

**EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO MATERIAL PARTICULADO FINO MODIFICA A  
ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES NOS TECIDOS  
CARDIOPULMONARES EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À DIETA  
HIPERLIPÍDICA<sup>1</sup>**

**Eloisa Gabriela De Pelegrin Basso<sup>2</sup>, Bethânia Salamoni<sup>3</sup>, Pauline Brendler Goettems-  
Fiorin<sup>4</sup>, Thiago Gomes Heck<sup>5</sup>, Mirna Stela Ludwig<sup>6</sup>, Greice Franciele Feyh Dos Santos  
Montagner<sup>7</sup>.**

<sup>1</sup> Projeto de Iniciação Científica

<sup>2</sup> Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF) - Departamento de Ciências da Vida – DCVida/UNIJUI e Acadêmica de Ciências Biológicas – UNIJUI, Bolsista PIBIC/UNIJUI. E-mail: elo\_basso@hotmail.com

<sup>3</sup> Mestranda do PPG Ciências da Saúde - UFCSPA e Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF) - Departamento de Ciências da Vida – DCVida/UNIJUI

<sup>4</sup> Professora do Departamento de Ciências da Vida – DCVida – UNIJUI e Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF) - Departamento de Ciências da Vida – DCVida/UNIJUI

<sup>5</sup> Professor do Departamento de Ciências da Vida e do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS) DCVida UNIJUI e Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF) - Departamento de Ciências da Vida – DCVida/UNIJUI

<sup>6</sup> Professora do Departamento de Ciências da Vida, Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS) DCVida UNIJUI

<sup>7</sup> Professora do Departamento de Ciências da Vida-UNIJUI

## INTRODUÇÃO:

A obesidade é considerada um problema atual de saúde pública, apresentando origens complexas, de caráter genético, comportamental, bem como, ambiental. É uma enfermidade causada por fatores endógenos (hereditariedade, fatores congênitos, psicogênicos, neurológicos e endócrinos) e/ou exógenos (alimentação inadequada e sedentarismo, por exemplo) (SANTOS, et al., 2010).

Sociedades modernas estão convergindo para um padrão alimentar denominado “dieta ocidental”, caracterizado pelo consumo de alimentos com elevada densidade energética, parcialmente resultante do elevado conteúdo de lipídios presentes desses alimentos (ROBERTS & BARNARD, 2005). A elevada quantidade de lipídios na dieta está associada ao elevado consumo de ácidos graxos saturados e poli-insaturados ômega-6 contribuindo para o desenvolvimento da obesidade (ASTRUP, et al., 2000).

O comprometimento da qualidade do ar também se constitui um problema de saúde pública, devido à emissão atmosférica de toneladas de substâncias poluentes, com destaque para a emissão e formação de componentes tóxicos sólidos chamados de material particulado (MP). Estas partículas

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico

**Evento:** XXII Seminário de Iniciação Científica

sólidas suspensas no ar variam de tamanho e composição (SOARES, 2006), sendo que o MP fino (MP<sub>2,5</sub>) é motivo de atenção por apresentar correlação positiva com altas taxas de morbidade e mortalidade respiratória e cardiovascular em seres humanos (BINOKI, 2010).

Observa-se que o MP<sub>2,5</sub> é capaz de alcançar as unidades alveolares, interagindo com macrófagos e células epiteliais, podendo agir como agente químico, desencadeando lesões e morte celular (KUMAR, et al., 2008). Pesquisas epidemiológicas reforçam a existência de uma forte associação entre exposição à poluição do ar, doenças respiratórias e mortalidade em crianças (SALDIVA, et al. 1994; CONCEIÇÃO, et al., 2001). Adicionalmente, destaca-se que indivíduos com doenças cardiometabólicas apresentam maior sensibilidade aos efeitos da poluição (O'NEILL, et al., 2005; BRUNEKREEF, HOLGATE, 2002; POPE III, DOCKERY, 2006; MILLS, et al., 2009).

Neste sentido, diversos estudos sugerem a existência de uma associação entre o MP<sub>2,5</sub> e prevalência do diabetes (PEARSON, et al., 2010; O'NEILL et al., 2005; RIOUX, et al., 2011). A exposição crônica a poluição induz intolerância à glicose, estresse oxidativo, inflamação, o que a torna um fator de risco no desenvolvimento de DM (XU, et al., 2011). Indivíduos diabéticos apresentam taxas elevadas de mortalidade e hospitalizações devido a cardiopatias decorrentes da inalação de partículas presentes no ar (O'NEILL et al., 2005). Vários mecanismos estão envolvidos no dano causado pela inalação de MP, dentre eles podemos citar o estresse oxidativo (RHODEN, et al., 2004), que pode ser caracterizado pelo desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o sistema de defesa antioxidantes (VINCENT, TAYLOR, 2006; SOMOGYI, et al., 2007).

O sistema de defesa antioxidante enzimático, representado pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) são enzimas que desempenham papel principal como reguladoras da homeostasia redox intracelular (SILVEIRA, 2010). Ele é acionado para neutralizar o dano oxidativo e proteger as células da ação das espécies reativas de oxigênio (EROS) (ZANCHI, et al., 2008a; MARITIM, et al., 2003), sendo marcadores de desafios impostos ao organismo, como a exposição ao MP (ZANCHI, et al., 2008b; PEREIRA, et al., 2007).

Neste contexto, realizamos este trabalho onde se buscou avaliar os níveis de estresse oxidativo cardiopulmonar em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e expostos a poluição atmosférica.

#### METODOLOGIA

**LOCAL DE REALIZAÇÃO:** Laboratório de Ensaio Biológicos – Departamento de Ciências da Vida – Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUI. Rua do Comércio no3000, Bairro Universitário, Ijuí/RS. E foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIJUI (008/2013). **ANIMAIS:** Os animais foram utilizados 25 camundongos machos da linhagem B6129SF2/J (B6), com 21 dias, no período pós-desmame, provenientes do Biotério da UNIJUI. Os animais foram mantidos em gaiolas semi-metabólicas em condições ideais. **GRUPOS EXPERIMENTAIS:** os animais foram divididos em quatro grupos, de acordo com a intervenção alimentar e exposição ao MP ou salina concomitantemente desde o desmame por 24 semanas, constituindo os grupos: Poluído (P; n=6), Dieta Hiperlipídica + Salina (D; n=6), Dieta Hiperlipídica

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico

**Evento:** XXII Seminário de Iniciação Científica

+ Poluição (DP; n=7) e Controle (C; n=6) Salina. **INTERVENÇÃO ALIMENTAR:** Os animais dos grupos D e DP receberam dieta hiperlipídica com 60% de gordura em Kcal, constituída de ração padronizada para animais de laboratório (Nuvilab CR-1) com 22% de proteína, 37,4% de gordura suína 13,7% de albumina, 7,4% aminomix (vitaminas e minerais) e 1,1% de pó-tetra (farinha de osso e ostra), já os grupos C e P receberam ração padronizada para animais de laboratório (Nuvilab CR-1 – 4% de gordura), ambos por 24 semanas. **MATERIAL PARTICULADO:** O poluente utilizado no experimento foi Material Particulado Fino (MP2,5), contido em filtro de policarbonato o qual foi coletado através de coletador gravimétrico, na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo na cidade de São Paulo, Brasil. Os animais dos grupos P e DP receberam 10µL de suspensão de MP2,5, via intranasal (i.n) na dose de 5µg e os grupos C e D, receberam 10 µL de solução de salina 0,9%. O procedimento de instilação foi realizado diariamente por 24 semanas auxílio de micropipeta automática. **PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS:** Após as 24 semanas de intervenção os camundongos foram sacrificados por decapitação e foram coletados pulmão e coração. Parte dos tecidos foram homogeneizados em 5 volumes (pulmão) e 7 volumes (coração) de tampão de fosfato de potássio (pH 7,4) contendo inibidores de protease para análises das atividades enzimáticas da Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD). **DETERMINAÇÃO DE SOD E CAT:** A atividade da Superóxido Dismutase (SOD) foi determinada de acordo com Marklund e Marklund (1974), e os resultados serão expressos em unidade de SOD/mg de proteínas totais (U SOD/mg proteína). A atividade da CAT foi determinada de acordo com Aebi (1984) e os resultados serão expressos em pmol/mg de proteínas totais. **CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA:** A concentração de proteína nos homogeneizados foi determinada no Laboratório de Ensaio Biológicos – UNIJUI, através do método espectrofotométrico de Bradford, a 595nm, utilizando curva padrão de albumina (1mg/ml) sendo o resultado expresso em mg de proteína por ml (Bradford, 1976). **ANÁLISE ESTATÍSTICA:** Foi realizada no programa Graph Pad 3.0. Os resultados foram expressos como médias+DP e analisados por ANOVA, seguida de teste post-hoc de Tukey, considerando nível de significância  $p < 0,05$ .

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

No coração, a atividade enzimática da SOD é menor no grupo submetido à exposição a poluente e dieta hiperlipídica (DP) em comparação ao grupo submetido apenas a dieta hiperlipídica (D) ou dieta padrão (C) ( $p < 0,05$ ) (Fig. 1-A). Em relação à atividade enzimática da catalase, não se observou diferença neste parâmetro, nos diferentes grupos experimentais.

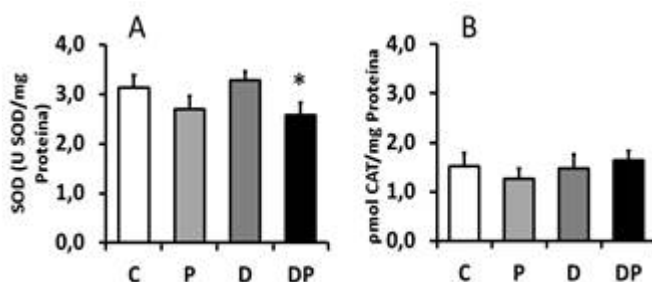


Figura 1: Atividade enzimática no tecido cardíaco de camundongos B6 submetidos a dieta hiperlipídica e exposição a material particulado durante 24 semanas. A- Atividade enzimática da SOD. \*DP vs C e D  $P < 0,05$ ; B – Atividade da enzima CAT, não apresentou diferença entre os grupos  $P = 0,0626$ .

Em relação à atividade das enzimas SOD e CAT no pulmão, não foi observado diferença em relação à atividade enzimática da SOD (Fig. 2-A), ao contrário do que apresentou o tecido cardíaco. Contudo, a atividade enzimática da CAT foi maior nos grupos D e DP em relação ao grupo P ( $p < 0,05$ ). (Fig 2- B).

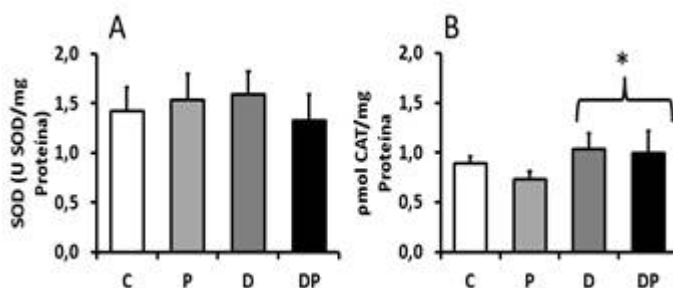


Figura 2: Atividade enzimática no tecido pulmonar de camundongos B6 submetidos a dieta hiperlipídica e exposição a material particulado durante 24 semanas. A- Atividade enzimática da SOD não apresentou diferença entre os grupos  $P = 0,3269$ . B – Atividade da enzima CAT, D e DP vs P;  $P < 0,05$ .

Com base nos resultados relativos a maior atividade da CAT no pulmão dos animais que receberam apenas dieta hiperlipídica associado ou não a exposição ao MP, pode-se sugerir que esta enzima esteja agindo como um protetor do tecido pulmonar contra o dano oxidativo lipídico. RAHMAN (2006) relata que essa enzima é bastante importante na defesa pulmonar, pois é responsável pela inativação do peróxido de hidrogênio, situação que impede a cascata de formação de novos subprodutos oxidativos (FERRO et al., 2010).

CONCLUSÃO

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

Neste contexto, sugere-se que a ingestão de dieta hiperlipídica, a exposição à poluição atmosférica, associadas ou não, são capazes provocar alterações nos mecanismos de proteção antioxidantes.

**PALAVRAS-CHAVE:** Poluição atmosférica – Obesidade – Enzimas Antioxidantes –  
**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, v.105, p.121. 1984.

ASTRUP, A. et al. The role of dietary fat in body fatness: evidence from a preliminary meta-analysis of ad libitum low-fat dietary intervention studies. *Br J Nutr*, v.83, p.S25-S32, 2000.

BINOKI, D.H. Alterações cardiopulmonares induzidas em ratos saudáveis após a instilação nasal subcrônica de suspensão aquosa de material particulado fino em concentração ambiental. 2010. 118f. Tese (Doutorado em Patologia) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v.72, p.248-54., 1976.

BRUNEKREEF B.; HOLGATE S.T. Air pollution and health. *The Lancet*, v.360, n.19, p.1233-1242, Oct. 2002.

CONCEIÇÃO, G.M.S; MIRAGLIA, S.G.E.K.; KISHI, H.S.; Et al. Air Pollution and Child Mortality: A Time-Series Study in São Paulo, Brazil. *Environmental Health Perspectives*, v.109, n.3, p.347-350, June. 2001.

FERRO, C. O, CHAGAS, V. L. A, OLIVIERIA, M. F. A. et al. Atividade da catalase no pulmão, rim e intestino delgado não isquemiado de ratos após reperfusão intestinal. *Rev. Col. Bras. Cir.* 37(1):031-038. 2010.

KUMAR V.; ABBAS A.K.; FAUSTO N.; MITCHELL R.N.; Robbins, *Patologia Básica*. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

MARKLUND S.; MARKLUNG G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, v.47, n.3, p.469-474, Sep. 1974.

MARITIM, A.C. et al. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17:1, 24-38, 2003.

MILLS N.L.; DONALDSON K.; HADDOKE P.W.; Et al. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, v.6, n.1, p.36-44, Jan. 2009.

O'NEILL M.S.; VEVES A.; ZANOBETTI A.; Et al. Diabetes enhances vulnerability to particulate air pollution associated impairment in vascular reactivity and endothelial function. *Circulation*, v. 111, n.22 p.2913-2920, May. 2005.

PEARSON, J. et al. Association Between Fine Particulate Matter and Diabetes Prevalence in the U.S. *Diabetes Care*, v.33, p.2196-2201, 2010.

PEREIRA C.E.L.; HECK T.G.; SALDIVA P.H.N.; RHODEN C.R. Ambient particulate air pollution from vehicles promotes lipid peroxidation and inflammatory responses in rat lung. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, v.40, n.10, p.1353-1359. Oct. 2007.

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

- POPE III C.A.; DOCKERY D.W. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *Journal of the Air & Waste Management Association*, v.56, p.709-742, Jun. 2006.
- RAHMAN, I, BISWAS, S.K, KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol* 533: 222–239. 2006.
- RHODEN, C.R. et al. N-Acetylcysteine Prevents Lung Inflammation After Short-Term Inhalation Exposure to Concentrated Ambient Particles. *Toxicological Sciences*, v.79, p.296–303, 2004.
- RIOUX C.L.; TUCKER K.L.; BRUGGE D.; GUTE D.M.; MWAMBURI M. Traffic exposure in a population with high prevalence type 2 diabetes - Do medications influence concentrations of C-reactive protein? *Environmental Pollution*, v.159, n.8-9, p.2051-2060, Aug.-Sep. 2011.
- ROBERTS, C.K.; BARNARD, .R.J. Effects of exercise and diet on chronic disease. *J Appl Physiol.*, v.98, n.1, p.3-30, 2005.
- SANTOS, A. C. A.; LOPES, A. C. T.; et al ESTUDO BIOMÉTRICO DE RATOS ALIMENTADOS COM DOIS TIPOS DE DIETA. Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão, Presidente Prudente, 2010.
- SALDIVA P.H.; LICHTENFELS A.J.; PAIVA P.S.; Et al. Association between air pollution due to respiratory diseases in children. *Environmetal Research*, v.65, n.2, p.218-225, May. 1994.
- SILVEIRA, M. da L. PERRY, M. L. dos S. Programação metabólica: estudo de parâmetros indicadores de resistência à insulina e espécies reativas de oxigênio em ratos. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Porto Alegre, 2010.
- SOARES, S. R. C. Efeito Aterogênico da Poluição Atmosférica: Associação aos Anticorpos anti LDLox e anti peptídeo D da apo B e aos Aspectos Morfométricos e Inflamatórios. 2006. 134f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Experimental) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- SOMOGYI, A.; ROSTA, K.; PUSZTAI, P.; Et al. Antioxidant measurements. *Physiol Meas*, v. 28, p. 41-55, 2007
- VINCENT, H. K.; TAYLOR, A. G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes*, v. 30, n. 3, p. 400-418, 2006.
- XU, Z. et al. Ambient particulate air pollution induces oxidative stress and alterations of mitochondria and gene expression in brown and white adipose tissues. *Particle and Fibre Toxicology*, v.8, n.20, p.1-14, 2011
- ZANCHI A.C.; SAIKI M.; SALDIVA P.H.N.; Et al. Hippocampus (HIPPO) lipid peroxidation (LPO) induced by Residual Oil Fly-Ash (ROFA) inhalation versus cognitive changes: An experimental study. *Inhalation Toxicology*, p.1-18, 2008a.
- ZANCHI A.C.; VENTURINI C.D.; SAIKI M.; Et al. Chronic Nasal Instillation of Residual-Oil Fly Ash (ROFA) Induces Brain Lipid Peroxidation and Behavioral Changes in Rats. *Inhalation Toxicology*, v.20, n.9, p.795–800, 2008b