

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijuí

PRIVAÇÃO DO ESTROGÊNIO ALTERA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE RATAS OBESAS EXPOSTAS AO ROFA¹
ESTROGEN DEPRIVATION CHANGES ANTIOXIDANT DEFENSE OF OBESE RATS EXPOSED TO ROFA

**Jaíne Borges Dos Santos², Lilian Côrrea Costa Beber³, Paula Taís Friske⁴,
Pauline Brendler Goettens Fiorin⁵, Thiago Gomes Heck⁶, Mirna Stela Ludwig⁷**

¹ Pesquisa Institucional desenvolvida no Grupo de Pesquisa em Fisiologia, Departamento de Ciências da Vida - UNIJUI

² Acadêmica de Enfermagem da UNIJUI. Bolsista PIBIC-CNPq. Grupo de Pesquisa em Fisiologia-GPeF.

³ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS)UNIJUI/UNICRUZ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia- GPeF.

⁴ Acadêmica de Nutrição da UNIJUI. Bolsista PIBIC- UNIJUI. Grupo de Pesquisa em Fisiologia-GPeF.

⁵ Docente do Departamento de Ciências da Vida-UNIJUI, Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde-UFCSPA.

⁶ Docente do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS). Departamento de Ciências da Vida (DCVida). Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI). Grupo de Pesquisa em Fisiologia- GPeF.

⁷ Docente do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS). Departamento de Ciências da Vida (DCVida). Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI). Grupo de Pesquisa em Fisiologia- GPeF. Orientadora.

INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença grave, altamente prevalente e está associada ao aumento da morbimortalidade (KUSHNER, 2018). É caracterizada pelo acúmulo de gordura visceral e é importante fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Outro fator de risco para a homeostase metabólica e vascular é a exposição à poluição atmosférica. Dentre os poluentes atmosféricos destaca-se o *Residual Oil Fly-Ash* (ROFA), um tipo de material particulado fino (MP_{2,5}) rico em metais de transição, cuja exposição leva a disfunção endotelial (MARCHINI *et al.*, 2014; MARCHINI *et al.*, 2016).

Nas mulheres, o risco cardiovascular aumenta no climatério, período marcado pela falência ovariana que leva à diminuição da produção de 17 β -estradiol (E2). O E2 é um hormônio antioxidante, anti-inflamatório, cardioprotetor e vasoprotetor e, sua deficiência está associada a disfunções metabólicas e vasculares (MONTEIRO; TEIXEIRA; CALHAU, 2014), envelhecimento

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijuí

vascular acelerado (HILDRETH et al., 2018) e aumento da pressão arterial (LIMA-MENDOZA et al., 2014).

A obesidade, exposição a poluentes e o climatério isolados estão ligados a desordens vasculares associadas ao estresse oxidativo. Esse trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da privação do E2 sobre parâmetros de estresse oxidativo plasmático de ratas obesas expostas cronicamente ao ROFA.

METODOLOGIA

Animais: foram utilizadas 54 ratas Wistar, com 8 semanas de idade, provenientes e mantidas no Biotério da UNIJUI em caixas semi-metabólicas, com temperatura ambiente controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa de 50-60% e ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os animais receberam água e ração *ad libidum*. Detalhamento do experimento: os animais foram inicialmente divididos em quatro grupos: Controle (C) (n=12), Poluição (P) (n=12), Dieta hiperlipídica (D) (n=15) e Dieta hiperlipídica + Poluição (DP) (n=15). Na 12ª semana de experimento, cada grupo teve metade dos seus animais submetidos à cirurgia bilateral para retirada dos ovários (OVX). A outra metade foi submetida à falsa cirurgia (*Sham*), dando origem a oito grupos: C, OVX, P, P-OVX, D, D-OVX, DP e DP-OVX. As demais intervenções foram mantidas por mais 12 semanas. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIJUI (CEUA 076/15). Ração: os grupos C, P, OVX e P-OVX receberam ração padronizada para animais de laboratório (Nuvilab CR-1), com total de energia metabolizável de 16,6 MJ / kg, sendo 11,4% gorduras, 62,8% carboidratos e 25,8% proteínas. Já os grupos D, DP, D-OVX e DP-OVX receberam ração hiperlipídica a base de banha suína, com energia metabolizável total de 22,8 MJ/kg, sendo 58,3 % de gorduras, 24,5% de carboidratos e 17,2% de proteínas. Todos os ingredientes (exceto carboidrato e banha de porco) foram ajustados para estarem presentes na mesma proporção que no grupo controle (BOCK et al., 2015). A ração hiperlipídica foi usada para a indução da obesidade, se confirmando na 24ª semana, onde os animais do grupo D-OVX tiveram o peso corporal total maior do que o C ($P=0,0017$) e do que os grupos P e D ($P=0,0112$). Instilação: os grupos C, OVX, D e D-OVX receberam solução fisiológica (50µL), enquanto P, P-OVX, DP e DP-OVX receberam ROFA (250µg/50µL), por instilação intranasal forçada diariamente com micropipeta automática, utilizando-se do reflexo de apneia (MEDEIROS et al., 2004). Ovariectomia: os grupos OVX, OVX-P, D-OVX e DP-OVX passaram por ovariectomia, que envolveu a remoção bilateral dos ovários. C, P, D e DP foram submetidos à falsa operação onde tiveram seus ovários identificados, expostos cirurgicamente, reposicionados e suturados. Todos passaram por procedimentos pós-cirúrgicos adequados. Coleta do sangue: após a eutanásia, o sangue foi coletado com anticoagulante EDTA e centrifugado por 5 minutos à velocidade de 3000 rpm. O sobrenadante foi coletado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado à temperatura 2-4°C. Dosagem de proteínas: foi determinada pelo método de Bradford (1976), à 578nm. Os resultados foram expressos em mg de proteína/mL. Lipoperoxidação: foi analisada pelo método de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), à 505nm (BUEGE; AUST, 1975). Os resultados foram expressos em mmol MDA/mL de plasma. Atividade da enzima antioxidante Superóxido Dismutase (SOD): foi

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijui

determinada a partir da inibição da autooxidação do pirogalol, a 420nm (MARKLUND; MARKLUND, 1974). Os resultados foram expressos em USOD/mg de proteína. Atividade da enzima antioxidante Catalase (CAT): foi determinada a partir da decomposição de peróxido de hidrogênio, a 240 nm (AEBI, 1984). Os resultados foram expressos em UCAT/mg de proteína. Análise estatística: os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. ANOVA de uma via seguida de pós-teste de *Tukey*, considerando o nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são produtos do metabolismo celular. Em condições inflamatórias de baixo grau ocorre um aumento na produção dessas espécies, por células imunológicas e endoteliais, o que leva ao estresse oxidativo e a disfunção endotelial (FERREIRA TELES *et al.*, 2015), que antecedem o desenvolvimento de várias doenças cardiovasculares (GIMBRONE E GARCIA-CARDENA, 2016).

A produção de ERO a nível endotelial, e pelas células imunológicas, pode levar ao acúmulo de malondialdeído, produto da lipoperoxidação, no plasma. Contudo, no nosso estudo, não se observou diferença na lipoperoxidação plasmática entre os grupos (Figura 1A).

No endotélio a principal ERO produzida é o superóxido (O_2^-) (SAWADA; ARANY, 2017). A SOD é a primeira e mais importante linha do sistema de defesa enzimático. Ela age por um mecanismo de dismutação do O_2^- , produzindo água e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ($2O_2^- + 2H \rightarrow H_2O_2 + O_2$), que tem menor potencial danoso comparado ao O_2^- . Quando analisada a atividade desta enzima, verifica-se maior atividade dela em animais D-OVX e DP-OVX quando comparados ao controle (Figura 1B). O aumento da atividade da SOD possivelmente indica um aumento na produção de O_2^- devido às intervenções, podendo, assim, representar uma tentativa de defesa contra os danos oxidativos causados pelas intervenções (SAWADA; ARANY, 2017).

Outra enzima antioxidante importante é a CAT. Ela promove a conversão do H_2O_2 à água e oxigênio ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$), impedindo a formação do radical hidroxila (OH^\cdot), que é muito prejudicial (MONTEZANO *et al.*, 2015). Normalmente, as enzimas SOD e CAT atuam sequencialmente para uma adequada neutralização das ERO. Neste estudo, entretanto, não se observou diferença na atividade da CAT entre os grupos (Figura 1C), bem como, na razão SOD/CAT (Figura 1D), o que pode sugerir uma fragilidade do pleno funcionamento do sistema de defesa antioxidante nas condições avaliadas.

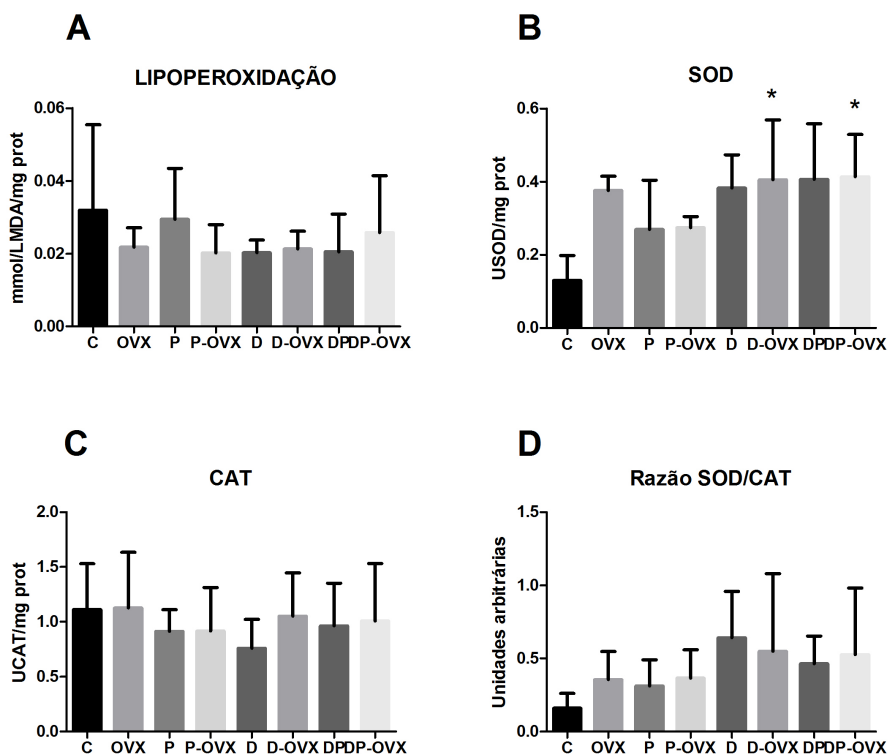
A condição de privação de estrogênio em ratas obesas (tratadas com dieta hiperlipídica), associada ou não à inalação de poluentes atmosféricos, altera os mecanismos de as defesas antioxidantes do organismo.

Figura 1: Avaliação dos efeitos da ovariectomia sobre parâmetros de estresse oxidativo

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijuí

no plasma de ratas Wistar obesas e expostas cronicamente ao ROFA.



A) Lipoperoxidação; B) SOD; C) CAT; D) Razão SOD/CAT. A) $P=0,6049$. B) * $P= 0,0330$ vs C. C) $P=0,8968$. D) $P=0,3437$. Os valores estão expressos em média \pm desvio-padrão. ANOVA de uma via, com pós teste de Tukey.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A privação de estrogênio causa aumento na atividade da SOD em ratas obesas, sugerindo um possível aumento de superóxido no plasma nesta condição, independente da exposição ao ROFA. A ausência de alteração na atividade da CAT pode indicar fragilidade do pleno funcionamento do sistema de defesa antioxidante, apesar de não ter sido detectado dano lipídico por estresse oxidativo no plasma.

Palavras-chave: Ovariectomia; Estrogênio; Estresse Oxidativo; Obesidade.

Keywords: Ovariectomy; Estrogen; Oxidative Stress; Obesity.

REFERÊNCIAS

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

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijui

BOCK DG, Caseys C, Cousens RD, Hahn MA, Heredia SM, Hubner S, et al. What we still don't know about invasion genetics. *Mol. Ecol.* 2015;24:2277-2297.

BUEGE, J.A., AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, v.52, p.302-309. 1978.

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

DE OLIVEIRA, P. A. et al. Unsaturated Fatty Acids Improve Atherosclerosis Markers in Obese and Overweight Non-diabetic Elderly Patients. *Obesity Surgery*, v. 27, n. 10, p. 2663-2671, 2017.

FERREIRA TELES, Y. C. et al. O papel do estresse oxidativo na síndrome metabólica The role of oxidative stress in metabolic syndrome. *J health Sci Inst.*, v. 33, n. 1, p. 89-93, 2015.

GIMBRONE, M. A., JR.; GARCIA-CARDENA, G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*, v. 118, n. 4, p. 620-36, Feb 19 2016. ISSN 1524-4571 (Electronic)0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26892962> >.

HILDRETH, K. L. et al. associated with menopausal symptoms and quality of life. v. 25, n. 9, p. 1-9, 2018.

KUSHNER, R. F. CR. *Progress in Cardiovascular Diseases*, p. 2-32, 2018.

LIMA-MENDOZA, L. A. et al. Vascular damage in obese female rats with hypoestrogenism. *Journal of Physiology and Biochemistry*, v. 70, n. 1, p. 81-91, 2014.

MARCHINI, T. et al. Acute exposure to air pollution particulate matter aggravates experimental myocardial infarction in mice by potentiating cytokine secretion from lung macrophages. *Basic Res Cardiol*, v. 111, n. 4, p. 44, Jul 2016. ISSN 1435-1803 (Electronic) 0300-8428 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27240856> >.

MARCHINI, T. et al. Time course of systemic oxidative stress and inflammatory response induced by an acute exposure to Residual Oil Fly Ash. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 274, n. 2, p. 274-82, Jan 15 2014. ISSN 1096-0333 (Electronic)0041-008X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24321338> >.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide

MEDEIROS, N. et al. Acute pulmonary and hematological effects of two types of particle surrogates are influenced by their elemental composition. *Environmental Research*, v. 95, p. 62-70, 2004.

MONTEIRO, R.; TEIXEIRA, D.; CALHAU, C. Estrogen signaling in metabolic inflammation. *Mediators of inflammation*, v. 2014, p. 615917, jan. 2014.

MONTEZANO, A. C. et al. SC. *Canadian Journal of Cardiology*, 2015. PERRY, J. J. P. et al. *Biochimica et Biophysica Acta The structural biochemistry of the superoxide dismutases. BBA - Proteins and Proteomics*, v. 1804, n. 2, p. 245-262, 2010.

SAWADA, N.; ARANY, Z. Metabolic Regulation of Angiogenesis in Diabetes and Aging. v. 3, p. 290-307, 2017.