

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: XXVI Seminário de Iniciação Científica

**EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ROFA ASSOCIADA AO HIPOESTROGENISMO
ELEVA COLESTEROL TOTAL E LDL DE RATAS¹
CHRONIC EXPOSURE TO ROFA ASSOCIATED WITH HYPOESTROGENISM
INCREASES TOTAL AND LDL CHOLESTEROL OF RATS**

**Lílian Corrêa Costa Beber², Pauline Brendler Goettems Fiorin³, Jaíne
Borges Dos Santos⁴, Paula Taís Friske⁵, Thiago Gomes Heck⁶, Mirna Stela
Ludwig⁷**

¹ Pesquisa realizada como parte do projeto de Mestrado.

² Aluna do curso de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde da UNIJUI, bolsista PROSUP-CAPES, liliantutty@hotmail.com.

³ Professora doutoranda do Departamento de Ciências da Vida (DCVida), pauline_goettems@yahoo.com.br.

⁴ Aluna do curso de Enfermagem, bolsista PIBIC-CNPq, jaine-borges02@hotmail.com.

⁵ Aluna do curso de Nutrição, bolsista PIBIC-UNIJUI, paula-friske@hotmail.com

⁶ Professor doutor do DCVida, gomesheck@yahoo.com.

⁷ Professora doutora do DCVida (orientadora), ludwig@unijui.edu.br.

INTRODUÇÃO

Desequilíbrios no perfil lipídico e redox estão intimamente envolvidos na fisiopatologia da aterosclerose (Manninen *et al.*, 1992; Li *et al.*, 2014; Amrita *et al.*, 2016). Elevadas concentrações de LDL favorecem a formação de LDL oxidada, altamente aterogênica (Li *et al.*, 2014). Baixas concentrações de HDL também são fatores de risco para tal (Manninen *et al.*, 1992), uma vez que deficiências no transporte reverso do LDL para o fígado aumentam a exposição destas moléculas a espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidos a nível vascular.

São inúmeros os fatores que interferem no metabolismo lipídico, entre eles, o climatério, que acomete mulheres acima de 40 anos. O climatério é caracterizado pela falência ovariana e consequente queda na produção de 17 β - estradiol (E2), condição conhecida como hipoestrogenismo, que está relacionado ao aumento do peso corporal e adiposidade (Lima-Mendoza *et al.*, 2014). A hipertrofia do tecido adiposo o torna mais susceptível a lipólise, o que eleva a concentração de ácidos graxos circulantes (Bendale *et al.*, 2013). Consequentemente, o hipoestrogenismo está relacionado a desequilíbrios no perfil lipídico e a elevada incidência de doenças vasculares (Petisco *et al.*, 2017).

Esse estágio na vida da mulher é de suma importância devido à perda da proteção antioxidante, anti-inflamatória e vasoprotetora conferida pelo E2. Além disso, o hipoestrogenismo está presente durante um terço da vida das mulheres da América Latina, visto que a expectativa de vida da população feminina latino-americana é de 73,6 anos, e a idade da menopausa é em média 48,7

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: XXVI Seminário de Iniciação Científica

anos (Sohenacker, 2014).

A exposição a poluentes concomitantemente a outros fatores de risco podem aumentar a susceptibilidade aos efeitos da privação de estrogênio sobre o perfil lipídico. Nesse contexto, ressalta-se o crescente número de admissões hospitalares emergenciais e a taxa de mortalidade anual devido a exposição a poluentes atmosféricos (Kheirbek *et al.*, 2016). Um tipo de poluente é o *Residual Oil Fly Ash* (ROFA), composto por partículas com diâmetro inferior a 2,5 μm ricas em metais de transição (Ghio *et al.*, 2002). Sabe-se que a exposição ao ROFA agrava problemas cardiovasculares em razão do aumento da produção de ERO, citocinas inflamatórias e o dos níveis de LDL (Chen *et al.*, 2013; Haberzettl *et al.*, 2016).

Os efeitos isolados da exposição crônica a poluentes atmosféricos e da privação de E2 sobre o perfil lipídico já são conhecidos. No entanto, ainda não há estudos sobre os efeitos da combinação destes dois fatores sobre o perfil lipídico. Portanto, nesse trabalho buscamos avaliar os efeitos da associação da exposição crônica ao ROFA e da privação de estrogênio sobre o perfil lipídico de ratas.

METODOLOGIA:

Animais: foram utilizados 24 ratas Wistar (8 semanas de idade). Os animais foram mantidos durante todo o período experimental no Biotério da UNIJUI em caixas semimetabólicas, 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 a vontade (*ad libitum*).

Delineamento experimental: os animais foram distribuídos inicialmente em dois grupos: Controle (C, $n=12$) e Poluição (P, $n=12$), tratados com ração padrão (Nuvilab CR-1) por 12 semanas. O grupo C recebeu instilação diária de 50 μL de solução fisiológica, enquanto que o grupo P recebeu ROFA (250 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$). Na 12ª semana de experimento, 50% dos animais de cada grupo foram submetidos à cirurgia bilateral para retirada dos ovários (OVX, $n=6$), e os outros 50%, submetidos à falsa cirurgia (*Sham*, $n=6$), originando quatro grupos ($n=6$ cada): Controle (C), Ovariectomia (OVX), Poluição (P), Poluição + Ovariectomia (P+OVX). A exposição ao ROFA foi mantida durante as 12 semanas seguintes. Na 24ª semana de experimento, foi coletado sangue para obtenção de soro, destinado as análises do perfil lipídico. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Unijuí (CEUA 076/15).

Perfil lipídico: colesterol Total (CT), HDL (c-HDL) e triglicerídeos (TG) foram dosados por método enzimático-colorimétrico (Sposito, 1997), através de kits da Bioclin - Quibasa por automação BS200- Mindray. O LDL (c-LDL) foi calculado pela fórmula de Friedewald ($\text{c-LDL-C} = \text{CT} - \text{c-HDL} - \text{TG}/5$), na qual TG/5 representa o colesterol ligado à VLDL-C.

Análise estatística: dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. ANOVA (*post-hoc* Tukey), $P < 0,05$.

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: XXVI Seminário de Iniciação Científica

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Nesse estudo, verificamos que a associação da exposição crônica ao ROFA e da redução nos níveis de estrogênio causou um aumento nos níveis de colesterol total e de colesterol LDL. Encontramos aumento na concentração de colesterol total no grupo de animais ovariectomizados e expostos ao poluente (P-OVX) comparado aos grupos controle (C) e poluído (P) (Figura 1A), e de LDL, comparado somente ao grupo poluído (P) (Figura 1C). Estes resultados reforçam a hipótese de que a combinação da exposição a poluição e hipoestrogenismo pode comprometer o metabolismo de animais fragilizados por cada um dos fatores isoladamente.

A exposição crônica a poluição pode elevar a concentração de colesterol total e de LDL (Chen *et al.*, 2013). Nesse estudo, porém, não observamos diferenças no perfil lipídico em razão da exposição ao ROFA isoladamente. Essa discrepância de resultados pode ser devido ao modelo animal utilizado, uma vez que Chen *et al.* (2013) utilizaram animais 'nocaute' para a apoenzima E, ou seja, já suscetíveis a dislipidemia e ao desenvolvimento de placas ateroscleróticas.

O hipoestrogenismo também foi responsável pelo aumento do colesterol total e LDL em muitos estudos (Lima-Mendoza *et al.*, 2014; Matthews *et al.*, 2017). Não observamos diferenças devido a ovariectomia isoladamente. Porém, estudos mostram que eventos oxidativos podem se desenvolver em mulheres, mesmo sem que haja hipercolesterolemia (Amrita *et al.*, 2016).

Além disso, há registros de que o hipoestrogenismo pode ocasionar redução na concentração de HDL (Matthews *et al.*, 2017), o que confere mau prognóstico para doenças vasculares (Manninen *et al.*, 1992; Yin *et al.*, 2013). No nosso estudo, a concentração de HDL (Figura 1B) e triglicerídeos (Figura 1D) não foi modificada pelas intervenções.

Avaliamos a razão LDL/HDL, marcador de doenças cardiovasculares, especialmente quando associada a elevadas concentrações de triglicerídeos (Manninen *et al.*, 1992). No nosso estudo, a razão não foi alterada pelas intervenções (Figura 1F). Também avaliamos a razão colesterol total/HDL, pois esta apresenta um poder preditivo superior a essas variáveis isoladas, ou até mesmo a razão LDL/HDL (Lemieux *et al.*, 2001). Apesar da associação dos dois fatores de risco (hipoestrogenismo e exposição ao ROFA) ter aumentado a concentração de colesterol total, não houve diferença na razão colesterol total/HDL (Figura 1E).

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: XXVI Seminário de Iniciação Científica

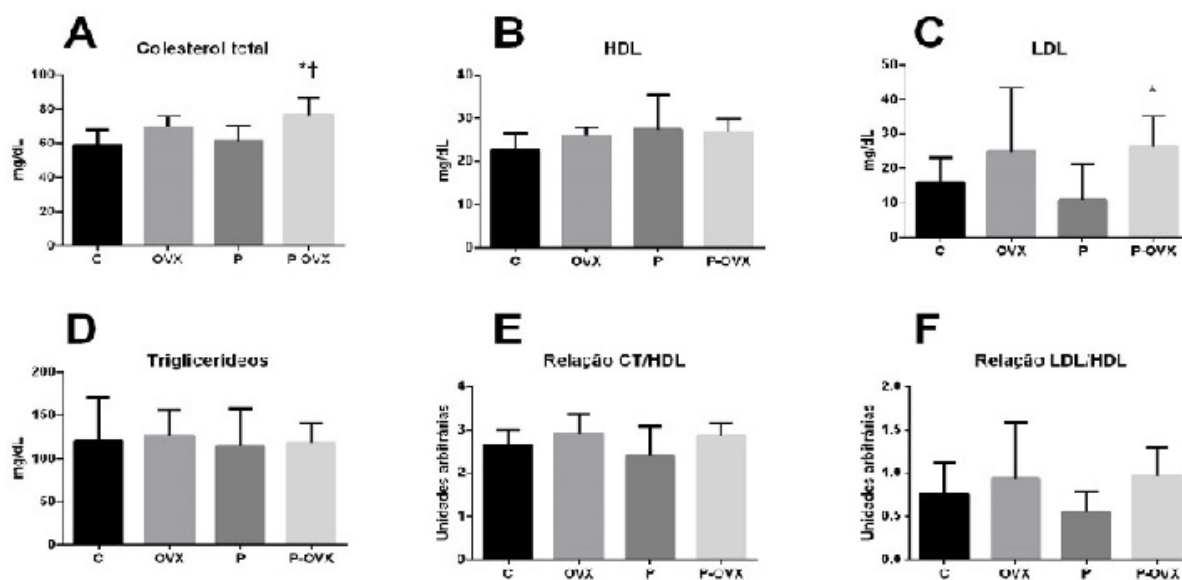


Figura 1: Avaliação dos efeitos da associação da exposição crônica ao ROFA e da privação de estrogênio sobre o perfil lipídico de ratas Wistar. Concentração de colesterol total (A); Concentração de HDL (B); Concentração de LDL (C); Concentração de triglicerídeos (D); Relação colesterol total/HDL (E); Relação LDL/HDL (F). Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio-padrão. ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey. A) *† $P=0,008$ vs C e P. B) $P=0,349$. C) * $P=0,043$ vs P. D) $P=0,958$. E) $P=0,234$. F) $P=0,318$.

Mostramos que a exposição crônica ao ROFA associada ao hipoestrogenismo altera o perfil lipídico, aumentando a concentração de colesterol total e LDL sem modificar as razões LDL/HDL e colesterol total/HDL. Esses resultados podem demonstrar maior propensão ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares na condição de hipoestrogenismo e poluição, como em mulheres pós-menopáusicas continuamente expostas a poluição atmosférica.

CONCLUSÃO:

A exposição ao ROFA associada ao hipoestrogenismo aumenta colesterol total e LDL, sugerindo maior propensão ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: ovariectomia; poluição do ar; dislipidemia; doenças cardiovasculares.

Keywords: ovariectomy; air pollution; dyslipidemia; cardiovascular diseases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: XXVI Seminário de Iniciação Científica

AMRITA, J. et al. Oxidative Stress: An Effective Prognostic Tool for an Early Detection of Cardiovascular Disease in Menopausal Women. **Biochem Res Int**, v. 2016, p. 6157605, 2016.

BENDALE, D. S. et al. 17-beta Oestradiol prevents cardiovascular dysfunction in post-menopausal metabolic syndrome by affecting SIRT1/AMPK/H3 acetylation. **Br J Pharmacol**, v. 170, n. 4, p. 779-95, Oct 2013.

CHEN, T. et al. Beijing ambient particle exposure accelerates atherosclerosis in ApoE knockout mice. **Toxicol Lett**, v. 223, n. 2, p. 146-53, Nov 25 2013.

GHIO, A. J. et al. Biologic effects of oil fly ash. **Environ Health Perspect**, v. 110 Suppl 1, p. 89-94, Feb 2002.

HABERZETTL, P. et al. Insulin sensitizers prevent fine particulate matter-induced vascular insulin resistance and changes in endothelial progenitor cell homeostasis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 310, n. 11, p. H1423-38, Jun 01 2016.

KHEIRBEK, I. et al. The contribution of motor vehicle emissions to ambient fine particulate matter public health impacts in New York City: a health burden assessment. **Environ Health**, v. 15, n. 1, p. 89, Aug 26 2016. ISSN 1476-069X (Electronic)

1476-069X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27566439> >.

LEMIEUX, I. et al. Total cholesterol/HDL cholesterol ratio vs LDL cholesterol/HDL cholesterol ratio as indices of ischemic heart disease risk in men: the Quebec Cardiovascular Study. **Arch Intern Med**, v. 161, n. 22, p. 2685-92, Dec 10-24 2001.

LI, H.; HORKE, S.; FORSTERMANN, U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 237, n. 1, p. 208-19, Nov 2014.

LIMA-MENDOZA, L. A. et al. Vascular damage in obese female rats with hypoestrogenism. **J Physiol Biochem**, v. 70, n. 1, p. 81-91, Mar 2014.

MANNINEN, V. et al. Joint effects of serum triglyceride and LDL cholesterol and HDL cholesterol concentrations on coronary heart disease risk in the Helsinki Heart Study. Implications for treatment. **Circulation**, v. 85, n. 1, p. 37-45, Jan 1992.

MATTHEWS, K. A. et al. Lipid Changes Around the Final Menstrual Period Predict Carotid Subclinical Disease in Postmenopausal Women. **Stroke**, v. 48, n. 1, p. 70-76, Jan 2017.

PETISCO, A. C. et al. High prevalence of subclinical atherosclerosis in Brazilian postmenopausal women with low and intermediate risk by Framingham score. **Int J Cardiovasc Imaging**, v. 33, n.

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: XXVI Seminário de Iniciação Científica

3, p. 401-410, Mar 2017.

SOHENACKER, D. A. E. A. Socioeconomic position, lifestyle factor and age at natural menopause: a systematic review and meta-analyses of studies across six continents. **International Journal of Epidemiology**, v. 43, n. 5, p. 1542-1562, 2014.

SPOSITO, A. C. C., C.; FONSECA, F. A. H.; BERTOLAMI, M. C. V Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, p. 2-19, 1997.

YIN, F. et al. Prooxidative effects of ambient pollutant chemicals are inhibited by HDL. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 27, n. 2, p. 172-83, Feb 2013