

Evento: XXVII Seminário de Iniciação Científica - BOLSISTAS DE GRADUAÇÃO UNIJUI

**EFEITOS DA COMBINAÇÃO ENTRE DIETA HIPERLIPÍDICA E EXPOSIÇÃO
CRÔNICA AO ROFA EM RATAS OVARIETOMIZADAS SOBRE
PARÂMETROS LEUCOCITÁRIOS¹
EFFECTS OF COMBINATION BETWEEN HYPERLIPIDIC DIET AND
CHRONIC EXPOSURE TO ROFA IN OVARIETOMIZED RATS ON
LEUCOCITARY PARAMETERS**

**Paula Taís Friske², Lílian Corrêa Costa-Beber³, Jaíne Borges Dos Santos⁴,
Mirna Stela Ludwig⁵, Thiago Gomes Heck⁶, Pauline Brendler Goettems
Fiorin⁷**

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

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

⁵ Professora 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

⁶ Professor 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 Departamento de Ciências da Vida (DCVida). Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI). Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF. Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - UFCSPA (Orientadora)

INTRODUÇÃO

Em 2018, 90% da população esteve exposta a altos níveis de poluição (OMS), o que torna a poluição uma grave ameaça a saúde. Dentre os diversos tipos de poluentes atmosféricos temos o *Residual Oil Fly-Ash* (ROFA), cujas partículas têm reduzido tamanho aerodinâmico, e podem chegar até os alvéolos pulmonares, atingir a circulação e promover efeitos sistêmicos (GOETTEMS-FIORIN *et al.*, 2016; MAI *et al.*, 2017) dentre estes, a inflamação (LIU *et al.*, 2019). Do mesmo modo, a obesidade também é um fator prejudicial para a homeostase corporal. Em 2016, cerca de 39% da população mundial era obesa, correspondendo a mais de 650 milhões de pessoas (WHO). A obesidade é caracterizada também por uma inflamação crônica, de baixo grau, que pode resultar em alterações em diversos órgãos (LUMENG *et al.*, 2011). Desse modo, a obesidade está relacionada ao aumento da mortalidade e ao maior o risco de desenvolver doenças cardiovasculares e diabetes (ABESO, 2016).

Evento: XXVII Seminário de Iniciação Científica - BOLSISTAS DE GRADUAÇÃO UNIJUI

Além dos riscos já associados aos efeitos da poluição e da obesidade, as mulheres ainda estão sujeitas a um fator de risco natural, que ocorre durante o climatério, por volta dos 40 a 65 anos. O climatério é uma fase que compreende a transição do período reprodutivo para o não reprodutivo da mulher (BRASIL, 2008), e é caracterizado principalmente pelo declínio da produção de estrogênio, devido a falência ovariana (FEBRASGO, 2010). O hipoestrogenismo também pode resultar na inflamação e na alteração das defesas antioxidantes (TALEB-BELKADI *et al.*, 2016). Tanto a exposição a poluição, quanto a obesidade e o hipoestrogenismo estão associados a inflamação. Para avaliar a condição inflamatória, existem diversos biomarcadores que já são utilizados, como a avaliação de parâmetros leucocitários (linfócitos, monócitos e neutrófilos). Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da ovariectomia sobre parâmetros leucocitários de ratas obesas expostas cronicamente ao ROFA.

METODOLOGIA

Animais: utilizamos 36 ratas *Wistar* (8 semanas de idade), provenientes do biotério da UNIJUI, mantidas sob ciclo claro/escuro 12h/12h e em temperatura ambiente de 22±2°C, que receberam água e ração *ad libitum*. Este projeto foi aprovado pelo CEUA da UNIJUI sob o parecer nº 076/2015.

Detalhamento do experimento: os animais foram inicialmente divididos em três grupos, grupo Controle (CTRL), Dieta Hiperlipídica (DHL), Dieta Hiperlipídica + ROFA (DHL+ROFA). O grupo CTRL recebeu dieta comercial padrão para animais de laboratório (NUVILAB®), enquanto os animais dos grupos DHL e DHL+ROFA receberam ração hiperlipídica. O grupo DHL+ROFA recebeu instilação de ROFA, enquanto os demais receberam solução salina 0,9%. Na 12ª semana de estudo, os animais foram submetidos a ovariectomia (OVX) ou a falsa cirurgia (*Sham*), resultando assim em cinco grupos experimentais: CTRL, DHL, DHL+ROFA, DHL+OVX e DHL+ROFA+OVX.

Dieta Hiperlipídica: preparada no Laboratório de Ensaio Biológicos da UNIJUI, conforme ARAÚJO *et al.*, (2007), a qual foi armazenada em refrigerador (2-8°C) e constituindo-se de 58,3% de gordura, e energia metabolizável total 22,8 MJ / kg. Para o preparo da ração foi utilizada ração padrão moída, banha, albumina de ovo, suplemento de aminoácido (Aminomix™), pó de osso e farinha de ostra. A ração padrão consiste de 11,4% de gordura.

ROFA: as partículas do poluente foram ressuspensas em solução fisiológica, na dose de 250 µg. A instilação intranasal foi realizada 5 vezes por semana, sempre no mesmo horário, durante as 24 semanas do estudo. Para realizar a instilação foi utilizada uma micropipeta automática, desprezando 50 µL da suspensão (ou de solução salina 0,9 %) na narina do animal, o que promove o reflexo de apneia seguida de inspiração profunda, e assim o líquido é impulsionado para os pulmões dos animais (MEDEIROS *et al.*, 2004).

Ovariectomia: consistiu da retirada bilateral de ovários, enquanto a falsa cirurgia (*Sham*) consistiu na exposição dos ovários, com posterior reposicionamento e sutura. A cirurgia *Sham* tem como objetivo submeter os animais ao mesmo estresse cirúrgico que os grupos ovariectomizados. Foi utilizado o seguinte protocolo cirúrgico: Medicação pré-anestésica: morfina 5 mg/kg via intraperitoneal (i.p.); Indução da anestesia: isoflurano a 4%; Manutenção da anestesia: isoflurano a 2%; Pós-operatório: meloxicam 0,2% (2 mg/kg) subcutâneo após 24 horas. Todas as cirurgias foram realizadas no Hospital Veterinário da UNIJUI pelo médico veterinário

Evento: XXVII Seminário de Iniciação Científica - BOLSISTAS DE GRADUAÇÃO UNIJUI

responsável.

Coleta de sangue: foi realizada ao final das 24 semanas. O sangue foi acondicionado em tubo anticoagulante (EDTA) para determinar os parâmetros leucocitários (5 μ L de EDTA para cada 500 μ L de sangue). Foi utilizado o analisador hematológico automático Micros 60® (Horiba). As amostras foram diluídas 1:2 com solução salina e analisadas em triplicata. O esfregaço sanguíneo foi realizado em uma lâmina, corada com coloração panótica (Newprov®), e analisado por um profissional, que contou 100 células por amostra. Para obter a razão neutrófilos/linfócitos, o número de neutrófilos foi dividido pelo número de linfócitos.

Análise estatística: após o teste de normalidade, realizamos ANOVA de uma via com pós teste de Tukey para dados paramétricos, e Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn para dados não paramétricos. Utilizamos o programa estatístico GraphPad 5.0, considerando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Investigamos se a privação de estrogênio, induzida pela OVX, poderia causar alterações nos parâmetros leucocitários de animais obesos previamente expostos ao ROFA. O grupo que recebeu dieta hiperlipídica e foi exposto à poluição (DHL+ROFA) apresentou um aumento de monócitos, sem efeitos da ovariectomia (Fig. 1A). Estudos indicam que pessoas expostas ao Material Particulado podem ter a porcentagem de monócitos aumentada (POPE III *et al.*, 2016) e em indivíduos obesos as alterações na distribuição de monócitos são comuns (DE MATOS *et al.*, 2019), sugerindo, portanto, que a associação das duas intervenções possa agravar esta condição, como observado no grupo DHL+ROFA.

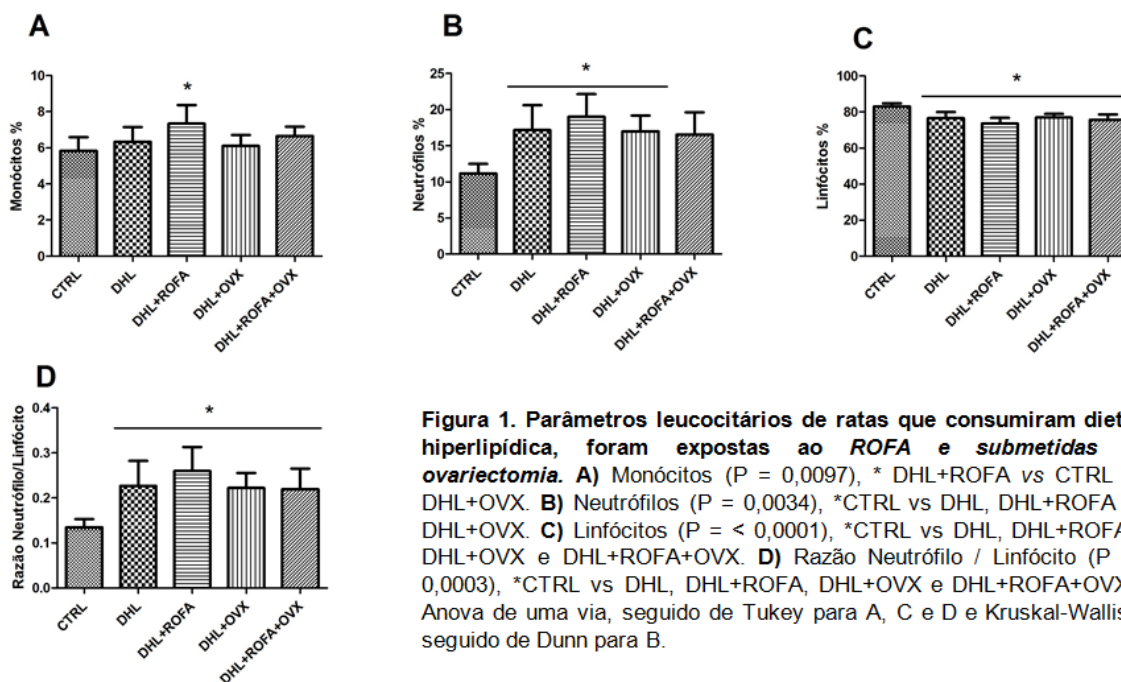


Figura 1. Parâmetros leucocitários de ratas que consumiram dieta hiperlipídica, foram expostas ao ROFA e submetidas à ovariectomia. A) Monócitos ($P = 0,0097$), * DHL+ROFA vs CTRL e DHL+OVX. **B)** Neutrófilos ($P = 0,0034$), *CTRL vs DHL, DHL+ROFA e DHL+OVX. **C)** Linfócitos ($P < 0,0001$), *CTRL vs DHL, DHL+ROFA, DHL+OVX e DHL+ROFA+OVX. **D)** Razão Neutrófilo / Linfócito ($P = 0,0003$), *CTRL vs DHL, DHL+ROFA, DHL+OVX e DHL+ROFA+OVX. Anova de uma via, seguido de Tukey para A, C e D e Kruskal-Wallis, seguido de Dunn para B.

Evento: XXVII Seminário de Iniciação Científica - BOLSISTAS DE GRADUAÇÃO UNIJUI

A porcentagem de neutrófilos foi maior nos grupos DHL, DHL+ROFA e DHL+OVX quando comparado ao CTRL ($P=0,0034$) (Fig. 1B). O estudo de Furuncuoğlu *et al.* (2016) observou uma correlação positiva entre o aumento do IMC e a porcentagem de neutrófilos, o que também foi evidenciado em nosso estudo, onde os grupos obesos tiveram a porcentagem de neutrófilos aumentada em relação ao controle. No entanto, quando associado os três fatores de risco (DHL+ROFA+OVX) este efeito não é observado.

A porcentagem de linfócitos foi menor em todos os grupos que receberam a dieta hiperlipídica (DHL, DHL+OVX, DHL+ROFA, DHL+ROFA+OVX), comparado ao CTRL ($P < 0,0001$) (Fig. 1C). Em estudo realizado com seres humanos a porcentagem de linfócitos também apresentou-se menor (AYDIN *et al.*, 2015). A porcentagem aumentada de neutrófilos e a de linfócitos reduzida pode representar a resposta imune fisiológica frente uma situação de inflamação. Um dos fatores que pode acarretar em inflamação sistêmica é o aumento do tecido adiposo visceral intra-abdominal (FONTANA *et al.*, 2007).

Desta forma, observamos que todos os animais que consumiram dieta hiperlipídica, também apresentaram aumento na razão neutrófilo/linfócito comparado ao grupo CTRL ($P = 0,0003$) (Fig. 1D), indicando efeito do aumento de adiposidade nestes animais. Efeitos semelhantes da obesidade sobre o aumento da razão neutrófilo/linfócito foram observadas no estudo de AYDIN *et al.*, 2015 com seres humanos, onde a razão foi aumentada no grupo obeso em comparação com os controles saudáveis. Sendo razão neutrófilo/linfócito um importante marcador de inflamação sistêmica (AFARI and BHAT, 2016; KHANDARE *et al.*, 2017), podemos destacar que o consumo de dieta hiperlipídica eleva o risco de desenvolver inflamação, sem efeitos associados da exposição ao ROFA e redução dos níveis de estrogênio.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O consumo de dieta hiperlipídica e a exposição ao ROFA alteram parâmetros leucocitários, sem efeitos da redução de estrogênio. Sugere-se que o consumo de dieta hiperlipídica, pode levar ao aumento da adiposidade, e causar uma condição de inflamação sistêmica, conforme evidenciado em nosso estudo pela razão neutrófilo/linfócito.

PALAVRAS-CHAVE: Obesidade; Poluentes Atmosféricos; Neutrófilo; Linfócito.

KEYWORDS: Obesity; Air Pollutants; Neutrophil; Lymphocyte.

REFERÊNCIAS

- AFARI, M. E.; BHAT, T. Neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) and cardiovascular diseases: an update. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 14, n. 5, p. 573-577, 2016.
- ARAÚJO, E. P. et al. Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. **Endocrinology**, v. 148, n. 12, p. 5991-5997, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. Diretrizes brasileiras de obesidade. [s.l: s.n.]. v. 4a ed.
- AYDIN, M. et al. Neutrophil lymphocyte ratio in obese adolescents. **Northern Clinics of Istanbul**, v. 2, n. 2, p. 87-91, 2015.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE

Evento: XXVII Seminário de Iniciação Científica - BOLSISTAS DE GRADUAÇÃO UNIJUI

AÇÕES PROGRAMÁTICAS ESTRATÉGICAS. Manual de Atenção à Mulher no Climatério / Menopausa. [s.l: s.n.].

DE MATOS, M. A. et al. High-intensity interval training reduces monocyte activation in obese adults. **Brain, Behavior, and Immunity**, 2019.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA, F. Manual de Orientação Climatério. [s.l: s.n.].

FONTANA, L. et al. Visceral Fat Adipokine Secretion Is Associated With Systemic Inflammation in Obese Humans. **Diabetes**, v. 56, n. April, p. 1010-1013, 2007.

FURUNCUOĞLU, Y. et al. How obesity affects the neutrophil/lymphocyte and platelet/lymphocyte ratio, systemic immune-inflammatory index and platelet indices: A retrospective study. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1300-1306, 2016.

GOETTEMES-FIORIN, P. B. et al. Fine particulate matter potentiates type 2 diabetes development in high-fat diet-treated mice: stress response and extracellular to intracellular HSP70 ratio analysis. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 72, n. 4, p. 643-656, 2016.

KHANDARE, S. A. S. C. et al. Study of Neutrophil-lymphocyte Ratio as Novel Marker for Diabetic Nephropathy in Type 2 Diabetes. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 21, n. 3, p. 787-392, 2017.

LIU, Q. et al. Ambient particulate air pollution and circulating C-reactive protein level: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, n. May, p. 0-1, 2019.

LUMENG, C. N. et al. Inflammatory links between obesity and metabolic disease Find the latest version : Review series Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **J Clin Invest**, v. 121, n. 6, p. 2111-2117, 2011.

MAI, A. S. et al. Exercise Training under Exposure to Low Levels of Fine Particulate Matter : Effects on Heart Oxidative Stress and Extra-to-Intracellular HSP70 Ratio. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 13, 2017.

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, n. 1, p. 62-70, 2004.

POPE III, C. A. et al. Exposure to Fine Particulate Air Pollution Is Associated with Endothelial Injury and Systemic Inflammation. **Circ Res**, v. 119, p. 1204-1214, 2016.

TALEB-BELKADI, O. et al. Lipid profile, inflammation, and oxidative status in peri- and postmenopausal women. **Gynecological Endocrinology**, n. August, 2016.

WHO. Obesity and overweight. Disponível em: [//www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight). Acesso em 12 de junho de 2019.