

Dunia Waked

Efeito da exposição crônica ao material particulado fino no tecido cardíaco de camundongos predispostos ao Lúpus Eritematoso Sistêmico

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

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Dra. Mariana Matera Veras

São Paulo

2022

Dunia Waked

Efeito da exposição crônica ao material particulado fino no tecido cardíaco de camundongos predispostos ao Lúpus Eritematoso Sistêmico

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

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Dra. Mariana Matera Veras

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Waked, Dunia

Efeito da exposição crônica ao material
particulado fino no tecido cardíaco de camundongos
predispostos ao lúpus eritematoso sistêmico / Dunia
Waked. -- São Paulo, 2022.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Mariana Matera Veras.

Descritores: 1.Doenças cardiovasculares
2.Remodelamento cardíaco 3.Lúpus eritematoso
sistêmico 4.Doença autoimune 5.Poluição do ar
6.Material particulado

USP/FM/DBD-129/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

À Deus toda honra e toda glória.

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Mariana Matera Veras, pela confiança depositada em mim durante o período do mestrado e por toda ajuda, força e atenção nos momentos de ansiedade. Obrigada por todos os ensinamentos, conselhos e oportunidades durante os últimos anos. Deixo aqui minha gratidão e admiração.

Às minhas amigas e parceiras de laboratório, Thamires Moraes e Ana Clara Bastos, agradeço a amizade, companheirismo e apoio de vocês. Todos os cafés, conversas e desabafos deixaram essa caminhada mais leve.

Aos demais colegas e colaboradores, Victor Yariwake, Gabriel Pereira, Felipe Pereira, Roberta Foster e Álvaro Pelegrin, obrigada por todos os momentos divertidos, experimentos e incentivos, em especial ao Victor por toda ajuda, correções e esclarecimentos durante esse estudo.

Aos meus colegas de pós-graduação, Denival Junior, Aline Parletta, Tabatha Oliveira e Guilherme Lunardon, que mesmo à distância nunca deixaram de me apoiar, agradeço toda ajuda e amizade de vocês.

A todos os funcionários do laboratório pelo auxílio e cuidado de sempre, e à Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) pela infraestrutura e apoio institucional.

À Deus por toda graça, por me guiar e proteger em todos os momentos, e até aqui ter me sustentado.

À toda minha família pelo apoio e acolhimento, em especial ao meu Pai Samir Waked, que sempre foi meu maior incentivador na carreira científica, à minha Mãe e Irmã, Graça Waked e Adila Waked, amo todos vocês!

À Penelope, José, Julie, Sky e Milly por serem a minha válvula de escape e estarem comigo nos momentos mais difíceis.

A todos os meus amigos, especialmente, Ana Carolina, Rômulo Nadona, Diego Dias, Aline Macedo, Fernanda Holanda, Marcia Regina e Filipe Tranche por todo o incentivo, apoio e amizade! Vocês são muito importantes para mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pelo fomento da pesquisa.

Normalização

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

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

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

Lista de figuras

Figura 1	Concentração de material particulado 2,5 em São Paulo	3
Figura 2	Translocação do material particulado conforme o seu diâmetro	5
Figura 3	Mecanismos aos quais o material particulado desencadeia eventos cardiovasculares	7
Figura 4	Patogênese do Lúpus eritematoso	8
Figura 5	Delineamento experimental	11
Figura 6	Concentrador de partículas ambientais (CPA)	12
Figura 7	Lâminas do coração escaneadas após o processamento histológico e coloração	14
Figura 8	Evolução de peso (g) dos animais do grupo LAF e LAP ao longo dos 4 meses de acompanhamento	17
Figura 9	Peso do coração normalizado pelo peso corpóreo	18
Figura 10	Análise da área relativa dos cardiomiócitos	19
Figura 11	Análise da fibrose cardíaca	20
Figura 12	Análise imuno-histoquímica de VEGF no coração	21
Figura 13	Análise imuno-histoquímica de IL-17A no coração	21
Figura 14	Análise imuno-histoquímica de Caspase 3 no coração	22
Figura 15	Análise imuno-histoquímica de IL-1 no coração	23
Figura 16	Análise imuno-histoquímica de complemento C3 no coração	24
Figura 17	Análise de anticorpos anti-DNA	24

Lista de abreviaturas e siglas

- $\mu\text{g}/\text{m}^3$ – Microgramas por metro cúbico
- μL – Microlitro
- μm – Micrômetro
- AF – Ar filtrado
- AP – Ar poluído
- BSA – Bovine serum albumine
- C3 – Complemento três
- CA – Concentração no ambiente
- CC – Concentração nas câmaras
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CO – Monóxido de carbono
- CPA – Concentrador de Partículas Atmosféricas
- DAB – Diaminobenzidina
- FMUSP – Faculdade de Medicina e São Paulo
- HC – Hidrocarboneto
- HE – Hematoxilina e Eosina
- HEPA – *High Efficiency Particulate Arrestance*
- IEMA – Instituto de Energia e Meio Ambiente
- IL1 – Interleucina um
- IL17 – Interleucina dezessete
- LAF – Lúpus Ar Filtrado
- LAP – Lúpus Ar Poluído
- LES – Lúpus Eritematoso Sistêmico
- MP – Material particulado
- NO_x – Nitrogênio

NZB – *New Zealand Black*

NZBWF1 - *New Zealand Black White F1*

NZW – *New Zealand White*

O3 – Ozônio

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

PBS – *Phosphate buffered saline*

Ph – Potencial hidrogênico

RPM – Rotação por minuto

SO₂ – Dióxido de enxofre

VEGF – *Vascular Endotelial Growth Factor*

Sumário

Lista de figuras

Lista de abreviaturas e siglas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA	1
1.2 EFEITOS DA POLUIÇÃO DO AR NO SISTEMA CARDIOVASCULAR	3
1.3 POLUIÇÃO DO AR E LÚPUS	5
1.4 MODELO EXPERIMENTAL	7
2 JUSTIFICATIVA	8
3. OBJETIVOS	8
3.1 Objetivo geral	8
3.2 Objetivos específicos	8
4. MÉTODOS	9
4.1 Animais e protocolo experimental	9
4.2 Exposição à poluição atmosférica	10
4.3 Coleta de tecidos	11
4.4 Processamento histológico	11
4.5 Análise morfológica	13
4.6 Avaliação imuno-histoquímica de marcadores inflamatórios, crescimento endotelial e apoptose.	13
4.7 Análise de anticorpos anti-DNA	14
4.8 Análise estatística dos dados	14
5. RESULTADOS	15
5.1 Evolução do peso corporal	15
5.2 Parâmetros cardiovasculares	15
5.2.1 Peso do coração	15
5.2.3 Análise da área relativa dos cardiomiócitos	16
5.2.4 Análise da fibrose cardíaca	17
6. DISCUSSÃO	23
REFERÊNCIAS	33
Anexos	43

RESUMO

Waked, D. *Efeito da exposição crônica ao material particulado fino no tecido cardíaco de camundongos predispostos ao Lúpus Eritematoso Sistêmico* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Estudos epidemiológicos e toxicológicos demonstraram que a inalação de material particulado (MP), um dos principais componentes da poluição do ar, está associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV). A exposição ao excesso de MP a longo prazo aumenta o risco de eventos cardiovasculares e pode reduzir a expectativa de vida em alguns anos. O Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica de natureza autoimune, caracterizada pela produção de autoanticorpos que acomete diversos órgãos, dentre eles o coração. Fatores hormonais, ambientais e genéticos estão diretamente associados ao desenvolvimento da doença e a poluição atmosférica tem sido evidenciada como um fator ambiental importante. Neste contexto, a poluição atmosférica pode ser um fator determinante para a progressão da doença e comprometimento cardiovascular. Este estudo tem como objetivo investigar se a exposição à poluição atmosférica promove o aumento da inflamação e remodelamento cardíaco em animais com lúpus eritematoso sistêmico. Foram utilizados camundongas fêmeas da linhagem NZBWF1, expostos ou não ao MP2.5, utilizando um concentrador de partículas ambientais. Foram analisados aspectos relacionados ao remodelamento cardíaco, inflamação e morte celular no miocárdio dos grupos. Foram avaliados o ganho de peso corporal dos grupos durante o período de exposição, o trofismo cardíaco pela razão peso do coração/corporal pós eutanásia, área relativa dos cardiomiócitos e área fibrótica no tecido cardíaco. Os animais que foram expostos ao MP2.5 apresentaram um aumento da área dos cardiomiócitos, assim como a área relativa de fibrose, além disso, observamos o aumento da imuno-marcação de IL-1 E C3 no tecido cardíaco, demonstrando o aumento da inflamação. Deste modo, sugerimos que a poluição atmosférica é capaz de promover remodelamento cardíaco e aumento da inflamação em animais que desenvolvem o LES.

Descritores: Doenças cardiovasculares; Remodelamento cardíaco; Lúpus eritematoso sistêmico; Doença autoimune; Poluição do ar; Material particulado.

ABSTRACT

Waked D. *Effect of chronic exposure to fine particulate matter on cardiac tissue of mice predisposed to Systemic Lupus Erythematosus* [dissertation]. Sao Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2022.

Epidemiological and toxicological studies have shown that the inhalation of particulate matter (PM), one of the main components of air pollution, is associated with the development of cardiovascular diseases (CVD). Long-term exposure to excess MP increases the risk of cardiovascular events and can reduce life expectancy by a few years. Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory disease of an autoimmune nature, characterized by the production of autoantibodies that affects several organs, including the heart. Hormonal, environmental and genetic factors are directly associated with the development of the disease and air pollution has been shown to be an important environmental factor. In this context, air pollution can be a determining factor for the progression of the disease and cardiovascular compromise. This study aims to investigate whether exposure to air pollution promotes increased inflammation and cardiac remodeling in animals with systemic lupus erythematosus. Female mice of the NZBWF1 strain, exposed or not to PM_{2.5}, were used using an environmental particle concentrator. Aspects related to cardiac remodeling, inflammation and cell death in the myocardium of the groups were analyzed. Body weight gain of the groups during the exposure period, cardiac trophism by heart/body weight ratio post euthanasia, relative area of cardiomyocytes and fibrotic area in cardiac tissue were evaluated. The animals that were exposed to PM_{2.5} showed an increase in the area of cardiomyocytes, as well as the relative area of fibrosis, in addition, we observed an increase in the immunostaining of IL-1 and C3 in the cardiac tissue, demonstrating an increase in inflammation. Thus, we suggest that air pollution is capable of promoting cardiac remodeling and increased inflammation in animals that develop SLE.

Descriptors: Cardiovascular diseases; Cardiac remodeling; Systemic lupus erythematosus; Autoimmune disease; Air pollution; Particulate matter.

1 INTRODUÇÃO

1.1 POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA

Dados recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS) demonstram que 99% da população mundial respira ar com altos índices de poluentes, além disso, a poluição do ar representa o principal problema ambiental causando mudanças climáticas e também promovendo danos à saúde humana, sendo responsável por cerca de 7 milhões de mortes prematuras a cada ano (OMS, 2022).

Hoje, nas grandes cidades a poluição do ar é decorrente principalmente da crescente quantidade de veículos e das atividades industriais. Levando em consideração que 80% da população mundial vive em cidades onde a qualidade do ar não atinge os padrões recomendados pela OMS, é essencial que a investigação dos impactos da exposição contínua seja realizada, uma vez que esta exposição ocorre de forma constante e ao longo de gerações (Gouveia et al., 2003). São Paulo, a maior cidade da América Latina se enquadra neste cenário, ou seja, as concentrações de poluentes no ar ambiente estão acima do recomendado pela OMS. Dados de monitoramento diários de material particulado 2.5 (MP_{2.5}) disponibilizados pelo Instituto de Energia e Meio Ambiente (IEMA) em uma grande via localizada em São Paulo, demonstram que nos últimos anos por muitas vezes o índice de qualidade do ar chegou a níveis ruins (figura 1).

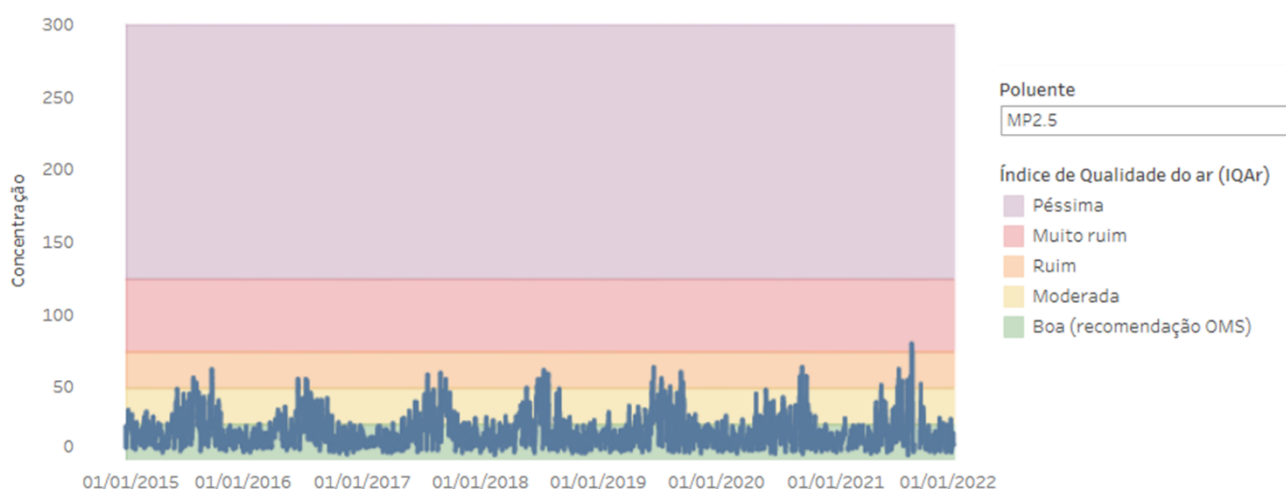


Figura 1. Concentração média diária de MP_{2.5} monitorada durante os últimos anos. Adaptada de IEMA, 2022.

A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) é o órgão responsável pela fiscalização ambiental e possui estações de monitoramento que registram ininterruptamente as concentrações dos poluentes na atmosfera, disponibilizando esses dados diariamente e de forma gratuita (CETESB, 2018). Os poluentes são classificados como primários, cuja emissão é feita diretamente da fonte para a atmosfera e os secundários, que possuem sua formação a partir de reações químicas entre os poluentes primários.

Os principais poluentes adotados universalmente como indicadores de qualidade do ar são os materiais particulados (MP), dióxido de enxofre (SO₂), monóxido de carbono (CO), oxidantes fotoquímicos, como o ozônio (O₃), hidrocarbonetos (HC) e óxidos de nitrogênio (NO_x) (CETESB, 2018).

Entre os diversos poluentes atmosféricos, o MP é considerado um dos principais responsáveis pelos efeitos negativos da poluição do ar na saúde humana. O material particulado são partículas sólidas ou líquidas suspensas por conta do seu pequeno tamanho, podendo se manter suspenso por muito tempo e deslocar-se na atmosfera (Kim et al., 2015).

As partículas inaláveis são aquelas cujo diâmetro é menor que 10 µm. Baseado no tamanho aerodinâmico, o MP é geralmente classificado em inalável (≤ 10 µm; MP₁₀), grosso (2,5-10 µm; MP_{2,5-10}), fino ($\leq 2,5$ µm; MP_{2,5}) e ultrafino ($\leq 0,1$ µm; MP_{0,1}). Quanto menor o seu tamanho, maior a chance de causar problemas à saúde, uma vez que conseguem atingir todo o trato respiratório e se alojar nos alvéolos pulmonares (Mota, 2014), sendo ainda capazes de translocar a parede de capilares pulmonares, alcançando a circulação sistêmica (Brook, 2008) (Figura 2).

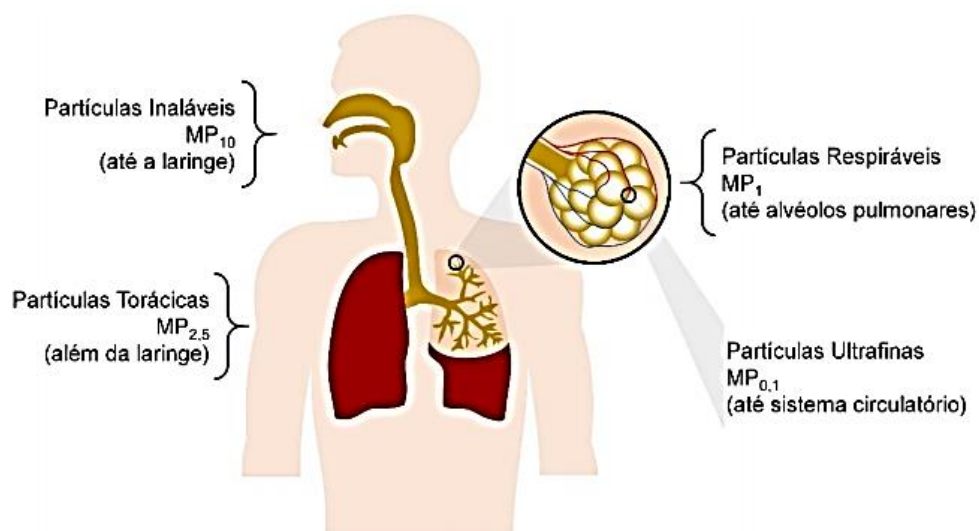


Figura 2. Alcance do material particulado conforme o seu diâmetro no trato respiratório. Adaptado de Brito et al., 2018 (Rev. Virtual Quim. Vol 10).

Assim, altas concentrações de MP, especialmente as partículas finas (MP_{2,5}) e ultrafinas (MP_{0,1}), representam um grande risco para o aumento das taxas de morbidade e mortalidade relacionadas principalmente às doenças respiratórias e cardiovasculares (Host et al., 2008; Hsieh et al., 2013; Goodman et al., 2004; Franck et al., 2011).

No entanto, os efeitos negativos da poluição na saúde humana não se restringem somente às condições patológicas nos sistemas respiratório e cardiovascular.

Já foram evidenciadas consequências na função reprodutora bem como no desenvolvimento e crescimento fetal (Veras et al., 2010), em processos neurodegenerativos (Calderón-Garcidueñas et al., 2016; Cheng et al., 2015) e ainda, a poluição do ar foi evidenciada como agravante em doenças autoimunes (Zhao et al., 2019).

1.2 EFEITOS DA POLUIÇÃO DO AR NO SISTEMA CARDIOVASCULAR

As doenças cardiovasculares são consideradas a principal causa de morte segundo a Organização Pan-americana da Saúde (OPAS, 2017). Dentre as doenças cardiovasculares de maior ocorrência, podem-se destacar doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, infarto agudo do miocárdio, doenças valvares, doenças hipertensivas e outros (Magalhaes et al., 2014). Diversos fatores contribuem para o desenvolvimento e a progressão dessas doenças, como o histórico familiar e hábitos pessoais e além disso, a poluição do ar representa um fator ambiental importante que

também contribui com alterações significativas no desenvolvimento dessas doenças no sistema cardiovascular (Brook et al., 2010).

Revisões bibliográficas evidenciaram uma série de estudos epidemiológicos que determinaram a associação entre a exposição ao MP e doenças cardiovasculares (Brook et al., 2010; Kodavanti et al., 2015). Dentre os efeitos prejudiciais descritos, incluem-se alterações na função cardíaca e no processo de remodelamento cardíaco (Liu et al., 2015). O remodelamento cardíaco consiste em um conjunto de mudanças moleculares, celulares e intersticiais, que se manifestam clinicamente por alterações no tamanho, massa, geometria e, conseqüentemente, podem levar ao prejuízo da função cardíaca em resposta a determinada injúria (Azevedo et al., 2015).

Investigações com foco no sistema cardiovascular demonstram que a exposição de camundongos ao MP_{2.5} promove alterações cardíacas (Bonilla et al., 2010) como fibrose e elastose de artérias coronárias (Akinaga et al., 2009) e disfunção sistólica e diastólica (Wold et al., 2012). Também há evidências na diminuição da função de cardiomiócitos isolados de camundongos e aumento da expressão de marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca. Além disso, dentre os demais poluentes, o material particulado fino destacou-se na associação a arritmias cardíacas (Shahrbaf et al., 2021). Outros trabalhos avaliaram a toxicidade da exposição aguda ao MP_{2.5} em camundongos jovens e adultos, demonstrando que a função cardíaca é prejudicada em ambos os grupos (Tankersley et al., 2008; Simkhovich et al., 2007).

Os principais mecanismos pelos quais a inalação do MP desencadeia os eventos cardiovasculares incluem:

- 1) ação direta das partículas ultrafinas e solúveis que translocam do pulmão para a circulação;
- 2) efeito indireto, induzido pela resposta inflamatória e estresse oxidativo pulmonar que liberam mediadores na circulação sistêmica;
- 3) e distúrbio do sistema nervoso autônomo, com ativação do sistema simpático e/ ou atenuação do sistema parassimpático (Figura 3) (Brook, 2008; Robertson e Miller, 2018).

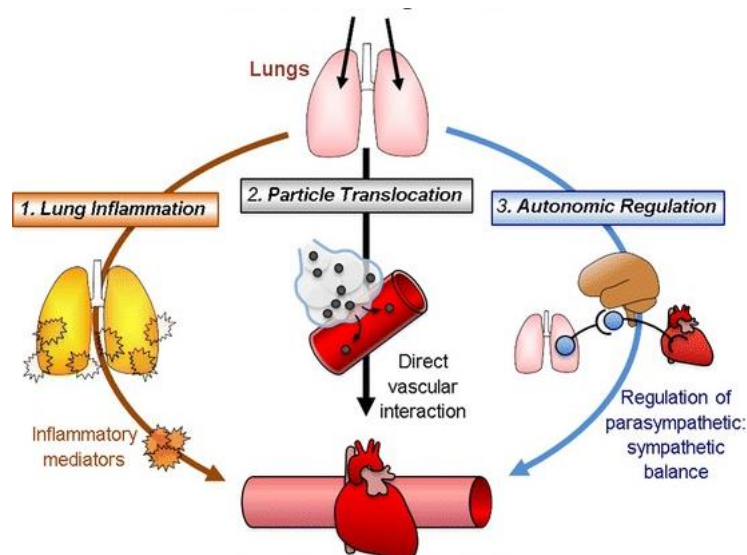


Figura 3. Mecanismos aos quais o material particulado desencadeia eventos cardiovasculares. Adaptado de Robertson e Miller, 2018.

1.3 POLUIÇÃO DO AR E LÚPUS

Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença crônica inflamatória de natureza autoimune, caracterizada pela produção de autoanticorpos que acomete diversos órgãos. As principais manifestações clínicas são lesão de pele, lesões articulares, inflamação dos rins, alterações hematológicas, neuro-psíquicas e inflamação das membranas que recobrem o pulmão e o coração (Fortuna & Brennan., 2013; Human Genome Sciences and The GlaxoSmithKline Group of Companies., 2012). A inflamação nos tecidos deve-se à deposição de imunocomplexos e ativação do sistema complemento (Galindo & Veiga., 2010).

Fatores genéticos, hormonais, imunológicos e ambientais estão associados ao desenvolvimento da doença. O LES pode apresentar-se de forma lenta e progressiva ou de forma rápida com a interferência desses fatores (Freire et al., 2011).

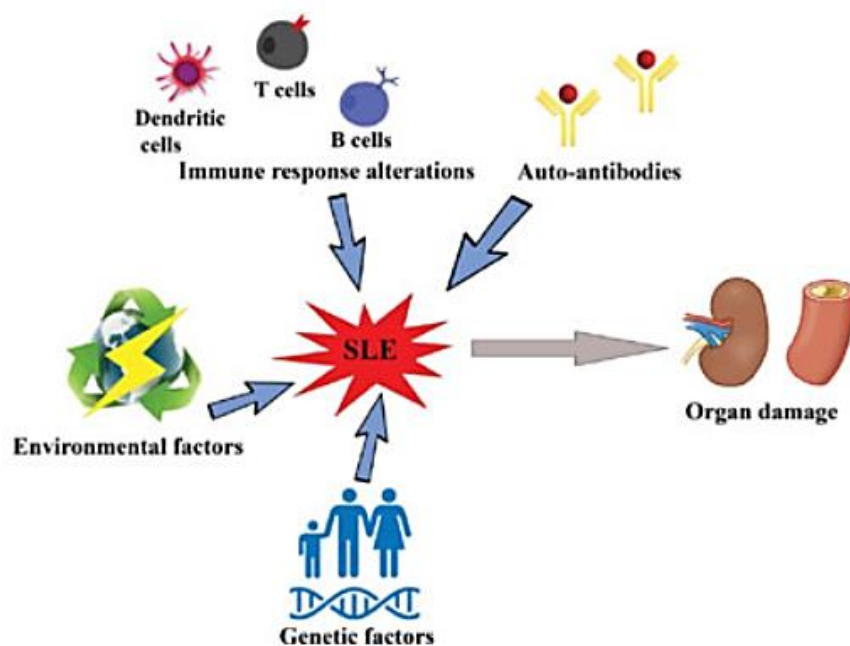


Figura 4. Patogênese do Lúpus eritematoso. Adaptado de Murtaza et al., 2018. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets.

O LES afeta indivíduos de todas as raças, principalmente jovens em fase reprodutiva e, em sua maioria, mulheres (Washio et al., 2019). Diversos estudos comprovam o envolvimento de fatores ambientais no desenvolvimento da doença, como a exposição à sílica, consumo de álcool, hormônios, estresse oxidativo e mais recentemente a poluição do ar (Barbhैया & Costenbader., 2017, Somers & Richardson., 2015, Strickland et al., 2016).

No Brasil, há estudos em que mostram uma incidência maior de LES comparado a dados internacionais (Vilar et al., 2003) e uma alta taxa de mortalidade pelo LES em si ou associado a outras doenças (Costi et al., 2017), sendo necessário a investigação e controle dos possíveis fatores agravantes.

Evidências demonstram que a exposição às partículas atmosféricas aumenta a inflamação das vias aéreas, pulmonar e sistêmica em pacientes com LES (Alves et al., 2017). As principais manifestações cardiovasculares no LES, são doença coronariana, infarto agudo do miocárdio e doença vascular periférica (Lazou et al., 2020). Além disso, o dano autoimune no tecido vascular, aumenta o risco de aterosclerose (Cojocarú et al., 2011). Assim, a exposição a poluição do ar aparece como um fator de agravamento do lúpus, bem como um dos possíveis estímulos para o desenvolvimento da doença.

Assim, diante do aumento na incidência de lúpus, que não se explica apenas por fatores genéticos, e sabendo que a poluição do ar aparece como um possível fator associado ao início da doença e mesmo como um fator para agravamento, propomos neste estudo uma investigação experimental dos efeitos da poluição do ar no sistema cardiovascular de animais predispostos ao lúpus.

1.4 MODELO EXPERIMENTAL

Modelos experimentais são importantes ferramentas para o estudo mais específico de determinadas patologias, permitindo a reprodução de seus sinais e sintomas e o entendimento consistente da doença. Existem diversos modelos para o estudo do LES (Mizui & Tsokos, 2020), dentre eles, estão os camundongos NZBWF1, derivados do cruzamento das linhagens New Zealand Black (NZB) x New Zealand White (NZW). Estes animais desenvolvem espontaneamente o LES, permitindo a observação e o estudo do desenvolvimento da doença e seus possíveis agravantes, terapias e mecanismos fisiopatológicos (Tejon et al., 2019). Esta linhagem já foi utilizada em diversos estudos relacionados ao LES, constatando ser um modelo eficiente no estudo da doença (Sharma et al., 2005; Wang & Sun., 2019).

Com base no que foi mencionado anteriormente, muitos trabalhos evidenciaram alterações estruturais e funcionais, além de alguns mecanismos envolvidos na patogênese das doenças cardiovasculares desencadeadas pela poluição atmosférica, no entanto, são insuficientes os estudos a respeito dos efeitos dos poluentes nos processos envolvidos no LES, especificamente no tecido cardíaco.

2. JUSTIFICATIVA

Embora muitos trabalhos tenham demonstrado uma associação entre a poluição atmosférica e os efeitos estruturais e funcionais no sistema cardiovascular, não há estudos que avaliaram os efeitos da exposição crônica à poluição em modelo animal que apresente espontaneamente o LES. Este trabalho poderá contribuir no melhor entendimento dos fatores associados ao LES e do possível agravamento da doença pela ação da poluição atmosférica de São Paulo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar se a exposição à poluição atmosférica, especificamente o MP_{2.5}, promove o aumento da inflamação e remodelamento no tecido cardíaco de animais que desenvolvem espontaneamente o LES (linhagem NZBWF1).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o impacto da poluição atmosférica no ganho de peso corpóreo dos animais durante o período de exposição;
- Avaliar aspectos gerais relacionados ao remodelamento cardíaco;
- Avaliar recrutamento de células inflamatórias, crescimento endotelial e morte celular no tecido cardíaco;
- Determinar a influência da poluição atmosférica na atividade da doença.

4. MÉTODOS

Este projeto trata-se de um estudo experimental que está vinculado a outro projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, com parecer do CEUA número: nº 095/17.

4.1 Animais e protocolo experimental

Foram utilizados vinte camundongas da linhagem New Zealand Black White F1 (NZBWF1), um modelo animal em que ocorre desenvolvimento espontâneo de LES. Os camundongos foram adquiridos da instituição de pesquisa The Jackson Laboratory (<https://www.jax.org>). Utilizou-se animais jovens, expostos ou não à poluição (MP_{2,5}) durante o período de 4 meses (n=10/grupo). As exposições tiveram início aos 3 meses de idade e foram realizadas no desenvolvimento de outro projeto do laboratório (Yariwake et al., 2021). Os grupos experimentais utilizados são:

- Grupo lúpus exposto ao ar filtrado (LAF)
- Grupo lúpus exposto ao ar poluído (LAP)



Figura 5. Delineamento experimental. Camundongos fêmeas da linhagem NZBWF1/J foram expostas ou não a poluição atmosférica (MP_{2,5}) a partir do 3º mês de vida. A

exposição teve a duração de 4 meses, onde o peso dos animais foi acompanhado durante este período. Ao término da exposição, os animais foram submetidos à eutanásia, o sangue e os tecidos foram coletados e pesados. N= 10/grupo (JAX® Mice, Products & Services).

4.2 Exposição à poluição atmosférica

A exposição à poluição atmosférica foi realizada no Concentrador de Partículas Ambientais (CPA) (Figura 6), conforme já utilizado pelo grupo de pesquisa (Davel et al., 2012). O CPA possui a tecnologia de impactadores virtuais que permitem concentrar MP_{2.5} em até 27 vezes a concentração ambiente, direcionando essas partículas para uma câmara de exposição, onde os animais a serem expostos (grupo LAP) foram colocados. O CPA também possui uma câmara de ar filtrado, na qual há um filtro do tipo HEPA que retém o MP_{2.5}, onde os animais do grupo ar filtrado (LAF) foram colocados. O CPA localiza-se no campus da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo que está aproximadamente 100 metros de uma estação de monitoramento da CETESB e 20 metros de uma avenida com alta densidade de tráfego (Av. Dr. Arnaldo x Rua Teodoro Sampaio).

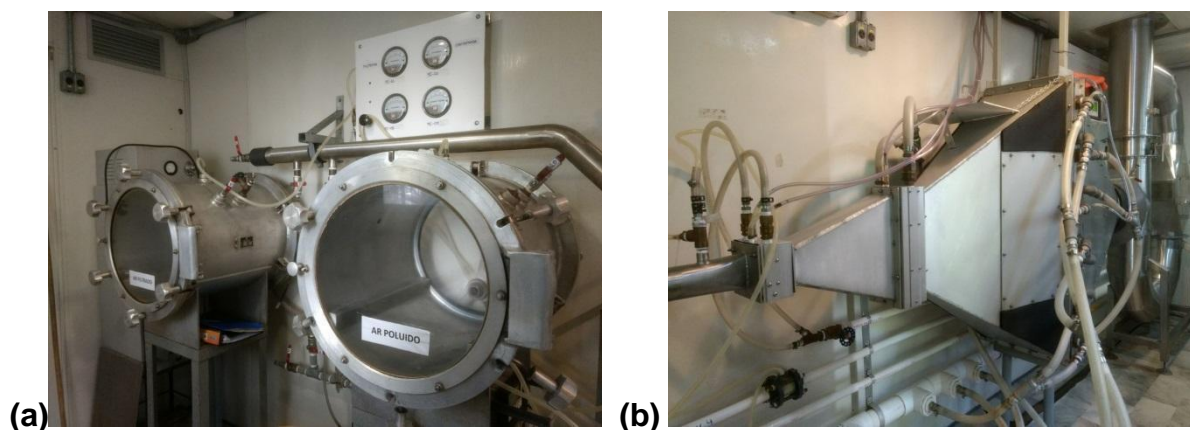


Figura 6. Concentrador de partículas ambientais (CPA). Na figura **A** as câmaras de ar filtrado (AF) e ar poluído (AP). Na figura **B** os impactadores virtuais que concentram o material particulado (MP_{2.5}).

Os animais foram levados para a exposição no CPA 5 vezes por semana, durante o período de 4 meses. Foram colocados em suas respectivas câmaras (AF e AP), em caixas com livre movimentação e acesso a água e alimentação. O tempo de exposição variou de acordo com o nível de MP2.5 do dia, o qual foi calculado de acordo com a fórmula:

$$\text{Tempo} = [\text{CA} / \text{CC}] \times 60 \text{ minutos}$$

Sendo que CA é a dose de exposição diária de MP_{2.5} (600 µg/m³ por dia): CC é a concentração dentro das câmaras, atingida com o uso do concentrador (varia de acordo com a concentração de MP2.5 do momento). A cada dia, a concentração inicial de PM_{2.5} foi medida e o tempo de exposição calculado. Em média as exposições duraram 90 minutos. Entre as exposições, os animais foram mantidos em gaiolas de plástico, em uma estante ventilada com ar filtrado e temperatura controlada, num ciclo claro-escuro de 12 horas.

4.3 Coleta de tecidos

Após o período de 4 meses de exposições, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico inalatório isoflurano (Cristália, Brasil). Após a eutanásia, o sangue foi coletado, centrifugado, o soro recolhido e congelado em ultrafreezer para a análise de anticorpos anti-DNA. O coração foi obtido, pesado e utilizado para análises histopatológicas e imuno-histoquímicas.

O trofismo cardíaco foi avaliado pela razão do peso total do coração pelo peso corpóreo do camundongo.

4.4 Processamento histológico

O material coletado passou por um processo de fixação, desidratação, diafanização e inclusão em parafina:

a) Fixação - o material foi fixado por 24 horas em formaldeído a 4% em PBS, para conservação do material e estrutura do tecido;

b) Desidratação - após 24 horas em formaldeído, os tecidos foram transferidos para recipientes contendo álcool nas concentrações: 70%, 85%, 95% e em álcool absoluto;

c) Diafanização – após a desidratação, o tecido passou por 3 banhos de xilol, este solvente permite a infiltração da parafina no tecido.

d) Inclusão – após a diafanização do tecido, foram realizadas passagens por parafina líquida (56°C) para total infiltração no tecido cardíaco. Após o período de infiltração, o material foi incluído em blocos de parafina, de modo em que fosse possível a obtenção de cortes do coração em secção transversal.

e) Posteriormente à inclusão do material, com o auxílio do micrótomo, foram realizados cortes de 5 µm, corados pelas técnicas de hematoxilina-eosina e Picro-Sirius Red para as análises morfométricas da composição do miocárdio. Posteriormente, as lâminas foram escaneadas com o digitalizador de lâminas e visualizadas através do software Panoramic Viewer (3DHistech, EUA) (figura 7). Também foram obtidos cortes em lâminas silanizadas para ensaios imuno-histoquímicos.

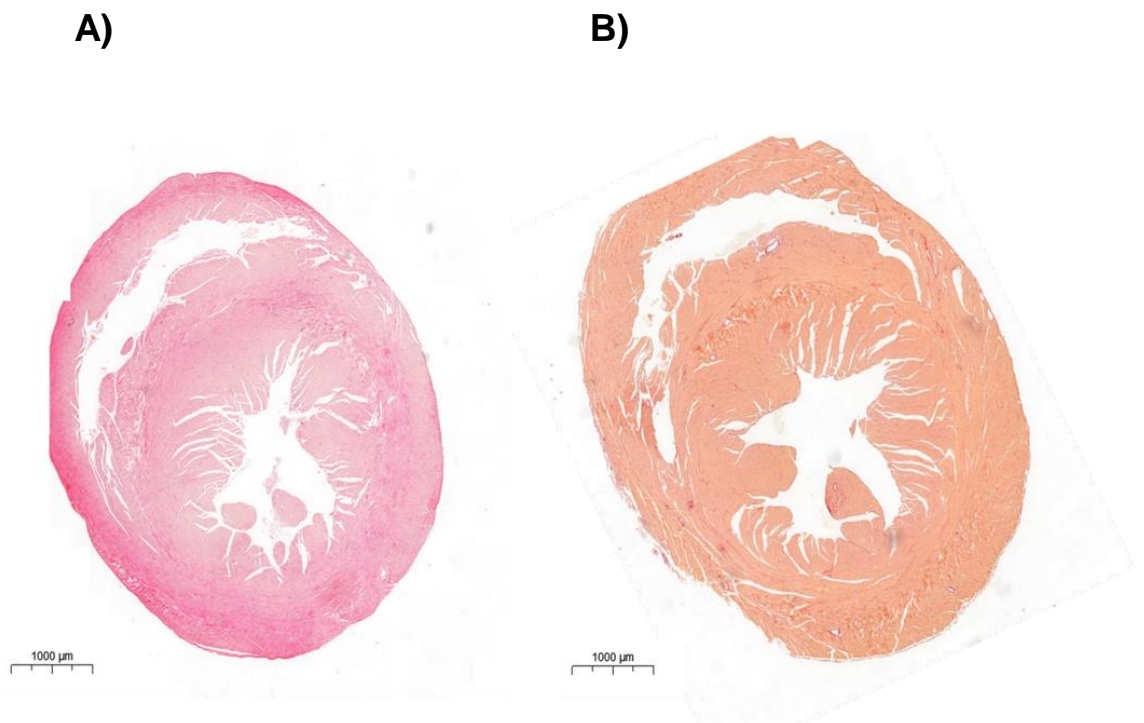


Figura 7. Lâminas do coração escaneadas após o processamento histológico e coloração. **(A)** Coloração de Hematoxilina & Eosina. **(B)** Coloração Picro-sirius Red. Aumento de 20x.

4.5 Análise morfológica

Imagens de 15 campos por lâmina em objetiva de 40x foram capturadas pelo software CaseViewer (3DHistech, EUA). A análise quantitativa da fibrose intersticial foi realizada utilizando o software ImageJ, o qual mapeia diferenças de cores por pixels, permitindo o cálculo da fração de fibrose expressa como porcentagem de uma determinada área de tecido. Com relação à análise da hipertrofia cardíaca, além da medida do peso do coração, foram quantificadas áreas de cardiomiócitos individuais em secção transversal e núcleo central na altura do músculo papilar (ventrículo esquerdo), nas lâminas coradas em HE, através do software ImageJ.

4.6 Avaliação imuno-histoquímica de marcadores inflamatórios, crescimento endotelial e apoptose.

Após a obtenção dos cortes do tecido cardíaco e vascular em lâminas silanizadas, os tecidos passaram por um processo de desparafinização em xilol e hidratação com concentrações graduais de álcool (absoluto, 95%, 85% e 70%), seguido por água destilada. Após a hidratação do tecido, o mesmo foi mantido em temperatura de 94°C por 20 minutos em tampão citrato de sódio (pH 6) para recuperação antigênica. O tecido foi resfriado em temperatura ambiente e posteriormente realizado o bloqueio da peroxidase endógena utilizando uma solução de peróxido de hidrogênio 3% em metanol. Em seguida, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas com albumina de soro bovino (BSA) 2%. Após o bloqueio as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários anti-IL17 (ab214588; 1:100), anti-VEGF (sc-7269; 1:500), anti-caspase3 (ab4051; 1:250), anti-IL1 (ab205924; 1:100) e anti-C3 (ab200999; 1:250) em câmara úmida à 4°C overnight e no dia seguinte, após a lavagem do anticorpo primário, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário. A marcação foi revelada pelo cromógeno diaminobenzidina (DAB) resultando em uma coloração marrom. As lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Harris seguido de desidratação, diafanização e montagem da lâmina. Foi realizada a padronização da concentração de cada anticorpo, para determinar a melhor marcação do antígeno de interesse nos tecidos.

Foram investigados os seguintes marcadores:

- IL-1 β (marcador de resposta inflamatória);
- IL-17A (marcador de resposta inflamatória);
- VEGF (fator de crescimento endotelial);
- Complemento C3 (proteína do sistema imune relacionado ao LES);
- Caspase 3 (marcador de apoptose).

Após o ensaio imuno-histoquímico e obtenção das lâminas imunomarcadas, foram capturadas imagens microscópicas na objetiva de 40x e quantificadas no software ImageJ, onde uma ferramenta específica desfragmenta as colorações da lâmina, possibilitando a seleção da cor do cromógeno DAB e assim, a quantificação da área marcada.

4.7 Análise de anticorpos anti-DNA

Parte do sangue coletado (aproximadamente 900 μ L) foi destinado para a detecção de anticorpos anti-DNA. Para isso as amostras foram centrifugadas a 3500rpm por 10 minutos e o sobrenadante (soro) foi recolhido e armazenado à temperatura de -70°C até o dia das análises. A detecção de anti-DNA foi realizada pelo método de imunofluorescência indireta com o kit NOVA Lite® dsDNA *Crithidia luciliae* (Inova Diagnostics), seguindo as recomendações do fabricante. Como conjugado, foi utilizado o anticorpo Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A-11001) na concentração de 1:100. As análises foram realizadas no Laboratório de Investigação em Reumatologia (LIM17) da FMUSP.

4.8 Análise estatística dos dados

Todas as variáveis foram analisadas no software GraphPad Prism 6 (©2017 GraphPad Software, California, USA). A normalidade das distribuições foi calculada a partir do teste de Shapiro-Wilk. Para a comparação entre duas variáveis de distribuição normal foi aplicado o teste t de Student (área relativa dos cardiomiócitos, C3 e IL17A). Já para a comparação de duas variáveis com distribuição não normal foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney (peso do coração/peso corporal, área relativa de fibrose, anti-DNA, Casp3, IL1 β e VEGF). Os dados de evolução do peso foram analisados por meio do teste two-way ANOVA, seguido do post hoc de Sidak. Para todos os testes foi considerado nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Evolução do peso corporal

Para identificar se a poluição poderia influenciar no peso corpóreo, foi acompanhado o ganho de peso corpóreo de camundongos fêmeas (NZBWF1) LAF e LAP durante 4 meses de exposição à poluição. Aqui, demonstramos que não houve diferença na evolução do peso entre os grupos (figura 8).

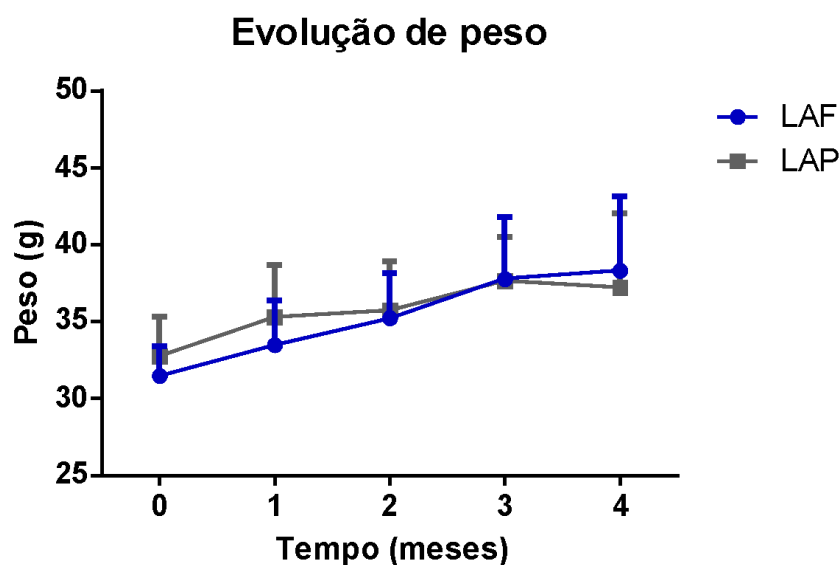


Figura 8. Evolução de peso (g) dos animais do grupo LAF e LAP ao longo dos 4 meses de acompanhamento. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão. LAF: lúpus ar filtrado. LAP: lúpus ar poluído. Teste de *two-way* ANOVA/*post hoc* de Sidak ($p < 0,05$). $n = 10-7$ /grupo.

5.2 Parâmetros cardiovasculares

5.2.1 Peso do coração

O peso do coração é utilizado para verificar uma possível atrofia ou hipertrofia cardíaca, por isso, ao final dos 4 meses de exposição os animais foram eutanasiados e o peso do coração coletado e normalizado pelo peso corporal. Quando comparados os grupos LAF e LAP não constatamos diferença significativa (figura 9).

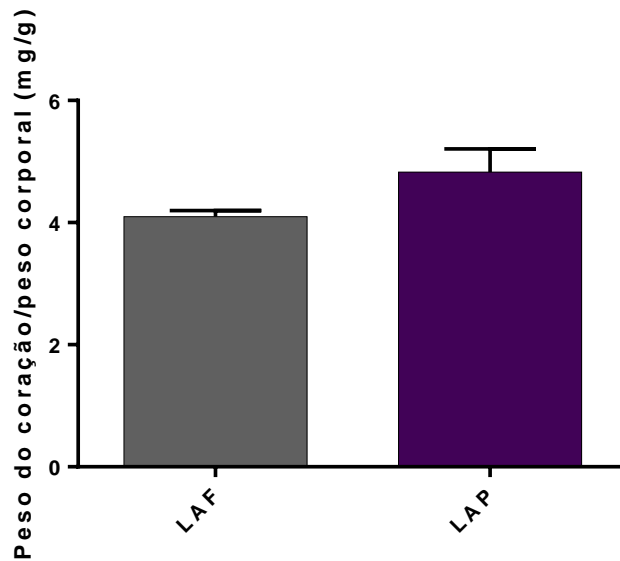


Figura 9. Peso do coração. Peso do coração normalizado pelo peso corpóreo. Valores representados em média±erro padrão. LAP vs LAF, teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$). (n=7-10/grupo).

5.2.2 Análise da área relativa dos cardiomiócitos

Acerca do remodelamento cardíaco, identificou-se através da mensuração da área relativa do cardiomiócito, identificamos uma hipertrofia cardíaca, observado pelo aumento da área dessa célula no grupo exposto à poluição quando comparado ao grupo controle ($p = 0,0005$) (figura 10).

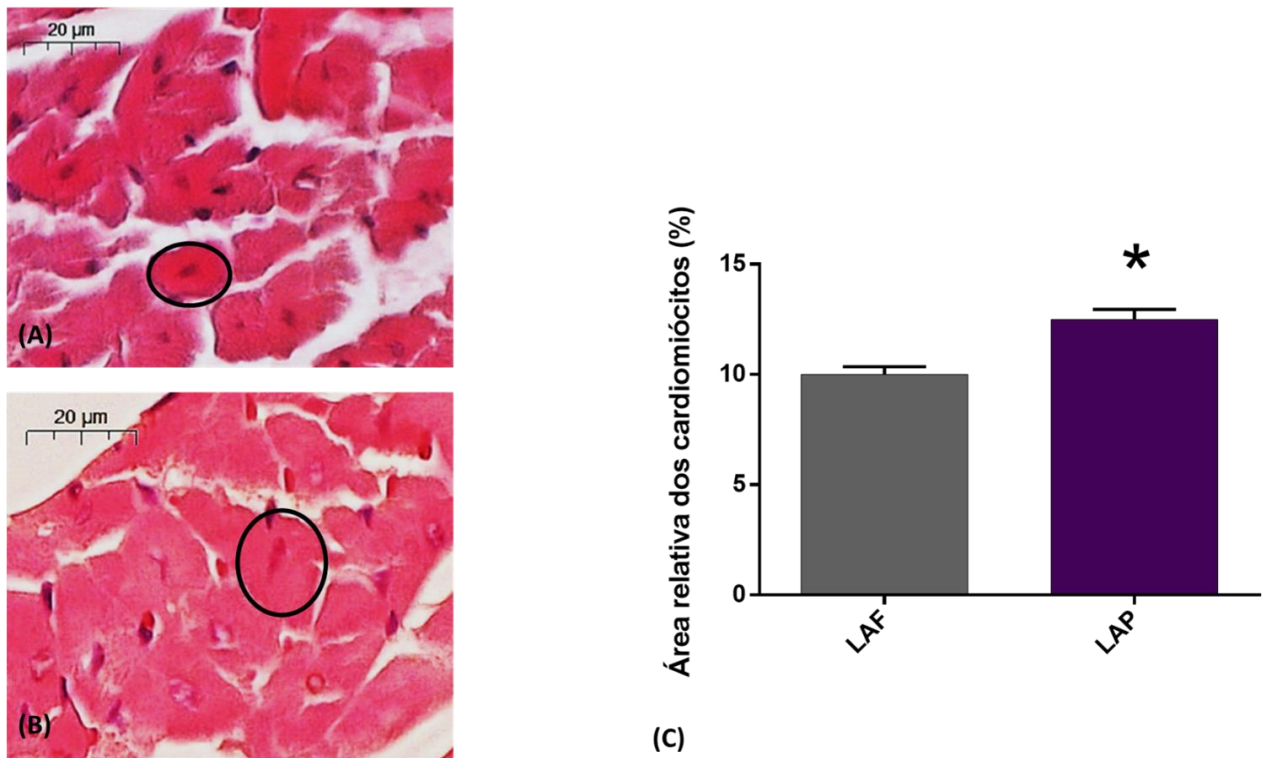


Figura 10. Análise da área relativa dos cardiomiócitos. Quantificação da área relativa dos cardiomiócitos avaliada pelo ImageJ (barras 20µm) em secções transversais do coração utilizando coloração de HE. **(A)** LAF: lúpus ar filtrado. **(B)** LAP: lúpus ar poluído. **(C)** área relativa dos cardiomiócitos. Resultados representados em média±desvio padrão. LAF: lúpus ar filtrado. LAP: lúpus ar poluído. *diferença estatística significativa entre LAF e LAP pelo teste t de Student ($p < 0,05$). $n = 10$ /grupo.

5.2.3 Análise da fibrose cardíaca

Para avaliar a deposição de colágeno no tecido cardíaco, a área relativa de fibrose dos animais do grupo LAF e LAP foi quantificada. Quando comparados os grupos, observamos um aumento no grupo exposto a poluição ($p = 0,0001$) (figura 11).

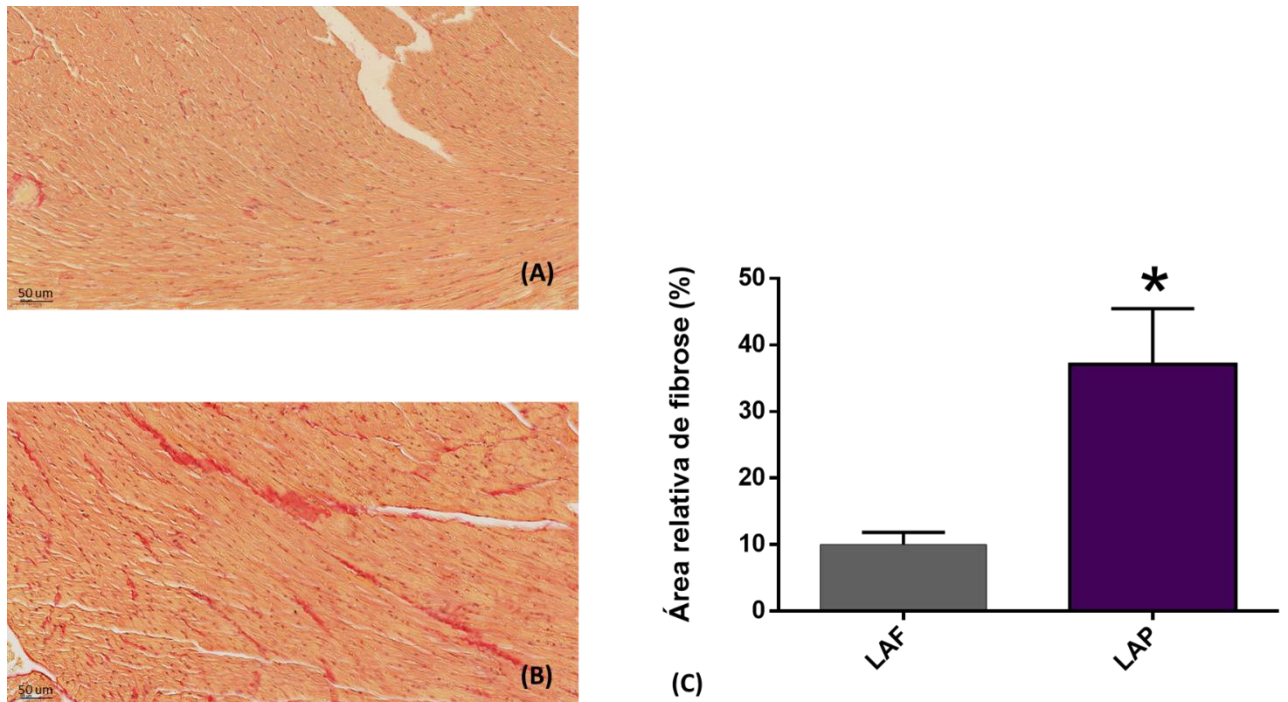


Figura 11. Análise da fibrose cardíaca. Quantificação da área de deposição de colágeno em cortes transversais do coração utilizando coloração com picrosirius red avaliada pelo ImageJ (barras 50μm). **(A)** LAF: lúpus ar filtrado. **(B)** LAP: lúpus ar poluído. **(C)** área marcada por fibrose. Resultados representados em média±desvio padrão. LAF: lúpus ar filtrado. LAP: lúpus ar poluído. *diferença estatística significativa entre LAF e LAP pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$). $n = 10$ /grupo.

5.3 Análise imuno-histoquímica

No ensaio imuno-histoquímico para análise de marcadores inflamatórios, crescimento endotelial e área de apoptose, não foi observada diferença significativa entre os grupos quando analisado o marcador VEGF (figura 12). Foi observada uma tendência ao aumento da área marcada pela IL-17 (figura 13) e caspase 3 (figura 14) e no grupo exposto à poluição. Em relação ao marcador inflamatório IL-1 β foi observado o aumento no grupo LAP em relação ao grupo LAF ($p = 0,0286$) (figura 15). Na análise de deposição de complemento C3, também foi observado um aumento do grupo exposto em relação ao controle ($p = 0,0079$) (figura 16).

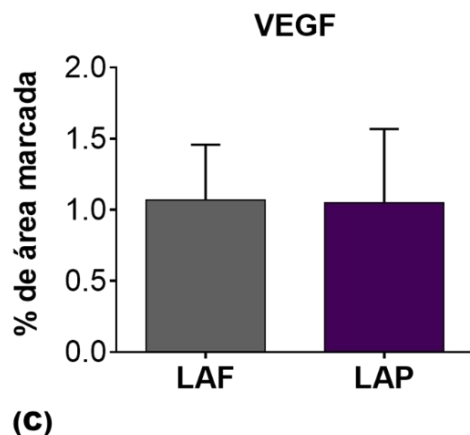
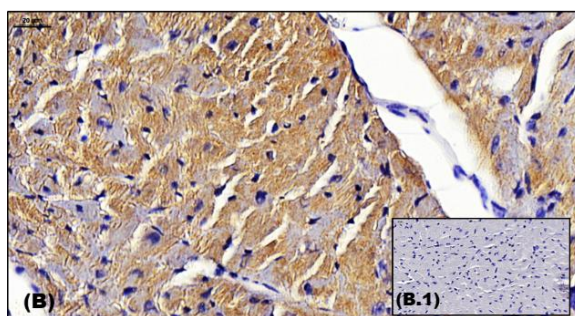
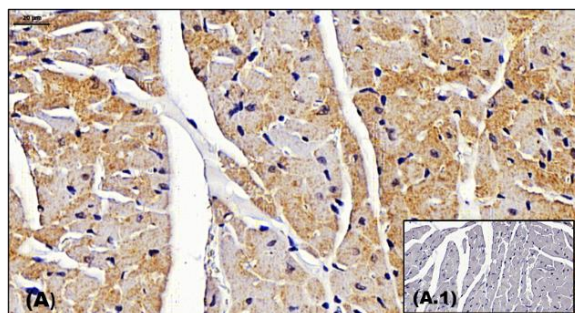


Figura 12. Análise imunohistoquímica de VEGF no coração. Quantificação da área marcada revelada por DAB. (A) LAF: lúpus ar filtrado. (A.1) controle negativo. (B) LAP: lúpus ar poluído. (B.1) controle negativo. (C) área marcada por VEGF. Resultados representados em média±erro padrão. LAP vs LAF, teste de Mann-Whitney (n=10/grupo).

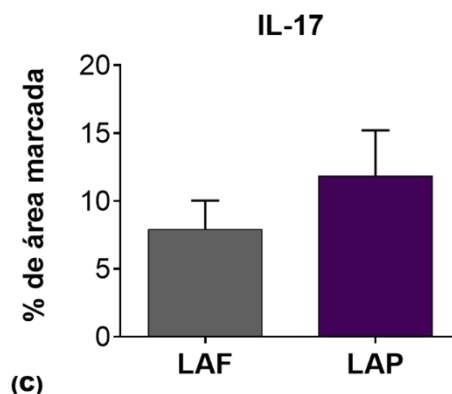
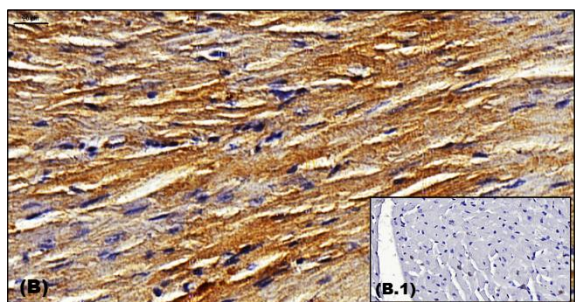
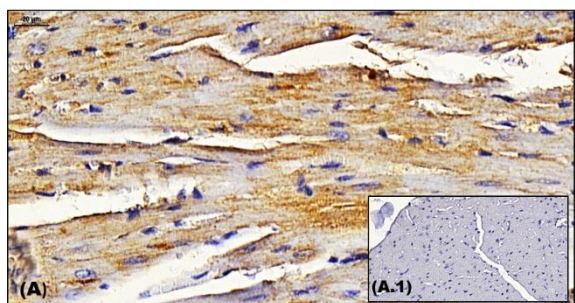


Figura 13. Análise imuno-histoquímica de IL-17A no coração. Quantificação da área marcada revelada por DAB. **(A)** LAF: lúpus ar filtrado. **(A.1)** controle negativo. **(B)** LAP: lúpus ar poluído. **(B.1)** controle negativo. **(C)** área marcada por IL-17. Resultados representados em média±erro padrão. LAP vs LAF, teste t de Student. (n=10/grupo).

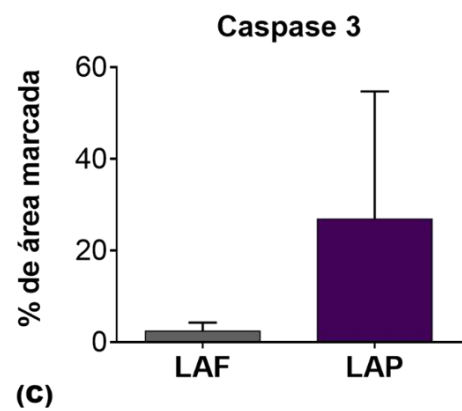
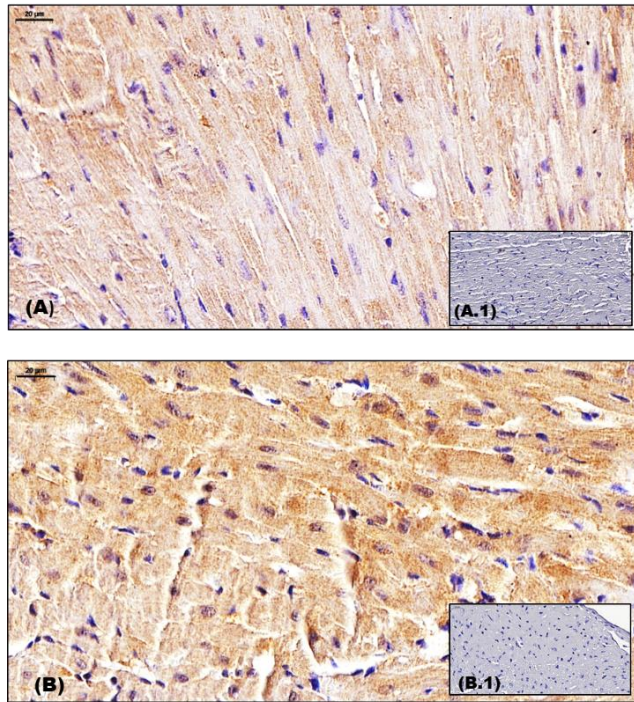


Figura 14. Análise imuno-histoquímica de Caspase 3 no coração. Quantificação da área marcada revelada por DAB. **(A)** LAF: lúpus ar filtrado. **(A.1)** controle negativo. **(B)** LAP: lúpus ar poluído. **(B.1)** controle negativo. **(C)** área marcada por Caspase 3. Resultados representados em média±erro padrão. LAP vs LAF, teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$). (n=10/grupo).

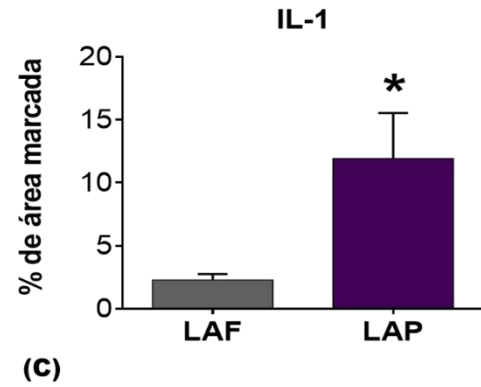
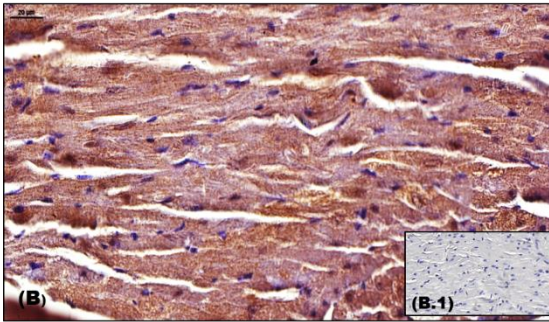
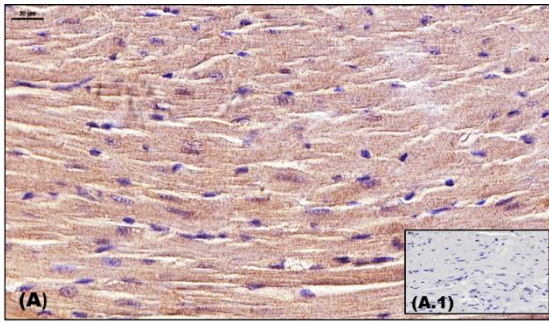


Figura 15. Análise imuno-histoquímica de IL-1 β no coração. Quantificação da área marcada revelada por DAB. **(A)** LAF: lúpus ar filtrado. **(A.1)** controle negativo. **(B)** LAP: lúpus ar poluído. **(B.1)** controle negativo. **(C)** área marcada por IL-1 β . Resultados representados em média \pm erro padrão. *diferença estatística significativa entre LAF e LAP pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$) n-10/grupo.

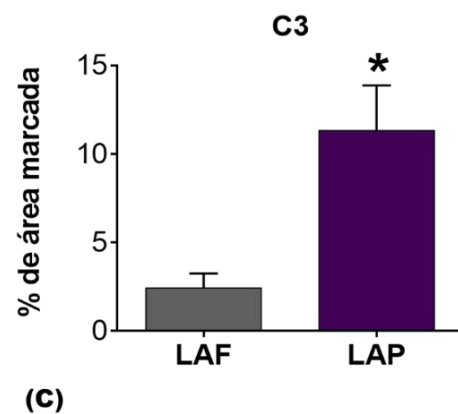
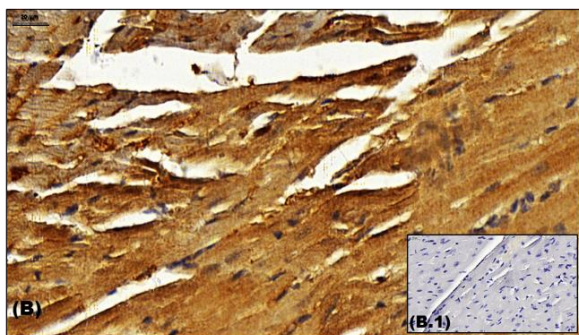
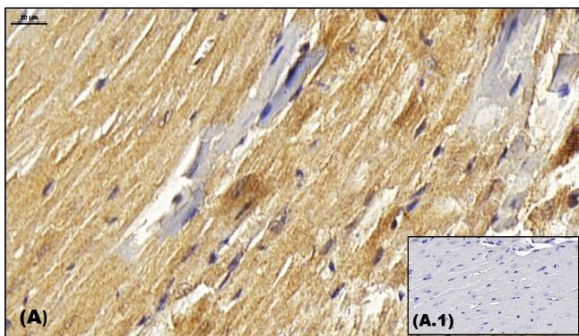


Figura 16. Análise imunohistoquímica de complemento C3 no coração. Quantificação da área marcada revelada por DAB. **(A)** LAF: lúpus ar filtrado. **(A.1)** controle negativo. **(B)** LAP: lúpus ar poluído. **(B.1)** controle negativo. **(C)** área marcada por complemento C3. Resultados representados em média±erro padrão. *diferença estatística significativa entre LAF e LAP pelo teste t de Student ($p < 0,05$). $n = 10$ /grupo.

5.4 Análise de anticorpos Anti-DNA

Para verificar a interferência da poluição na atividade da doença (LES), foi analisada a produção de anticorpos anti-DNA, por análise semiquantitativa onde foi detectada reação positiva para a produção dos anticorpos, porém, não foi observada diferença estatística entre os grupos (figura 17).

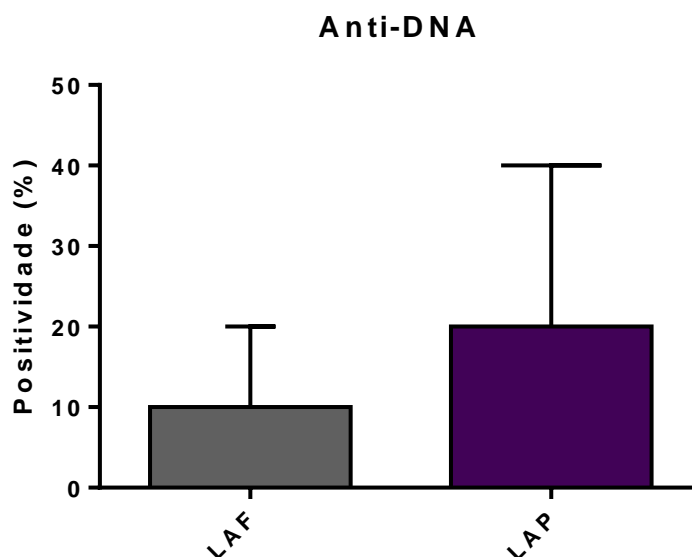


Figura 17. Análise de anticorpos anti-DNA. Resultados representados em média±erro padrão. LAP vs LAF, teste de Mann-Whitney ($n = 7-10$ /grupo).

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, investigamos os efeitos da exposição a poluição atmosférica (MP 2.5) sobre a morfologia cardíaca de camundongos fêmeas da linhagem NZBWF1 que apresentam lúpus. A exposição ao material particulado fino foi feita no período de 4 meses para a avaliação dos efeitos crônicos da poluição a longo prazo. A exposição ao PM2.5 teve início com os animais com 3 meses de idade, tempo aproximado em que a doença começa a se manifestar nestes animais (Mizui & Tsokos, 2020). Nossos resultados corroboram com resultados de outros estudos que mostram que a exposição a poluição do ar pode agravar ou servir como fator para o desencadeamento da doença e que alterações cardíacas podem ser aceleradas devido a exposição. Em nosso estudo, a dose de poluição administrada foi de aproximadamente 600ug/m³ por dia de exposição, sendo essa a dose estimada em que um morador de uma grande metrópole é exposto diariamente (Belloti, 2012 e Di Domenico, 2020). A ideia nesta pesquisa foi mimetizar o que aconteceria com um habitante da cidade de São Paulo, criando o gradiente de exposição para o material particulado fino (MP2.5).

O Lúpus eritematoso sistêmico é uma doença autoimune que envolve vários sistemas, acometendo principalmente mulheres adultas jovens, prejudicando a qualidade de vida. Além da predisposição genética, diferentes fatores ambientais vêm sendo investigados, pois podem estar envolvidos no desencadeamento da doença em pessoas com predisposição. A exposição aos raios UV e a poluição do ar são destaques em diferentes publicações, e recentemente nosso grupo de pesquisa mostrou que animais predispostos apresentam um agravamento da doença (Yariwake et al 2021).

O envolvimento dos fatores ambientais começou a ser estudado, pois estudos genômicos indicam particularidades nas mutações que não explicam o desenvolvimento

e mesmo as manifestações da doença. Além de fatores ambientais, fatores relacionados ao estilo de vida podem estar associados, tais como: exposição à sílica, uso de álcool, estrogênios exógenos, tabagismo e infecções (Goyes et al., 2021). Tendo em vista a variedade de fatores que podem interagir e interferir na progressão e no desencadeamento do LES, estudos em animais podem contribuir de forma significativa para o conhecimento dos principais fatores de risco e na compreensão da fisiopatologia da doença (Blaskiewicz et al., 2020).

Em nosso estudo avaliamos apenas fêmeas de camundongos predispostos a LES já que a doença é mais comum em mulheres em idade reprodutiva do que em homens; a proporção é de 3 mulheres afetadas para cada homem e em crianças esta proporção é ainda maior, sendo de 9/1 (Yee et al., 2015; Lim et al., 2014).

O LES é uma doença complexa com diversas manifestações clínicas, incluindo artrite e alterações neurológicas, renais, cutâneas, gastrointestinais e hematológicas. Além destes, os indivíduos portadores de SLE apresentam risco aumentado para doenças cardiovasculares (Souza et al., 2011; Ferranz & Rodriguez, 1985).

Uma revisão sistemática de vários estudos mostra que o risco de doenças cardiovasculares em pacientes portadores de lúpus, é duas vezes maior que indivíduos normais e é uma das principais causas de morte entre estes indivíduos (Schoenfeld et al., 2013).

Ainda não há muitos estudos que tenham como foco os desfechos cardiovasculares e mais raros ainda são os que relacionam a exposição a poluição do ar de indivíduos predispostos ao LES e efeitos no sistema cardiovascular.

A hipertensão tem prevalência alta entre portadores de LES (Budman e Steinberg, 1976; Mandell, 1987; Petri, 2000; Selzer et al., 2001; Al-Herz et al., 2003; Sabio et al., 2011; Shaharir et al., 2015), porém ainda não se sabe ao certo as causas. Especula-se que haja uma interação entre fatores comumente associados (idade, sexo, etnia e obesidade), fatores relacionados a doença (alteração no sistema imunológico, inflamação, alterações no sistema renina-angiotensina, efeitos colaterais de remédios) e fatores ambientais sabidamente associados a hipertensão, como por exemplo a poluição do ar (Brook et al., 2014; Cançado et al., 2006; Sabio et al., 2001; Chaiamnuay et al., 2007).

Apesar da importância da função renal para o controle de longo prazo da pressão arterial, estudos que investigaram a relação entre alterações renais e doenças cardiovasculares nem sempre encontram a resposta esperada. Por exemplo, Ward & Studenski, 1992 e Petrin et al. 1993, verificaram que a hipertensão ocorre independente da nefrite e mais recentemente Shaharir e colegas (Shaharir et al., 2015) observaram em uma corte de pacientes com LES, que 53% eram hipertensos porém não apresentavam nefrite. Contudo, não é arriscado dizer que prejuízos na taxa de filtração glomerular (GFR) e no fluxo de plasma renal estão presentes em alguns dos pacientes portadores de LES (Nakano et al., 1998, Daniel et al., 2001).

Um estudo anterior do nosso grupo, no qual fêmeas de camundongos predispostas ao LES (NZBW1) foram expostas a poluição, observamos a diminuição da sobrevivência, aumento de neutrófilos circulantes, início precoce de proteinúria e aumento do peso do rim com aumento do córtex renal (Yariwake et al 2021). Neste trabalho, o objetivo foi avaliar as repercussões morfológicas sobre o sistema cardiovascular usando o mesmo modelo de fêmeas predispostas ao LES e expostas a poluição do ar.

Ainda que não tenhamos feito uma avaliação da função cardíaca em nossos animais, alterações no coração foram observadas, indicando potencial para levar a uma disfunção. Infelizmente por serem animais sensíveis e de custo muito elevado optamos por não os submeter a exames de função cardíaca, já que estes exigem a anestesia dos animais.

Embora existam trabalhos na literatura demonstrando que a poluição do ar contribui para o aumento do ganho de peso corpóreo, em decorrência à disfunção metabólica (An et al., 2018; Heyes & Zhu., 2019 e Deschenes et al., 2019) e relacionando positivamente a exposição à poluição ao aumento do peso corpóreo (Yang et al., 2019 & Deschenes et al., 2019), nossos resultados indicam que ambos os grupos ganharam peso durante o período de exposição, porém não houve diferença significativa entre o grupo exposto à poluição e o grupo controle. Alguns estudos demonstram um efeito protetor do estrógeno em fêmeas, resultando na resistência ao aumento de peso (Stubbins et al., 2012), podendo este ter sido um fator pelo qual não observamos um aumento da massa corporal no grupo exposto.

A avaliação do trofismo cardíaco foi feita pela pesagem dos corações e sua normalização pelo peso corpóreo, mas não observamos diferenças significativas. Um estudo recente, mostra que a linhagem de camundongos NZBWF1 apresenta espontaneamente um aumento na pressão arterial com 34 semanas de idade, e estas alterações são precedidas de alterações nos níveis circulantes de auto anticorpos, na função hemodinâmica renal e injúria glomerular (Dent et al., 2020), porém neste estudo não foram investigadas alterações morfológicas no sistema cardiovascular.

Em nosso estudo os animais foram avaliados com 28 semanas, e é importante ressaltar também, que em comparação ao estudo de Dent e cols (2020), nossos animais

eram mais jovens e, portanto, as alterações observadas podem estar em estágio inicial e provavelmente aceleradas pela exposição a poluição do ar. Além da hipertrofia dos cardiomiócitos, várias alterações incluindo apoptose, fibrose e alterações na circulação coronariana também são observadas e podem explicar o aumento do risco de desfechos cardiovasculares (Gawałko et al., 2020). As quantificações da área composta por fibras colágenas em nossos animais demonstraram um aumento da porcentagem de fibrose cardíaca nos animais expostos à poluição por 4 meses, condizente com dados prévios da literatura que demonstram a influência da poluição na deposição de fibrose cardíaca e sugestivos de alteração na função cardíaca (Belloti, 2012; Wold et al., 2012).

Em ratos hipertensos a exposição crônica ao MP2.5 induz disfunção cardíaca e hipertrofia de cardiomiócitos e estas alterações são subsequentes a aumentos na pressão sanguínea e inflamação sistêmica (Ying et al., 2015), o que indica que as alterações por nos observadas em nossos animais também possam estar associadas a alterações na pressão e função cardíaca.

As investigações das alterações no miocárdio foram realizadas pela análise da área relativa dos cardiomiócitos dos grupos. Apesar dos nossos dados não demonstrarem um aumento do peso cardíaco, no entanto, em nossa avaliação da morfologia cardíaca, observamos que os animais que foram expostos à poluição tiveram um aumento da área da superfície dos cardiomiócitos, indicando que a poluição foi capaz de promover hipertrofia cardíaca. Este resultado apresenta-se semelhante a outros estudos já publicados e que observam estas alterações em roedores (Belloti, 2012; Ying et al., 2009).

Para avaliação de marcadores inflamatórios, de morte celular e fator de crescimento endotelial, foram realizados ensaios de imuno-histoquímica, uma técnica

eficiente para investigação e quantificação de antígenos nos tecidos (Baldi et al, 2022). Para avaliar a dinâmica de crescimento endotelial, utilizamos o marcador VEGF (*vascular endothelial growth factor*), esta proteína tem grande importância no desenvolvimento de novos vasos e no aumento da permeabilização vascular (Valiatti et al., 2011), além disso, níveis séricos de VEGF servem como um preditor independente da atividade da LES, mas não há estudos que mostrem alterações no músculo cardíaco de pacientes com LES (Willis et al., 2017; Tang et al., 2019). Ao contrário do esperado, nossos achados não demonstraram diferença significativa na marcação de VEGF quando comparados o grupo exposto a poluição e o grupo controle, contrapondo estudos onde foi demonstrado o aumento da produção da proteína associada à exposição aguda ao MP2.5 (Finch et al., 2019; Sun et al., 2018). Porém, nosso estudo difere no modelo utilizado, na dose de exposição e no tempo de exposição dificultando a comparação.

Um dos marcadores inflamatórios analisados foi a interleucina-17A (IL-17A), um elemento pró-inflamatório importante. Suas funções incluem recrutamento de neutrófilos, resposta contra agentes patogênicos extracelulares e indução de inflamação (Torres & Filipe, 2014), estando também relacionada a doenças autoimunes (Jin & Dong, 2013). Estudos evidenciaram que o bloqueio da IL-17 tem capacidade de diminuir manifestações do LES (Hsu et al., 2008), apontando ser um agente importante neste estudo. Nossos achados demonstraram uma tendência ao aumento da expressão de IL-17A no tecido cardíaco, porém não foi observada diferença estatística entre os grupos.

Contudo, ainda investigando inflamação, analisamos a interleucina-1 β (IL-1 β), uma citocina altamente inflamatória produzida principalmente por macrófagos, monócitos e células dendríticas (Varela & Forte, 2001; Costa & Antunes, 2008). Em nossos resultados, observamos um aumento da marcação de IL-1 β , nos camundongos que foram expostos ao MP2.5, quando comparado ao grupo controle, esses dados

corroboram com dados publicados, onde foi observado que a exposição à poluição atmosférica está diretamente associada ao aumento dos níveis séricos e moleculares de IL-1 β (Tsai et al., 2012; Fonken et al., 2012).

Também avaliamos a apoptose no tecido cardíaco dos animais expostos ou não ao PM2.5. A apoptose é um mecanismo de morte celular programada, onde em condições fisiológicas é um sistema de manutenção das células e reposição de tecidos (Gasques et al., 2013). Já a apoptose patológica, pode ser desencadeada por fatores nocivos que causam injúria celular, como por exemplo a poluição atmosférica (MP2.5), que foi já evidenciada como indutora de morte por apoptose em células epiteliais brônquicas (Colasanti et al., 2018).

A caspase-3 é um marcador altamente utilizado em ensaios imuno-histoquímicos para análise de apoptose (Gomes et al., 2008). O nível sérico de caspase 3 e caspase 9 é maior entre os pacientes com LES quando comparados aos controles, conforme observado por (Hamza et al., 2020). Como mencionado, neste trabalho analisamos a imuno-expressão da caspase-3 no tecido cardíaco e nossos resultados demonstraram uma tendência ao aumento desse marcador, porém estatisticamente não houve diferença. A caspase 3 foi avaliada pois a morte celular mediada intrinsecamente é necessária para o desenvolvimento de hipertrofia de cardiomiócitos (Putinski et al., 2013). Contudo, este achado corrobora resultados descritos anteriormente (Fuchs, 2014; Wang et al., 2019; Yang et al., 2019) onde houve um aumento da imuno-expressão de caspase-3, em animais expostos à poluição do ar.

O complemento C3 é um mediador inflamatório que faz parte do sistema complemento, utilizado como indicador importante da fisiopatologia do LES. Quando ativado, pode desencadear citólise, recrutamento de leucócitos e inflamação nos tecidos

onde é depositado (Silva et al., 2011). Realizamos a análise da imuno-expressão de C3 e constatamos um aumento da deposição deste marcador, no miocárdio dos animais que foram expostos a poluição. Esse achado vai de acordo com dados encontrados na literatura, onde há um aumento da deposição de imunocomplexos em diferentes tecidos, quando a doença está em atividade, bem como no tecido cardíaco (Utiyama et al., 2004; Glovsky et al., 2004).

A avaliação do comprometimento cardíaco em modelos animais de LES espontâneo (BXSB, MRL/1 e NZB/W F1) mostram que em todas as linhagens desenvolvem lesões nos vasos coronarianos e infartos do miocárdio, caracterizado por necrose de cardiomiócitos e hemorragia focal, infiltração de leucócitos, macrófagos e formação de tecido cicatricial. Em nosso estudo não observamos estas alterações. Depósitos de IgG e complemento C3 são observados nos vasos dos átrios e ventrículos em todas as linhagens, e, portanto, acredita-se que a deposição de imunocomplexos desempenha um papel na patogênese subjacente (Accinni e Dixon, 1979; Sanghera et al., 2019).

Outro marcador importante característico do LES, é produção de anticorpos anti-DNA e está diretamente relacionado a atividade da doença, sendo utilizado por muitos estudos, como um parâmetro de confirmação da doença (Jesus et al., 2012; Marçon et al., 2004). Nesse sentido, realizamos um ensaio para detecção desses anticorpos nos animais lúpicos, visando verificar a possível interferência da exposição ao material particulado, na produção desse marcador. De acordo com os demais resultados, presumíamos identificar um aumento na produção destes anticorpos, entretanto, não observamos diferença estatística entre os grupos exposto e controle. Apesar deste

resultado, ambos os grupos apresentaram produção de anticorpos anti-DNA, reafirmando essa característica do LES nos animais NZBW.

Finalmente, podemos observar neste estudo, a forte influência da exposição ao material particulado fino 2.5, na modulação da produção de marcadores inflamatórios no miocárdio de animais que manifestam o LES, e conseqüentemente alterações morfológicas nesse tecido. Não se sabe ao certo todos os mecanismos envolvidos neste processo, necessitando estudos mais específicos, possivelmente aos níveis moleculares e genéticos, para melhor entendimento da interação entre o MP2.5 e o manifestações cardíacas no LES.

CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou que a exposição ao material particulado fino, é capaz de promover a hipertrofia de cardiomiocitos e aumento da deposição de colágeno em animais que desenvolvem LES espontaneamente, bem como aumentar a imunopressão de IL-1 β e de C3, associados a inflamação e a atividade da LES, respectivamente. Esses dados sugerem que o MP2.5, é capaz de intensificar a atividade da doença e agravar os efeitos cardiovasculares associados.

REFERÊNCIAS

ACCINNI, L & DIXON, F. **Degenerative vascular disease and myocardial infarction in mice with lupus-like syndrome.** Am J Pathol, 96 p.477-92. 1979.

AKINAGA, L.; LICHTENFELS, A.; OLIVEIRA, R.; CALDINI, E.; DOLHNIKOFF, M.; SILVA, L.; BUENO, H.; PEREIRA, L.; SALDIVA, P.; GARCIA, M. **Effects of Chronic Exposure to Air Pollution from Sao Paulo City on Coronary of Swiss Mice, from Birth to Adulthood.** Toxicologic Pathology, 37: 306-314, 2009.

AKINAGA, L.; LICHTENFELS, A.; OLIVEIRA, R.; CALDINI, E.; DOLHNIKOFF, M.; SILVA, L.; BUENO, H.; PEREIRA, L.; SALDIVA, P.; GARCIA, M. **Effects of Chronic Exposure to Air Pollution from Sao Paulo City on Coronary of Swiss Mice, from Birth to Adulthood.** Toxicologic Pathology. n.37, n.3, p.306-314. 2009.

AKSAKAL, E.; AKARAS, N.; TANBOGA, I.; KURT, M.; HALICI, Z.; ODABASIOGLU, F.; UNAL, B. **Relationship between oxidative stress and cardiomyopathic changes in ovariectomized rats.** Cardiology. n 4, v.119, p.235-41, 2011.

AI-HERZ, A; ENSWORTH, S; SHOJANIA, K; ESDAILE, J. **Cardiovascular risk factor screening in systemic lupus erythematosus.** The Journal of Rheumatology, 30, 493-6, 2003.

ALI, M.; FIROZ C.K.; JABIR, N.R.; REHAN, M.; KHAN, M.S.; TABREZ, S. **An Insight on the pathogenesis and treatment of Systmic Lupus Erythematosus.** Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. n.2, v.18, p.110-123, 2018.

ALVES, A; GIACOMIN, M; BRAGA, A; SALLUM, A; PEREIRA, P; FARHAT, L; STRUFALDI, F; LICHTENFELS, A; CARVALHO, T; NAKAGAWA, N; SILVA, C; FARHAT, S. **Influence of air pollution on airway inflammation and disease activity in childhood-systemic lupus erythematosus.** Clin Rheumatology, n.3, v.37, p.683-690, 2018.

AN, R.; ZHANG, S.; JI, M.; GUAN, C. **Impact of ambient air pollution on physical activity among adults: a systematic review and meta-analysis.** Perspect Public Health. n.2, v.138, p.111-121. 2018.

ARBEX, M; SANTOS, U; MARTINS, L; SALDIVA, P; PEREIRA, L; BRAGA, A. **A poluição do ar e o sistema respiratório.** Jornal Brasileiro de Pneumologia. n.5, v.38, p.1806-3756, 2012.

AZEVEDO, P. POLEGATO, B.; MINICUCCI, M.; PAIVA, S.; ZORNOF, L. **Remodelação Cardíaca: Conceitos, Impacto Clínico, Mecanismos Fisiopatológicos e Tratamento Farmacológico.** Sociedade Brasileira de Cardiologia. n.1, v.106, p.62-69. 2016

BALDI, K.R.A.; LIMA, J.L.F.; SILVA, I.G.; PEROSA, F.F.; MENDES, R.E.; GOMES, T.M.A. **Comparison between immunofluorescence and immunohistochemistry for Listeria monocytogenes detection in formalin-fixed paraffin-embedded tissues.** Microbiology cienc rural. n.3, v.52, 2022.

BARBHAYA, M; COSTENBADER, K.H. **Environmental exposures and the development of systemic lupus erythematosus.** Current Opinion in Rheumatology. n.5, v.28, p.497-505, 2016

BELOTTI, L. **Efeitos cardiopulmonares da exposição ao material particulado fino (MP2,5) proveniente do concentrador de partículas ambientais (CPA) na hipertrofia ventricular esquerda de ratos wistar.** Dissertação de mestrado, São Paulo, 2012.

BLASKIEVICZ, P.; SILVA, A.; FERNANDES, V.; JUNIOR, O.; SHIMOYA-BITTENCOURT, W.; FERREIRA, S.; SILVA, C. **Atmospheric Pollution Exposure Increases Disease Activity of Systemic Lupus Erythematosus.** Int. J. Environ. Res. Public Health. n.6, v.17. p.1984, 2020.

BONILLA, J.P.R.; BREYSSE, P.N.; DOMINICI, F.; GEYH, A. TANKERSLEY, C.C. **Ambient air pollution alters heart rate regulation in aged mice.** Inhalation Toxicology. n.4, v.22, p.330-339, 2009.

BRITO, G.; SODRÉ, F.; ALMEIDA, V. **O Impacto do Material Particulado na Qualidade do Ar.** Rev. Virtual Quim. n.5, v.10, 2018.

BROOK, R. **Cardiovascular effects of air pollution.** Clinical Science. n.6, v.115, p.175-187. 2008.

BROOK, R. FRANKLIN, B.; CASCIO, W.; HONG, Y.; HOWARD, G.; LIPSETT, M.; LUEPKER, R.; MITTLEMAN, M.; SAMET, J.; SMITHJR, S.; TAGER, I. **Air Pollution and Cardiovascular Disease: A Statement for Healthcare Professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association.** Circulation. n.21, v.109, p.2655-2671, 2004.

BROOK, R.; RAJAGOPALAN, S.; POPE, A.; BROOK, J.; BHATANAGAR, A.; DIEZ, A.; HOLGUIN, F.; HONG, Y.; LUEPKER, R.; MITTLEMAN, M.; PETERS, A.; SISCOVICK, D.; SMITH, S.; WHITSEL, L.; KAUFMAN, J. **Particulate Matter Air Pollution and Cardiovascular Disease.** Circulation. n.21, v.121, p.2331-2378, 2010.

BROWER, G.; GARDNER, J.; FORMAN, M.; MURRAY, D.; VOLOSHENYUK, T.; LEVICK, S.; JANICKI, J. **The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function.** European Journal of Cardio-thoracic Surgery. n.4, v.30, p.604-610, 2006.

BUDMAN, D & STEINBERG, A. **Hypertension and renal disease in systemic lupus erythematosus.** Arch Intern Med,136, 1003-7, 1976.

CALDERÓN-GARCIDUENÃS, L.; LERAY, E.; HEYDARPOUR, P.; TORRES-JARDÓN, R.; REIS, J. **Air pollution, a rising environmental risk factor for cognition, neuroinflammation and neurodegeneration: The clinical impact on children and beyond.** Rev Neurol (Paris). n.1, v.172, p.69-80, 2016.

CANÇADO, J.; BRAGA, A.; PEREIRA, L.; ARBEX, M.; SALDIVA, P.; SANTOS, U. **Clinical repercussions of exposure to atmospheric pollution.** Jornal Brasileiro de Pneumologia. n.2, v.32, 2006.

Cetesb, **Poluentes**. Disponível em: <http://cetesb.sp.gov.br/ar/poluentes>. Acesso: em 4 de abril de 2018.

Cetesb, **Qualidade do ar**. Disponível em: <http://cetesb.sp.gov.br/ar/>. Acesso: em 4 de abril de 2018.

CHAIAMNUAY, S; BERTOLI, A; ROSEMAN, J; MCGWIN, G; APTE, M; DURAN, S; ET AL. **African-American and Hispanic ethnicities, renal involvement and obesity predispose to hypertension in systemic lupus erythematosus: results from LUMINA, a multiethnic cohort (LUMINA XLV)**. Ann Rheum Dis, 66, 618–22, 2007.

CHENG, J.; WNAG, X.; WELLENIUS, G.; SERRE, M.; DRISCOLL, L.; CASANOVA, R.; MCARDLE, J.; MANSON, J.; CHUI, H.; ESPELAND, M. **Ambient air pollution and neurotoxicity on brain structure: Evidence from women's health initiative memory study**. Ann Neurol. n.3, v.78, p.446-476, 2015.

COJOCARU, M; COJOCARU, I; SILOSI, I; VRABIE, C. **Manifestations of Systemic Lupus**. A Journal of Clinical Medicine. n.4, v.6, p.330-336. 2011.

COLASANTI, T.; FIORITO, S.; ALESSANDRI, C.; SERAFINO, A.; FEDERICA, A.; BARBATI, C.; MORELLO, F.; ALFÉ, M.; BLASIO, G.D.; GARGIULO, V.; VOMERO, M.; CONTI, F.; VALESINI, G. **Diesel exhaust particles induce autophagy and citrullination in Normal human bronchial epithelial cells**. Cell Death e Disease. n.1073, v.9, 2018.

COSTA, R.D.; MENONÇA, V.A.; LYON, S.; PENIDO, R.A.; COSTA, A.M.D.D.; COSTA, M.D.; NISHI, M.P.; TEIXEIRA, M.M.; TEIXEIRA, A.L.; ANTUNES, C.M.F. **Avaliação de expressão de interleucina 1 beta (IL-1B) e antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1Ra) em pacientes com Hanseníase**. Rev Soc Bras Med. n.2, v.41, 2008.

COSTI, L; IWAMOTO, M; NEVES, D; CALDAS, M. **Mortalidade por lúpus eritematoso sistêmico no Brasil: avaliação das causas de acordo com o banco de dados de saúde do governo**. Revista Brasileira de Reumatologia. n.6, v.57, p.574-582, 2017.

DANIEL, L; SICHEZ, H; DUSSOL, B; BRANGER, D; PELLISSIER, J; BERLAND, Y. **Tubular lesions and tubular cell adhesion molecules for the prognosis of lupus nephritis**. Kidney International, 60, p. 2215-2221, 2001.

DAVEL, A.; LEMOS, M.; PASTRO, L.; PEDRO, S.; ANDREC, P.; HEBEDAD, C.; FARSKYD, S.; SALDIVA, P.; ROSSONIE, L. **Endothelial dysfunction in the pulmonary artery induced by concentrated fine particulate matter exposure is associated with local but not systemic inflammation**. Toxicology. n.1-3, v.295, p.39-46, 2012.

DENT, E; TAYLOR, E; SASSER, J; RYAN, M. **Temporal hemodynamic changes in a female mouse model of systemic lupus erythematosus**. Renal Hemodynamics, 318: F1074–F1085, 2020.

DESCHENES, O.; WANG, H.; WANG, S.; ZHANG, P. **The effect of air pollution on body weight and obesity: Evidence from China**. Elsevier, 102461, 2020.

DOMENICO, M; BENEVENUTO, S; TOMASINI, P; YARIWAKE, V; ALVEZ, N; RAHMEIER, F; FERNANDES, M; MOURA, D; SALDIVA, P; VERAS, M. **Concentrated ambient fine particulate matter (PM2.5) exposure induce brain damage in pre and postnatal exposed mice.** NeuroToxicology. n.127, v,79, p.127-141, 2020

FERRANS, V & RODRÍGUEZ, E. **Cardiovascular lesions in collagen-vascular diseases.** Heart and Vessels, 1, p. 256–261, 1985.

FINCH, J.; RIGGS, D.W.; O'TOOLE, T.E.; POPE, C.A.; BHATNAGAR, A.; CONKILIN, D.J. **Acute exposure to air pollution is associated with novel changes in blood levels of endothelin-1 and circulating angiogenic cells in young, healthy adults.** AIMS Environmental Science. n.4, v.6, p.265-276. 2019.

FONKEN, L.K.; XU, X.; WEIL, Z.M.; CHEN, G.; SUN, Q.; RAJAGOPALAN, S.; NELSON, R.J. **Air pollution impairs cognition, provokes depressive-like behaviors and alters hippocampal cytokine expression and morphology.** Molecular psychiatry. v.16, p.987-995. 2011.

FORTUNA, G & BRENNAN, M. **Systemic Lupus Erythematosus Epidemiology, Pathophysiology, Manifestations, and Management.** Dent Clin N Am 57 631–655, 2013.

FRANCK, U.; ODEH, S.; WIEDENSOHLER, A.; WEHNER, B.; HERBARTH, O. **The effect of particle size on cardiovascular disorders—the smaller the worse.** Sci Total Environ. n.20, v.409, p.4217-4221, 2011.

FREIREI, E; SOUTOII, L; CICONELLI, R. **Medidas de avaliação em lúpus eritematoso sistêmico.** Rev. Bras. Reumatol. n.1, v.51, p.70-80, 2011.

FUCHS, LUIZ. **Efeito da poluição do ar na adrenal de camundongos aspectos histomorfométricos e imunoistoquímicos.** Tese de doutorado, faculdade de medicina da universidade de São paulo. São Paulo. 2014.

GALINDO, C; VEIGA, R. **Características clínicas e diagnósticas do lúpus eritematoso sistêmico: uma revisão.** Revista eletrônica de Farmácia, n.4, v.7, p.13, 2011.

GASQUES, L.S.; GALVANINI, P.A.; FAVARETTO, F.; SANTANA, T.F.; PAMPHILE, J.A. **Independência ou morte; a apoptose como mecanismo de defesa.** Arq Ciênc saúde UNIPAR. n.1, v.17, p.49-53, 2013.

GAWAŁKO, M; BALSAM, P; LODZIŃSKI, P; GRABOWSKI, M; KRZOWSKI, B; OPOLSKI, G; KOSIUK, J. **Cardiac Arrhythmias in Autoimmune Diseases.** Circulation Journal, 84, 685–694, 2020.

GLOVSKY, M; WARD, P; JOHNSON, K. **Complement determinations in human disease.** Annals of Allergy, Asthma & Immunology, v 93, P. 513-523, 2004.

GOMES, M.J.; FILHO, J.M.R.; MALAFIA, O.; CZECZKO, N.G.; RIBAS, C, A,P,M.; NASSIF, P.A.N.; BITTENCOURT, L.P.M. **Avaliação da expressão da caspase-3 no**

adenocarcinoma colorretal através de um sistema computadorizado de análises de imagem. ABCD, arq, cir, dig. n.1, v.21, 2008.

GOODMAN, P.; DOCKERY, D.; CLANCY, L. **Cause-Specific Mortality and the Extended Effects of Particulate Pollution and Temperature Exposure.** Environmental Health Perspectives, n.2, v.112, p.179-85, 2004.

GOUVEIA, N.; AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S.; LEON, A.; CORREIA, J.; JUNGER, L.; FREITAS, C.; DAUMAS, R.; MARTINS, L.; GIUSSEPE, L.; CONCEIÇÃO, G.; MENERICH, A.; CRUZ, J. **Poluição do ar e efeitos na saúde nas populações de duas grandes metrópoles brasileiras.** Epidemiol. Serv. Saúde, n.1, v.12, p.29-40, 2003.

GOYES, A; MORA, C; ARSANIOS, D; ORDUZ, K. **Systemic lupus erythematosus, a disease conditioned by the environment****Lupus eritematoso sistémico, una enfermedad condicionada por el medio ambiente.** Revista Colombiana de Reumatología, 28, p.12-20, 2021.

HAMZA, I; MOHAMED, K; MAHAMED, S. **The role of caspase 3 and caspase 9 in systemic lupus erythematosus patients.** Biochem, Cell. Arck, 20, p. 1179-1182, 2020.

HEYES, A. & ZHU, M. **Air pollution as a cause of sleeplessness: Social media evidence from a panel of Chinese cities.** Ideas, 07.002, 2019.

HOST, S.; LARRIEU, S.; PASCAL, L.; BLANCHARD, M.; DECLERCQ, C.; FABRE, P.; JUSOT J.; CHARDON, B.; TERTRE, A.; WAGNER, V.; PROUVOST, H.; LEFRANC, A. **Short-term associations between fine and coarse particles and hospital admissions for cardiorespiratory diseases in six French cities.** Occupational and Environmental Medicine. n.8, v.65, p.544-551, 2008.

HSIEH, Y.; TSAI, S.; YANG, C. **Fine particulate air pollution and hospital admissions for congestive heart failure: a case-crossover study in Taipei.** Inhal Toxicol. n.8, v.25, p.455-460, 2013.

HSU, H.C.; YANG, P.; WANG, J.; MYERS, R.; CHEN, J.; YI, J.; GUENTERT, T.; TOUSSON, A.; STATUS, A.L.; LE, T.L.; LORENZ, R.G.; XU, H.; KOLLS, J.K.; CARTER, R.H.; CHAPLIN D.D.; WILLIAMS, R.W.; MOUNTZ, J.D. **Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice.** Nature immunology. n.2, v.9, p.166-175. 2008.

HUANG, L.; XI, Z.; WANG, C.; ZHANG, Y.; YANG, Z.; ZHANG, S.; CHEN, Y.; ZUO, Z. **Phenanthrene exposure induces cardiac hypertrophy via reducing miR-133a expression by DNA methylation.** Scientific Reports. n.6, 20105, 2016.

HUMAN GENOME SCIENCES INC AND THE GLAXOSMITHKLINE GROUP OF COMPANIES. **Systemic Lupus Erythematosus: A Primer for Managed Care.** A Supplement to The American Journal of Managed Care, 2012.

INSTITUTO DE ENERGIA E MEIO AMBIENTE (IEMA). Disponível em:<https://energiaeambiente.org.br/qualidadedoar>. acessado em: 17 de fevereiro de 2022.

JESUS, A.A.; CAMPOS, L.M.A.; LIPHAUS, B.L.; SAMPAIO, M.C.; ROSSETO, E.A.; SILVA, C.A.A.; SCHEINBER, M. **Anticorpos anti-C1q , anticromatina/nucleossomo e anti-dsDNA em pacientes com lúpos eritematoso sistêmico juvenil.** Rev Bras Reumatol. n.6, v.52, 2012.

JIN, W.; DONG, C. **IL-17 cytokines in immunity and inflammation.** Emerg Microbes Infect. n.1, v.2, p.1-5, 2013.

JURIJ, P; BLAZ, R; PRIMOZ, D; DUSAN, L; BORUT, B; ALENKA, V; DUSAN, F; PAVLE J. **The Dissociation of Arterial Hypertension and Lupus Glomerulonephritis in Systemic Lupus Erythematosus.** Blood Pressure, 108-112, 1993.

KIM, K.H.; KABIR, E.; KABIR S. **A review on the human health impact of airborne particulate matter.** Environment International. v.74, p.16-143. 2015.

KODAVANTI, U.; RUSSELL, J.; COSTA, D. **Rat models of cardiometabolic diseases: baseline clinical chemistries, and rationale for their use in examining air pollution health effects.** Inhalation Toxicology. n.1, v.27, p.2-13, 2015.

LAZOU, A; IKONOMIDIS, I; BARTEKOVA, M; BENEDEK, T; MAKAVOS, G; PALIOURA, D; FUENTES, H; ANDREADOU, I. **Chronic inflammatory diseases, myocardial function and cardioprotection.** British Pharmacological. n.23, v.177, p.5357-5374. 2020.

LIM, S; BAYAKLY, A; HELMICK, C; GORDON, C; EASLEY, K; DRENKARD, C. **The incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus, 2002-2004: The Georgia Lupus Registry.** Arthritis Rheumatol. 66, p.357–368, 2014.

LIU, Y.; GOODSON, J.; CHIN, M. **Air pollution and adverse cardiac remodeling: clinical effects and basic mechanisms.** Frontier in Physiology. n.162, v.6, 2015.

MAGALHÃES, F.; MENDONÇA, L.; REBOUÇAS, C.; LIMA, F.; CUSTYÓDIO, I.; OLIVEIRA, S. **Fatores de risco para doenças cardiovasculares em profissionais de enfermagem: estratégias de promoção da saúde.** Revista Brasileira de Enfermagem. n.3, v. 67, p.394-400, 2014.

MANDELL, B. **Cardiovascular involvement in systemic lupus erythematosus.** Semin Arthritis Rheum, 17, 126-41, 1987.

MARÇON, C.R.; MORAES, M.R.; LANZELOTTI, S.M.; SIMIS, D.R.C.; NOVAES, G.S. **Marcadores de Envolvimento sistêmico no lúpus eritematoso crônico discóide.** Rev Bras Reumatol. n.5, v, 44, 2004.

MIZUI, M AND TSOKOS, G. **Animal Models: Systemic Autoimmune Diseases.** The Autoimmune Diseases. 6 ed., Capítulo. 29, p.533-511, 2020.

MIZUI, M; TSOKOS G. **Animal Models: Systemic.** Autoimmune Diseases (Sixth Edition), 2020.

MOTA, D. **Caracterização físico-química do material particulado emitido por forno de pizzaria: estudo de caso da Pizzaria Achiropizza.** *Ciência e Natura*, Santa Maria, v. 36 n. 2. p. 258–267, 2014.

NAKANO, M; UENO, M; HASEGAWA, H; WATANABE, T; KURODA, T; ITO, S; ARAKAWA M. **Renal haemodynamic characteristics in patients with lupus nephritis.** *Ann Rheum Dis*, 57, p 226–230, 1998.

OPAS, **Doenças Cardiovasculares.** Disponível em: http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=839. Acesso em 10 de maio de 2018.

PETRI, M. **Detection of coronary artery disease and the role of traditional risk factors in the Hopkins Lupus Cohort.** *Lupus*, 9, 170-5, 2000.

PUTINSKI, C; ABDUL-GHANI, M; STILES, R; BRUNETTE, S; DICK, S; FERNANDO, P; MEGENEY, L. **Intrinsic-mediated caspase activation is essential for cardiomyocyte hypertrophy.** *Proceedings of the national academy of sciences*, 110, 43, 2013.

ROBERTSON, S.; MILLER, M.R. **Ambient Air Pollution and Thrombosis.** *Part Fibre Toxicol.* n.1, v.15. 2018.

SABIA, J; HITOS, J; NAVARRETE, N; MEDIAVILLA, J; JAIMEZ, J; CHAMORRO, D; ALONSO, J. **Prevalence of and Factors Associated with Hypertension in Young and Old Women with Systemic Lupus Erythematosus.** *The Journal of Rheumatology*, 38, 1026-1032, 2011.

SABIO, J; MEDIAVILLA, J; FERNÁNDEZ-TORRES, C; ALIAGA, L; JIMÉNEZ-ALONSO, J. **Risk factors related to hypertension in a Spanish systemic lupus erythematosus cohort.** *Lupus*,10, 451–2, 2001.

SANGHERA, C; WONG, L; PANAH, M; SINTOU, A; HASHAM, M; SATTLER. **Cardiac phenotype in mouse models of systemic autoimmunity.** *Dis Model Mech.* 12, 3, 2019.

SCHOENFELD, S; KASTURI, S; COSTENBADER, K. **The epidemiology of atherosclerotic cardiovascular disease among patients with SLE: a systematic review.** *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 43, p.77-95, 2013.

SELZER, F; TYRRELL, K; FITZGERALD, S; TRACY, R; KULLER, L; MANZI, S. **Vascular Stiffness in Women With Systemic Lupus Erythematosus.** *Hypertension*, 37, 1075-1082, 2001.

SHAHRBAF, M.A.; AKBARZADEH, M.A.; TABARY, M.; KHAHESHI, I. **Air Pollution and Cardiac Arrhythmias: A comprehensive Review.** *Current Problems in Cardiology.* n.3, v.46, 2021.

SHAHARIR, S; GAFOR, A; SAID, M; KONG.N. **Steroid-induced diabetes mellitus in systemic lupus erythematosus patients: analysis from a Malaysian multi-ethnic lupus cohort.** *Rheumatic Diseases*, 18, p. 541-547, 2015.

SHARMA, R; HE, Q; RILEY, R. **Lupus-prone NZBWF1/J mice, defective in cytokine signaling, are resistant to fumonisin hepatotoxicity despite accumulation of liver sphinganine.** Toxicology. n.1, v.216, p.59-71. 2005.

SILVA, H.C.L.; MOSCA, T.; FORTE, W.C.N. **Aumento sérico dos componentes C3 e C4 do complemento e presença de doenças.** Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo. n.3, v.56, p.122-126. 2011.

SIMKHOVICH, B.; MARJORAM, P.; KLEINMAN, M.; KLONER, R. **Direct and acute cardiotoxicity of ultrafine particles in young adult and old rat hearts.** Basic Research in Cardiology. n.6, v.106, p.467-475. 2007.

SOMERS, E; RICHARDSON, B. **Environmental Exposures, Epigenetic Changes and the Risk of Lupus.** Lupus, Author manuscript. n.6, v.23, p.568-576. 2014.

SOUZA, A; DIONELLO, C; RESENDE, M. **Insuficiência Cardíaca Secundária a Lúpus Eritematoso Sistêmico.** Rev Bras Cardiol, 24, 186-188, 2011.

STRICKLAND, F; LI, Y; JOHNSON, K; SUN, Z; RICHARDSON, B. **CD4+ T Cells Epigenetically Modified by Oxidative Stress Cause Lupus-like Autoimmunity in Mice.** J Autoimmune. v.62, p.75-80, 2016.

STUBBINS, R.; HOLCOMB, V.; HONG, J.; & NÚÑEZ, N. **Estrogen modulates abdominal adiposity and protects female mice from obesity and impaired glucose tolerance.** Eur J Nutr. n.7, v.51, p.861–870, 2012.

SUN, Y.; WANG, Y.; SHU, Y.; WEN, J.; LI, W.; YANG, L.; HUANG, X.; MO, Y.; ZHAO, Y.; LU, Y. **Exposure to PM2.5 via vascular endothelial growth factor relationship: meta-analysis.** Plos One. n.6, v.13, 2018.

TANG, W; ZHOU, T; ZHONG, Z; ZHONG, H. **Meta-analysis of associations of vascular endothelial growth factor protein levels and-634G/C polymorphism with systemic lupus erythematosus susceptibility.** BMC Med. Genet, 20, 46, 2019.

TANKERSLEY, C.; CHAMPION, H.; TAKIMOTO, E.; GABRIELSON, K.; BEDJA, D.; MISRA, V.; EL-HADDAD, H.; RABOLD, R.; MITZNER, W. **Exposure to inhaled particulate matter impairs cardiac function in senescent mice.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. n.1, v.295, p. 252–263, 2008.

TEJON, G; HIDALGO, T; BONO, M; ROSEMBLATT, M. **Um modelo espontâneo de lúpus em camundongo: fisiologia e terapia.** Lúpus - novos avanços e desafios, Sophia Lionaki, IntechOpen, 2019.

TORRES, T.; FILIPE, P. **Interleucina-17 como Alvo Terapêutico na Psoríase.** Acta Med Port. n.2, v.27, p.252-258, 2014.

TSAI, D.H.; AMYAI, N.; VIDAL, P.M.; WANG, J.L.; RIEDIKER, M.; MOOSER, V.; PACCAUD, F.; WAEBER, G.; VOLLENWEIDER, P.; BOCHUD, M. **Effects of particulate matter on inflammatory markers in the general adult population.** Particle and Fibre Toxicology. n.24, v.9, 2012.

UTIYAMA, S; REASON, I; KOTZE, L. **The complement system in diseases: genetic and pathogeny**. Sociedade Brasileira de Reumatologia, 44, 2004.

VALIATTI, F.B.; CRISPIM, D.; BENFICA, C.; VALIATTI, B.B.; KRAMER, C.K.; CANANI, L.H. **Papel do fator de crescimento vascular endotelial na angiogênese e na retinopatia diabética**. Arq Bras Endocrinol Metab. n.2, v.55, p.106-113. 2011.

VARELLAL, P.P.V.; FORTE, W.C.N. **Citocina: a revisão**. Revista Brasileira de alergia e imunopatologia. n.4, v.24, p.146-154. 2001.

VERAS, M.; CALDINI, E.; DOLHNIKOFF, M.; SALDIVA, P. **Air pollution and effects on reproductive-system functions globally with particular emphasis on the Brazilian population**. J Toxicology Environ Health B Crit Rev. n.1, v.13, p.1-15. 2010.

VILAR, M; RODRIGUES, J; SATO, E. **Incidência de lúpus eritematoso sistêmico em Natal, RN – Brasil**. Revista Brasileira de Reumatologia. n.6, v.43, 2003.

WANG, D & SUN, L. **Systemic Lupus Erythematosus**. A Roadmap to Non-Hematopoietic Stem Cell-based Therapeutics, 143-172, 2019.

WANG, Q; GAN, X; LI, F; CHEN, Y; FU, W; ZHU, X; XU, D; LONG, M; XU, D. **PM2.5 Exposure Induces More Serious Apoptosis of Cardiomyocytes Mediated by Caspase3 through JNK/ P53 Pathway in Hyperlipidemic Rats**. Int J Biol Sci, 15 p.24-33, 2019.

WARD, M; STUDENSKI, S. **Clinical prognostic factors in lupus nephritis. The importance of hypertension and smoking**. Arch Intern Med, 152, 2082-8, 1992.

WASHIO, M; KIYOHARA, C; OHTA, A. **Epidemiology of systemic Lupus Erythematosus**. Intech Open, 2019.

WILLIS, R; SMIKLE, M; DECEULAER K; PENABAD, Z; PAPALARGO, R; JAJORIA, P; HARPER, B; MURTHY, V; PETRI, M; GONZALEZ, E. **Clinical associations of proinflammatory cytokines, oxidative biomarkers and vitamin D levels in systemic lupus erythematosus**. Lupus, 26, p.1517-1527, 2017.

WOLD, L.; YING, Z.; HUTCHINSON, K.; VELTEN, M.; GORR, M.; VELTEN, C.; YOUTZ, D.; WANG, A.; LUCCHESI, P.; SUN, Q.; RAJAGOPALAN, S. **Cardiovascular Remodeling in Response to Long-Term Exposure to Fine Particulate Matter Air Pollution**. National Institute of Health. n.4, v.1:5, p.452–461, 2012.

WOLD, L.E.; YING, Z.; HUTCHINSON, K.R.; VELTEN, M.; GORR, M.W; VELTEN, C.; YOUTZ, D.J.; WANG, A.; LUCCHESI, P.A.; SUN, Q.; RAJAGOPALAN, S. **Cardiovascular Remodeling in Response to Long-Term Exposure to Fine Particulate Matter Air Pollution**. Circ Heart Fail. n.4, v.5, p.452-461. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (OMS). Air Pollution. disponível em: https://www.who.int/health-topics/air-pollution#tab=tab_1. acessado em: 17 de fevereiro de 2022.

XU, Y.; ARENAS, I.; ARMSTRONG, S.; DAVIDGE, S. **Estrogen modulation of left ventricular remodeling in the aged heart.** Cardiovasc Res. n.2, v.57, p.388-394, 2003.

YANG, X; ZHAO, T; FENG, L; SHI, Y; JIANG, J; LIANG, S; SUN, B; XU, Q; DUAN, J; SUN, Z. **PM2.5-induced ADRB2 hypermethylation contributed to cardiac dysfunction through cardiomyocytes apoptosis via PI3K/Akt pathway.** Environment International, 127, p.601-61, 2019.

YANG, Z.; SONG, Q.; LI, J.; ZHANG Y. **Air Pollution as a Cause of Obesity: Micro-Level Evidence from Chinese Cities.** Int J Environ Res Public Health. n.21, v.16, p.4296. 2019.

YARIWAKE, V; TORRES, J; SANTOS, A; FREITAS, S; ANGELIS, K; FARHAT, S; CAMARA, N; VERAS, M. **Chronic exposure to PM2.5 aggravates SLE manifestations in Lúpus-prone mice.** Part Fibre Toxicol, v 18, 2021.

YEE, C; SU, L; TOESCU, V; HICKMAN, R; SITUNAYAKE, D; BOWMAN, S; FAREWELL, V; GORDON, C. **Birmingham SLE cohort: outcomes of a large inception cohort followed for up to 21 years.** Rheumatology (Oxford) 54, p.836–843, 2015.

Ying Z, Xie X, Bai Y, Chen M, Wang X, Zhang X, Morishita M, Sun Q, Rajagopalan S. **Exposure to concentrated ambient particulate matter induces reversible increase of heart weight in spontaneously hypertensive rats.** Part Fibre Toxicol. 25, 12:15, 2015.

YING, Z.; YUE, P.; XU, X.; ZHONG, M.; SUN,Q.; MIKOLAJ, M.; WANG, A.; BROOK, R.D.; CHEN, L.C.; RAJAGOPALAN, S. **Air pollution and Cardiac remodeling: a role for RhoA/Rho-Kinase.** Am J Physiol Heart Physiol. n.5, v.296. 2009.

ZHAO, C; XU, Z; WU, G; MAO, Y; LIU, L; WU, Q; DAN, Y; TAO, S; ZHANG, Q; SAM, N; FAN, Y; ZOU, Y; YE, D; PAN, H. **Emerging role of air pollution in autoimmune diseases.** Autoimmunity Reviews. n.6, v.18, p.607-614. 2019.



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A **CEUA** da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 06/10/2020, **APROVOU o documento** abaixo mencionado para o protocolo de pesquisa nº **095/17** intitulado “**Avaliação da aceleração do desenvolvimento de lúpus eritematoso sistêmico em modelo animal de exposição à poluição atmosférica**” apresentado pelo Departamento de Patologia.

- Inclusão da **aluna Dunia Waked** como pesquisadora executante;
- Prorrogação de prazo para **27/03/2022**

Pesquisador Responsável: **Mariana Matera Veras**

CEUA-FMUSP, 06 de outubro de 2020

Dr. Eduardo Pompeu

Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da
FMUSP e-mail: ceua@fm.usp.br