

A ANÁLISE DA FLUORESCÊNCIA DO SANGUE DE COELHOS SUBMETIDOS À DIETA HIPERCOLESTEROLÊMICA

Mônica Nascimento da Silva¹, Letícia Bonfante Sicchieri², Flávia Rodrigues de Oliveira Silva³, Karina de Oliveira Gonçalves¹, Maira Franco de Andrade², Valéria Pereira Lanzoni⁴ e Lilia Coronato Courrol^{1,2}.

¹Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema, Rua Artur Riedel, 275 Eldorado, 09972-270 - Diadema, SP - Brasil

²Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Centro de Lasers e Aplicações, São Paulo, SP, Brasil.

³Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Centro de Ciências e Tecnologia dos Materiais, São Paulo, SP, Brasil.

⁴Universidade Federal de São Paulo, Campus São Paulo, Rua Botucatu, 740, V. Clementino, São Paulo CEP: 04023-062 SP- Brasil.

e-mail: monicaswitt@gmail.com

Resumo: A aterosclerose é uma doença degenerativa crônica caracterizada pela presença de lesões com aspectos de placas ou ateromas em artérias de médio e grande calibre. É a causa primária de doenças cardiovasculares e infarto, que por sua vez representam a principal causa de morte por doença no mundo. Este estudo busca um potencial marcador de aterosclerose o que pode viabilizar um método diagnóstico minimamente invasivo e de baixo custo. Neste estudo coelhos da raça *New Zeland* foram submetidos à dieta hipercolesterolêmica. Em um primeiro estudo foram realizadas extrações do sangue e das artérias. Foi realizado o perfil metabólico dos coelhos após 20, 40 e 60 dias do início da dieta. As artérias excisadas foram analisadas por microscopia para verificação da instalação do processo aterosclerótico nos coelhos. No segundo experimento realizou-se a coleta de fezes semanalmente. Nosso objetivo foi a verificação das variações da quantidade de PPIX (protoporfirina IX) no sangue e nas fezes com o estadiamento da aterosclerose. Com as fezes obteve-se uma curva de calibração para a determinação da melhor quantidade de massa fecal para o melhor volume de acetona, para a extração da PPIX. O melhor resultado foi obtido com os valores 0,10 g de massa fecal para 400 microlitros de acetona. O estudo da extração da PPIX tanto no sangue e nas fezes mostrou o aumento da emissão de fluorescência da PPIX no grupo da indução hipercolesterolêmica, acompanhando o aumento dos valores de LDL (lipoproteína de baixa densidade). Este estudo identificou um potencial marcador de aterosclerose.

Palavras-chave: protoporfirina IX, biomarcador, aterosclerose, hipercolesterolemia, fluorescência.

Abstract: *Atherosclerosis is a chronic degenerative disease characterized by lesions with plaques in arteries*

of medium and large caliber. It is the primary cause of heart disease and stroke, which in turn are the leading cause of death by disease in the world. This study searches a potential marker of atherosclerosis which may enable a diagnosis minimally invasive and inexpensive method. New Zealand male rabbits were fed with a hypercaloric diet. In a first study the extraction of blood and arteries were performed. The blood was collected to monitor the metabolic profile after 20, 40 and 60 days after starting the diet. The arteries were excised and analyzed microscopy to stage the atherosclerosis processes. In a second experiment the feces were weekly collected. This study was designed to verify variations in the protoporphyrin IX (PPIX) present in the blood and feces with the atherosclerosis staging. With the feces was obtained a calibration curve for determining the optimal amount of fecal mass to volume of acetone better for the extraction of PPIX. The best result was obtained 0.10 g values of fecal mass to 400 microliters of acetone. The study of the PPIX extraction from the blood as in feces showed increased PPIX fluorescence emission in the hypercholesterolemic induction group, with the increase of LDL (low density lipoprotein) This study identified a potential marker for atherosclerosis.

Keywords: protoporphyrin IX biomarkers, arteriosclerosis, hypercholesterolemia, fluorescence.

Introdução

A aterosclerose é uma doença degenerativa crônica que acomete artérias de médio e grande calibre caracterizadas pela presença de lesões com aspectos de placas ou ateromas. Ocorre quando há oclusão das artérias, restringindo o fluxo do sangue para o coração, que sem transporte de oxigênio, resulta no infarto e

óbito do paciente[1]. A primeira descrição do acúmulo de protoporfirina XI ou PPIX em lesões ateroscleróticas foi realizada por Spears et al[2].

A PPIX é um fluoróforo endógeno que faz parte do ciclo da heme, com absorção em torno de 400 a 450 nm e emissão em torno de 630 a 690 nm. Seu espectro de absorção apresenta a banda Soret (região de 400 nm) e as bandas Q (região de 450 e 750 nm), sua emissão ocorre principalmente entre 635 nm e 705 nm[3].

Precursora imediata na biossíntese do heme. Como ocorre em tecidos tumorais, a intensidade de emissão da PPIX aumenta na presença de placa de ateroma[4].

O propósito deste trabalho foi verificar a formação de placa de ateroma nas artérias a partir da indução de uma dieta hipercolesterolêmica: verificar a relação entre o tempo de dietas dos animais e aumento da fluorescência da PPIX no sangue e nas fezes.

Materiais e métodos

Foram utilizados 24 animais sendo todos coelhos brancos e machos da Nova Zelândia da espécie *Oryctolagus Cuniculus*, adultos e pesando cerca de (2,5 ± 0,5) kg e com idade de (3,5 ± 0,5) meses. No grupo controle (GC) os animais receberam ração molhada com clorofórmio e no grupo experimental (GE) os animais receberam ração contendo 1% de colesterol diluído em clorofórmio. A ração hipercolesterolêmica 1% foi obtida a partir da adição de 200 gramas de colesterol (Sigma-Aldrich a 95%) dissolvidos em 800 microlitros de clorofórmio e distribuído em 20 quilogramas de ração comercial Nuvital para coelhos.

No primeiro experimento os grupos foram divididos em GC (grupo controle) com 1 animal e GE (grupo experimental) com 3 animais. A cada vinte dias ocorria eutanásia de 3 animais do grupo GE e 1 animal do grupo GC para a análise das lâminas histológicas e estadiamento do processo aterosclerótico. As artérias dos animais foram cortadas no plano vertical em 10 µm de espessura em um criostato, e então montadas em lâminas de vidros e coradas em Oil Red. As imagens foram obtidas com o microscópio LEICA DNI60000.

No segundo experimento foram estudados 4 animais do grupo controle (GC), 2 animais receberam ração comercial sem clorofórmio e 6 animais receberam ração contendo 1% de colesterol diluído em clorofórmio, o grupo experimental (GE). Neste experimento foram coletadas amostras de sangue a cada 20 dias e fezes após 68, 75, 82 e 89 dias.

Aproximadamente 500 µL de sangue de cada animal foram coletados e a PPIX foi extraída com acetona.

As fezes foram coletadas sempre frescas, sendo a massa fecal de 0,10 g e a quantidade de acetona de 400 µL, conforme curva de calibração realizada. A fluorescência da PPIX extraída das fezes e do sangue foi analisada com o fluorímetro Jobin Yvon Fluorolog 3, a partir da excitação em 400 nm e medidos no intervalo entre 550 e 750 nm. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética pela Unifesp CEP N°0374/12 e CEP N° 03727/11.

Resultados

A figura 1 apresenta as imagens das artérias coradas com Oil Red tanto do grupo experimental (GE) e do controle (GC) de 20 a 60 dias. Na figura 2 observa-se uma correlação entre o aumento da espessura das artérias (obtidas pelas imagens de artérias de 3 animais de cada grupo) e o perfil lipídico no decorrer do experimento. Observa-se que o aumento da espessura das artérias acompanha o aumento das frações totais de colesterol total e lipoproteínas de baixa densidade (LDL).

A figura 3 mostra os espectros de emissão da protoporfirina IX (PPIX) extraída do sangue obtidos para os animais em fase de aclimatação (10 dias antes do início do protocolo de indução de hipercolesterolemia). A figura 4 mostra a evolução da intensidade de emissão da PPIX em função do tempo de dieta, nos grupos 0 a 60 dias.

A evolução da intensidade de emissão da coproporfirina, a porfírina nas fezes em função do tempo da indução de dieta hipercolesterolêmica, pode ser observada na figura 5 para os grupos 68, 75, 82 e 89 dias.

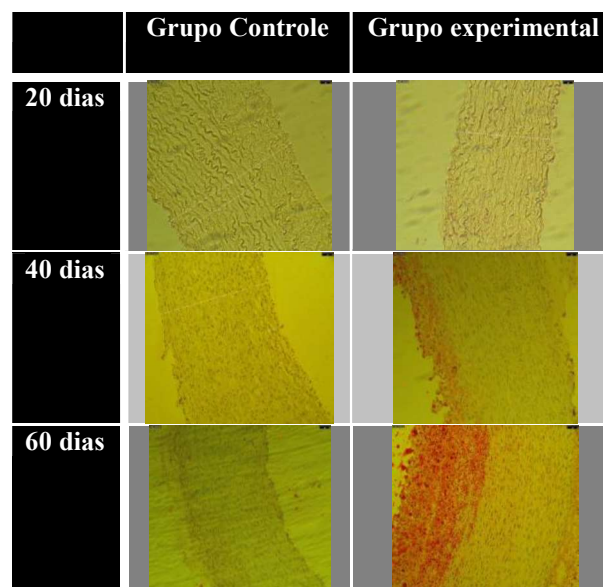


Figura 1: As imagens foram obtidas dos grupos 0 a 60 dias do experimento das aortas (esquerda do grupo controle (GC) e a direita (GE) grupo experimental).

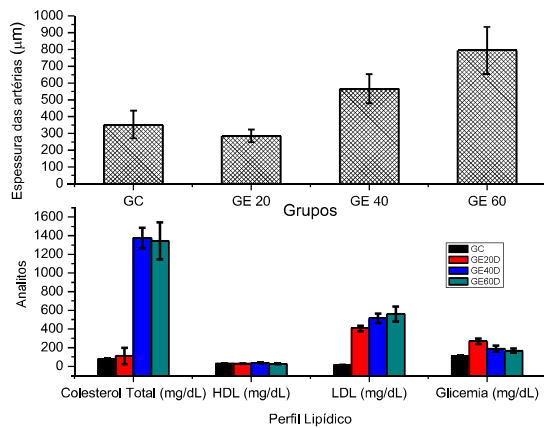


Figura 2: Correlação entre as espessuras das artérias dos animais do grupo controle e experimentais 20, 40 e 60 dias e perfil lipídico dos animais submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica ao longo do tempo de dieta.

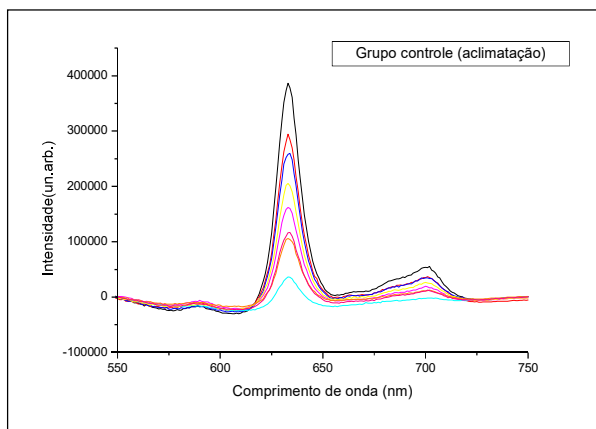


Figura 3: Fluorescência das amostras de PPIX extraídas do sangue total do grupo 0 (aclimação).

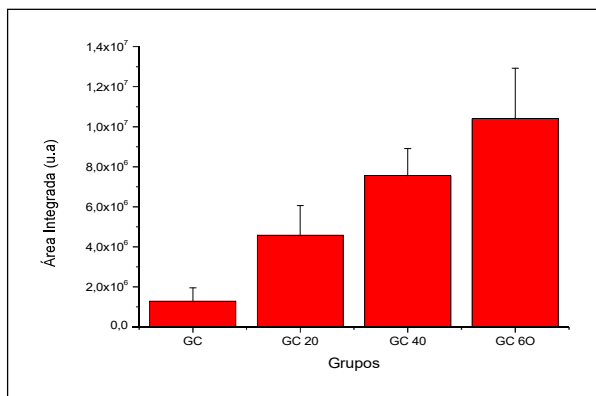


Figura 4: Área do espectro da emissão da PPIX do grupo controle (GC) de 0 a 60 dias.

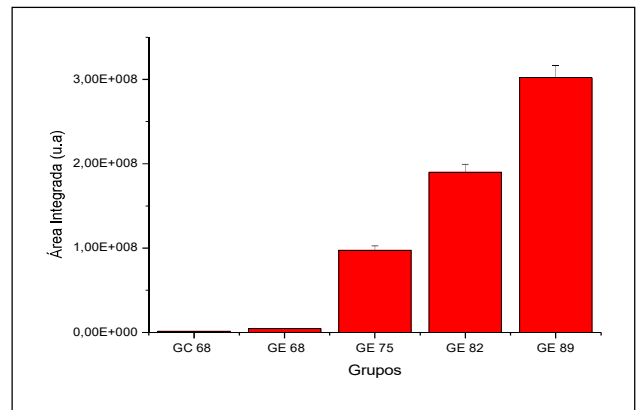


Figura 5: A área integrada da evolução da coproporfirina.

Discussão

A partir de 20 dias após o início da dieta hipercalórica observa-se a formação da placa de ateroma e um aumento da túnica íntima, o que acompanha o aumento das frações de colesterol total e LDL, verificando um quadro de aterosclerose.

Os resultados apresentados mostram que, a intensidade do sinal de emissão da protoporfirina IX no sangue e porfirina nas fezes foi maior no grupo experimental (GE) que no grupo controle (GC) a partir de 20 dias após o início da dieta.

Observa-se através de uma análise quantitativa da espessura das artérias e das frações de LDL, uma correlação positiva com a intensidade de emissão da PPIX no sangue dos grupos estudados.

Conclusão

Verificou-se a partir dos resultados obtidos, um aumento da intensidade de emissão da PPIX no sangue e da coproporfirina nas fezes que acompanha um aumento na espessura das artérias. Este resultado sugere que a PPIX pode ser considerada como um biomarcador da aterosclerose tanto nas fezes como no sangue. Assim, por ser um método barato e com grande potencial para ser oferecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

Agradecimentos

Ao CNPQ pela bolsa concedida, à Unifesp Diadema, ao Centro de Laser (CLA) pelas medidas de fluorescência, ao Biotério e ao CB (Centro de Biotecnologia) do IPEN, pelo uso das suas instalações, em especial as Dras. Nanci do Nascimento, Rosa e Lídia.

Referências

- [1] Pinho RA, Araujo MC, Ghisi GLM, Benetti M. Doença arterial coronariana, exercício físico e estresse oxidativo. Arquivo Brasileiro de Cardiologia .2010; 94(4): 549-555.
- [2] Spears JR, Serur J, Shroshire D, Paulin S.

Fluorescence of Experimental Atheromatous plaques, with Hematoporphyrin Derivate. *Journal of Clinical Investigation*. 1983;71(2):395-399.

[3] Silva FRO. Diagnóstico de Câncer de Próstata baseado nos métodos de caracterização espectroscópica de porfirinas no sangue e de quantificação de Citrato na urina através do complexo Európio- Oxitetraciclina. [dissertação]. São Paulo; Universidade Federal de São Paulo; 2011.

[4] Peng C, Li Y, Liang H, Cheng J, Li Q, Sun X, Li Z, Wang F, Guo Y, Tian Z, Yang L, Tian Y, Zhang Z, Cao W. Detection and photodynamic therapy of inflamed atherosclerotic plaques in the carotid artery of rabbits. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*. 2011; 102(1):26-31.