

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

**EFEITOS DA COMBINAÇÃO ENTRE DIETA HIPERLIPÍDICA E EXPOSIÇÃO
CRÔNICA AO ROFA NO PERFIL REDOX HEPÁTICO DE RATAS
OVARECTOMIZADAS¹**

**EFFECTS OF HIGH FAT DIET CONSUMPTION AND CHRONIC ROFA
EXPOSURE IN HEPATIC REDOX PROFILE OF OVARECTOMIZED RATS**

**Kauana Souza De Oliveira², Paula Taís Friske³, Lilian Correa Costa
Beber⁴, Thiago Gomes Heck⁵, Mirna Stela Ludwig⁶, Pauline Brendler
Goettems Fiorin⁷**

¹ Pesquisa desenvolvida pelo Grupo de Pesquisa em Fisiologia, Departamento de Ciências da Vida - UNIJUI

² Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas - UNIJUI, Bolsista PIBIC/UNIJUI, Grupo de Pesquisa em Fisiologia/GPeF

³ Acadêmica do Curso de Nutrição - UNIJUI, Bolsista PIBIC/UNIJUI, Grupo de Pesquisa em Fisiologia/GPeF

⁴ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde UNICRUZ/UNIJUI

⁵ Docente do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde UNICRUZ/UNIJUI

⁶ Docente do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde UNICRUZ/UNIJUI

⁷ Orientadora. Docente do Departamento de Ciências da Vida-UNIJUI, Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - UFCSPA

Introdução: O comportamento alimentar tem mudado com o passar do tempo, e, gradualmente, houve um aumento na busca por alimentos ricos em energia. Alimentos como esses são mais acessíveis na indústria alimentar, pela sua praticidade e sua aparência, no entanto, podem contribuir para o aumento da obesidade e doenças relacionadas ao excesso de peso corporal (Da Silveira et al., 2018).

O acúmulo de gordura anormal ou excessiva, caracterizados por sobrepeso e obesidade, podem apresentar um grande risco para a saúde (OMS, 1998). Assim como o elevado consumo de dietas hipercalóricas têm gerado muita discussão e reflexão acerca dos problemas correlacionados, a exposição à poluição atmosférica é outro fator que tem se tornado alvo de estudos, devido ao risco à saúde humana (Da Silveira et al., 2018).

Dentre os poluentes, podemos dar ênfase ao ROFA, Residual Oil Fly Ash, um tipo de material particulado com diâmetro de 2,5 µm, decorrente da queima de combustíveis fósseis e rico em metais pesados, e que por apresentar diâmetro reduzido, é facilmente circula pelo organismo (Ghio et al., 2002).

Estudos experimentais mostram que a poluição atmosférica, juntamente com a obesidade, tem contribuído para o desenvolvimento de inúmeras patologias. As principais vias pelas quais as alterações fisiopatológicas ocorrem são a inflamação e o estresse oxidativo (Goettems-Fiorin et al., 2016).

O gênero feminino, quando afetado por estes fatores, é mais suscetível, principalmente no

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

climatério, período em que ocorre pela falência ovariana e consequente hipoestrogenismo (Kim, 2012). Deste modo, sua diminuição pode levar a disfunções no metabolismo feminino, além de estar associado a um prejuízo nas defesas antioxidantes e no perfil inflamatório (Rettberg et al., 2014).

Deste modo, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da privação de estrogênio, induzido por ovariectomia, em animais submetidos à Dieta Hiperlipídica e à exposição ao poluente atmosférico ROFA quanto aos níveis de lipoperoxidação e atividade de enzimas antioxidantes no fígado.

Metodologia: Animais: Foram utilizadas 36 ratas Wistar com 8 semanas, provenientes do biotério da UNIJUI. Os animais foram mantidos sob condições ideais para animais de laboratório, com ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura $24 \pm 2^\circ\text{C}$, todos os animais receberam água ad libitum. Aprovado no CEUA Nº 076/15.

Delineamento experimental: os animais foram divididos em cinco grupos: Controle (CTRL), Dieta (DHL), Dieta poluição (DHL+ROFA), Dieta ovariectomia (DHL+OVX), Dieta poluição ovariectomia (DHL+ROFA+OVX). Os animais pertencentes ao grupo CTRL receberam ração padrão (Nuvilab CR-1), com 11,4% de gordura. Os animais dos demais grupos receberam dieta hiperlipídica à base de banha de porco, produzida no Laboratório de Ensaios Biológicos (Lebio) da UNIJUI, que consistia em 58,3% de gordura. Os animais receberam diariamente 50µL de solução fisiológica (CTRL, DHL, DHL+OVX) ou 50µL de ROFA (DHL+ROFA e DHL+ROFA+OVX). Na 12ª semana de estudo, metade dos animais de cada grupo que recebeu a DHL foi submetida a ovariectomia (OVX) e a outra metade, mais o grupo CTRL, foi submetida a falsa cirurgia (Sham). Dando sequência a mais 12 semanas de intervenção com os fatores descritos acima (DHL ou ração padrão, e ROFA ou salina), até completar 24 semanas de delineamento experimental.

ROFA: O ROFA foi coletado em filtro de policarbonato na USP, este filtro passou por processo de sonificação para obtenção das partículas, que foram ressuspensas em solução fisiológica (NaCl 0,9%), na dose de 250 µg/50 µL. O processo de instilação intranasal foi realizado com auxílio de micropipeta automática, desprezando 50 µL da suspensão (ou de Salina) na narina do animal, que por reflexo de apneia seguida de inspiração profunda, impulsiona o líquido para os pulmões. O processo de instilação foi realizado 5 vezes por semana, uma vez ao dia, sempre no mesmo turno, durante as 24 semanas de estudo.

Ovariectomia: consistiu da retirada bilateral de ovários. A falsa cirurgia consistiu da exposição dos ovários com consecutivo reposicionamento para posterior sutura.

Coleta do material biológico: ao final das 24 semanas o fígado foi retirado, pesado em balança semi-analítica e congelado em nitrogênio líquido para realização das análises de marcadores de estresse oxidativo.

Análises de TBARS, CAT E SOD: As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (KPi) pH 7,4. A peroxidação lipídica foi mensurada pelo Teste de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) (BUEGE e AUST, 1978). A atividade da catalase (CAT) foi realizada de acordo com Aebi (1984). A análise da atividade da SOD foi realizada pela técnica de inibição da auto-oxidação do pirgalol (MARKLUND e MARKLUND 1974).

Análise estatística: foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) de uma via, com pós teste de Tukey no programa estatístico GraphPad 5.0, e adotamos $p < 0,05$.

Resultados e Discussão: Investigamos se o efeito da privação de estrogênio em animais

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

submetidos à Dieta Hiperlipídica e ao ROFA alteraria os níveis de lipoperoxidação no tecido hepático. Assim, ao analisarmos os dados referentes à 24ª semana de estudo, verificamos que não houve diferença significativa entre os grupos em relação aos níveis de lipoperoxidação (Figura 1).

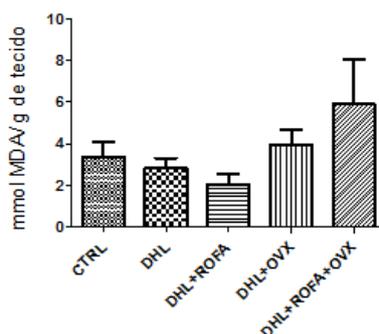


Figura 1. Avaliação da lipoperoxidação de tecido hepático de ratas *Wistar* ovariectomizadas, submetidas à exposição ao ROFA e consumo de DHL. Anova de uma via, seguido de Tukey. $P=0,308$.

Em estudos de Wattanathorn (2019) com ratas ovariectomizadas e recebendo ração hiperlipídica, os níveis de MDA no tecido adiposo de ratas normais e OVX aumentou, a dieta também produziu redução nas atividades de SOD, CAT e no tecido adiposo de ratas normais e OVX. O que sugere que os animais que receberam dieta, poluição e OVX (DHL+ROFA+OVX) apresentam à longo prazo um potencial para desenvolvimento de uma condição de estresse oxidativo. O tecido hepático, não se mostrou responsivo, pois não apresentou diferenças nas enzimas antioxidantes SOD (Figura 2 A) e CAT (Figura 2B).

Em estudo de Goettems-Fiorin (2016), que avaliou a dieta hiperlipídica associada à exposição à poluição atmosférica, os animais apresentaram maior atividade da enzima antioxidante no tecido adiposo branco (CAT e SOD), sendo que este aumento foi de 4,0 vezes na atividade de CAT e de 2,7 vezes na atividade SOD em comparação com os outros grupos do estudo. No fígado, houve uma menor atividade da CAT em comparação ao grupo controle.

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

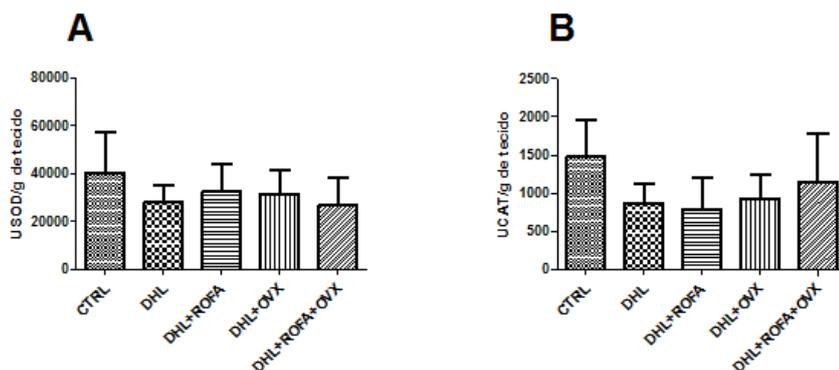


Figura 2. Atividade das enzimas antioxidantes em tecido hepático de ratas *Wistar ovariectomizadas*, submetidas à exposição ao ROFA e consumo de DHL. **A)** Superóxido Dismutase. Anova de uma via, seguido de Tukey. $P=0,476$. **B)** Catalase. Anova de uma via, seguido de Tukey. $P=0,170$.

Conforme estudo de Baldissera et al. (2018), a exposição ao ROFA promove um desequilíbrio em enzimas antioxidantes no plasma, como observado pelo aumento da atividade da SOD, mas sem alteração na atividade da CAT e sua relação foi aumentada. Contrapondo nosso estudo, onde observamos que a relação SOD/CAT não apersentou diferença significativa.

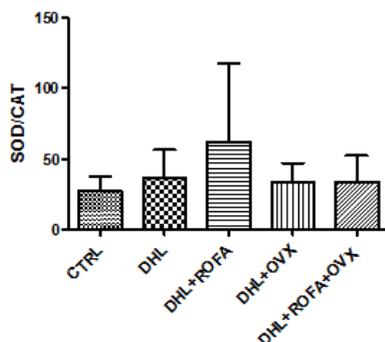


Figura 3. Razão SOD/CAT em tecido hepático de ratas *Wistar ovariectomizadas*, submetidas à exposição ao ROFA e consumo de DHL. Anova de uma via, seguido de teste Tukey. $P=0,743$.

Estudos de Xu (2010) sugerem que alterações no perfil redox, pela indução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em resposta ao consumo de dieta hiperlipídica, reforçada pela exposição ao material particulado fino (MP2.5), promove alterações metabólicas que aumentam a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças crônicas. Músculo, fígado e tecido adiposo parecem ser mais responsivos aos desafios devido à sua boa capacidade antioxidante. Submetido constantemente aos desafios metabólicos, esses tecidos respondem com a defesa antioxidante ainda preservada. Entretanto, ainda são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos celulares que refletem na lipoperoxidação do tecido hepático de ratas que consomem DHL, são expostas à estressores como a poluição, e ainda submetidas à redução dos níveis de estrogênio

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

pela condição de ovariectomia.

Considerações Finais: Este cenário de resposta revela que o tecido tem diferentes padrões de resposta ao estresse oxidativo e diferentes graus de suscetibilidade a danos quando submetidos a estressores e a associação dieta hiperlipídica + ROFA, sendo que o hipoestrogenismo não foi capaz de alterar o perfil redox hepático.

Palavras-chave: ROFA, estrogênio, dieta hiperlipídica, lipoperoxidação, ovariectomia

Keywords: ROFA, estrogen, high fat diet, lipoperoxidation, ovariectomy

Referências:

AEBI, H. Oxygen Radicals in Biological Systems. *Methods in Enzymology*, 1984. v. 105, n. 1947, p. 121-126.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Vigitel Brasil 2011: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico*. Secretaria de Vigilância em Saúde - Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BUEGE, J.A., AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, v.52, p.302-309. 1978. EDWARDS, C. A. Historical overview of vermicomposting. *BioCycle*, 36, 6: 56. 1995.

DA SILVEIRA CG, DI DOMENICO M, HILÁRIO NASCIMENTO SALDIVA P, RAMOS RHODEN C. Subchronic air pollution exposure increases highly palatable food intake, modulates caloric efficiency and induces lipoperoxidation. *Inhal Toxicol.* 30 (9-10):370-380, 2018.

GHIO, A. J. et al. Biologic effects of oil fly ash. *Environmental Health Perspectives*, v. 110, n. SUPPL. 1, p. 89-94, 2002.

GOETTEMES-FIORIN PB, GROCHANKE BS, BALDISSERA FG, DOS SANTOS AB, HOMEM DE BITTENCOURT PI, LUDWIG MS, RHODEN CR, HECK TG (2016). Fine particulate matter potentiates type 2 diabetes development in high-fat diet-treated mice: stress response and extracellular to intracellular HSP70 ratio analysis. *J Physiol Biochem* 72:643-656.

KIM, C. Does menopause increase diabetes risk? Strategies for diabetes prevention in midlife women. *Women's Health*, v. 8, p. 155-167, 2012.

MARKLUND S, MARKLUND G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, v. 47, n. 3, p. 469-470, 1974.

RETTBERG, J. R.; YAO, J.; BRINTON, R. D. Estrogen: A master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. *Front Neuroendocrinol.*, v. 19, n. 1, p. 389-399, 2014

XU X, YAVAR Z, VERDIN M, YING Z, MIHAI G, KAMPFRATH T, WANG A, ZHONGM, LIPPMANNM, CHEN LC et al (2010) Effect of early particulate air pollution exposure on obesity in mice: role of p47phox. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:2518-2527

WATTANATHORN, J.; KAWVISED, S.; THUKHAM-MEE, W. Encapsulated Mulberry Fruit Extract Alleviates Changes in an Animal Model of Menopause with Metabolic Syndrome. *Hindawi. Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. v.2019.