estes achados são esperados quando há distúrbios metabólicos relacionados à degradação de lipídeos, o que concorda com os níveis elevados de peroxidação lipídica nos animais expostos a níveis ambientais de poluição atmosférica.

Uma vez que estas vesículas ricas em restos membranosos se acumulam nas células, constituindo os grânulos de lipofuscina descritos pelos patologistas ("atrofia fosca do miocárdio"), acreditamos que esta análise ultra-estrutural não pode ser utilizada para estudos nos quais espera-

se uma recuperação dos danos ao se passar do ambiente poluído para um ambiente de ar limpo.

Para esclarecer as dúvidas relativas ao remodelamento arterial são necessários estudos que analisem mais cortes, trabalhando com a quantidade real de vasos presentes no miocárdio, de modo a permitir a análise em cortes transversais apenas. Além disso, para a utilização de amostras maiores pode ser necessária a análise de maior quantidade de animais por grupo.

Parece que a avaliação mais sensível para os efeitos da poluição deva ser realmente buscada a nível bioquímico ou imunohistoquímico, uma vez que as alterações morfológicas devem demorar mais tempo para se manifestar e/ou dependerem dos níveis de poluentes. Outro fator importante é o período do ano durante o qual os animais devem ser expostos, uma vez que sabidamente as condições climáticas têm grande influência na dispersão dos poluentes.

As perguntas levantadas para este trabalho foram interessantes e abrem novos rumos para a pesquisa nesta área, principalmente no que diz respeito à influência da exposição intra-uterina aos poluentes atmosféricos ocasionando distúrbios na saúde do adulto. Este fato deve ser analisado como um problema de saúde pública.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÕES

Os níveis ambientais de poluição atmosférica causam estresse oxidativo no miocárdio.

A avaliação da peroxidação lipídica, tanto o teste do TBA quanto a imunohistoquímica para isoprostano, permitem a identificação e quantificação do estresse oxidativo causado pela poluição atmosférica ambiental.

A análise ultra-estrutural revela vesículas características dos processos de digestão de estruturas membranosas nos animais expostos à poluição ambiental na vida pós-natal, o que coincide com o aumento de peroxidação lipídica encontrado.

A exposição aos níveis ambientais de poluição durante o desenvolvimento embrionário acarreta um aumento significativo do estresse oxidativo no animal mesmo que este passe a viver em ambiente de ar filtrado após o nascimento.

Transcorrer a gestação em ambiente com baixos níveis de poluentes não garante menores níveis de peroxidação lipídica se o animal passa a viver em ambiente poluído após o nascimento.

Não foi possível detectar diferenças importantes na organização tecidual das coronárias provocadas por um período relativamente curto de exposição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Batalha JR, Saldiva PHN, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, Koutrakis P, Godleski JJ. Concentrated air particles induce vasoconstriction of small pulmonary arteries in rats. *Environ Health Perspect.* 2002; 115: 1192-7.

Berry C, Hamilton CA, Brosnan MJ, Magill FG, Berg GA, McMurray JJ, Dominiczak AF. Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation.* 2000; 101(18):2206-12.

Böhm GM, Saldiva PH, Pasqualucci CA, Massad E, Martins Mde E, Zin WA, Cardoso WV, Criado PM, Komatsuzaki M, Sakae RS, et al. Biological effects of air pollution in Sao Paulo and Cubatão. *Environ Res.* 1989; 49(2): 208-16.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 7 (72): 248-54.

Brauer M, Ebelt ST, Fisher TV, Brumm J, Petkau AJ, Vedal S. Exposure of chronic obstructive pulmonary disease patients to particles: respiratory and cardiovascular health effects. *Expo Anal Environ Epidemiol.* 2001; 11(6):490-500.

Brook RD, Brook JR, Rajagopalan S. Air pollution: the "Heart" of the problem. *Curr Hypertens Rep.* 2003; 5(1): 32-9.

Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet.* 2002; 360(9341):1233-42.

Brunekreef B. Air pollution and life expectancy: is there a relation? *Occupational and Environmental Medicine.* 1997; 54: 781-4.

Buege JA, Aust S D. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 1978; 52: 302-9.

Chen J, Petersen DR, Schenker S, Henderson GL. Formation of malondialdehyde adducts in livers of rats exposed to ethanol: role in ethanol-mediated inhibition of cytochrome c oxidase. *Alcohol Clin Exp Res.* 2000; 24(4): 544-52.

Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res.* 2000; 33 Suppl: S99-108.

Cracowski JL, Tremel F, Marpeau C, Baguet JP, Stanke-Labesque, Mallion JM, Bessard G.. Increased formation of F2-isoprostanes in patients with severe heart failure. *Heart*. 2000; 84: 439-40.

Cunningham J, Dockery DW, Speizer FE. Maternal smoking during pregnancy as a predictor of lung function in children. *Am J Epidemiol*. 1994; 139(12): 1139-52.

de Paula Santos U, Braga AL, Giorgi DM, Pereira LA, Grupi CJ, Lin CA, Bussacos MA, Zanetta DM, do Nascimento Saldiva PH, Filho MT. Effects of air pollution on blood pressure and heart rate variability: a panel study of vehicular traffic controllers in the city of Sao Paulo, Brazil. *Eur Heart J*. 2005; 26(2): 193-200.

Devlin RB, Ghio AJ, Kehrl H, Sanders G, Cascio W. Elderly humans exposed to concentrated air pollution particles have decreased heart rate variability. *Eur Respir*. 2003; J 40: 76s-80s.

Di Stefano I, Koopmans DR, Langille BL. Modulation of arterial growth of rabbit carotid artery associated with experimental elevation of blood flow. *J Vasc. Res*. 1998; 35: 1-7.

Dockery DW; Pope CA III, Xu X, Spengler JC, Ware JH, Fay ME, Ferris BG JR, Speizer FE. An association between air pollution and mortality in six US cities. *N Eng J Med*. 1993; 329: 1753-9.

Donaldson K, Stone V, Seaton A, MacNee W. Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. *Environ Health Perspect*. 2001; 109 Suppl 4: 523-7.

Draper H, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 421-31.

Gold DR, Litonjua A, Schwartz J, Lovett E, Larson A, Nearing B, Allen G, Verrier M, Cherry R, Verrier R. Ambient pollution and heart rate variability. *Circulation*. 2000; 101: 1267-73.

Goldberg MS, Burnett RT, Bailar JC III, Tamblyn R, Ernst P, Flegel K, Brook J, Bonyalot Y, Singh R, Valois MF, Vincent R. Identification of persons with cardiorespiratory conditions who are at risk of dying from the acute effects of ambient air particles. *Environ Health Persp*. 2001; 109(4): 487-94.

Gouveia N, Fletcher T. Time series analysis of air pollution and mortality: effects by cause, age and socioeconomic status. *J Epidemiol Community Health*. 2000; 54(10): 750-5.

Hajat S, Haines A, Goubet SA, Atkinson RW, Anderson HR. Association of air pollution with daily GP consultations for asthma and other lower respiratory conditions in London. *Thorax* 54: 597-605, 1999.

Ibald-Mulli A, Stieber J, Wichmann HE, Koenig W, Peters A. Effects of air pollution on blood pressure: a population-based approach. *Am J Public Health*. 2001; 91: 571-7.

Kelly FJ. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occupational And Environmental Medicine*. 2003; 60: 612-6.

Kunzli N, Jerrett M, Mack WJ, Beckerman B, LaBree L, Gilliland F, Thomas D, Peters J, Hodis HN. Ambient air pollution and atherosclerosis in Los Angeles. *Environ Health Perspect*. 2005; 113: 201-6.

Lemos M, Lichtenfels AJ, Amaro Junior E, Macchione M, Martins MA, King M, Bohm GM, Saldiva PH. Quantitative pathology of nasal passages in rats exposed to urban levels of air pollution. *Environ Res*. 1994; 66(1): 87-95.

Lemos M, Mohallem S, Macchione M, Dolhnikoff M, Assunção JV, Godleski JJ, Saldiva PHN. Chronic exposure to urban air pollution induces structural alterations in murine pulmonary and coronary arteries. *Inhalation Toxicology*. 2006; 18:247-53.

Lin CA, Amador Pereira LA, de Souza Conceicao GM, Kishi HS, Milani R Jr, Ferreira Braga AL, Nascimento Saldiva PH. Association between air pollution and ischemic cardiovascular emergency room visits. *Environ Res*. 2003; 92(1): 57-63.

Lin CA, Martins MA, Farhat SC, Pope CA, Conceicao GM, Anastacio VM, Hatanaka M, Andrade WC, Hamaue WR, Bohm GM, Saldiva PH. Air pollution and respiratory illness of children in Sao Paulo, Brazil. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 1999; 13: 475-88.

Little RE, Gladen BC. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reproductive Toxicology*. 1999; 13: 347-52.

Macchione M, Oliveira AP, Gallafrio CT, Muchao FP, Obara MT, Guimaraes ET, Artaxo P, King M, Lorenzi-Filho G, Junqueira VC, Saldiva PH. Acute effects of inhalable particles on the frog palate mucociliary epithelium. *Environ Health Perspect*. 1999; 107(10): 829-33.

Mehrabi MR, Serbecic N, Ekmekcioglu C, Tamaddon F, Ullrich R, Sinzinger H, Glogar HD. The isoprostane 8-epi-PGF(2alpha) is a valuable indicator of oxidative injury in human heart valves. *Cardiovasc Pathol*. 2001; 10(5):241-5.

Menzel DB. The toxicity of air pollution in experimental animals and humans: the role of oxidative stress. *Toxicol Lett*. 1994; 72(1-3): 269-77.

Mohallem SV, de Araujo Lobo DJ, Pesquero CR, Assuncao JV, de Andre PA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of Sao Paulo. *Environ Res*. 2005; 98(2):196-202.

Montes, G.S. and Junqueira, L.C.U. Histochemical localization of collagen and of proteoglycans in tissues. In: Nimni, M.E. Collagen v.2. Boca Raton, CRC Press, 1988; p. 41-72.

Nemmar A, Nemery B, Hoylaerts MF, Vermeylen J. Air pollution and thrombosis: an experimental approach. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002; 32(5-6): 349-50.

Neves J, Cruz AS, Azevedo I, Vaz AC, Vasco P, Santos PJ, Bicho MP. Reduced and oxidized glutathione of the placenta in pregnancy complicated by pre-eclampsia. *Acta Med Port.* 1997; 10(5): 357-60.

Nonaka-Sarukawa M, Yamamoto K, Aoki H, Takano H, Katsuki T, Ikeda U, Shimada K. Increased urinary 15-F2t-isoprostane concentrations in patients with non-ischaemic congestive heart failure: a marker of oxidative stress. *Heart.* 2003; 89:871-4.

Ostro B, Lipsett M, Mann J, Braxton-Owens H, White M. Air pollution and exacerbation of asthma in African-American children in Los Angeles. *Epidemiology.* 2001; 12: 200-8.

Pereira LA, Loomis D, Conceicao GM, Braga AL, Arcas RM, Kishi HS, Singer JM, Bohm GM, Saldiva PH. Association between air pollution and intrauterine mortality in Sao Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect.* 1998; 106(6): 325-9.

Peters A, Dockery DW, Muller JE, Mittleman MA. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation.* 2001; 103(23): 2810-5.

Peters A, Liu E, Verrier RL, Schwartz J, Gold DR, Mittleman M, Baliff J, Oh JA, Allen G, Monahan K, Dockery DW. Air pollution and incidence of cardiac arrhythmia. *Epidemiology.* 2000; 11(1):11-7.

Pinkerton KE, Joad JP. The mammalian respiratory system and critical windows of exposure for children's health. *Environ Health Perspect.* 2000; 108 Suppl 3:457-62.

Plopper CG, Fanucchi MV. Do urban environmental pollutants exacerbate childhood lung diseases? *Environ Health Perspect.* 2000; 108A: 252-3.

Pope CA 3rd, Thun MJ, Namboodiri MM, Dockery DW, Evans JS, Speizer FE, Heath CW Jr. Particulate air pollution as predictor of mortality in a prospective *Critical Care Medicine.* 1995; 151: 669-74.

Pope CA, Dockery DW. Acute health effects of PM10 pollution and symptomatic and asymptomatic children. *Am Rev Respir Dis.* 1992; 145: 1123-8.

Ritz B, Fruin S, Chapa G, Shaw GM, Harris JA. Ambient air pollution and risk of birth defects in Southern California. *Am J Epidemiol.* 2002; 155:17-25.

Rubanyi GM. Vascular effects of oxygen-derived free radicals. *Free Radic Biol Med*. 1988; 4(2):107-20.

Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, Diaz E, Suh H, Tsuda A, Godleski JJ. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 165 (12): 1607-10.

Saldiva PHN, Lichtenfels AJFC, Paiva PSP, Barone IA, Martins MA, Massad E, Pereira JCR, Xavier V P, Singer JM, Böhm GM. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo-Brazil. *Environ. Res*. 1994; 65: 218-25.

Saldiva PHN, Pope CA, Schwartz J, Dockery DW, Lichtenfels AJFC, Salge JM, Barone IA, Böhm GM. Air pollution and mortality in elderly people: a time series study in São Paulo, Brazil. *Arch. Environ. Health*. 1995; 50: 159-63.

Saldiva PHN. Air pollution in urban areas: the role of automotive emissions as a public health problem. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1998; 2: 868.

Schwartz J. Air pollution and blood markers of cardiovascular risk. *Environ Health Perspect*. 2001; 109: 405-9.

Schwartz J. Harvesting and long term exposure effects in the relation between air pollution and mortality. *Am J Epidemiol*. 2000; 151: 440-8.

Schwartz J; Neas LM. Fine particles are more strongly associate than coarse particles are with the acute respiratory health effects in schoolchildren. *Epidemiology*. 2000; 11: 6-10.

Stone V. Environmental air pollution. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162: 44-7.

Suwa T, Hogg JC, Quinlan KB, Ohgami A, Vincent R, van Eeden SF. Particulate air pollution induces progression of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39:935-42.

Suwa T, Hogg JC, Quinlan KB, Ohgami A, Vincent R, van Eeden SF. Particulate air pollution induces progression of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39(6): 935-42.

Tabacova S, Baird DD, Balabaeva L. Exposure to oxidized nitrogen: lipid peroxidation and neonatal health risk. *Arch Environ Health*. 1998; 53(3):214-21.

Tager IB, Hanrahan JP, Tosteson TD, Castile RG, Brown RW, Weiss ST, Speizer FE. Lung function, pre- and post-natal smoke exposure, and wheezing in the first year of life. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 147(4):811-7.

Tanriverdi H, Evrengul H, Kuru O, Tanriverdi S, Seleci D, Enli Y, Kaftan HA, Kiliç M. Cigarette Smoking Induced Oxidative Stress may Impair Endothelial Function and Coronary Blood Flow in Angiographically Normal Coronary Arteries *Circ.* 2006; J70: 593-9.

Ward MR; Pasterkamp G; Yeung AC; Borst C. Arterial Remodeling: Mechanisms and Clinical Implications. *Circulation.* 2000; 102: 1186-91.