

Adriana Morgan de Oliveira Fonoff

A influência da poluição atmosférica no remodelamento miocárdico

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

Programa de: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Felix José Alvarez Ramires

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Fonoff, Adriana Morgan de Oliveira
A influência da poluição atmosférica no remodelamento miocárdico /
Adriana Morgan de Oliveira Fonoff. -- São Paulo, 2014.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.
Orientador: Felix José Alvarez Ramires.

Descritores: 1.Poluição do ar 2.Remodelação ventricular 3.Inflamação
4.Estresse oxidativo 5.Disfunção ventricular 6.Ratos Wistar 7.Infarto do miocárdio

USP/FM/DBD-101/14

*“Uma vida não basta ser apenas vivida:
também precisa ser sonhada”*

Mário Quintana

DEDICATÓRIA

Antonio,

Filho amado, presente de Deus para toda minha vida.
Meu precioso, a mamãe te ama muito.

Filipe,

Pelo apoio nesses anos de estudo, paciência e muita ajuda.

Maria Helena,

Minha mãe amada, eu nem sei o que eu seria sem você, obrigada pela ajuda, paciência e todo o seu amor com minha família.

Marina, Júlia e Otávio,

A tia ama vocês.

In memoriam

Ao meu pai José e minha querida avó Júlia

“O tempo não para!

“Só a saudade é que faz as coisas pararem no tempo”

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

A Deus

*“Aclamai a Deus, toda a terra,
Cantai glória de seu nome,
Rendei-lhe glorioso louvor.
Dizei a Deus: Vossas obras são estupendas!
Tal é o vosso poder que os próprios inimigos
vos glorificam”*

Salmo 66

Ao Prof. Dr. Charles Mady - Diretor da Unidade Clínica de Miocardiopatias e Doenças da Aorta – InCor - HC-FMUSP - por acreditar no meu trabalho e pela oportunidade de fazer parte dessa grande família Cardio Geral.

Ao Prof. Dr. Felix José Alvarez Ramires, o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transmite sabedoria, competência e inteligência; o meu respeito e admiração pela sua seriedade e pelo apoio na realização dessa tese.

A realização de um projeto de pesquisa como este só foi possível com o apoio de vários colaboradores. Seguem os meus sinceros agradecimentos a todos da família Cardio Geral que, de uma forma ou de outra, contribuíram para realização dessa pesquisa.

Aos companheiros de laboratório:

Fernanda Gallinaro Pessoa e Keila Fonseca, pela amizade e ajuda nas diferentes fases dessa tese.

Orlando Ribeiro, pela ajuda na realização do modelo de infarto e cuidado com os animais e pela paciência em todos esses anos de convívio.

À amiga Lucia Oliveira, pela ajuda nos processos e toda a formatação dessa tese.

À Profa. Dra. Vera Maria Cury Salemi, pela ajuda na realização e análise dos ecocardiogramas.

Às amigas Paula Buck e Roseli Chaves, pela amizade, compreensão e pelas boas risadas ao longo desse período.

À Profa. Dra. Bárbara Ianni, Prof. Dr. Edmundo Arteaga, Prof. Dr. Fábio Fernandes, Dr. Luciano Nastari, Dr. Ricardo Ribeiro Dias, Dr. André Luiz Dabarian, Dr. Maurício Rodrigues Jordão, Dra. Isabel Furquin, Dr. Murillo Antunes de Oliveira e Dr. Dirceu Thiago Pessoa de Melo, Dra. Renata Santos Corrêa.

À Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi e as funcionárias do Laboratório de Patologia, Joyce Tiyeko Kawakami e Renata Nishiyama Ikegami, pelos ensinamentos transmitidos e a utilização do laboratório.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva - Professor Titular do Departamento de Patologia - FMUSP e Dra. Mariana Veras - pesquisadora do Laboratório de Poluição e Doenças Respiratórias – FMUSP, pelos ensinamentos na área de poluição e pela utilização do concentrador de poluição atmosférica - CPA.

Ao Prof. Dr. Raul Maranhão e funcionários do Laboratório de Lípidos, em especial à Priscila Carvalho, pelos ensinamentos em PCR *Real Time* e pela utilização de toda estrutura laboratorial.

À Profa Dra. Hiro Gotto e funcionários do Biotério - IMT-FMUSP, pela utilização e cuidados dos animais durante todo o experimento.

Ao Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo e funcionários do laboratório de Biologia Vascular, em especial a Victor Debbas, Dra. Ana lochabel Soares Moretti e Dr. Leonardo Tanaka, pela ajuda e ensinamentos em estresse oxidativo.

Às funcionárias da Comissão de Pós-Graduação Neusa Rodrigues Dini, Juliana Lattari Sobrinho Pagni, Tatiane Lago dos Santos e Nathalia Dal Arosa Barbosa Bindi, pela ajuda ao longo desses três anos de doutorado.

Ao amigo Leandro Eziquiel de Souza, do laboratório de Hipertensão - FMUSP, pela ajuda na realização do modelo infarto.

À Roberta Souza – Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, pela ajuda na análise estatística.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo apoio financeiro na realização desta tese.

Sumário

Lista de abreviaturas e unidades

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	13
2.1.	Objetivo geral	14
2.2.	Objetivos específicos.....	14
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1.	Grupos do estudo	16
3.1.2.	Critérios de exclusão do estudo	17
3.1.3.	Modelo experimental	17
3.2.	Caracterização do local da exposição	19
3.2.1.	Câmara de exposição.....	20
3.3.	Análise morfométrica.....	22
3.4.	Área do infarto.....	23
3.5.	Ecocardiograma	25
3.6.	Análise da expressão gênica através da técnica PCR Real Time.....	25
3.6.1.	Extração do RNA total.....	26
3.6.2.	Tratamento do RNA total com DNase free	27
3.6.3.	Síntese do DNA complementar (cDNA).....	27
3.6.4.	Análise da expressão gênica	28
3.7.	Análise do estresse oxidativo	31
3.7.1.	Glutathiona.....	31
3.7.2.	ADMA.....	32
3.8.	Análise estatística	33
5.	RESULTADOS	35
5.1.	Sobrevida dos animais	36
5.2.	Análise morfométrica.....	36
5.3.	Área de infarto.....	38
5.4.	Ecocardiograma	39
5.4.1.	Fração de encurtamento	39
5.4.2.	Diâmetro diastólico do VE	40
5.4.3.	Diâmetro sistólico do VE	41
5.5.	Expressão gênica.....	42
5.5.1.	BNP.....	42
5.5.2.	Apoptose	43
5.5.3.	Citocinas inflamatórias	45
5.6.	Análise do estresse oxidativo	50
5.6.1.	Glutathiona.....	50
5.6.2.	ADMA.....	51
5.7.	Limitações da pesquisa	53
7.	DISCUSSÃO	54
8.	CONCLUSÕES	64
9.	REFERÊNCIAS	66

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
ADMA	<i>asymmetric dimethylarginine</i> / dimetilarginina assimétrica
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> / célula B de linfoma 2
BNP	<i>brain natriuretic peptide</i> / tédio natriurético cerebral
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CCL- 21	<i>chemokine (C-C motif) ligand 21</i> / quimiocina do ligante 21
CCL- 3	<i>chemokine (C-C motif) ligand 3</i> / quimiocina do ligante 3
CCL- 5	<i>chemokine (C-C motif) ligand 5</i> / quimiocina do ligante 5
CCR-5	<i>C-C chemokine receptor type 5</i> / receptor de quimiocina tipo 5
CCR-7	<i>C-C chemokine receptor type 7</i> / receptor de quimiocina tipo 7
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> / ácido desoxirribonucleico complementar
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CO	monóxido de carbono
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CT	grupo controle
CTP	grupo controle exposto à poluição
DDVE	diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo
DEPC	dietilpirocarbonato
Detran	Departamento Estadual de Trânsito (SP)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> / ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DP	desvio padrão
DSVE	diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FVCI-VD	fração do volume de colágeno intersticial do ventrículo direito
FVCI-VE	fração do volume de colágeno intersticial do ventrículo esquerdo
g	gramas
GAPDH	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> / gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GSH	<i>glutathione</i> / glutationa
GSSG	<i>glutathione oxidase</i> / glutationa oxidada
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HC	hidrocarboneto
HCl	ácido clorídrico
Hg	mercúrio

IL-6	interleucina 6
INF- γ	<i>interferon γ</i>
KCl	cloreto de potássio
M	molar
MgCl	cloreto de magnésio
MMP	<i>metalloprotease</i> / metaloproteinase
MP	material particulado
NAD	<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i> / dinucleotídeo de nicotinamida-adenina
NADPH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> / dinucleotídeo de nicotinamida-adenina fosfato oxidase
NF- $\kappa\beta$	<i>factor nuclear kappa B</i> / fator nuclear kappa beta
ng	nanograma
NO	óxido nítrico
O ₃	ozônio
OH	hidroxila
ONOO	peróxido nítrico
p53	gene supressor tumoral (proteína 53)
Pb	chumbo
pb	pares de base
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> / fator de crescimento derivado de plaqueta
RNA	<i>ribonucleic acid</i> / ácido ribonucleico
ROS	<i>reactive oxygen species</i> / espécies reativas de oxigênio
rpm	rotação por minuto
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> / transcriptase reversa - reação em cadeia de polimerase
SOD-s	<i>superoxide</i> dismutases / superóxido dismutase
SO _x	óxido de enxofre
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i> / fator de transformação de crescimento beta
TNF- α	<i>tumor necrosis factor</i> / fator de necrose tumoral alfa
Tris	<i>hidroximetil aminometano</i> / hidroximetilaminometano
UV	ultravioleta
VD	ventrículo direito
VE	ventrículo esquerdo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais poluentes atmosféricos	5
Tabela 2 - Sequência de <i>primers</i>	30
Tabela 3 - Fração do volume de colágeno intersticial	37
Tabela 4 - Quantificação da área de IAM.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comparação do tamanho aerodinâmico das partículas	7
Figura 2 - Fluxo de trabalho	17
Figura 3 - Modelo experimental de IAM.....	18
Figura 4 - Fotografia aérea do local de exposição - FMUSP.....	20
Figura 5 - Vista externa do concentrador de poluição - FMUSP	21
Figura 6 - Câmara de exposição à poluição atmosférica	22
Figura 7 - Quantificação da fração de colágeno intersticial.....	23
Figura 8 - Medida da área de infarto	24
Figura 9 - Miocárdio corado pela técnica de <i>Picrosirius red</i>	36
Figura 10 - Foto ilustrativa do ecocardiograma	40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Fração do volume de colágeno intersticial do VE	37
Gráfico 2 - Fração do volume de colágeno intersticial do VD	38
Gráfico 3 - Área de IAM.....	39
Gráfico 4 - Fração de encurtamento do VE	40
Gráfico 5 - Diâmetro diastólico final do VE	41
Gráfico 6 - Diâmetro sistólico final do VE	42
Gráfico 7 - Expressão relativa do gene BNP	43
Gráfico 8- Expressão relativa do gene p53.....	44
Gráfico 9 - Expressão relativa do gene Bcl-2	44
Gráfico 10 - Expressão relativa do gene CCL-3	45
Gráfico 11 - Expressão relativa do gene IL-6	46
Gráfico 12 - Expressão relativa do gene TGF- β	46
Gráfico 13 - Expressão relativa do gene TNF- α	47
Gráfico 14 - Expressão relativa do gene IL-1 β	48
Gráfico 15 - Expressão relativa do gene INF- γ	48
Gráfico 16 - Expressão relativa do gene CCL-21	49
Gráfico 17 - Expressão relativa do gene CCR-7.....	50
Gráfico 18 - Análise em soro do conteúdo GSH total	51
Gráfico 19 - Quantificação da proteína ADMA.....	52

RESUMO

Oliveira AM. *A influência da poluição atmosférica no remodelamento miocárdico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

O avanço tecnológico trouxe aumento na quantidade e na variedade de agentes eliminados na atmosfera, tendo relação direta com o aumento de partículas de poluição do ar e com a ocorrência de mortes por falência cardíaca, infarto agudo do miocárdio e arritmias. Muitos estudos já relataram que o aumento de material particulado (MP <10 nM) induz ao estresse oxidativo que, por sua vez, pode causar inflamação, aumentando a expressão de citocinas inflamatórias. Especificamente no miocárdio, quando agredido, ocorre necrose dos cardiomiócitos, apoptose, ativação do sistema complemento, acúmulo de células inflamatórias na área infartada e na área remota, tendo como mediadores dessa perda celular a inflamação e o estresse oxidativo. Essa cadeia complexa de eventos promove intenso remodelamento molecular e celular na região infartada e em regiões distantes a ela. Visto a poluição atuar tanto na inflamação quanto no estresse oxidativo, e esses serem mecanismos de lesão miocárdica, nossa hipótese é que a poluição poderia ser um amplificador dessa lesão. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da poluição no remodelamento estrutural, geométrico e funcional do coração em modelo experimental de infarto do miocárdio. Para tal, foram analisados o acúmulo de colágeno intersticial no miocárdio, a inflamação, o estresse oxidativo e a apoptose. Foram estudados 75 ratos *wistar* divididos em 5 grupos: controle (CT), grupo controle exposto à poluição (CTP), grupo infartado (IAM), infartado exposto à poluição (IAM G1) e grupo exposto à poluição antes e após o infarto (IAM G2). Os métodos utilizados foram: histologia para análise morfológica, RT-PCR *real time* para citocinas inflamatórias e apoptose, ecocardiograma para anatomia e função cardíaca e ELISA para avaliação do estresse oxidativo. Os resultados mostraram maior deposição de colágeno intersticial no ventrículo esquerdo nos grupos CTP, IAM, IAM G1 e IAM G2, quando comparados ao grupo controle ($p \leq 0,001$). No VD, houve maior deposição de colágeno nos grupos CTP, IAM, IAM G1 e IAM G2 em relação ao controle ($p \leq 0,002$). Ao final do estudo, o grupo CT apresentou o maior valor

médio de fração de encurtamento, quando comparado aos outros grupos de estudo ($p \leq 0,03$). Na análise do DSVE, verificamos que o grupo controle apresentou a menor média, quando comparado com os grupos infartados ($p \leq 0,003$). Para a avaliação da apoptose, analisamos os genes p53 e Bcl-2 e verificamos maior expressão desses genes nos grupos IAM G1 e IAM G2 quando comparados com o CT, porém sem significância estatística. A poluição potencializou a expressão da citocina TGF- β no grupo exposto previamente à poluição (IAM G2) em comparação ao grupo IAM ($p = 0,004$). Os grupos infartados também tiveram maior expressão do TGF- β quando comparados com o grupo CT ($p \leq 0,04$). O gene TNF- α foi mais expresso apenas no grupo IAM G2, quando comparado com o grupo CTP, apresentando valor de $p = 0,012$. Ao analisarmos o gene IL-1 β , observamos maior expressão desse gene quando comparado o grupo CTP com o grupo IAM ($p = 0,04$) e com o grupo IAM G2 ($p = 0,01$). Na análise da expressão do gene INF- γ , verificamos que houve maior expressão desse gene no grupo exposto previamente à poluição, em relação aos outros grupos do estudo, apresentando o valor de $p \leq 0,01$. Ao analisarmos a expressão da citocina CCL-21, verificamos maior expressão desse gene no grupo IAM, quando comparado com os grupos controles CT e CTP, sendo $p \leq 0,035$. O grupo IAM também apresentou maior expressão do gene CCR7 quando comparado ao grupo CTP ($p = 0,03$). A proteína glutathiona total apresentou maior concentração nos grupos CTP ($p = 0,034$), IAM ($p = 0,014$), IAM G1 ($p = 0,008$), quando comparados ao grupo CT. Concluímos que a poluição estimulou a deposição de fibrose no miocárdio dos corações saudáveis, mas não amplificou essa resposta nos corações infartados nem aumentou a área de infarto. A poluição modulou a resposta inflamatória, sendo ainda maior no grupo exposto à poluição por tempo mais prolongado (IAM G2). A poluição também modulou o estresse oxidativo nos corações saudáveis, mas não amplificou essa resposta nos corações infartados.

Descritores: 1.Poluição do ar; 2.Remodelação ventricular; 3.Inflamação; 4.Estresse oxidativo; 5.Disfunção ventricular; 6.Ratos Wistar; 7.Infarto do miocárdio

SUMMARY

Oliveira AM. *The role of air pollution upon myocardial remodeling* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

Technological improvement has brought an increased amount and range of agents disposed in the atmosphere. Moreover, there is a direct relationship with increased air pollution with the occurrence of deaths because heart failure, acute myocardial infarction and arrhythmias. Many studies have reported that the increase of particulate matter (<10 nM) induces oxidative stress which can cause inflammation increasing the expression of inflammatory cytokines. Specifically, in the myocardium affected by an ischemic process, cardiomyocytes necrosis, apoptosis, activation of the complement system, inflammatory cell accumulation in the infarcted area and in remote area occurs. The pathways for this cell loss also include inflammation and oxidative stress. This complex chain of events promotes intense molecular and cellular remodeling in the infarcted region and in regions distant to it. However, the available literature does not correlate the influence of exposure to pollution with remodeling, inflammation and oxidative stress specifically in the myocardium. The aim of this study was to evaluate the role of pollution in structural, geometric and functional remodeling in the heart using an experimental model of myocardial infarction. This study, analyzed the accumulation of interstitial collagen in the myocardium, as well as inflammation, oxidative stress and apoptosis 75 rats were divided into five groups: control group (CT), control group exposed to pollution (CTP), myocardial infarcted group (MI), infarcted group immediately exposed to pollution (MI G1) and infarcted previously exposed to pollution and kept on that after infarction (MI G2). The methods that was used: histology for morphometric analysis, real time RT-PCR for inflammatory cytokines and apoptosis, echocardiography for cardiac anatomy and function and ELISA to assess oxidative stress. The results showed greater deposition of interstitial collagen in the left ventricle in groups CTP, MI, MI G1 and MI G2 when compared to the control group ($p \leq 0.001$). In the RV, there was a greater collagen deposition in groups CTP, MI, MI G1 and MI G2

compared to control ($p \leq 0.002$). At the end of the study, the CT group showed the higher mean shortening fraction than the other study groups ($p \leq 0.03$). The analysis of LVSD found that the control group had lower average than infarcted groups ($p \leq 0.003$). For the assessment of apoptosis, we analyzed the genes p53 and Bcl-2 with higher expression in groups MI G1 and MI G2 compared with CT, but without statistical significance. The pollution increased the expression of TGF- β in the group previously exposed to pollution (MI G2) compared to MI group ($p = 0.004$). The infarcted groups had higher expression of TGF- β compared to the CT group ($p \leq 0.04$). The TNF- α gene was over expressed only in the group MI G2 compared the CTP group ($p = 0.012$). By analyzing the gene IL-1 β we observed higher expression this gene when compared with the group CTP with the group MI ($p = 0.04$) and the group MI G2 ($p = 0.01$). In the analysis of gene expression INF- γ we observed that there was a higher expression of this gene in the group previously exposed to pollution (MI G2) compared to other groups ($p \leq 0.01$). We also analyzed the expression of cytokines CCL-21 and CCR7. We observed significant expression this gene CCL-21 in the MI group compared with the control groups (CT and CTP) and the value ($p \leq 0,035$). This group (MI) also showed higher expression this gene CCR-7 when compared CTP ($p = 0.03$). The protein showed higher glutathione concentration in the groups CTP ($p = 0.03$), MI ($p = 0,014$), MI G1 ($p = 0,008$) as compared to CT. We conclude that pollution has stimulated the deposition of fibrosis in the myocardium of healthy hearts, but did not amplify this response in infarcted hearts nor increased the infarcted area. The pollution modulated the inflammatory response and was even greater in the group exposed to pollution for longer periods (MI G2). The pollution has also modulated the oxidative stress in healthy hearts, but did not amplify this response in infarcted hearts.

Descriptors: 1.Air pollution; 2.Ventricular remodeling; 3.Inflammation; 4.Oxidative stress; 5.Ventricular dysfunction; 6.Rats Wistar; 7.Myocardial infarction

1. INTRODUÇÃO

A partir da Revolução Industrial, nos séculos XVIII e XIX, iniciou-se a economia industrializada focada no espaço urbano e com grande aumento de consumo de recursos naturais.

A industrialização foi um marco para o início do aumento da poluição atmosférica. Isso ocorreu através da queima, em grande escala, de carvão e lenha para as indústrias e, posteriormente, pela queima de combustíveis fósseis em motores a explosão.

Em meados do século XX, os centros urbanos no Brasil tornaram-se mais populosos, com rápido crescimento das cidades e da concentração de indústrias, além da presença de veículos automotores em grande escala, intensificando a quantidade e a variedade de poluentes eliminados na atmosfera. Em decorrência desse aumento dos poluentes, a qualidade do ar passou a ser um problema de saúde pública, representando alto risco à população.

Os primeiros estudos relacionados à poluição atmosférica, e suas implicações na saúde, datam da metade do século passado e essa relação foi comprovada por trabalhos epidemiológicos.^{1, 2} Esses trabalhos demonstraram associação positiva entre os elevados níveis de material particulado atmosférico (MP) com maior número de casos de mortes diárias e elevado número de admissões hospitalares devido a problemas cardiovasculares e morbidade respiratória³. Pessoas idosas e pacientes com doenças cardiorrespiratórias pré-existentes são ainda mais suscetíveis a pior evolução, quando comparados com a população saudável⁴. Routledge *et al.*², em 2005, mostraram que há relação entre o aumento das partículas de poluição do ar

com a ocorrência de mortes por falência cardíaca, infarto do miocárdio e pelo aumento de arritmias. O aumento do custo agregado devido às visitas hospitalares, aposentadorias precoces por invalidez ou por progressão de doenças crônicas⁴ representa outro fator de fundamental importância na avaliação do papel da poluição na saúde.

O nível de poluição atmosférica é determinado pela quantificação das substâncias poluentes presentes no ar. Conforme a Resolução CONAMA de 28/06/1990⁵, considera-se poluente atmosférico “qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos, e que tornem ou possam tornar o ar impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde, inconveniente ao bem-estar público, danoso aos materiais, à fauna e à flora ou prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade”^{5,6}.

A variedade das substâncias que podem ser encontradas na atmosfera é muito ampla, o que torna difícil a tarefa de estabelecer uma classificação. Para facilitar essa classificação, os poluentes são divididos em duas categorias: primários e secundários. Os poluentes primários são aqueles emitidos diretamente pelas fontes de emissão. Já os poluentes secundários são aqueles formados através da reação química entre poluentes primários e componentes naturais da atmosfera⁵.

Quando se determina a concentração de um poluente na atmosfera, mede-se também o grau de exposição dos receptores (seres humanos, outros animais, plantas, materiais), como resultado final do processo de lançamento

desse poluente na atmosfera a partir de suas fontes de emissão e suas interações na atmosfera, do ponto de vista físico (diluição) e químico (reações químicas). O sistema pode ser visualizado da seguinte forma⁷:

Fontes de poluição → processos atmosféricos → receptores
(poluentes) (diluição e / ou reação químicas)

Extraído: Relatório Ar 2012 – CETESB⁷

As fontes emissoras de contaminantes atmosféricos são classificadas em estacionárias ou móveis. As principais fontes estacionárias estão ligadas a processos de combustão ocorridos na produção industrial, na operação de usinas termoelétricas ou nas queimadas de resíduos sólidos. As fontes móveis são representadas principalmente pelos veículos automotores.

De acordo com o relatório da CETESB⁸ (2005), sobre a qualidade do ar da cidade de São Paulo, as fontes descritas acima são responsáveis pela emissão anual de 1,46 milhões de toneladas de monóxido de carbono (CO), 354 mil toneladas de hidrocarbonetos, 317 mil toneladas de óxido de nitrogênio (NO), 28 mil toneladas de material particulado (MP) e 12 mil toneladas de óxido de enxofre (SO), conforme dados apresentados na tabela 1. Dos valores totais apresentados, os veículos são responsáveis por 97% das emissões de CO, 97% HC, 96% NO, 40% MP e 42% SO_x⁸.

Tabela 1 - Principais poluentes atmosféricos, suas fontes, o impacto e a duração desses componentes na natureza

Poluentes	Principais fontes antropogênicas	Impacto/duração/abrangência
Dióxido de enxofre (SO ₂)	Combustão de carvão e derivados de petróleo	Tóxico e muito ácido / poucos dias / de local a regional
Monóxido de carbono (CO)	Queima incompleta de combustíveis fósseis e de biomassa	Tóxico, ácido / mês / ocupacional e local
Óxido de nitrogênio (NO _x)	Queima de combustível sob altas temperaturas, especialmente os que contêm nitrogênio em sua composição	Tóxico, ácido e precursor de O ₃ / de horas a poucos dias / de local a regional
Material particulado (MP)	Queima incompleta de combustíveis fósseis e de biomassa, presença de enxofre no combustível, formando sulfatos	Tóxicos e irritativos / de horas a poucos dias / de ocupacional a regional
Hidrocarbonetos (HC _s)	Emissão evaporativa de combustíveis	Tóxicos, irritativos e precursores de O ₃ / de meses a anos / de local a global
Ozônio troposférico (O ₃)	Poluentes secundários, não emitido pelos processos, mas formado pela oxidação fotoquímica (luz solar) de NO _x e HC _s na atmosfera	Tóxico e irritativo / mês / de local a regional
Metais pesados e especialmente chumbo (Pb) e mercúrio (Hg)	Queima de carvão e derivados de petróleo com aditivos	Muito tóxico / mês / de local a regional

Extraído: Relatório Cetesb 2005⁸

Na cidade de São Paulo, o ar atmosférico é um sistema complexo, no qual estão presentes aerossóis, gases emitidos por veículos automotores, poluentes causados pelas reações químicas na atmosfera que, somados, levam a um ar de baixa qualidade.

De acordo com dados do DETRAN (Departamento Estadual de Trânsito de São Paulo)⁹, a frota de veículos na cidade de São Paulo atingiu um total de 7.577.2016 de unidades em dezembro de 2013, sendo o automóvel o veículo mais comum, com 5.445.562 unidades; em segundo lugar, motocicletas, triciclos e quadriciclos, com 995.112 unidades; em terceiro, micro-ônibus, camionetas, caminhonetes e utilitários, com 858.222 unidades; em quarto, caminhões, com 147.072 unidades; em quinto, veículos reboque e semi reboque, com 80.715 unidades e em sexto lugar, ônibus, com 43.568 unidades.

Conforme dados apresentados, os principais poluentes atmosféricos presentes nas grandes cidades, como o município de São Paulo, estão diretamente relacionados com o tráfego de veículos automotores (motores do ciclo Otto e a *diesel*). Esses poluentes são compostos por monóxido de carbono (CO), hidrocarbonetos (HC), óxido de nitrogênio (NOx), material particulado fino (MP), aldeídos(CHO)¹⁰.

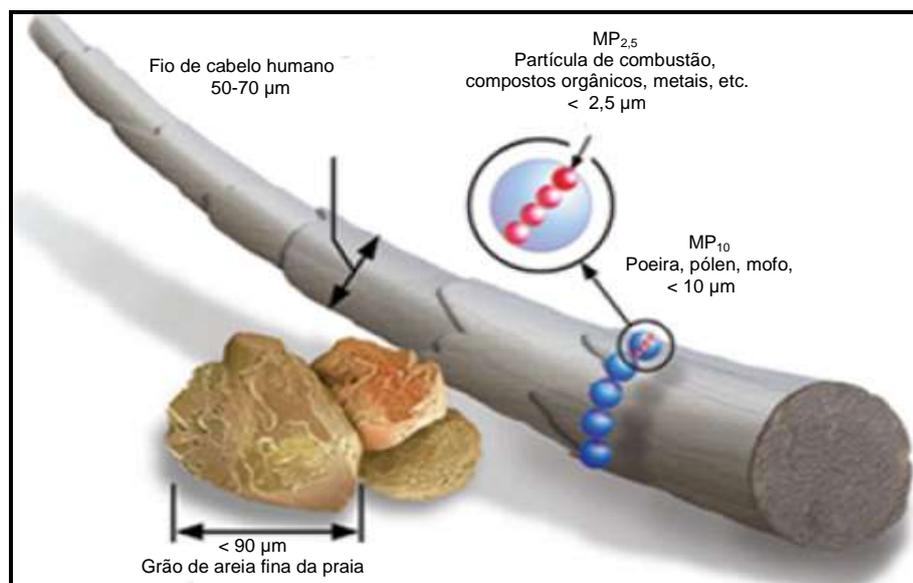
Talvez nenhum poluente seja tão complexo como a poluição por partículas, também chamadas de material particulado (MP).

O material particulado é constituído por partículas sólidas e líquidas em suspensão na atmosfera, cujo diâmetro varia de alguns nanômetros a dezenas de micrômetros, sendo formadas por uma mistura de partículas de origem primária e secundária¹¹⁻¹⁵.

Algumas partículas, como a poeira, a sujeira, a fuligem ou a fumaça são grandes ou escuras o suficiente para serem vistas a olho nu. Outras são tão pequenas que só podem ser detectáveis através de microscópio eletrônico. Essas partículas de vários tamanhos e formas podem ser constituídas por

centenas de produtos químicos diferentes e podem variar de acordo com a época do ano e por local e são afetadas por vários aspectos do clima, como temperatura, umidade e vento.

Em geral, as partículas de poluição consistem de uma mistura de materiais de grandes dimensões, denominadas partículas grossas, sendo as menores denominadas partículas finas. As partículas ultrafinas possuem o diâmetro inferior a $0,1 \mu\text{m}$ ($\text{MP}_{0,1}$), já as partículas finas são definidas pelo diâmetro entre $0,1$ a $2,5 \mu\text{m}$ ($\text{MP}_{2,5}$) já as partículas grossas possuem diâmetro entre $2,5$ a $10 \mu\text{m}$ (MP_{10})¹⁵⁻¹⁸.



Fonte: Adaptado de EPA 2011¹⁹

Figura 1 - Comparação do tamanho aerodinâmico das partículas ($\text{MP}_{2,5} \mu\text{m}$ - $10 \mu\text{m}$) com outros materiais

O tamanho das partículas está diretamente associado ao seu potencial de causar problemas à saúde, sendo que, quanto menores forem, maiores são os efeitos adversos provocados. Inúmeros estudos na literatura mostraram que

o tamanho da partícula transportada pelo ar e a sua área de superfície determinam o potencial de provocar lesão inflamatória, lesão oxidativa e outros efeitos biológicos²⁰. O material particulado fino constituído de partículas atmosféricas com diâmetro aerodinâmico menor que 2,5 µm (MP_{2,5}) tem maior probabilidade de se alojar nos brônquios, fato que não ocorre com o material particulado grosso, com diâmetro aerodinâmico entre 2,5 µm e 10 µm. Essas partículas grossas ficam retidas no nariz e nasofaringe e são eliminadas posteriormente pelo sistema respiratório para a atmosfera²². Valavanidis *et al.*²³ (2008) mostraram que o material particulado tem diversos efeitos lesivos nas células, tais como citotoxicidade através de mecanismos de estresse oxidativo, mutagenicidade e estimulação de fatores pró inflamatórios. Ocorrem aumento da expressão de quimiocinas, hiperplasia de células epiteliais, fibrose pulmonar e estímulo à formação de tumores²².

O estresse oxidativo e a inflamação têm sido amplamente estudados em inúmeras doenças, incluindo as cardiovasculares. A ativação desses dois mecanismos está diretamente associada à exposição à poluição. O estresse oxidativo é considerado um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, promovendo danos às biomoléculas. Esse processo é gerado através de uma variedade de mecanismos, que incluem respiração mitocondrial, isquemia / reperfusão e inflamação. O DNA é considerado um importante alvo para as espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais são comprovadamente estimuladas pela exposição à poluição atmosférica. O dano causado ao DNA, através das ROS, expõe o indivíduo a alto risco de doenças e pode servir como importante marcador do estresse oxidativo²⁴. A formação de ROS no coração

pode ser induzida através da ação de citocinas e fatores de crescimento. A angiotensina II, PDGF, e TNF- α , por exemplo, podem induzir a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do radical superóxido ($O_2 \cdot -$). Essa formação ocorre através da ativação da NADPH oxidase²⁵⁻²⁷ e, assim, os principais processos em que o coração necessita de mais energia podem também resultar na produção de ROS.²⁵ O estresse oxidativo, por si só, é um mecanismo fundamental que está associado à perda de miócitos por necrose ou apoptose e, conseqüentemente, remodelamento estrutural do miocárdio com fibrose intersticial e perivascular.

A inflamação, estimulada pela exposição à poluição, é outro mecanismo diretamente implicado na lesão miocárdica. Frantz *et al.* (2009) e outros pesquisadores^{26, 27}, demonstraram que as principais células envolvidas no processo inflamatório do miocárdio são leucócitos, macrófagos, linfócitos, monócitos e neutrófilos. Essas células invadem o miocárdio agredido, iniciando e perpetuando esse processo^{27, 28}. As células inflamatórias são atraídas para essas regiões através das moléculas de adesão e quimiocinas expressas pelas células endoteliais que estão na borda da vasculatura coronariana. Essa migração, para as regiões afetadas do miocárdio, é facilitada pela atividade proteolítica das metaloproteinases na adventícia dos vasos intramiocárdicos²⁹, onde há liberação maciça de ROS e enzimas proteolíticas através das células inflamatórias. Esse fato contribui para o desenvolvimento de lesões na região agredida e facilita a sinalização para a propagação da inflamação para as áreas distantes^{27, 30}. Além disso, a resposta de quimiocinas no tecido lesado pode ser induzida por vários fatores, incluindo a via do fator nuclear (NF- κ B).

Essa via está associada à síntese de diferentes citocinas, tais como TNF- α , IL-6, TGF- β , as quais estão diretamente associadas ao dano celular miocárdico e reposição por fibrose³¹⁻³³. As células danificadas e restos celulares podem, por sua vez, ativar os macrófagos, induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias e proteases, bem como a geração de ROS³⁴. Essa complexa cascata de resposta de mediadores do estresse oxidativo e da inflamação tem duas vias por onde o estresse oxidativo estimula a inflamação e essa exacerba o estresse oxidativo²⁵.

Conforme descrito anteriormente¹⁻³, muitos foram os estudos que relacionaram altos índices de poluição, observados nos grandes centros urbanos, com as doenças cardiovasculares e pulmonares. No entanto, a literatura disponível não correlaciona a influência da exposição à poluição com o remodelamento, inflamação e estresse oxidativo, especificamente no miocárdio.

O termo remodelamento foi empregado pela primeira vez, em 1982, pelos pesquisadores Hockman e Bulkley³⁵. Esse termo foi usado referindo-se à isquemia miocárdica em um modelo experimental, no qual verificaram a substituição do tecido necrótico infartado pelo tecido de cicatrização. Em 1985, o termo remodelamento foi utilizado, já no contexto atual, pela pesquisadora Janice Pfeffer³⁶, num estudo experimental em ratos, em que o termo remodelamento serviu para caracterizar o aumento da cavidade ventricular esquerda. A partir desse estudo, o remodelamento vem sendo aplicado em situações clínicas em que há variações genéticas, moleculares, celulares e

estruturais miocárdicas que vão se manifestar clinicamente por alterações no tamanho, geometria e função do coração, em resposta a determinada injúria³⁷.

Especificamente no miocárdio, quando agredido por um processo isquêmico, ocorre a formação de tecido fibrótico, que altera a morfologia, a geometria, o comportamento elétrico e a função contrátil do músculo cardíaco. Alguns fatores importantes desse remodelamento são a necrose dos cardiomiócitos, apoptose, ativação do sistema complemento, inflamação e estresse oxidativo. Há um acúmulo de células inflamatórias na área infartada e na área remota, além da ativação neuro-hormonal local e remota ao infarto. Essa cadeia complexa de eventos promove intenso remodelamento molecular e celular na região infartada e em regiões distantes a ela³⁷.

A poluição atmosférica pode estar associada diretamente ao remodelamento cardíaco, mediado pelo estresse oxidativo e pela inflamação, conforme descrito por Ying *et al.*³⁸, em 2009. Sabe-se que: 1 - a exposição à poluição estimula o estresse oxidativo e a inflamação, e que esses dois mecanismos estão interligados; 2 - que o estresse oxidativo e a inflamação estão associados à perda de miócitos no miocárdio por necrose e apoptose; 3 - que ambos os mecanismos estão relacionados à ativação neuro-hormonal tissular, sendo vias de sinalização importantes na expansão e progressão da lesão do miocárdio; 4 - e que essa cascata resulta, portanto, num acúmulo de colágeno no interstício, promovendo tanto uma fibrose reparativa como reativa.

Levando em consideração as colocações acima, a hipótese deste estudo é de que a poluição pode ser um fator importante envolvido no aumento da

fibrose e na extensão da lesão miocárdica em um modelo experimental de infarto agudo no miocárdio em ratos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o papel da poluição no remodelamento estrutural, geométrico e funcional do coração.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar, no miocárdio, a ação da poluição:

- I. no colágeno intersticial
- II. na ativação inflamatória
- III. no estresse oxidativo e apoptose
- IV. na geometria e função cardíaca sistólica

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Grupos do estudo

Foram estudados 75 ratos machos Wistar pesando entre 250 - 300 g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Esses animais foram mantidos em gaiolas apropriadas com 3 animais em cada, com ração e água *ad libitum* e identificados com *microchip* implantados através de injeção subcutânea.

Este estudo foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo *The Universities Federation for Animal Welfare*^{39, 40}.

O protocolo de Pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob nº 335/10 e obteve suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo 2010/11541-4).

Os animais foram divididos em 5 grupos com 15 animais (figura 2), a saber:

- I CT – grupo controle
- II - CTP – grupo controle exposto à poluição
- III - IAM – grupo infartado
- IV - IAM G1 – grupo infartado e exposto imediatamente à poluição durante 4 semanas
- V - IAM G2 – grupo exposto previamente à poluição durante 3 semanas, submetido ao infarto e exposto por mais 4 semanas à poluição.

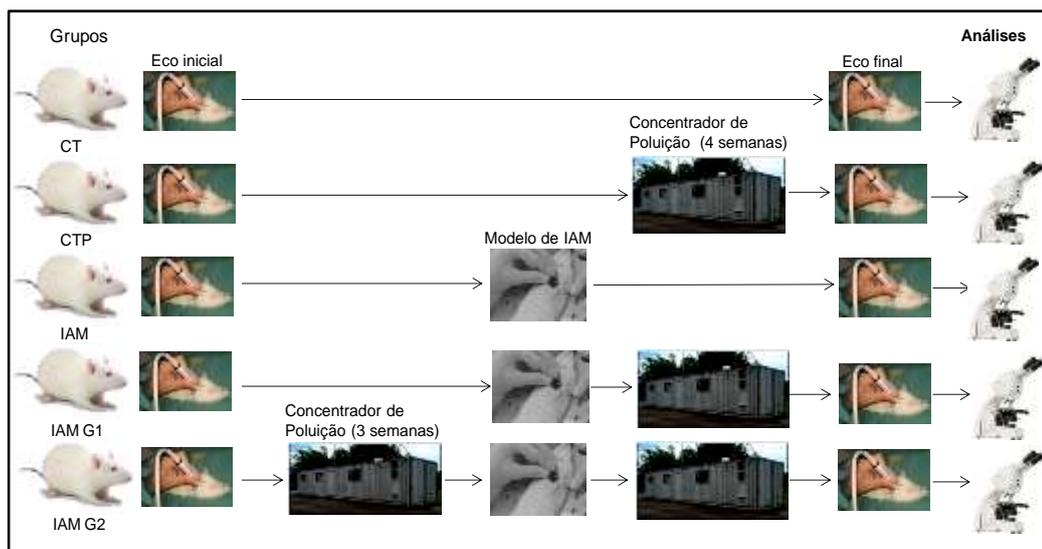


Figura 2 - Fluxo de trabalho

3.1.2. Critérios de exclusão do estudo

Durante a realização do modelo de IAM, os animais que vieram a óbito foram substituídos antes do início do projeto. Também foram excluídos do estudo os animais que tiveram a área de infarto menor que 20%.

3.1.3. Modelo experimental

Para a realização do modelo de IAM, os animais foram anestesiados com uma combinação de xylazina (10 mg/kg) e quetamina (50 mg/kg) intraperitoneal, entubados oro-traquealmente com jelco 14 G e colocados em ventilação mecânica com frequência de 60 ciclos/minutos e volume corrente de 2,5 mL. Uma incisão transversal foi realizada sobre o hemitórax esquerdo, para

exposição dos músculos peitorais, os quais foram afastados. Em seguida, a toracotomia esquerda foi realizada ao nível do 3º espaço intercostal, para visualização da parede ântero-lateral do ventrículo esquerdo próximo à base do coração (figura 3).

Após a pericardiotomia, a artéria coronária esquerda foi localizada na região entre o átrio esquerdo e a emergência da artéria pulmonar. A ligadura da artéria foi realizada com fio de *nylon* 6.0, 1 a 2 mm após sua origem. A isquemia resultante foi verificada pelo descoramento muscular da parede livre do ventrículo esquerdo. A parede do tórax foi suturada com fio de algodão 3.0 e o ar do espaço pleural, drenado.

Os animais do grupo IV foram submetidos ao infarto e imediatamente expostos à poluição atmosférica durante 4 semanas. Os animais do grupo V foram expostos à poluição durante 3 semanas prévias ao IAM. Após esse período, foram submetidos ao infarto e retornaram à exposição durante mais 4 semanas.

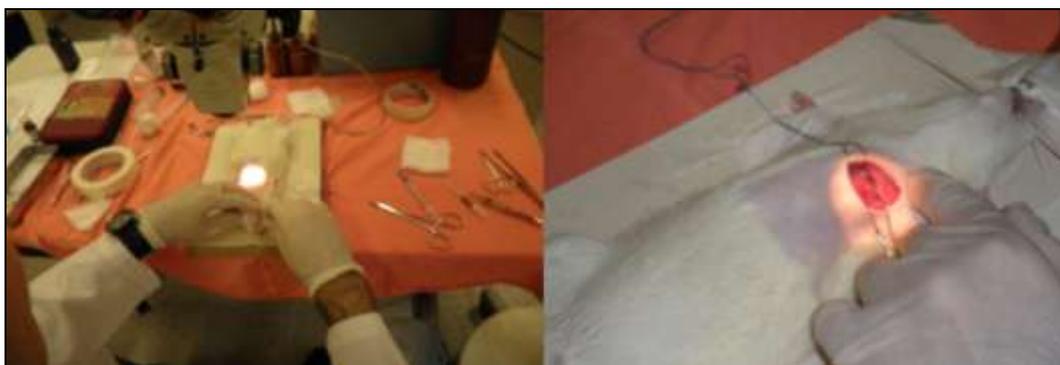


Figura 3 – Modelo experimental de infarto agudo do miocárdio

Os animais foram eutanasiados sob anestesia com quetamina 50 mg/Kg e xylazina 10 mg/Kg e sob ventilação mecânica. Nessa etapa foi coletado sangue total e, logo depois, realizada a administração de solução com cloreto de potássio (soro fisiológico 0,9% 80 mL + KCl 19,1% 20 mL), até a parada cardíaca.

Após a parada cardíaca total do animal foram coletados o coração, o pulmão, o rim e a tibia. Esses órgãos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em *freezer* -86° C, para a realização de experimentos futuros.

Logo após a remoção do coração o órgão foi dividido em três partes: base, 1/3 médio e ponta, sendo o 1/3 médio fixado em formol 10% e emblocados em parafina para a realização da análise morfométrica. A base e a ponta foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas em *freezer* -86°C, para a realização dos experimentos deste trabalho. Todo o procedimento foi conduzido utilizando-se material esterilizado.

Outros órgãos não usados nesse trabalho foram colocados em saco leitoso, com identificação da espécie, data e procedência do laboratório e entregues para o descarte, que foi realizado conforme as normas de descarte de material biológico do Biotério do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.2. Caracterização do local da exposição

O experimento foi realizado no pátio da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que está localizado em um cruzamento com alto

tráfego veicular (Rua Teodoro Sampaio com Avenida Dr. Arnaldo/SP - figura 4). Conforme dados do relatório da CETESB, do ano de 2006, há uma circulação diária de aproximadamente 85 mil carros, sendo 10 mil veículos a *diesel* e 6,5 mil motocicletas, na avenida Dr. Arnaldo. Já na Rua Teodoro Sampaio, os números correspondentes são 26 mil carros, 5 mil veículos a *diesel* e 800 motos⁴¹.

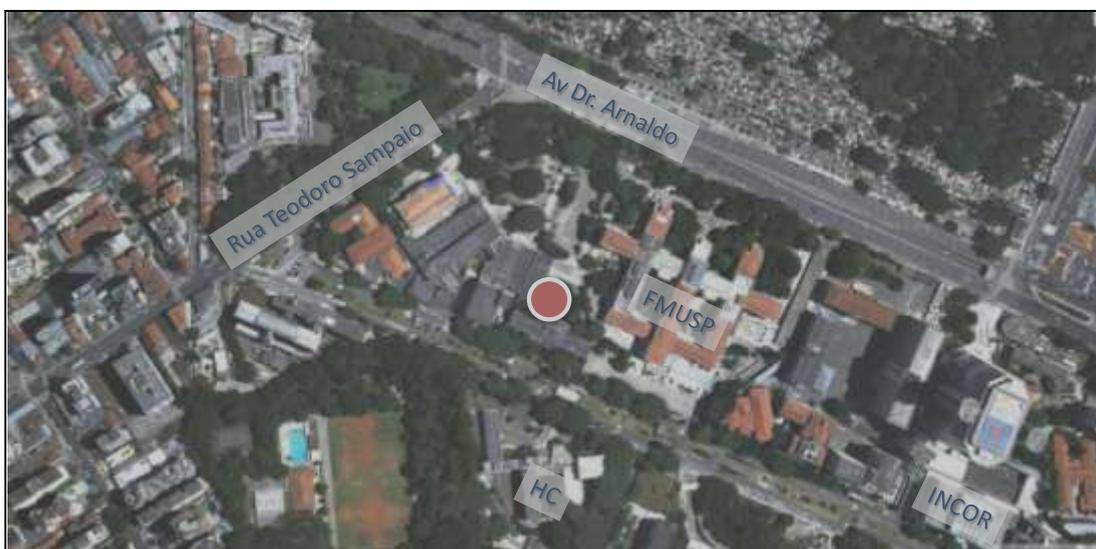


Figura 4 - Fotografia aérea do local de exposição. O círculo vermelho mostra o local onde foi instalado o concentrador de poluição - FMUSP

3.2.1. Câmara de exposição

O sistema que foi usado neste trabalho já foi previamente descrito por diversos trabalhos^{11, 42, 43-46}.

A exposição foi realizada como descrito por Mohallem *et al.*⁴³ (2005), com o objetivo de criar um local real de exposição ao material particulado (MP) do ar emitido pela frota veicular (figura 5). Foram utilizadas duas câmaras que

ficaram lado a lado, constituídas de estruturas cilíndricas de alumínio, medindo 2 metros de diâmetro e 2,15 metros de altura, cobertas por filme plástico com proteção contra raios UV (figura 6).



Figura 5 - Vista externa do contêiner onde está localizado o concentrador de poluição – Faculdade de Medicina – USP

O ar atmosférico entra na base das câmaras por uma bomba de sucção e é uniformemente distribuído, saindo pela abertura na parte superior. Esse sistema é normobárico, sendo que a pressão interna não excede 30 mm H₂O. A câmara possui um sistema de filtração com 3 filtros alinhados em série, sendo um para substâncias químicas e os outros dois removem grandes partículas e partículas finas até 0,3 µm (figura 6).

As câmaras receberam o ar atmosférico com fluxo de 20 m³/minuto e foram mantidas as mesmas condições de temperatura e umidade. A dose de exposição foi escolhida tendo como referência a dose pela qual pessoas que vivem na cidade de São Paulo estão expostas. Dados dos relatórios da CETESB mostraram que a média diária anual acumulada por hora na cidade é

de $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$. Assim, em 24 horas, a essa concentração, temos total de $600 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Portanto, nesse estudo os animais receberam diariamente uma concentração de poluição em média entre $600\text{-}800\mu\text{g}/\text{m}^3$ $\text{MP}_{2,5}$. As exposições foram realizadas ao longo do dia e por 5 vezes na semana.

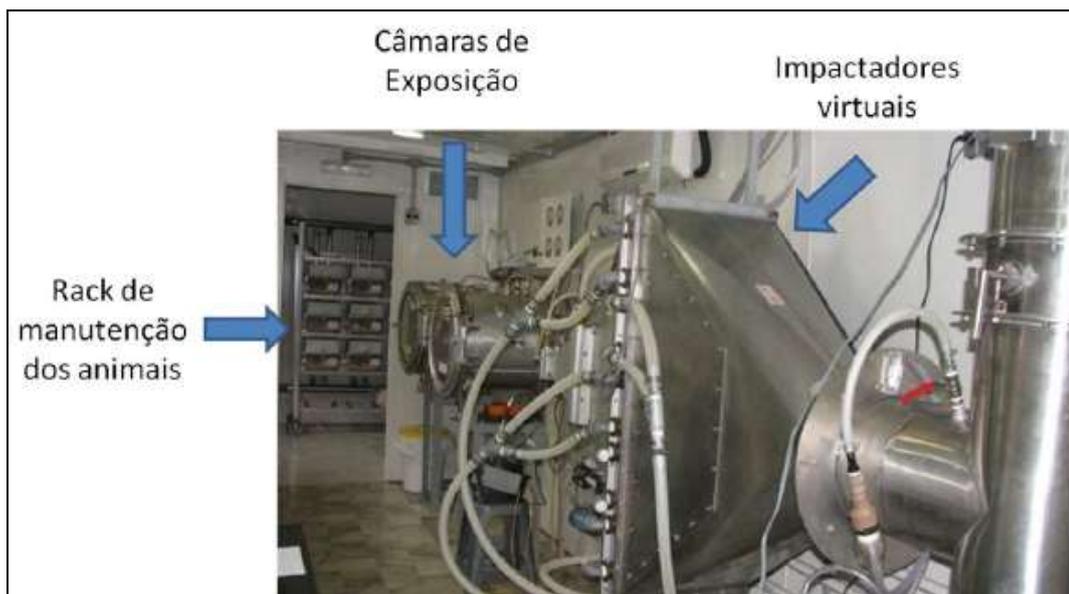


Figura 6 - Câmara de exposição à poluição atmosférica

3.3. Análise morfométrica

Os corações em parafina foram submetidos a cortes transversais em secções de $4 \mu\text{m}$ ao nível do equador, de modo a analisar os ventrículos direito e esquerdo. Foram colocados em lâminas silanizadas, para evitar o descolamento dos tecidos durante os procedimentos histológicos. Os cortes foram corados por *Picrosirius red* e utilizados para análise morfométrica para a quantificação da fração do volume de colágeno no miocárdio.

Para isso, um corte de cada coração foi analisado pelo programa *Leica QWIN Image Processing and Analysis Software* (*Leica Microsystems Cambridge Ltda*), acoplado a microscopia ótica.

A quantificação da fração do volume de colágeno intersticial (FVCI) foi determinada calculando-se a percentagem de área de colágeno sobre a área total de miocárdio, analisando-se todos os campos de um corte, utilizando-se a objetiva de 5X e aplicando-se a fórmula abaixo e conforme demonstrado na figura 7. A fração do volume de colágeno intersticial do ventrículo esquerdo e do ventrículo direito foi determinada separadamente, excluindo-se a área do infarto.

$$\text{FVCI (\%)} = \frac{\text{Área de colágeno}}{\text{Área total do miocárdio}} \times 100$$

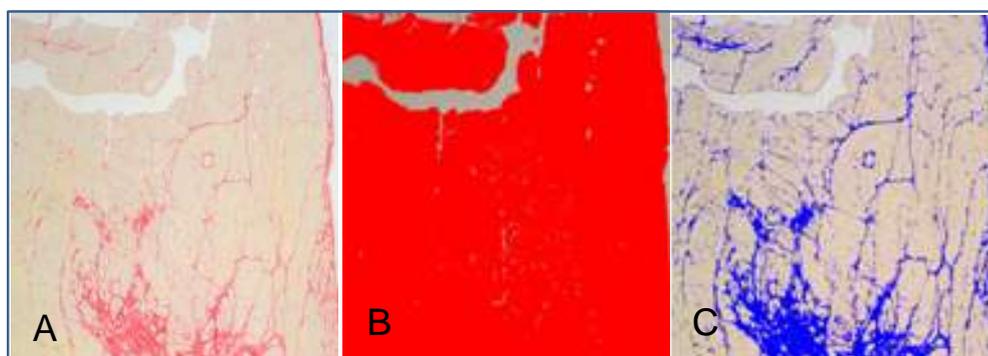


Figura 7 - Quantificação da fração de colágeno intersticial, onde (A) lâmina total, (B) quantificação da área total do miocárdio (vermelho) e (C) quantificação da área de colágeno (azul)

3.4. Área do infarto

Os mesmos cortes utilizados para a quantificação da fração do volume de colágeno foram utilizados na medida da área do infarto. Usando o processador de análise de imagem *Leica QWIN Image Processing and*

Analysis Software (Leica Microsystems Cambridge Ltda), os cortes ventriculares, englobando a circunferência ventricular esquerda inteira de cada amostra, foram fotografados. O IAM foi definido como correspondendo à região da parede ventricular entre as bordas externas onde foi identificado tecido de cicatrização. Foram medidas as circunferências das regiões infartadas e não infartadas³⁷. O tamanho da área de infarto foi, então, calculado como a percentagem do comprimento do IAM em relação à circunferência ventricular esquerda inteira de cada secção^{36, 47}. A área do infarto do miocárdio final foi determinada com lente macro (figura 8) e utilizando-se a fórmula:

$$\text{Área de infarto (\%)} = \frac{\frac{\text{AE-IAM} + \text{AI-IAM}}{2}}{\frac{\text{AE-VE} + \text{AI-VE}}{2}} \times 100$$

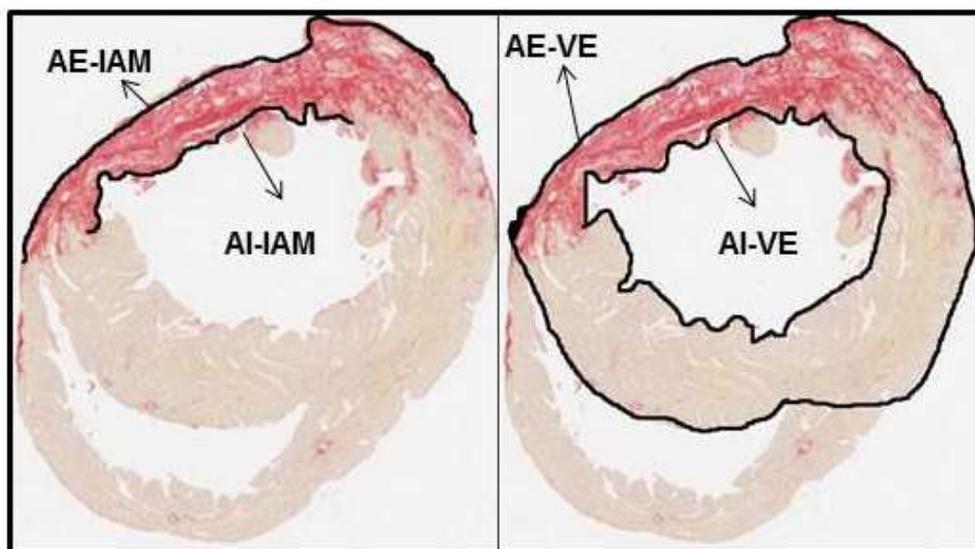


Figura 8 - Medida da área de infarto: AE-IAM (área externa do infarto), AI-IAM (área interna do infarto), AE-VE (área externa do ventrículo esquerdo), AI-VE (área interna do ventrículo esquerdo).

3.5. Ecocardiograma

Ecocardiograma transtorácico modo M, bidimensional e Doppler pulsado foi realizado utilizando-se o aparelho *Acuson*, modelo Sequoia 512, com transdutor de 9 mm e frequência de 13 MHz. O padrão de contração regional e global foi avaliado em tempo real nos cortes paraesternal longitudinal e transversal do ventrículo esquerdo (VE). As dimensões cardíacas sistólicas e diastólicas foram analisadas pelo modo M. A função ventricular sistólica foi avaliada pela medida da fração de encurtamento. Os animais foram submetidos a esse exame no início e ao final do estudo, sendo previamente anestesiados com uma combinação de quetamina (50 mg/Kg) e Xylazina (10 mg/Kg) via intraperitoneal. O exame foi realizado de acordo com a sua padronização em ratos, sendo considerados como valores normais os ecocardiogramas de animais sadios do grupo controle⁴⁸.

3.6. Análise da expressão gênica através da técnica PCR *Real Time*

Esta metodologia foi aplicada para avaliação de mediadores da inflamação (TNF- α , TGF- β 1, IL-1, IL-6, INF- γ , CCL-3, CCL-5, CCL-21, CCr-5, CCr-7), da apoptose (p53 e Bcl-2) e da sobrecarga ventricular (BNP).

3.6.1. Extração do RNA total

Para extração de RNA das amostras de tecido cardíaco, foram utilizados 50 a 100 mg de tecido em 1,0 mL de *TRizol® Reagent (Invitrogen™)*. O material foi triturado no *TRizol® Reagent* até sua completa homogeneização e mantido em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio e agitou-se vigorosamente com as mãos durante 15 segundos, seguindo um período de incubação de 2 a 3 minutos, em temperatura ambiente. Essa mistura foi, então, centrifugada a 4°C, a uma velocidade de 12.000 x *g* durante 15 minutos. A parte aquosa foi removida e transferida para outro tubo limpo e estéril. Foram adicionados 0,5 mL de álcool isopropanol e deixada em incubação em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 12.000 x *g* por 10 minutos, a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi, então, removido e descartado, ficando apenas o precipitado para ser lavado com 1 mL de álcool etílico, agitando o tubo no vórtex e centrifugando por 5 minutos, a uma velocidade de 7.500 x *g* a 4°C. O sobrenadante foi, então, descartado, deixando o precipitado formado no fundo do tubo secar, sendo este eluído com 30 a 50 µL de água DEPC. As concentrações das amostras foram determinadas através da leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda 260/280 nm, utilizando-se o aparelho *nanodrop (Thermo Scientific)*. Já a qualidade das mesmas foi verificada através de corrida de eletroforese em gel de agarose. Uma alíquota com 3 µg de RNA de cada amostra foi separada para a realização do tratamento e transcrição reversa e o restante das amostras foi armazenado em *freezer -86°C*.

3.6.2. Tratamento do RNA total com DNase free

O RNA foi submetido ao tratamento com a enzima *Turbo DNA-Free*[™] da empresa *Ambion (The RNA company)*, o protocolo do fabricante foi seguido rigorosamente, utilizando-se a quantidade de 3 µg de RNA. Ao RNA foi adicionado 0,1 do volume de *Turbo DNase Buffer 10 X* e 1,0 µL de turbo Dnase. As amostras foram, então, homogeneizadas vigorosamente e incubadas a 37°C durante 20 a 30 minutos, no equipamento *MasterCycler Gradient (Eppendorf)*. Ao final da incubação, foi adicionado 0,1 do volume do reagente de inativação da DNase, seguido de incubação por 5 minutos em temperatura ambiente (25°C), também no *MasterCycler Gradient (Eppendorf)*. Após término da incubação, seguiu-se a centrifugação da amostra a 10.000 x g por 1,5 minuto e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo livre de RNase.

3.6.3. Síntese do DNA complementar (cDNA)

Foram utilizados 3 µL RNA total tratado (VF=10 µl), 0,5 µL de oligo dt (500 ng/µL), 0,5 µL de *Random primer* (100 ng), 1 µL de 10 mM dNTP.

Foi realizada incubação por 5 minutos à temperatura de 65°C, e mais 10 minutos à temperatura ambiente, utilizando o aparelho *MasterCycler Gradient (Eppendorf)*.

Foi preparada uma mistura contendo 4 µL de tampão da *Super Script II 5 X* [Tris-HCL 250 mM, KCL 376 mM e MgCL₂ 15 mM], 2 µL de DTT 0,1 M

(Invitrogen, Life Technologies, CA, EUA), 1 μ L de RNA out e 1 μ L da Super Script II (200 U / μ l). Essa mistura foi adicionada à amostra e incubada a 25°C por 10 minutos, seguidos de 50 minutos a 42°C; para finalizar e inativar a enzima, a reação ficou incubando durante 15 minutos a 70°C.

A concentração do cDNA (VF = 20 μ L) foi determinada por leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260 nm. Os cDNAs foram diluídos a uma concentração de 1:40 μ L e armazenados em *freezer* a temperatura de -20°C.

3.6.4. Análise da expressão dos genes através da técnica de RT-PCR *Real Time*

As reações de RT-PCR *Real Time* foram feitas em placas de 96 poços, usando reagente *Power SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems – EUA), conforme descrito pelo fabricante, e o equipamento utilizado foi *StepOne Plus Real-Time PCR Systems-Applied Biosystems*. A reação foi preparada com 6 μ L de *Sybr Green*; 3,0 μ L de cDNA diluídos 1:40 e 3,0 μ L de *primer* (*Foward* e *Reverse*) já diluídos na concentração determinada previamente na reação de otimização dos *primers*, necessária para uma eficiência de 100%. Essas quantidades foram utilizadas para elaboração da reação de *real time* em duplicata. O programa para a amplificação das amostras consiste em uma denaturação inicial de 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (denaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento dos *primers* e extensão). No final de todas as reações, as curvas de dissociação com

temperaturas crescentes foram analisadas, a fim de verificar a amplificação de um único produto. As condições da reação foram idênticas às utilizadas para a construção das curvas de calibração e otimização dos *primers*. Cada reação foi realizada em duplicata e, para cada gene do estudo, foram amplificadas em paralelo as amostras controles cDNA. Todas as reações de PCR consideradas para análise apresentaram eficiência igual ou superior a 95%.

A reação para cada gene analisado foi cuidadosamente padronizada, a fim de evitar amplificação inespecífica.

A detecção dos produtos foi feita pelo monitoramento do sinal fluorescente emitido pelo corante *SYBR Green* (*Applied Biosystems*), que intercala a dupla fita do DNA, obtido no final de cada ciclo. Os valores quantitativos foram obtidos a partir do ciclo limiar ou *cycle threshold* (Ct), onde o aumento do sinal associado ao crescimento exponencial dos produtos de PCR começa a ser detectado⁴⁹.

Os níveis de expressão dos genes estudados foram normalizados em relação ao RNAm dos genes endógenos (GAPDH e β -actina), conforme descrito por Livak *et al.*⁵⁰, em 2001.

Nesse trabalho, tomou-se o cuidado de verificar a especificidade da reação de RT-PCR, realizando-se a curva de dissociação. A reação, sendo específica para os produtos de PCR analisado, mostrou um gráfico com apenas um pico a uma determinada temperatura em todas as amostras dos animais estudados. Os oligonucleotídeos usados para esse experimento estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Sequência de *primers* utilizados para amplificação dos genes: GAPDH, β -actina, p53, Bcl-2, TNF- α , TGF- β 1, IL-1 β , IL-6, INF- γ , CCL-3, CCL-21, CCR-7 e BNP

Gene	Sequência	Gene Bank Acess
GAPDH	F: 5' ATGTATCCGTTGTGGATCTGAC 3' R: 5' CCTGCTTCACCACCTTCTTG 3'	NM_017008
β-actina	F: 5' GTGCTSTGTTGCCCTSGSCTTCG 3' R: 5' TCGAATCGCACCTGATCACTA 3'	NM_031144
p53	F: 5' CAGCTTTGAGTTCGTGTTTGT 3' R: 5' ATGCTCTTCTTTTTTGCAGAA 3'	NM_030989
Bcl-2	F: 5' GGAGCGTCAACAGGGAGATG 3' R: 5' GATGCCGGTTCAGGTACTIONAG 3'	NM_016993
TNF-α	F: 5' GACCTCACACTCAGATCATCTTCT 3' R: 5' TGCTACGACGTGGGCTACG 3'	NM_012675.3
TGF-β	F: 5' CAACAATTCCTGGCGTTACCTT 3' R: 5' AAGCCCTGTATTCCGTCTCCTT 3'	NM_021578.2
IL-1β	F: 5' CCCTGCAGCTGGAGAGTGTGGTGTG 3' R: 5' TGTGCTCTGCTTGAGAGGTGCT 3'	NM_031512.2
IL-6	F: 5' CGAGCCCACCAGGAACGAAAGTC 3' R: 5' CTGGCTGGAAGRTCTCTTGCGGAG 3'	NM_012589.1
INF-γ	F: 5' TCGAATCGCACCTGATCACTA 3' R: 5' GGGTTGTTACCTCGAATTG 3'	NM_138880.2
CCL-3	F: 5' CCGCTGCCCTTGCTGTT 3' R: 5' CGCTGAGAAGACTTCGTTCCA 3'	NM_013025
CCL-21	F: 5' CCATCCAGCAATCCTGTTC 3' R: 5' TCAGGGTTTGCGCATAGCT 3'	NM_001008513.1
CCR-7	F: 5' CGGATACCTACCTGCTCAACCT 3' R: 5' GTAGGCCAGAAAGGAAGGA 3'	NM_199489.3
BNP	F: 5' CACAGTCTCTGCTTCAGGTACCA 3' R: 5' GCGGCTGCAACGAGGAT 3'	NM_03116.3

3.7. Análise do estresse oxidativo

Para análise do estresse oxidativo nas amostras de soro dos animais, foram feitas análises das proteínas glutathiona e ADMA.

A glutathiona tem sido descrita como um antioxidante que protege o miocárdio contra a lesão da isquemia-reperfusão. Já a proteína ADMA é considerada importante inibidor endógeno da síntese de NO, sendo importante mediador na doença cardiovascular.

3.7.1. Glutathiona

Utilizamos o reagente *Glutathione Fluorescent Detection Kit* (Arbor Assays) para dosagem do estado *redox* da glutathiona em soro dos animais do estudo. O experimento é baseado no reconhecimento do grupo tiol presente em moléculas de glutathiona, formando uma substância altamente fluorescente que é detectada em placas de 96 poços, através de um aparelho de fluorímetro.

Foi adicionado ao soro o mesmo volume de uma solução de desproteinização volume/volume. Essa mistura foi incubada a 4°C durante 10 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g, durante 10 minutos, para remover o precipitado de proteínas. Em outro tubo limpo, coletou-se o sobrenadante. Esse material foi armazenado em *freezer* -86°C. O sobrenadante foi diluído com o tampão de amostra (1:2,5) sendo que essa solução ficou com a concentração final de 1%.

Para a realização do experimento, foi necessário que todos os reagentes fossem deixados em temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos.

Foram pipetados 50 μL de todas as amostras na placa, sempre em duplicata. Em seguida, foram adicionados 25 μL do reagente *ThiStar* em cada poço e incubados durante 15 minutos.

Na sequência, à mesma amostra foram adicionados 25 μL do reagente (*reaction mixture*) em cada poço e incubados durante 15 minutos. Esse reagente converte todo o conteúdo de glutatona oxidada em glutatona total. Ao término dessa incubação, foi efetuada a leitura a 510 nm com excitação de 370 a 410 nm. Esses dados foram usados para determinar a concentração de glutatona total (GSH total).

Uma curva com concentrações conhecidas de glutatona foi utilizada como padrão.

3.7.2. ADMA

Para a determinação do ADMA, utilizamos o *kit* de ELISA ADMA *direct* para camundongos e ratos (*Enzo Life Sciences*).

As amostras foram centrifugadas em colunas para retenção de resíduos contidos no soro. Após a centrifugação, foi transferido o sobrenadante e seguido o protocolo.

As amostras, os controles e o padrão do experimento foram pipetados na placa de 96 poços, sempre em duplicatas. Adicionados 100 μL do

anticorpo primário ADMA e incubados durante 15 a 20 horas à temperatura de 2 a 8°C.

Após o período de incubação, foram efetuadas 5 lavagens na placa, para remoção total do excedente de anticorpo.

Na sequência, foram adicionados 200 µL de anticorpo secundário e incubados durante 1 hora em temperatura ambiente. Após esse período, foram efetuadas 5 lavagens da placa, para remoção total do excedente de anticorpo secundário. Ao término desse processo, foram adicionados 200 µL de substrato e incubados durante 6 a 10 minutos, em temperatura ambiente, sem iluminação. Após esse processo, foi adicionada uma solução para interromper a reação.

A placa foi lida imediatamente em aparelho de espectrofotômetro, com comprimento de onda a 450 nm contra 620 nm (690 como referência). Para efetuar os cálculos, foi utilizada uma curva de 4 parâmetros, conforme sugerido pelo fabricante.

3.8. Análise estatística

Testes não paramétricos de Kruskal-Wallis⁵¹ foram utilizados para comparação das variáveis entre os 5 grupos. Quando diferenças significativas entre os grupos foram observadas, as múltiplas comparações entre pares de grupos foram feitas aplicando-se correção de Bonferroni⁵¹.

O nível de significância dos testes foi de 5%, ou seja, diferenças significativas foram consideradas quando o nível descritivo do teste (valor de p)

foi menor ou igual a 0,05. Vale verificar os casos em que o valor de p foi maior que 0,05, porém menor que 0,10. Neste caso, as evidências de diferenças existem, porém são mais fracas. Os dados foram apresentados com a média e desvio padrão.

Foi utilizado o *Software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)*, versão 19, para as estatísticas descritivas, gráficos e testes não paramétricos.

5. RESULTADOS

5.1. Sobrevida dos animais

No período de execução do modelo de IAM, houve 10% de mortalidade. Esses animais foram repostos antes do início do estudo. Durante o período de exposição à poluição atmosférica, não tivemos nenhuma perda de animais.

5.2. Análise morfométrica

A fração do volume de colágeno intersticial do ventrículo esquerdo - FVCI-VE (%) foi maior nos grupos: CTP, IAM, IAM G1 e IAM G2 em relação ao grupo controle (figura 9, tabela 3 e gráfico 1). Chamamos a atenção ao grupo CTP, que apresentou maior deposição de colágeno no VE, quando comparado ao grupo CT ($p = 0,001$). Os grupos infartados também apresentaram maior deposição de colágeno, quando comparados ao grupo CT ($p \leq 0,001$). Observamos que, nos grupos infartados (IAM vs IAM G1, IAM vs IAM G2 e IAM G1 vs IAM G2), a poluição não acentuou a deposição de colágeno no interstício do miocárdio ($p = 1,00$).

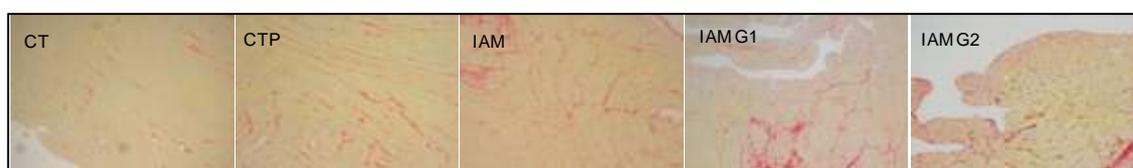


Figura 9 - Miocárdio corado pela técnica de *Picrosirius red*, marcação do colágeno na cor vermelha (objetiva 5 X)

Tabela 3 - Fração do volume de colágeno intersticial (%)

	VE	VD
CT	0,35 ± 0,16	0,47 ± 0,18
CTP	0,67 ± 0,19	1,05 ± 0,50
IAM	2,77 ± 1,19	3,05 ± 1,81
IAM G1	3,72 ± 2,61	2,82 ± 1,34
IAM G2	3,31 ± 1,97	4,49 ± 3,46

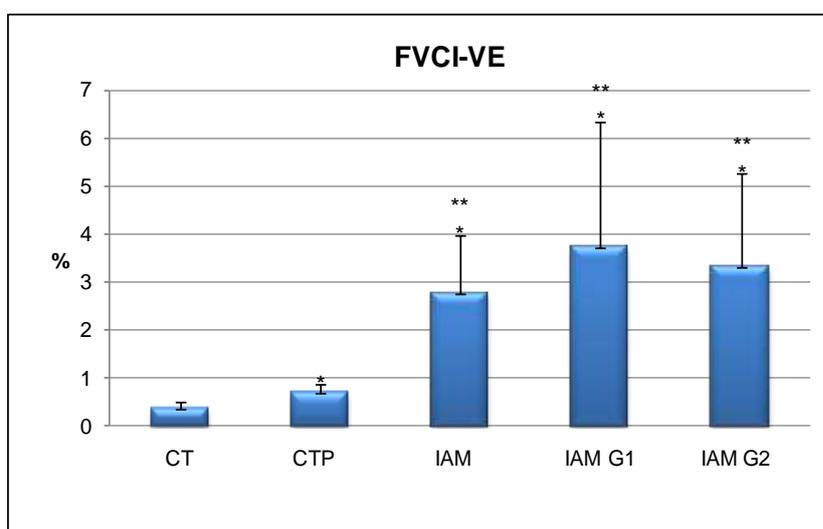


Gráfico 1 - Fração do volume de colágeno intersticial do ventrículo esquerdo - % FVCI-VE

* $p \leq 0,001$ (CT vs CTP, IAM, IAM G1 e IAM G2)

** $p \leq 0,001$ (CTP vs IAM, IAM G1 e IAM G2)

A fração do volume de colágeno intersticial do ventrículo direito - FVCI-VD (%) foi maior nos grupos CTP, IAM, IAM G1 e IAM G2, em relação ao grupo controle, conforme apresentados na tabela 3 e gráfico 2. O grupo CTP também apresentou maior deposição de colágeno no VD, quando comparado ao grupo CT ($p = 0,002$). Os grupos infartados também apresentaram maior deposição de colágeno, quando comparados ao grupo CTP ($p \leq 0,013$).

Observamos que, nos grupos infartados, a poluição não aumentou a deposição de colágeno no interstício do miocárdio ($p = 1,00$).

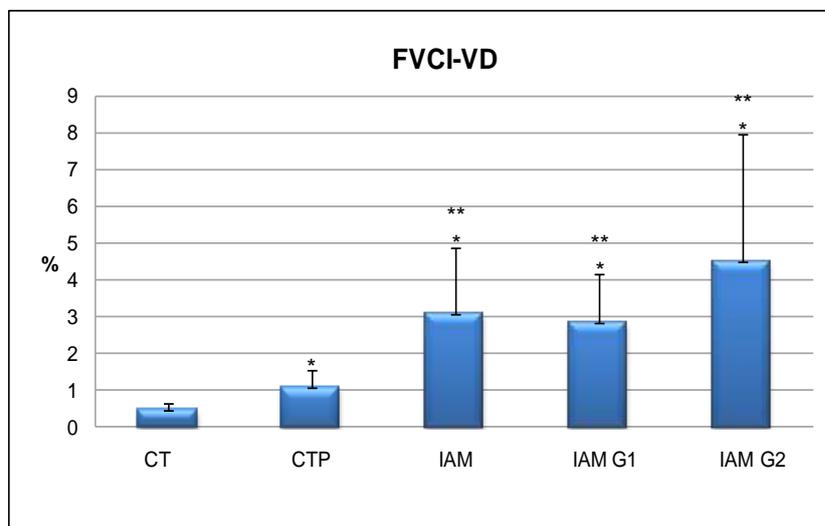


Gráfico 2 - Fração do volume de colágeno intersticial do ventrículo direito - % FVCI-VD

* $p \leq 0,002$ (CT vs CTP, IAM, IAM G1 e IAM G2)

** $p \leq 0,013$ (CTP vs IAM, IAM G1 e IAM G2)

5.3. Área de infarto

A comparação do grupo IAM com os grupos infartados e expostos à poluição (IAM G1 e IAM G2) demonstrou que a poluição atmosférica não interferiu no tamanho da área infartada ($p = 0,660$), conforme dados apresentados na tabela 4 e no gráfico 3.

Tabela 4 - Quantificação da área de infarto

IAM	27,30%
IAM G1	24,46%
IAM G2	27,90%

Valor de p : teste de *Kruskal-Wallis* ($p = 0,660$)

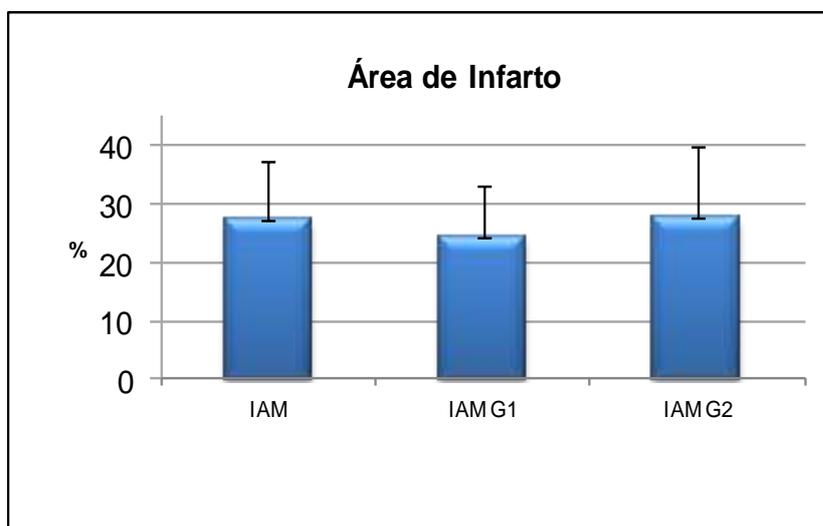


Gráfico 3 - Área de infarto ($p = 0,660$)

5.4. Ecocardiograma

5.4.1. Fração de encurtamento

A FE foi semelhante em todos os grupos na fase inicial do estudo ($p = 0,107$). Já na fase final do estudo, o grupo CT apresentou o maior valor médio de FE, quando comparado aos outros grupos de estudo (CT = 48%; CTP = 43%; IAM = 32%; IAM G1 = 27% e IAM G2 = 35%). Chamamos a atenção para o fato de que o grupo CTP apresentou menor FE que o grupo CT ($p = 0,033$).

Os grupos infartados também apresentaram FE reduzida em comparação aos grupos controles ($p \leq 0,03$). Entretanto, a poluição não adicionou piora na função ventricular esquerda nos animais infartados ($p = 1,00$). Dados apresentados na figura 10 e no gráfico 4.

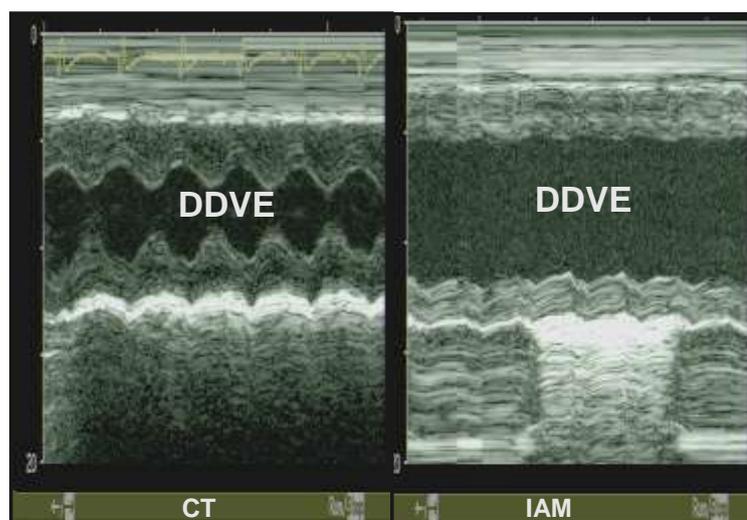


Figura 10 - Foto ilustrativa do ecocardiograma dos animais do grupo controle (CT) e infartado (IAM)

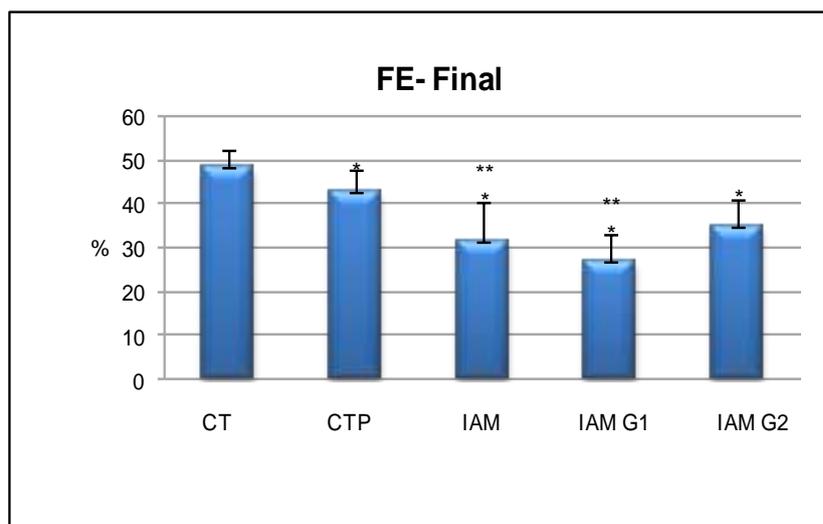


Gráfico 4 - Fração de encurtamento do VE (%)

* $p \leq 0,03$ (CT vs CTP, IAM, IAM G1 e IAM G2)

** $p \leq 0,05$ (CTP vs IAM e IAM G1)

5.4.2. Diâmetro diastólico do VE

O DDVE foi semelhante em todos os grupos na fase inicial do estudo, sem diferenças estatísticas. Já na fase final do estudo, apesar de os grupos

infartados terem um DDVE maior que os grupos controle, isso não foi estatisticamente significativo ($p = 0,75$). A exposição à poluição atmosférica não potencializou o efeito na dilatação, no modelo experimental estudado. Os valores dos DDVE (cm) foram CT = $0,83 \pm 0,04$; CTP = $0,80 \pm 0,07$; IAM = $0,87 \pm 0,12$; IAM G1 = $0,87 \pm 0,12$ e IAM G2 = $0,90 \pm 0,10$. Dados apresentados no gráfico 5.

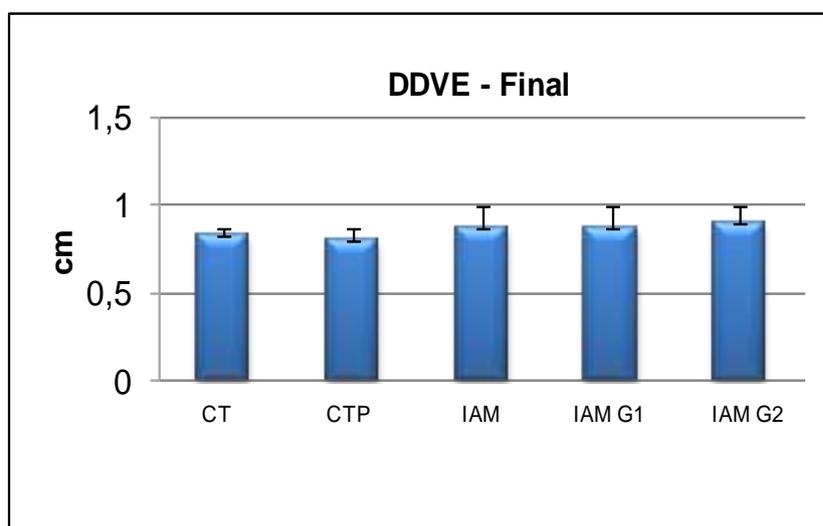


Gráfico 5 - Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDVE-cm) ($p = 0,75$)

5.4.3. Diâmetro sistólico do VE

A DSVE (cm) foi semelhante em todos os grupos na fase inicial do estudo ($p = 0,092$). No final do estudo, o grupo controle apresentou a menor média de diâmetro sistólico, quando comparado com os grupos infartados (CT= $0,43 \pm 0,037$; CTP= $0,46 \pm 0,077$; IAM= $0,64 \pm 0,12$; IAM G1= $0,67 \pm 0,102$ e IAM G2= $0,58 \pm 0,13$). O grupo CTP teve DSVE maior que o grupo CT, porém sem relevância estatística ($p = 1,00$) (gráfico 6).

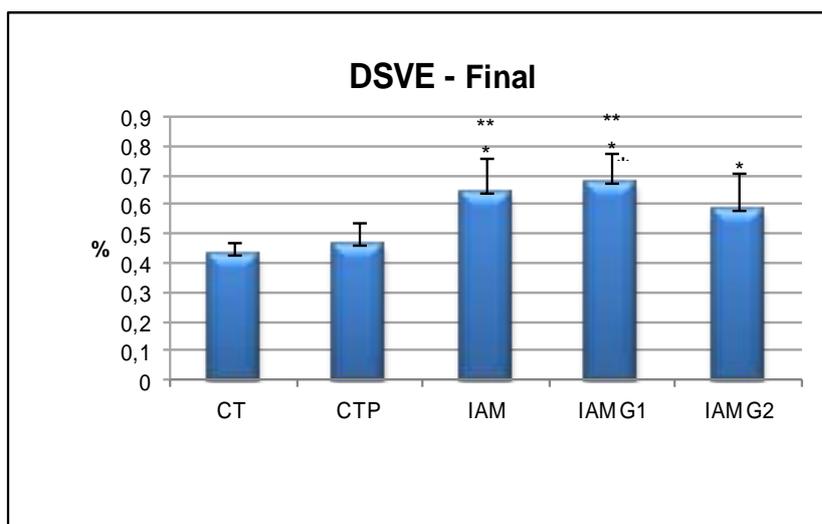


Gráfico 6 - Diâmetro sistólico final do VE (DSVE - cm)

* $p \leq 0,003$ (CT vs IAM, IAM G1 e IAM G2)

** $p \leq 0,018$ (CTP vs IAM e IAM G1)

5.5. Expressão gênica

5.5.1. BNP

O gene BNP, que avalia a sobrecarga ventricular, apresentou maior expressão nos grupos CTP ($0,28 \pm 0,60$), IAM ($0,20 \pm 0,10$), IAM G2 ($0,72 \pm 1,67$), em relação ao grupo CT ($0,16 \pm 0,21$). Apesar de verificarmos uma maior expressão desse gene nesses grupos, os valores não foram representativos estatisticamente ($p = 0,118$) (gráfico 7).

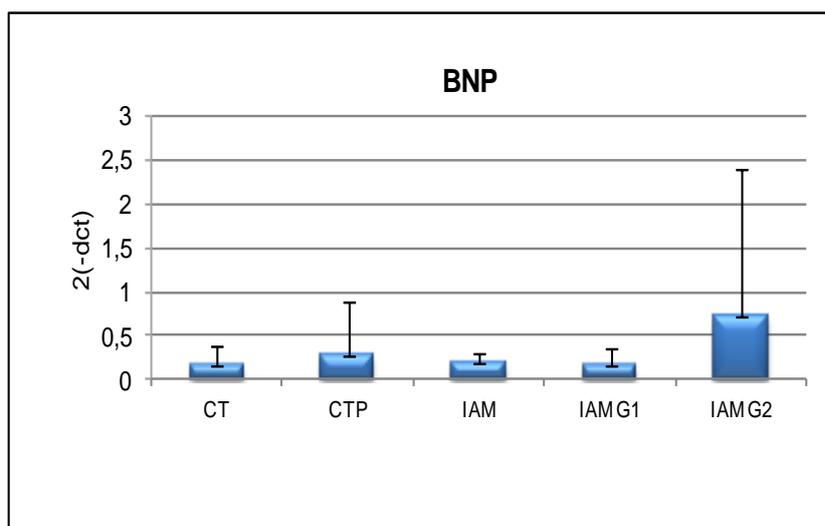


Gráfico 7 - Expressão relativa do gene BNP ($p = 0,118$)

5.5.2. Apoptose

Na avaliação da apoptose, o gene p53 foi mais expresso nos grupos IAM G1 e IAM G2, quando comparados com o CT, porém sem significância estatística, CT vs IAM G1 ($p = 0,52$) e CT vs IAM G2 ($p = 0,12$). Apesar de terem esses grupos valores médios, o dobro quando comparados ao grupo IAM (sem poluição), a diferença não apresentou significância estatística IAM vs IAM G1 ($p = 1,0$); IAM vs IAM G2 ($p = 0,23$), sugerindo que a exposição à poluição não intensificou a resposta da apoptose nesse modelo. Já o grupo IAM G2 apresentou níveis de expressão do gene p53 ainda mais elevados quando comparados com o grupo CTP, apresentando valor de $p = 0,02$), conforme apresentado no gráfico 8.

O gene Bcl-2 não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, apesar de apresentar maior média de expressão no grupo IAM G2 (gráfico 9).

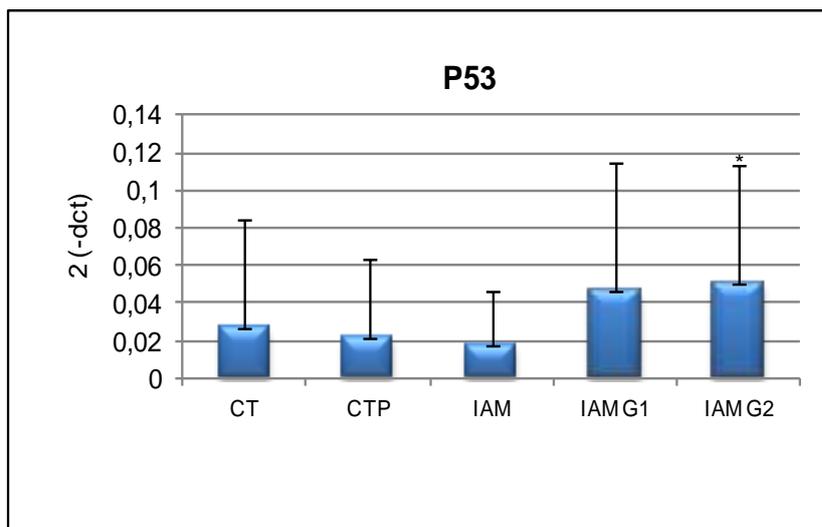


Gráfico 8 - Expressão relativa do gene p53

*p = 0,02 (CTP vs IAM G2)

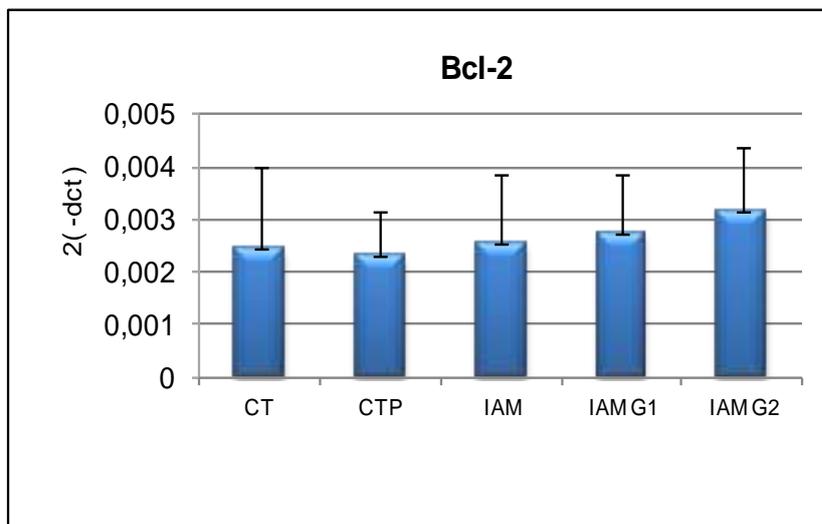


Gráfico 9 - Expressão relativa do gene Bcl-2 (p=0,27)

5.5.3. Citocinas inflamatórias

Para analisarmos o perfil inflamatório neste estudo, avaliamos a expressão de 8 citocinas diferentes (CCL-3, IL-6, TGF- β , TNF- α , IL-1 β , INF- γ , CCL-21 e CCR-7).

Apesar de o gene CCL-3 estar mais expresso nos grupos infartados em relação aos grupos controle, e ainda maior no grupo previamente exposto à poluição (IAM G2), não houve diferenças estatisticamente significantes (gráfico 10).

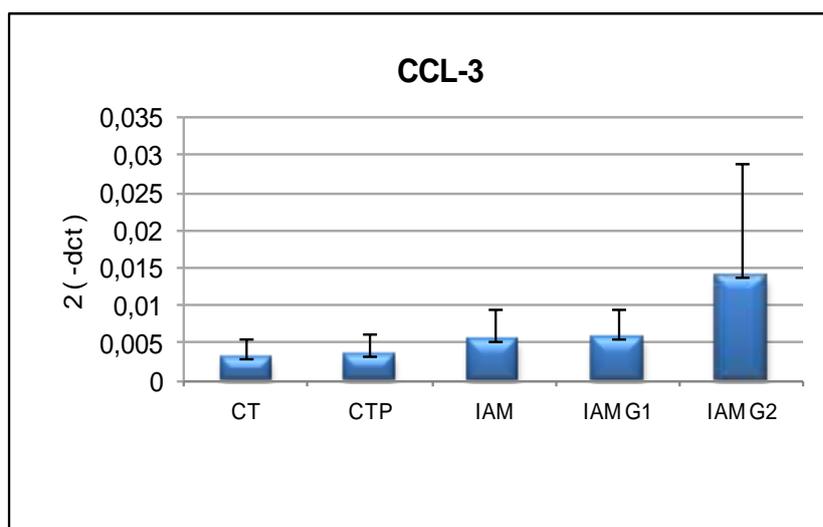


Gráfico 10 - Expressão relativa do gene CCL-3 ($p = 0,15$)

O gene IL-6 também mostrou maior expressão no grupo infartado exposto previamente à poluição (IAM G2), porém essa expressão não atingiu a significância estatística proposta ($p = 0,07$), conforme dados apresentados no gráfico 11.

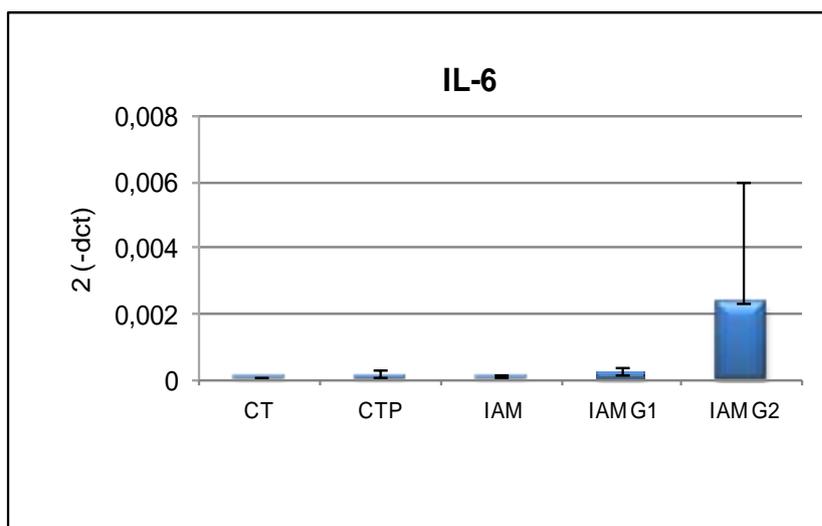


Gráfico 11 - Expressão relativa do gene IL-6 ($p=0,07$)

O gene TGF- β teve maior expressão nos grupos infartados em comparação aos grupos controle ($p \leq 0,04$). A poluição potencializou a expressão desta citocina no grupo exposto previamente à poluição (IAM G2), em comparação ao grupo IAM (sem poluição), apresentando valor de $p = 0,001$ (gráfico 12).

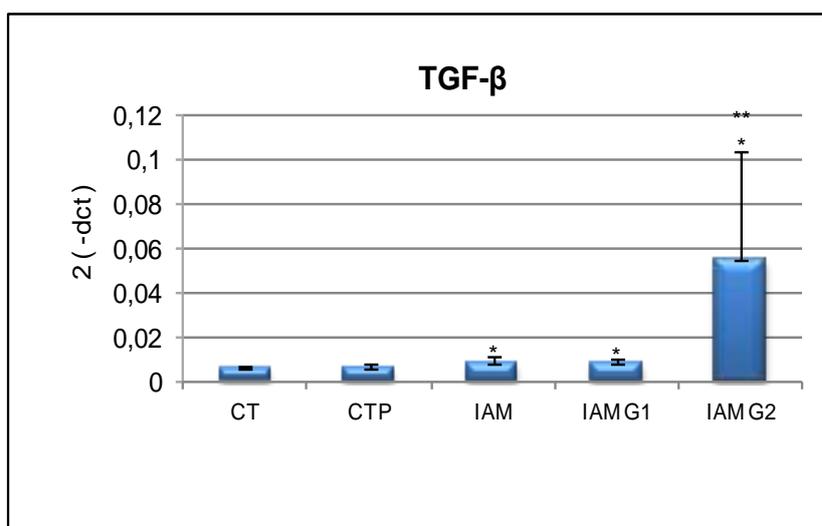


Gráfico 12 - Expressão relativa do gene TGF- β

* $p \leq 0,04$ (CT vs IAM, IAM G1 e IAM G2)

** $p = 0,001$ (CTP vs IAM G2)

O gene TNF- α apresentou-se mais elevado novamente no grupo exposto previamente à poluição (IAM G2), quando comparado com o grupo CTP ($p = 0,012$). Apesar de o gene TNF- α estar mais expresso no grupo IAM G2 em relação ao grupo IAM (sem poluição), isso não foi estatisticamente significativo ($p = 0,155$; gráfico 13).

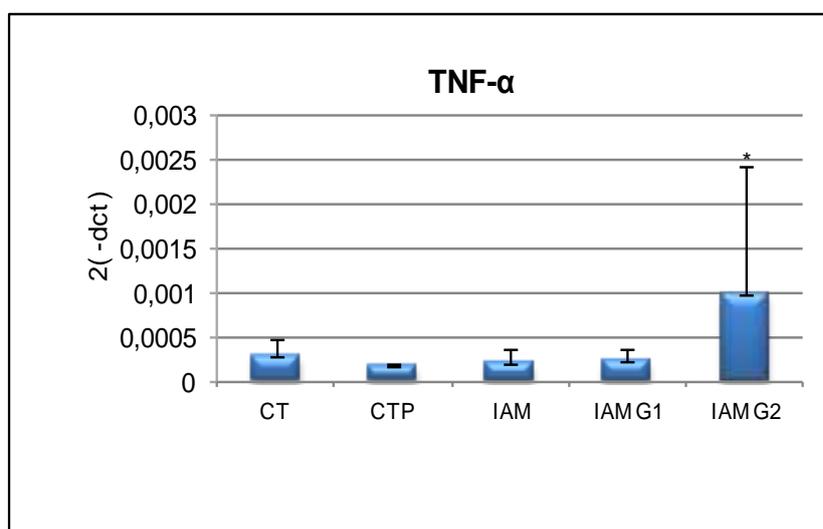


Gráfico 13 - Expressão relativa do gene TNF- α

* $p = 0,012$ (CTP vs IAM G2)

Ao analisarmos a citocina IL-1 β , verificamos que esta apresentou comportamento heterogêneo de expressão para os grupos expostos à poluição (gráfico 14), tanto no infartado quanto no controle, mostrando elevados níveis de expressão. Porém, apenas observamos valores significativos quando comparados o grupo CTP com o grupo IAM ($p = 0,04$) e com o grupo IAM G2 ($p = 0,01$).

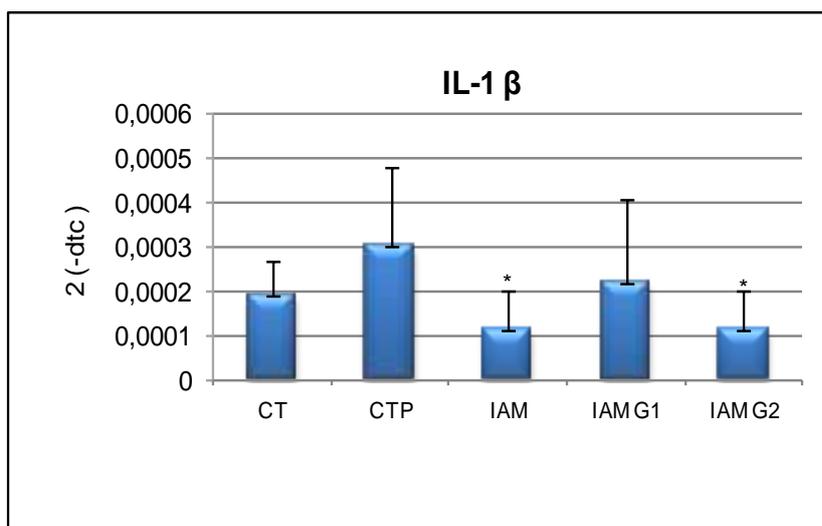


Gráfico 14 - Expressão relativa do gene IL-1 β

* $p \leq 0,04$ (CTP vs IAM e IAM G2)

Ao analisarmos a expressão do gene INF- γ , verificamos, mais uma vez, que houve uma maior expressão desse gene no grupo exposto previamente à poluição (IAM G2), em relação aos outros grupos, incluindo o grupo IAM, sem poluição ($p = 0,01$; gráfico 15).

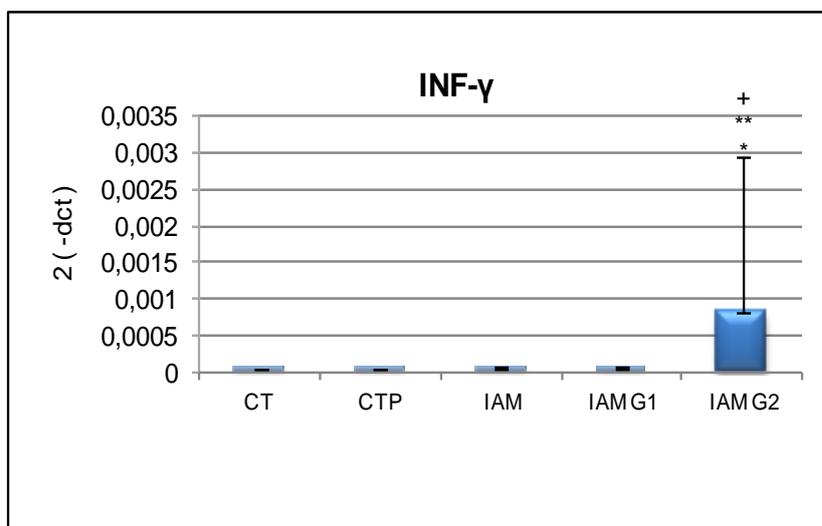


Gráfico 15 - Expressão relativa do gene INF- γ

* $p = 0,007$ (CT vs IAM G2)

** $p = 0,002$ (CTP vs IAM G2)

+ $p \leq 0,01$ (IAM G2 vs IAM e IAM G1)

Os genes CCL-21 e CCR-7 tiveram maior expressão nos grupos infartados, quando comparados com os grupos controle. Assim como nas outras citocinas, os genes CCL-21 e CCR-7 (gráficos 16 e 17) foram mais elevados no grupo IAM G2, quando comparados com os grupos controle, porém esse aumento na expressão nos dois genes não foi estatisticamente significativo ($p = 1,00$). Já o grupo IAM apresentou expressão maior em relação aos grupos controle ($p \leq 0,04$).

Novamente observamos maior expressão desses genes no grupo IAM G2 em comparação com o grupo IAM (sem poluição), mas sem significância estatística ($p = 1,00$).

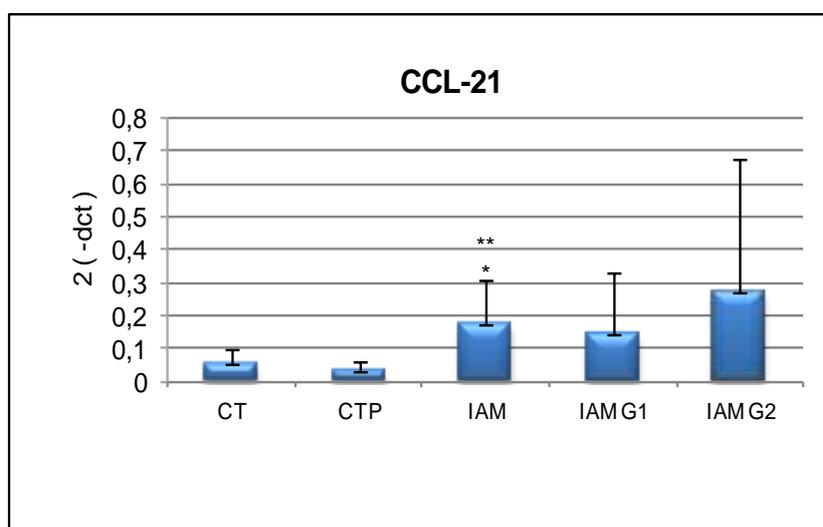


Gráfico 16 - Expressão relativa do gene CCL-21

* $p = 0,04$ (CT vs IAM)

** $p = 0,004$ (CTP vs IAM)

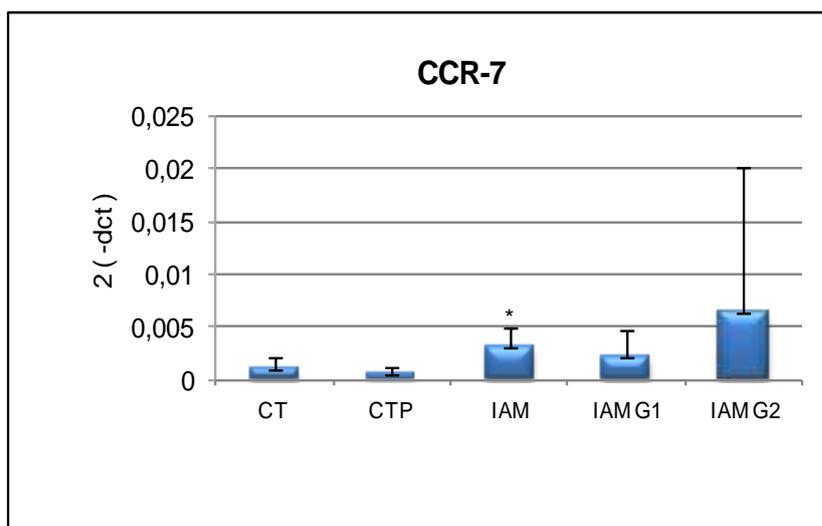


Gráfico 17 - Expressão relativa do gene CCR-7

*p = 0,03 (CTP vs IAM)

5.6. Análise do estresse oxidativo

5.6.1. Glutathiona

No gráfico 18, ilustramos os dados obtidos na mensuração da glutathiona total. Observamos que essa proteína apresentou maior concentração em todos os grupos, quando comparado com o CT ($p \leq 0,03$). Verificamos que o CTP tem maior concentração de glutathiona, quando comparado com o CT ($p = 0,03$), exceto com o grupo IAM G2.

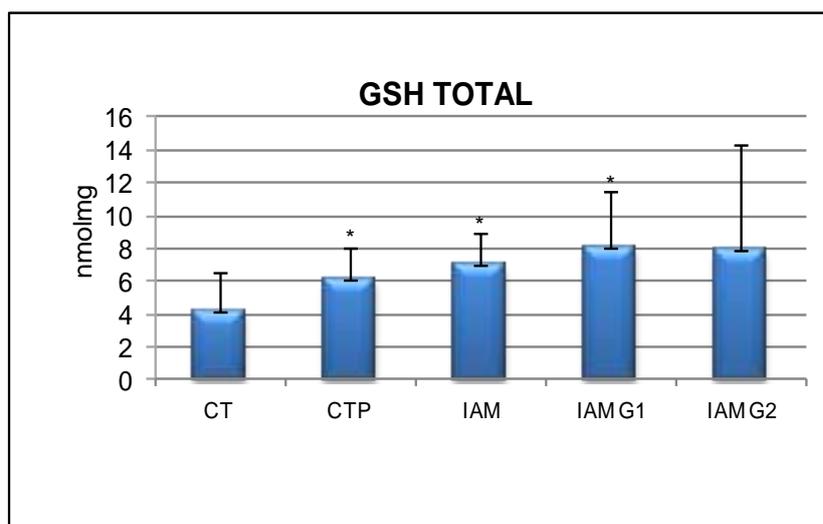


Gráfico 18 - Análise em soro do conteúdo GSH total

* $p \leq 0,03$ (CT vs CTP, IAM e IAM G1)

5.6.2. ADMA

Apesar de a proteína ADMA ser considerada como importante marcador da doença cardiovascular, não encontramos diferenças nas amostras de soro dos grupos (CT = $0,27 \pm 0,10$; CTP = $0,20 \pm 0,05$; IAM = $0,22 \pm 0,05$; IAM G1 = $0,22 \pm 0,05$; e IAM G2 = $0,22 \pm 0,08$), apresentando $p = 0,170$ (gráfico 19).

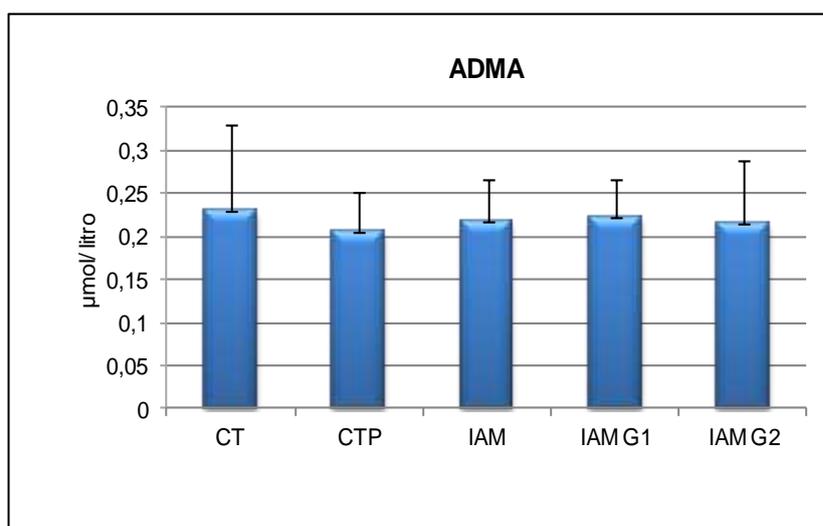


Gráfico 19 - Quantificação da proteína ADMA ($p = 0,170$)

5.7. Limitações da pesquisa

Em algumas variáveis, com nível de significância limítrofe, é provável que o número de animais tenha interferido no resultado.

Estudamos a fase crônica, portanto a parte dos mecanismos (inflamação, apoptose e estresse oxidativo) poderia ser mais exacerbada na fase aguda.

7. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, inúmeros trabalhos epidemiológicos apresentados na literatura evidenciaram os efeitos da poluição atmosférica, principalmente o material particulado fino ($MP_{2.5}$), com o aumento de admissão hospitalar⁵²⁻⁵⁴. Essa exposição à poluição está associada à maior causa de morbidade e mortalidade relacionada a inúmeras doenças, principalmente cardiorrespiratórias. A elevação da poluição, em um curto prazo, ao longo de um período de horas por dia, pode provocar morte cardíaca, infarto do miocárdio e intensificar a insuficiência cardíaca⁵⁴.

O presente trabalho baseou-se na análise do papel da poluição atmosférica no remodelamento do miocárdio. Para tal, produzimos um cenário real de exposição à poluição atmosférica com a dose acumulada equivalente a $600/800 \mu\text{g m}^3$, concentração que representa aquela em que uma pessoa comum pode ficar exposta diariamente em grandes centros urbanos, como a cidade de São Paulo^{11, 55}.

Até o momento, a literatura não apresenta dados acumulados associando diretamente à poluição atmosférica o remodelamento miocárdico, mais especificamente a fibrose, correlacionando esse dano com os seus possíveis mediadores.

Vários são os mecanismos que justificam o estímulo da poluição atmosférica na fibrose miocárdica e que, portanto, são a base da hipótese dessa investigação. A inflamação, o estresse oxidativo e a apoptose figuram entre essas vias promotoras da deposição exacerbada do colágeno no interstício do miocárdio, promovendo o remodelamento estrutural da arquitetura desse músculo^{56, 57}. Essas mesmas vias que promovem a perda celular por

necrose e/ou apoptose em diferentes tecidos modulam a lesão miocárdica causada por diferentes agressões^{19, 23}.

Para este estudo, escolhemos o modelo de infarto agudo do miocárdio, por ser um modelo experimental bem estabelecido na literatura e por desenvolver essa sequência de mecanismos que levam à agressão ao tecido miocárdico³⁵⁻³⁷. Por serem vias comuns àquelas estimuladas pela poluição, esta poderia, portanto, amplificar a resposta, levando ao aumento da fibrose miocárdica.

Neste estudo, pudemos observar o estímulo gerado pela poluição no acúmulo exacerbado de colágeno no interstício miocárdico de corações saudáveis. Dessa forma, vimos que a FVCI foi aproximadamente o dobro no grupo CTP em comparação ao grupo CT, no ventrículo esquerdo. Esse resultado já foi observado no trabalho de Wold *et al.*⁵⁸ (2012) que, entretanto, expuseram os animais, no período de 9 meses, a uma concentração de material particulado muito menor que a utilizada no presente estudo. Lembramos que a concentração utilizada neste trabalho se aproxima muito mais da vida real de um indivíduo que vive em grandes centros urbanos, como a cidade de São Paulo. Também em nosso estudo tivemos a oportunidade de quantificar o acúmulo de colágeno separadamente no ventrículo direito. Essa análise também evidenciou deposição de colágeno maior que o dobro no CTP, em comparação ao grupo CT. Em nossa opinião, essa medida isolada do ventrículo esquerdo do ventrículo direito, diferente do apresentado no trabalho de Wold *et al.*⁵⁸ (2012), é de fundamental importância, vistos os efeitos que a poluição apresenta no território pulmonar, o que poderia influenciar o aumento

da fibrose no território direito. Isso deixa claro, dessa forma, a influência direta da poluição no miocárdio.

Como esperado, o modelo escolhido promoveu intensa fibrose nos ventrículos esquerdo e direito e nas áreas remotas ao infarto, desconsiderando a área infartada. Esses dados já eram esperados, como visto desde os primeiros trabalhos feito por Janice Pfeffer *et al.*³⁶. A cascata de vias ativadas pela agressão miocárdica são, por vezes, coincidentes àquelas ativadas pela poluição em diferentes tecidos. Seria, portanto, de se esperar que, assim como nos corações saudáveis do grupo CTP, a poluição amplificaria a resposta da agressão ao miocárdio pelo infarto. Entretanto, não observamos essa exacerbação do acúmulo do colágeno no interstício do miocárdio estimulada pela poluição nos grupos infartados. Isso ficou claro quando não demonstramos diferenças significativas na análise da FVCI-VE e FVCI-VD entre os grupos infartados e expostos à poluição atmosférica e o grupo infartado que ficou em estante ventilada com filtros de purificação de ar. Também essa não amplificação da poluição na resposta à agressão miocárdica fica evidente na semelhança do tamanho da área de infarto entre todos os grupos infartados, com ou sem exposição à poluição atmosférica. Duas hipóteses podem ser especuladas neste cenário. A primeira é que a cascata de mediadores ativadas pela agressão isquêmica seja muito mais intensa do que aquela estimulada pela poluição, sobrepondo-se ao estímulo desta na resposta da fibrose miocárdica. Outra hipótese seria que o tempo mais prolongado de exposição à poluição poderia, aí sim, intensificar ou perpetuar a ativação das vias de modulação da fibrose. Essa especulação é reforçada quando

observamos a FVCI-VD que, apesar de sem significância estatística, é de aproximadamente 25% maior no grupo IAM G2 (exposto por tempo mais prolongado à poluição) do que o grupo IAM. Do mesmo modo, no trabalho de Wold *et al.*⁵⁸, observamos que, apesar de uma dose muito menor de exposição ao material particulado, o tempo de 9 meses foi o suficiente para causar fibrose miocárdica.

A ativação de mediadores com efeitos endócrinos, autócrinos e parácrinos são bem descritos no desenvolvimento da fibrose miocárdica⁵⁹⁻⁶¹. Esse é o caso do sistema renina-angiotensina-aldosterona, o qual é estimulado pelo sistema simpático. Por sua vez, a ativação simpática tem um estímulo direto da poluição⁵⁸, portanto essa poderia ser outra via que promoveu o aumento da fibrose nos corações saudáveis. Mais uma vez, esses mediadores estão extremamente elevados no miocárdio infartado²⁹. Assim, é possível que o estímulo da poluição seja insuficiente para amplificar a fibrose no interstício do miocárdio.

Um mecanismo que promove a ação direta da poluição no coração é a presença de substâncias metálicas ligadas às partículas que são solúveis em água e, assim, biodisponíveis, passando diretamente para a circulação pulmonar e migrando para o coração, induzindo lesões cardíacas. Outra hipótese afirma que a exposição ao material particulado fino leva à inflamação microvascular, trombose e mudanças endoteliais sistêmicas, resultando uma alteração da contratilidade miocárdica⁶². Uma vez estimulado o miocárdio e vias sistêmicas, uma cascata de eventos é iniciada. Nesse cenário, mediadores inflamatórios representam fator fundamental na lesão miocárdica. Sabemos

que a resposta inata da inflamação representa um mecanismo protetor^{26, 28, 29}. Entretanto, os níveis e a permanência de mediadores inflamatórios no miocárdio promovem a perda da unidade contrátil, tanto por necrose quanto por estímulos à apoptose^{29, 31, 32, 34, 63}. No presente estudo, nós observamos estímulo significativo da poluição nas vias inflamatórias. Esse estímulo ficou ainda mais claro nos animais do grupo IAM G2, que ficaram expostos durante 7 semanas à poluição atmosférica. Tanto a expressão de TGF- β , TNF- α e INF- γ apresentaram significância estatística nesse contexto. Outros marcadores moleculares analisados, como a expressão das citocinas CCL-3, IL-6, CCL-21 e CCR-7, também tiveram níveis mais elevados no grupo IAM G2 (por tempo mais prolongado à poluição), porém, não atingiram valores significantes estatisticamente. É possível que o número de animais ou o tempo de exposição à poluição não tenham sido suficiente para essas análises, visto os valores absolutos em algumas situações serem quase três vezes maiores que os valores dos grupos controle. De qualquer maneira, a ativação inflamatória ficou clara nos resultados desse experimento. Os níveis elevados de TGF- β , TNF- α e de outras citocinas já haviam sido demonstradas em outros trabalhos⁶⁴⁻⁶⁷. Entretanto, o que não ficou claro em outros estudos foi uma relação dessa inflamação com a fibrose, especificamente no miocárdio. Nós pudemos observar que, no grupo com o tempo mais prolongado de exposição à poluição (IAM G2), a média dos níveis de mediadores inflamatórios foi maior, coincidindo com a maior deposição de colágeno no interstício do miocárdio (FCVI-VD). Nesse grupo, mais uma vez se repete de forma coerente o fato de a poluição não exacerbar a resposta inflamatória após a agressão miocárdica

pela isquemia, exceto o INF- γ , que esteve mais elevado no grupo IAM G2 em comparação ao grupo IAM, novamente coincidindo com o padrão de resposta da deposição de colágeno intersticial.

Uma complexa rede de mediadores e sinalizadores promove uma inter-relação de duas vias entre a ativação inflamatória e o estresse oxidativo. Sabemos que citocinas inflamatórias, por diferentes vias, estimulam a liberação de espécies reativas de oxigênio e essas, por sua vez, perpetuam a resposta inflamatória^{23-25, 68, 69}. O dano celular causado pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio ou pela redução de seus antagonistas é bem descrito em várias situações¹⁹. Risom *et al.*²⁴ (2005), Misha *et al.*²⁵ (2012), Kim *et al.*⁶⁹ (2012) e Valavanidis *et al.*⁷⁰ (2013) mostraram o aumento do estresse oxidativo estimulado pela exposição à poluição. A perda de cardiomiócitos promovida pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio no miocárdio, tanto por necrose e/ou por apoptose, também é bastante estudada^{70, 71}. Nossos achados corroboram esses estudos^{69, 70}, quando observamos um acúmulo da glutathione nos soros dos animais estudados expostos à poluição. A glutathione é um composto tiol não proteico (tripeptídeo linear) antioxidante que tem a sua produção aumentada quando estimulada pela poluição atmosférica. Isso ficou comprovado quando observamos valores significativamente maiores no grupo saudável exposto à poluição (CTP), quando comparado ao grupo CT. Ainda no que se refere ao estresse oxidativo, mais uma vez observamos níveis elevados de glutathione nos grupos infartados e expostos à poluição (IAM G1 e IAM G2) em comparação ao grupo IAM, porém sem significância estatística⁷². Considerando a cascata de eventos inflamação mais estresse oxidativo mais

fibrose miocárdica, os dados são alinhados no seu padrão de apresentação. Portanto, a explicação para tal deve ser a mesma, qual seja, o tempo de exposição à poluição atmosférica ou ao número de animais estudados.

Como resultado da ação da inflamação e do estresse oxidativo desencadeados tanto pela injúria isquêmica e/ou pela exposição à poluição, a perda de cardiomiócitos ocorre com consequente reposição por colágeno, levando a uma fibrose reparativa. Essa perda da unidade contrátil do miocárdio ocorre, entre outras causas, por apoptose^{25, 69}. Nossos achados mostram uma elevação da p53, mediador pró-apoptótico, principalmente nos grupos infartados expostos à poluição, mais ainda no grupo IAM G2 (tempo mais prolongado de exposição à poluição), confirmando, assim, o estímulo à apoptose no miocárdio promovido pela exposição à poluição atmosférica. Entretanto, esse estímulo, apesar de maior nos grupos infartados e expostos à poluição, não atingiram significância quando comparados ao grupo infartado (controle). É possível que o mecanismo de perda celular por apoptose na área remota ao infarto também tenha interferido na fibrose reparativa, visto que, na fração de colágeno do VD e na área de infarto, foi maior no grupo infartado (IAM G2), apesar de não ter atingido valores estatisticamente significantes.

Independente do mecanismo causador da perda celular e do remodelamento estrutural do miocárdio, a perda das funções sistólica e diástólica do coração ocorre em diferentes graus, na dependência da extensão do dano celular, do comportamento molecular intracelular e do interstício miocárdio. Como era de se esperar, os grupos infartados tiveram a função sistólica mais comprometida em comparação com os grupos controle. O

comprometimento do interstício miocárdico com o aumento do colágeno nesse compartimento mostrou papel fundamental na alteração da função sistólica ventricular esquerda. Podemos explorar essa afirmativa, visto que as áreas de infarto foram semelhantes em todos os grupos infartados e ainda menor no grupo infartado exposto à poluição (IAM G1). Porém, esse grupo foi o que apresentou maior percentual de área de colágeno no interstício na área remota ao infarto no ventrículo esquerdo e também o que apresentou menor fração de encurtamento entre os grupos, sugerindo que, de fato, a distorção do interstício do miocárdio distante da área infartada se mostra como importante modulador do comprometimento funcional do coração. Vale ressaltar que a poluição, assim como a deposição de colágeno, não promoveu perda maior da função sistólica ventricular nos grupos infartados. Entretanto, assim como a poluição promoveu maior deposição de colágeno do interstício miocárdico nos corações saudáveis, ela também promoveu perda da função sistólica no coração dos animais desse grupo, confirmando, assim, a importância do remodelamento estrutural miocárdico na função cardíaca e o papel da poluição no remodelamento estrutural e funcional.

Analisando os dados encontrados em nosso estudo, podemos concluir que, de fato, a poluição atmosférica tem papel fundamental no remodelamento estrutural do miocárdio, promovendo a perda da função do coração, não amplificando, entretanto, a resposta no coração agredido pela injúria isquêmica. A inflamação, o estresse oxidativo e a apoptose parecem ser vias que participam diretamente nesse processo. E o tempo de exposição à

poluição atmosférica sugere ter papel fundamental no estímulo dessas vias moduladoras da lesão celular.

Logo, este estudo define um outro aspecto do prejuízo da poluição à saúde, mais especificamente, a lesão cardíaca, dados esses que, somados às de outros estudos, demonstram a necessidade imediata do desenvolvimento de medidas políticas para o controle da poluição em nosso meio.

8. CONCLUSÕES

1. A poluição estimulou a deposição de colágeno no interstício miocárdico do VE e do VD em corações saudáveis. Entretanto, ela não amplificou a resposta de fibrose miocárdica no coração agredido pela isquemia produzida no modelo de infarto. Também não promoveu o aumento da área de infarto neste modelo.
2. A poluição promoveu piora da função sistólica no VE em corações saudáveis. Mais uma vez, ela não intensificou a deterioração da função ventricular nos corações infartados.
3. Neste modelo, a poluição não intensificou a piora do remodelamento geométrico ventricular nos corações infartados, conforme observado na avaliação do DSVE.
4. Quanto ao perfil inflamatório, a poluição amplificou essa resposta no grupo exposto a esse agente por tempo mais prolongado (IAM G2).
5. Apesar de a poluição estimular a apoptose nos corações infartados, ela não foi fator determinante nesse cenário.
6. A poluição modulou o estresse oxidativo nos corações saudáveis, mas não amplificou essa resposta nos corações infartados.

9. REFERÊNCIAS

1. Gouveia N, de Freitas CU, Martins LC, Marcilio IO. Respiratory and cardiovascular hospitalizations associated with air pollution in the city of São Paulo, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2006;22:2669-77.
2. Routledge HC, Ayres JG. Air pollution and the heart. *Occup Med (Lond)*. 2005;55:439-47.
3. Hsieh YL, Tsai SS, Yang CY. Fine particulate air pollution and hospital admissions for congestive heart failure: a case-crossover study in Taipei. *Inhal Toxicol*. 2013;25:455-60.
4. Alselme F, Lorient S, Henry JP, Dionnet F, Napoleoni JG, Thuillez C, Morin JP. Inhalation of diluted engine emission impacts heart rate variability and arrhythmia occurrence in rat model of chronic ischemic heart failure. *Arch Toxicol*. 2007;81:299-307.
5. COMANA N. 18, de 6 maio de 1986
<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res1986.html> - acesso 10/02/2014.
6. COMANA N. 6, 28 de junho de 1990
<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res90/res1990.html> - acesso 10/02/2014.
7. Cetesb. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo 2011/ CETESB São Paulo: CETESB, 2012
<http://www.cetesb.sp.gov.br/ar/qualidade-do-ar/31-publicacoes-e-relatorios>.
8. Cetesb. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo 2005
<http://www.cetesb.sp.gov.br/ar/qualidade-do-ar/31-publicacoes-e-relatorios>.
9. Detran. www.detran.sp.gov.br/wps/portal/detran/odetranestatisticasdotransito/5a-frota – acesso 10/02/2014.
10. Proconve. www.mma.gov.br/estruturas/163/arquivos/proconve163.pdf.
11. Belotti L. Efeitos cardiopulmonares da exposição ao material particulado fino (MP_{2,5}) proveniente do concentrador de partículas ambientais (CPA) na hipertrofia ventricular esquerda de ratos Wistar. São Paulo, 2012. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
12. Pope III CA, Verrier RL, Lovett EG, Larson AC, Raizenne ME, Kanner RE, Schwartz J, Villages GM, Gold DR, Dockery DW. Heart rate variability associated with particulate air pollution. *Am Heart J*. 1999;138(5,Pt 1):890-9.

13. Pope III CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston G. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*. 2002;287:1132-41.
14. Pope III CA, Hansen ML, Long RW, Nielsen KR, Eatough NL, Wilson WE, Eatough DJ. Ambient particulate air pollution, heart rate variability, and blood markers of inflammation in a panel of elderly subjects. *Environ Health Perspect*. 2004;112:339-45.
15. Pope III CA, Burnett RT, Krewski D, Jerrett M, Shi Y, Calle EE, Thun MJ. Cardiovascular mortality and exposure to airborne fine particulate matter and cigarette smoke. *Circulation*. 2009;120:941-8.
16. WHO. World Health Organization. Air quality guideline for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. Global update - 2005. WHO, 20p. Acesso em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_SDE_PHE_OEH_06.02_eng.pdf
17. WHO - World Health Organization. European Centre for Environment and Health. Effects of air pollution on children's health and development - a review of the evidence. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, 2005. Acesso em http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0010/74728/E86575.pdf
18. WHO - World Health Organization. Health aspects of air pollution with particulate matter, ozone and nitrogen dioxide. Report on a WHO Working Group, Bonn, Germany, 13-15 January 2003. Acesso em: 10/02/2014
19. EPA - U.S. Environmental Protection Agency <http://www.epa.gov/climatechange/ghgemissions/usinventoryreport.html>. Acesso em 10/02/2014.
20. Lewtas J. Air pollution combustion emission: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutat Res*. 2012;636:95-133.
21. CETESB Operação Inverno-2008 – Qualidade do ar (relatório 2008) <http://www.cetesb.sp.gov.br/ar/qualidade-do-ar/31-publicacoes-e-relatorios>. Acesso em: 10/02/2014
22. Miraglia SG, Saldiva PH, Bohm GM. An evaluation of air pollution health impacts and costs in São Paulo, Brazil. *Environ Manage*. 2005;35:667-76.
23. Valavanidis A, Fiotakis K, Vlachogianni T. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2008;26:339-62.

24. Risom L, Moller P, Loft S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res*. 2005;592:119-37.
25. Mishra P, Samanta L. Oxidative stress and heart failure in altered thyroid states. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:741861.
26. Segura AM, Frazier OH, Buja LM. Fibrosis and heart failure. *Heart Fail Rev*. 2014;19:173-85.
27. Frantz S, Bauersachs J, Ertl G. Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc Res*. 2009;81:474-81.
28. Brook RD. Cardiovascular effects of air pollution. *Clin Sci (Lond)*. 2008;115:175-87.
29. Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res*. 2009;81:482-90.
30. Farah E, Fusco DR, Okumoto PR, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Okoshi K, Zanati SG, Paiva SA, Zornoff LA. Impacto do padrão geométrico ventricular na remodelação cardíaca após o infarto agudo do miocárdio. *Arq Bras Cardiol*. 2013;100:518-23.
31. Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res*. 2002;91:988-98.
32. Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone Trial (VEST). *Circulation*. 2001;103:2055-9.
33. Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation*. 1998;98:149-56.
34. Ahn J, Kim J. Mechanisms and consequences of inflammatory signaling in the myocardium. *Curr Hypertens Rep*. 2012;14:510-6.
35. Hochman JS, Bulkley BH. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study. *Circulation*. 1982;65:1446-50.
36. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circulation*. 1985;71:84-95.
37. Zornoff LAM, Paiva SAR, Minicucci MF, Spadaro J. Remodelação ventricular pós-infarto do miocárdio: conceitos e implicações clínicas. *Arq Bras Cardiol*. 2009;92:157-164.

38. Ying Z, Yue P, Xu X, Zhong M, Sun Q, Mikolaj M, Wang A, Brook RD. Air pollution and cardiac remodeling: a role for RhoA/Rho-kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296:H1540-50.
39. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). In: <http://www.cobea.org.br/index.php>. Acesso em: 10/02/2014
40. Science in the Service of animal Welfare. In: <http://www.ufaw.org.uk/>. Acesso em: 10/02/2014
41. Relatório da CESTESB <http://www.cetesb.sp.gov.br/ar/qualidade-do-ar/31-publicacoes-e-relatorios> 2006. Acesso em: 10/02/2014
42. Camargo Pires-Neto R, Júlia Lichtenfels A, Regina Soares S, Macchione M, Saldiva PHN, Dolhnikoff M. Effects of São Paulo air pollution on the upper airways of mice. *Environ Res*. 2006;101:356-61.
43. Molallem SV, Lobo DJA, Pesquero CR, Assunção JV, André PA De, Saldiva PHN, Dolhnikoff M. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of São Paulo. *Environ Res*. 2005;98:196-202.
44. Lichtenfels AJ, Gomes JB, Pieri PC, El Khouri Miraglia SG, Hallak J, Saldiva PH. Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in São Paulo, Brazil. *Fertil Steril*. 2007;87:230-2.
45. Mauad T, Rivero DHRF, Oliveira RC, Lichtenfels AJFC, Guimarães ET, André PA, Kasahara DI, Bueno HMS, Saldiva PHN. Chronic exposure to ambient levels of urban particles affects mouse lung development. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178:721-8.
46. Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini E G, Ribeiro AACM, Mayhew TM, Saldiva PHN, Dolhnikoff M. Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. *Bio Reprod*. 2008;79:578-84.
47. Koike MK, Frimm CC, Cúri M. Low coronary driving pressure early in the course of myocardial infarction is associated with subendocardial remodeling and left ventricular dysfunction. *Int J Exp Pathol*. 2007;88:279-90.
48. Salemi VM, Bilate AM, Ramires FJ, Picard MH, Gregio DM, Kalil J, Neto EC, Mady C. Reference values from M-mode and Doppler echocardiography for normal Syrian hamsters. *Eur J Echocardiogr*. 2005;6:41-6.
49. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol*. 2002;30:503-12.

50. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods*. 2001;25:402-8.
51. Siegel S, Castellan Jr NJ. Nonparametric statistics for the behavioral science. New York, NY: McGraw-Hill, 2nd ed., 1988.
52. Rappold AG, Cascio WE, Kilaru VJ, Stone SL, Neas LM, Devlin RB, Diaz-Sanchez D. Cardio-respiratory outcomes associated with exposure to wildfire smoke are modified by measures of community health. *Environ Health*. 2012;11:71.
53. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Afonso J, Rodríguez S, Juarez-Prera RA, Arroyo-Ucar E, Gonzalez Y, Abreu-Gonzalez P, Avanzas P. Air pollution and heart failure: relationship with the ejection fraction. *World J Cardiol*. 2013;5:49-53.
54. Tsai SS, Chen PS, Yang YH, Liou SH, Wu TN, Sung FC, Yang CY. Air pollution and hospital admissions for chronic obstructive pulmonary disease: are their potentially sensitive groups? *J Toxicol Environ Health A*. 2012;75:242-51.
55. Castro KR. Efeitos da exposição crônica à poluição urbana sobre a receptividade uterina: estudo morfo-funcional do remodelamento celular endométrio e a expressão de fatores envolvidos na preparação para a implantação embrionária. São Paulo (2013) Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
56. Minicucci MF, Azevedo PS, Martinez PF, Lima AR, Bonomo C, Guizoni DM, Polegato BF, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara BB, Paiva SA, Zornoff LA. Critical infarct size to induce ventricular remodeling, cardiac dysfunction and heart failure in rats. *Int J Cardiol*. 2011;151:242-3.
57. Ardisson LP, Minicucci MF, Azevedo PS, Chiuso-Minicucci F, Matsubara BB, Matsubara LS, Santos PP, Assalin HB, Novo R, Novelli EL, Sant'ana LS, Paiva SA, Zornoff LA. Influence of AIN-93 diet on mortality and cardiac remodeling after myocardial infarction in rats. *Int J Cardiol*. 2012;156:265-9.
58. Wold LE, Ying Z, Hutchinson KR, Velten M, Gorr MW, Velten C, Youtz DJ, Wang A, Lucchesi PA, Sun Q, Rajagopalan S. Cardiovascular remodeling in response to long-term exposure to fine particulate matter air pollution. *Circ Heart Fail*. 2012;5:452-61.
59. Ramires FJA, Sun Y, Weber KT. Myocardial fibrosis associated with aldosterone or angiotensin II administration: attenuation by calcium channel blockade. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30:475-83.

60. Meng W, Zhao W, Zhao T, Liu C, Chen Y, Liu H, Sun Y. Autocrine and paracrine function of angiotensin 1-7 in tissue repair during hypertension. *Am J Hypertens*. 2014 Jan 15. [Epub ahead of print].
61. Weber KT, Sun Y, Díez J. Fibrosis: a living tissue and the infarcted heart. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:2029-31.
62. Kodavanti UP1, Moyer CF, Ledbetter AD, Schladweiler MC, Costa DL, Hauser R, Christiani DC, Nyska A. Inhaled environmental combustion particles cause myocardial injury in the wistar Kyoto rat. *Toxicol Sci*. 2003;71:237-45.
63. Soufen HN, Salemi VMC, Aneas IMS, Ramires FJA, Benício AMD, Benvenuti LA, Krieger JE, Mady C. Collagen content, but not the ratios of collagen type III/I mRNAs, differs among hypertensive, alcoholic, and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Braz J Med Biol Res*. 2008;41:1098-104.
64. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res*. 2004;94:1543-53.
65. Shinde AV, Frangogiannis NG. Fibroblasts in myocardial infarction: A role in inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;pii:S0022-2828(13)00347-7.
66. Totlandsdal AI, Skomedal T, Låg M, Osnes JB, Refsnes M. Pro-inflammatory potential of ultrafine particles in mono- and co-cultures of primary cardiac cells. *Toxicology*. 2008;247:23-32.
67. Xu X, Jiang SY, Wang TY, Bai Y, Zhong M, Wang A, Lippmann M, Chen LC, Rajagopalan S, Sun Q. Inflammatory response to fine particulate air pollution exposure: neutrophil versus monocyte. *Plos One*. 2013;8:e71414.
68. Routledge HC, Ayres JG. Air pollution and the heart. *Occup Med (Lond)*. 2005;55:439-47.
69. Kim JB, Kim C, Choi E, Park S, Park H, Pak HN, Lee MH, Shin DC, Hwang KC, Joung B. Particulate air pollution induces arrhythmia via oxidative stress and calcium calmodulin kinase II activation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;259:66-73.
70. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loidas S. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10:3886-907.

71. Santos CX, Tanaka LY, Wosniak J, Laurindo FR. Mechanisms and Implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: Roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11:2409-27.
72. Azevedo LC, Pedro MA, Souza LC, de Souza HP, Janiszewski M, da Luz PL, Laurindo FR. Oxidative stress as a signaling mechanism of the vascular response to injury: the redox hypothesis of restenosis. *Cardiovasc Res*. 2000;47:436-45.