

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

**OVARIECTOMIA COMBINADA À EXPOSIÇÃO CRÔNICA A POLUENTE
REDUZ A ATIVIDADE DE ENZIMA ANTIOXIDANTE E A CONCENTRAÇÃO
DE HSP70 NO TECIDO CARDÍACO DE RATAS¹
OVARECTOMY COMBINED WITH CHRONIC POLLUTANT EXPOSURE
REDUCES ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITY AND HSP70
CONCENTRATION IN RAT HEART TISSUE**

**Jaíne Borges Dos Santos², Lílian Corrêa 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 exposição à poluição atmosférica é um fator de risco para doenças cardiovasculares (COSSELMAN; NAVAS-ACIEN; KAUFMAN, 2015). Dentre os poluentes atmosféricos, destaca-se o *Residual Oil Fly-Ash* (ROFA), um tipo de material particulado fino (MP_{2,5}), cuja exposição leva a alterações subclínicas que desempenham um papel importante na morbidade cardiovascular (KÜNZLI *et al.*, 2005).

Organismos femininos estão sujeitos a um fator de fragilidade natural, a falta de estrogênio. Durante a transição da idade reprodutiva para a não reprodutiva, ocorre diminuição da produção de 17 β -estradiol (E2), causada pela falência ovariana e que caracteriza o climatério. O E2 é um hormônio antioxidante, anti-inflamatório, cardioprotetor e vasoprotetor (MEYER *et al.*, 2014). Nessa fase, devido à redução progressiva dos níveis de E2, ocorre mudança no padrão antropométrico, disfunção metabólica (MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013), predispondo a danos cardíacos (HILDRETH *et al.*, 2018).

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

As doenças cardiovasculares apresentam uma fase subclínica e assintomática, caracterizada por estresse oxidativo (WITMAN *et al.*, 2012). O estado pró-oxidante de um organismo provoca uma resposta de estresse celular, como o aumento dos níveis de proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70). A HSP70 quando localizada no meio intracelular, tem ação de chaperona, é anti-apoptótica e anti-inflamatória (NEWSHOLME; HOMEM DE BITTENCOURT JR, 2014).

Foi recentemente constatado que a ovariectomia (modelo animal para indução de hipoestrogenismo) predispõe o organismo aos efeitos da exposição ao ROFA, através da redução da atividade antioxidante e da expressão hepática de HSP70 (GOETTEMS-FIORIN *et al.*, 2019). No entanto, seus efeitos sobre o tecido cardíaco ainda não são conhecidos. Portanto, o presente trabalho visou avaliar se a ovariectomia piora parâmetros de estresse oxidativo e a concentração cardíaca de HSP70 em ratas expostas cronicamente ao ROFA.

METODOLOGIA

Animais: foram utilizadas 24 ratas Wistar (8 semanas de idade), provenientes e mantidas no Biotério da UNIJUI em caixas, 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 padrão (Nuvilab CR-1) *ad libidum*.

Detalhamento experimental: os animais foram inicialmente divididos em dois grupos: Controle (C) (n=12) e Poluição (P) (n=12). O grupo P recebeu ROFA (250 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$), por instilação intranasal, cinco vezes por semana, enquanto o grupo C recebeu o mesmo volume de solução fisiológica, utilizando-se do reflexo de apneia (MEDEIROS *et al.*, 2004) por 12 semanas. Na 12ª semana de experimento, cada grupo teve metade dos seus animais submetidos à ovariectomia bilateral (OVX), e a outra metade à falsa cirurgia (*Sham*), dando origem a quatro grupos (n = 6 p/grupo): C, OVX, P e P-OVX. Todos passaram por procedimentos pós-cirúrgicos adequados (GOETTEMS-FIORIN *et al.*, 2019). As demais intervenções foram mantidas por mais 12 semanas (CEUA nº 076/15).

Coleta e preparo do material biológico: os animais foram eutanasiados na 24ª semana. O coração foi coletado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -20°C . As amostras foram homogeneizadas em tampão SDS 0,1%.

Dosagem de proteínas: determinada pelo método de Bradford (1976), à 578 nm. Os dados foram utilizados para o preparo das amostras e realização do *Western Blot*.

Expressão de HSP70: *Western Blot* (LAEMMLI, 1970). Primeiro anticorpo monoclonal anti-HSP70 (Sigma-Aldrich H5147, 1:1000), e o segundo anti-IgG de rato marcado por peroxidase (Sigma-Aldrich A9044, 1:15000). Revelação da β -actina: anticorpo anti- β -actina (Sigma-Aldrich A3854, 1:50000). Imagens quantificadas com o programa Image J. Resultados expressos em unidades arbitrárias de HSP70/ β -actina.

Lipoperoxidação: analisada pelo método de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), à 505 nm (BUEGE; AUST, 1975). Resultados expressos em mmol MDA/g de tecido.

Atividade da Superóxido Dismutase (SOD): determinada a partir da inibição da autooxidação do pirogalol, à 420 nm (MARKLUND; MARKLUND, 1974). Resultados foram expressos em USOD/g de tecido.

Atividade da Catalase: determinada a partir da decomposição de peróxido de hidrogênio, a 240 nm (AEBI, 1984). Resultados foram expressos em UCAT/g de tecido.

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

Análise estatística: dados expressos como média \pm desvio padrão. ANOVA de uma via seguida de *Tukey*, $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O grupo P-OVX apresentou menor atividade da catalase comparado ao grupo OVX, que por sua vez, teve maior atividade desta enzima comparado ao grupo Controle ($P=0,035$) (Figura 1-B). Os resultados indicam que a ovariectomia (OVX) aumenta a atividade da enzima antioxidante catalase no tecido cardíaco, porém, quando a OVX é associada à exposição ao ROFA, a atividade da referida enzima diminui. Não houve alteração na atividade da enzima antioxidante SOD ($P= 0,397$) (Figura 1-A) e no nível de lipoperoxidação ($P=0,686$) (Figura 1-C).

Embora não tenha ocorrido alteração na lipoperoxidação, a redução dos níveis de estrogênio aliada a exposição a poluentes, pode representar um fator de risco para a homeostase redox cardíaca, considerando a redução da defesa enzimática antioxidante em animais ovariectomizados previamente expostos ao poluente atmosférico ROFA.

O potencial danoso do ROFA é atribuído a sua composição rica em metais de transição. Metais de transição, no meio intracelular, participam de reações de Fenton e Haber-Weiss, através das quais convertem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ao radical hidroxila (OH^\cdot), um radical livre bastante reativo e lesivo (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Conseqüentemente, causam estresse oxidativo, danos celulares e à saúde dos indivíduos (LAKEY *et al.*, 2016), o que pode justificar o resultado encontrado neste estudo.

Em resposta à perda da homeostase redox, normalmente as células aumentam a expressão de HSP70 (GRUNWALD *et al.*, 2014). No nosso estudo, observamos que o grupo P-OVX apresentou menor concentração cardíaca de HSP70 comparado ao grupo P ($P=0,036$) (Figura 1-D). Este resultado mostra que a ovariectomia reduz a capacidade de resposta ao estresse, avaliado pela concentração de HSP70 cardíaca, em animais expostos ao poluente ROFA. Isto sugere que a exposição ao poluente ROFA pode ser um fator de risco adicional à manutenção da saúde cardíaca em organismos com deficiência de estrogênio, o que pode estar associado a perda do efeito protetor deste hormônio, pois, sabe-se que ele apresenta propriedades cardioprotetoras quanto a defesa antioxidante (MEYER *et al.*, 2014) e na resposta ao estresse por estimular a expressão de HSP72 em cardiomiócitos (HAMILTON; GUPTA; KNOWLTON, 2004).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ovariectomia associada à exposição prévia e crônica à poluente atmosférico reduz a defesa antioxidante e a capacidade de resposta ao estresse em animais, com possíveis efeitos negativos sobre a saúde cardíaca.

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

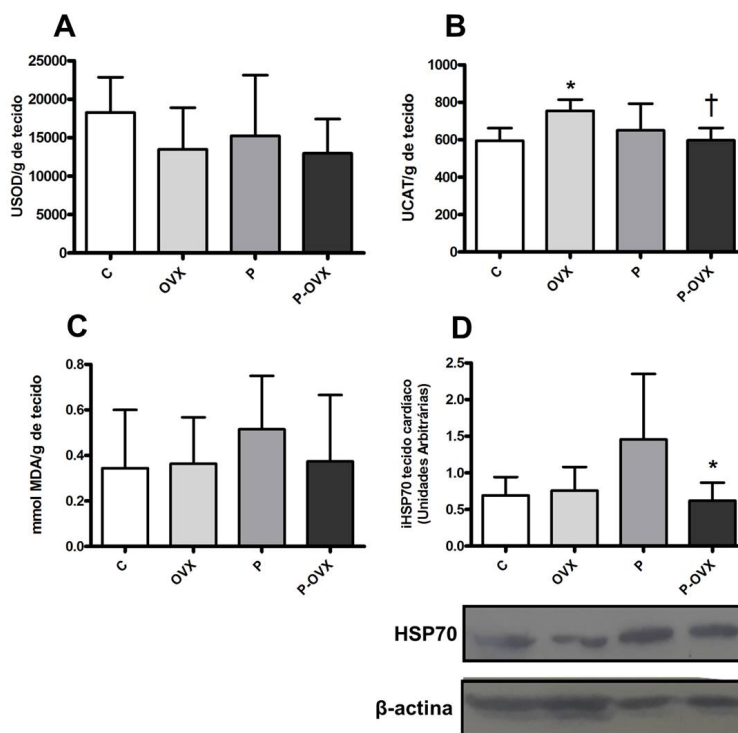


Figura 1: Avaliação dos efeitos da ovariectomia sobre parâmetros de estresse oxidativo e concentração de iHSP70 no tecido cardíaco de ratas Wistar expostas ao ROFA. A) SOD; B) Catalase; C) Lipoperoxidação; D) Concentração de HSP70. A) $P=0,397$. B) $P=0,035$ * vs C e † vs OVX. C) $P=0,686$. D) $P=0,036$ * vs P. ANOVA de uma via, com pós teste de Tukey. Os valores estão expressos em média \pm desvio-padrão (n = 6 p/grupo).

Palavras-chave: Ovariectomia; Poluentes Atmosféricos; Estresse Oxidativo; Proteínas de Choque Térmico.

Keywords: Ovariectomy; Air Pollutants; Oxidative Stress; Heat-Shock Proteins.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v.105, p.121, 1984.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-10, 1978.
- COSELMAN, K. E.; NAVAS-ACIEN, A.; KAUFMAN, J. D. Environmental factors in cardiovascular disease. **Nat. Rev. Cardiol**, v. 12, n. 4, p. 627-642, 2015.
- GRUNWALD, M. S. *et al.* The oxidation of HSP70 is associated with functional impairment and lack of stimulatory capacity. **Cell Stress and Chaperones**, v. 19, n. 6, p. 913-925, 2014.
- POLIDORI, M. *et al.* Increased F2 isoprostane plasma levels in patients with congestive heart failure are correlated with antioxidant status and disease severity. **Journal of Cardiac Failure**, v. 10, n. 4, p. 334-338, 2004.
- GOETTEMES-FIORIN, P. B. *et al.* Ovariectomy predisposes female rats to fine particulate matter

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

exposure ' s effects by altering metabolic , oxidative , pro-inflammatory , and heat-shock protein levels. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-14, 2019.

HAMILTON, K. L .; GUPTA, S .; KNOWLTON, A. A. Estrogênio e regulação da expressão de proteínas de choque térmico em cardiomiócitos femininos: cross-talk com sinalização NFkB. **Jornal de cardiologia molecular e celular**, v. 36, n. 4, p. 577-584, 2004.

HILDRETH, K. L. *et al.* Vascular dysfunction across the stages of the menopausal transition is associated with menopausal symptoms and quality of life. **Menopause**, v. 25, n. 9, p. 1-9, 2018.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins patologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

KÜNZLI, N. *et al.* Ambient air pollution and atherosclerosis in Los Angeles. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 2, p. 201-206, 2005.

LAEMMLI, U. K., Molbert, E., Showe, M., and Kellenberger, E., J. **Mol. Biol.**, v. 49, n.99, 1970.

LAKEY, P. S. J. *et al.* Chemical exposure-response relationship between air pollutants and reactive oxygen species in the human respiratory tract. **Nature Publishing Group**, p. 1-6, 2016.

LATCHMAN, D. S. Heat shock proteins and cardiac protection. **Cardiovascular Research**, v. 2-3, p. 1141-1152, 2004.

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. 1-13, 2017.

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. 474, p. 469-474, 1974.

MAUVAIS-JARVIS, F.; CLEGG, D. J.; HEVENER, A. L. The Role of Estrogens in Control of Energy Balance and Glucose Homeostasis. **Endocr Rev**, v. 34, p. 309-338, 2013.

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.

MEYER, M. R. *et al.* G protein-coupled estrogen receptor protects from atherosclerosis. **Scientific Reports**, v. 4, 2014.

NEWSHOLME, P.; HOMEM DE BITTENCOURT JR, P. I. The fat cell senescence hypothesis : a mechanism responsible for abrogating the resolution of inflammation in chronic disease. **Clinical nutrition**, v. 17, n. 4, p. 295-305, 2014.

PERSKY, A. M. *et al.* Protective Effect of Estrogens Against Oxidative Damage to Heart and Skeletal Muscle. **Estrogen and muscle damage**, v. 223, n. 44463, p. 59-66, 2000.

WITMAN, M. A. H. *et al.* A differing role of oxidative stress in the regulation of central and peripheral hemodynamics during exercise in heart failure. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 303, n. 10, p. H1237-H1244, 2012.