

Evento: XXVIII Seminário de Iniciação Científica  
ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

## EFEITOS DA COMBINAÇÃO ENTRE DIETA HIPERLIPÍDICA E EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO ROFA EM RATAS OVARIETOMIZADAS SOBRE O PERFIL INFLAMATÓRIO HEPÁTICO<sup>1</sup>

### EFFECTS OF THE COMBINATION BETWEEN HYPERLIPIDIC DIET AND CHRONIC EXPOSURE TO ROFAC IN OVARIETOMIZED RATS ON HEPATIC INFLAMMATORY PROFILE

Paula Taís Friske<sup>2</sup>, Lílian Corrêa Costa Beber<sup>3</sup>, Jaíne Borges dos Santos<sup>4</sup>, Mirna Stela Ludwig<sup>5</sup>, Thiago Gomes Heck<sup>6</sup>, Pauline Brendler Goettems Fiorin<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Pesquisa Institucional desenvolvida no Grupo de Pesquisa em Fisiologia, Departamento de Ciências da Vida - UNIJUÍ

<sup>2</sup> Acadêmica de Nutrição da UNIJUÍ. Bolsista PIBIC-UNIJUI. Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF

<sup>3</sup> Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica, pela UFRGS. Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF

<sup>4</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS). UNIJUÍ/UNICRUZ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF

<sup>5</sup> 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 (UNIJUÍ). Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF

<sup>6</sup> 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 (UNIJUÍ). Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF

<sup>7</sup> Docente do Departamento de Ciências da Vida (DCVida). Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ). Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF. Doutora em Ciências da Saúde - UFCSPA (Orientadora)

## INTRODUÇÃO

A poluição do ar afeta a saúde de milhares de pessoas todos os anos, sendo um grande problema de saúde pública mundial. Em 2016 a exposição à poluição foi associada a mais de 50 mil mortes no Brasil (WHO, 2018). Diversos tipos de poluentes atmosféricos podem estar associados aos danos causados a saúde pela poluição. Um dos poluentes mais prejudiciais à saúde é o *Residual Oil Fly Ash* (ROFA), um material particulado fino com 2,5 micrômetros, composto por nitrato, sulfato e metais, como ferro, níquel e vanádio (CHEN; LIPPMANN, 2009). O ROFA quando inalado pode chegar até a corrente sanguínea e alcançar diversos órgãos e tecidos e assim levar a alterações da homeostase corporal, como a inflamação (GOETTEMS-FIORIN et al., 2016; LIU et al., 2019; MAI et al., 2017).

A obesidade, definida pelo Índice de Massa Corporal (IMC) igual ou superior a 30 kg/m<sup>2</sup> (ABESO, 2016), é outra condição que pode causar danos a homeostase corporal por ser uma condição de inflamação crônica de baixo grau (LUMENG et al., 2011). Devido ao estado de inflamação crônica, a obesidade é encarada como um fator de risco para o desenvolvimento de diversas doenças, sendo associada ao aumento dos casos de doenças cardiovasculares, diabetes e outras (ABESO, 2016).

Além destes dois fatores que podem alterar a homeostase corporal, as mulheres ainda são afetadas por um terceiro fator, a redução da produção de estrogênio que ocorre naturalmente no período de climatério. O estrogênio é um importante hormônio feminino, tendo como função a regulação metabólica de tecidos (KIM, 2012; MEYER et al., 2014; PELLEGRINI et al., 2014), além de ser vasodilatador e anti-inflamatório (JOSEFSSON; TARKOWSKI; CARISTEN, 1992). A redução dos níveis circulantes de estrogênio poderia agravar e potencializar os efeitos já causados pela obesidade,

**Evento:** XXVIII Seminário de Iniciação Científica

**ODS:** 3 - Saúde e Bem-estar

pela exposição à poluição atmosférica, ou da associação entre ambos. Para avaliar tal situação, busque-se a utilização de marcadores biológicos que evidenciam alterações oxidativas e inflamatórias, como as Proteínas de Choque Térmico (Heat Shock Proteins – HSPs) de 70 kDa – HSP70 (HOOPER; BALOGH; RIVAS, 2014). Estudos indicam que a redução da concentração intracelular de HSP70 está associada à inflamação e doenças (KRAUSE et al., 2015; SELLAES et al., 2019).

Desta forma, a partir do biomarcador em destaque, e dos fatores de risco apresentados, nosso objetivo é avaliar o efeito da privação de estrogênio, induzido por ovariectomia, em animais obesos expostos à poluição por ROFA quanto ao perfil inflamatório (HSP70) hepático.

**Palavras-chave:** Menopausa; Poluição do Ar; Obesidade.

**Keywords:** *Menopause; Air Pollution; Obesity.*

## METODOLOGIA

**Animais:** Neste estudo foram utilizadas 28 ratas *Wistar (Rattus Norvegicus Albinus)*, com 60 dias de vida, provenientes do biotério da UNIJUÍ, mantidos sob condições ideais para animais de laboratório, com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , recebendo água e ração *ad libitum*. Este projeto foi aprovado pelo CEUA da UNIJUÍ (parecer nº 076/15).

**Delineamento experimental:** Os animais foram inicialmente divididos em três grupos: Controle (CTRL), Dieta Hiperlipídica (DHL), Dieta Hiperlipídica + ROFA (DHL+ROFA). O grupo CTRL recebeu uma dieta comercial padrão para animais de laboratório (NUVILAB®), enquanto os animais dos grupos DHL e DHL+ROFA receberam uma ração hiperlipídica. O grupo DHL+ROFA recebeu instilação intranasal 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 (n=5-6): CTRL, DHL, DHL+ROFA, DHL+OVX e DHL+ROFA+OVX. Após mais 12 semanas de estudo, totalizando 24 semanas, ocorreu a coleta do material biológico (fígado) que posteriormente foi utilizado para realizar as avaliações da concentração da HSP70.

**Dieta Hiperlipídica:** preparada no Laboratório de Ensaios Biológicos da UNIJUI, conforme ARAÚJO et al., (2007) a qual era armazenada em refrigerador ( $2-8^\circ\text{C}$ ) e constituía-se de 58,3% de gordura, e energia metabolizável total 22,8 MJ/kg. Para o preparo da ração eram utilizados: 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.

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

Evento: XXVIII Seminário de Iniciação Científica

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

**Poluição Atmosférica:** As partículas foram ressuspensas na concentração 250  $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ , em solução fisiológica. O processo de instilação intranasal era realizado com auxílio de micropipeta automática, desprezando 50  $\mu\text{L}$  da suspensão (ou de solução fisiológica) na narina do animal, o que promove o reflexo de apneia que é seguida de inspiração profunda, a qual impulsiona o líquido para os pulmões (MEDEIROS et al., 2004). A instilação foi realizada durante as 24 semanas de estudo, 5 vezes por semana.

**Coleta e preparo do tecido para análise:** foi realizada ao final das 24 semanas de estudo. O fígado foi coletado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado para posterior homogeneização. A homogeneização foi feita em tampão SDS 0,1% contendo inibidor de protease (PMSF). Para a análise de Western Blotting (LAEMMLI, 1970) foi realizada a determinação da quantidade de proteínas das amostras através do método de Bradford (1976) à 578 nm. As amostras foram diluídas em SDS 0,1% e em Sample Buffer e, posteriormente, fervidas para a desnaturação das proteínas.

**Western Blotting:** Utilizou-se anticorpo específico monoclonal anti-HSP70 (Sigma-Aldrich H5147, 1:1000) seguido de anticorpo secundário (Sigma-Aldrich A9044, 1:15.000). Revelação da  $\beta$ -actina: anticorpo anti- $\beta$ -actina (Sigma-Aldrich A3854, 1:50000). As bandas foram quantificadas através do software Image J®. Resultados expressos em unidades arbitrárias de HSP70/ $\beta$ -actina.

**Análise estatística:** realizada por ANOVA de uma via, seguido pelo Teste de Tukey, no programa estatístico GraphPad 5.0. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão,  $P < 0,05$ .

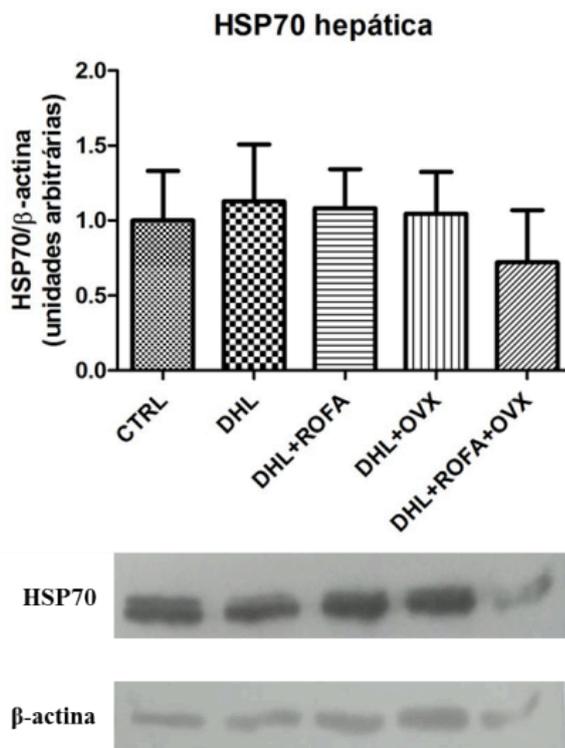
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nosso estudo investigamos se a privação de estrogênio em animais que consumiam uma dieta hiperlipídica e estavam expostos ao ROFA afetaria a expressão da HSP70 no fígado. Ao analisar os resultados observamos que não houve diferença nos níveis de HSP70 hepática (Figura 1) entre os grupos de estudo. Podemos considerar que a redução dos níveis de estrogênio não potencializou os efeitos inflamatórios que poderiam progredir da exposição ao ROFA, consumo de dieta hiperlipídica ou a associação de ambos, avaliados pela concentração da HSP70 hepática.

Alguns estudos já vem observando que a associação da exposição ao ROFA e a privação de estrogênio causam um aumento da expressão da HSP70 hepática (GOETTEMS-FIORIN et al., 2019), assim como a associação da exposição à poluição e o consumo de uma dieta hiperlipídica (GOETTEMS-FIORIN et al., 2016), o que nos indica que o terceiro fator de risco poderia exacerbar ou sinalizar alterações de forma mais precoce.

Em um indivíduo saudável, durante um processo inflamatório o organismo responderia aumentando a concentração da HSP70 como uma forma de se defender diante daquela circunstância. Mas, em situações em que o organismo enfrenta um estresse crônico, condições em que há a presença de diversos fatores de estresse e que se mantem por um longo período, a resposta de expressão desta proteína é prejudicada, principalmente em tecidos metabólicos como o fígado (NEWSHOLME; DE BITTENCOURT, 2014).

Evento: XXVIII Seminário de Iniciação Científica  
ODS: 3 - Saúde e Bem-estar



**Figura 1. Efeitos da redução dos níveis de estrogênio sobre os níveis de HSP70 hepática de ratas que consomem dieta hiperlipídica e são expostas ao ROFA.  $P = 0,210$ . Dados expressos como média  $\pm$  DP. ANOVA de uma via seguida de pós Teste de Tukey.**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O consumo de dieta hiperlipídica e a exposição ao ROFA no período experimental de estudo não promoveram alterações inflamatórias hepáticas avaliadas pelos níveis de HSP70. A privação de estrogênio, associada à ambas as condições de risco pré-existentes, não foi capaz de potencializar os efeitos promovendo uma condição pró-inflamatória hepática.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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*. São Paulo, 2016. v. 4<sup>a</sup> ed.

CHEN, L. C.; LIPPMANN, M. Effects of metals within ambient air particulate matter (PM) on human health. *Inhalation Toxicology*, v. 21, n. 1, p. 1–31, 2009.

GOETTEMS-FIORIN, P. B. et al. Fine particulate matter potentiates type 2 diabetes development

Evento: XXVIII Seminário de Iniciação Científica

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

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.

GOETTEMS-FIORIN, P. B. et al. Ovariectomy predisposes female rats to fine particulate matter exposure's effects by altering metabolic, oxidative, pro-inflammatory, and heat-shock protein levels. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 20, p. 20581–20594, 2019.

HOOPER, P. L.; BALOGH, G.; RIVAS, E. The importance of the cellular stress response in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. **Cell Stress and Chaperones**, p. 447–464, 2014.

JOSEFSSON, E.; TARKOWSKI, A.; CARISTEN, H. Anti-inflammatory properties of estrogen. **Cellular Immunology**, v. 142, n. 1, p. 67–78, 1992.

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

KRAUSE, M. et al. The regulatory roles of NADPH oxidase, intra- and extra-cellular HSP70 in pancreatic islet function, dysfunction and diabetes. **Clinical Science**, v. 128, n. 11, p. 789–803, 2015.

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.

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

NEWSHOLME, P.; DE BITTENCOURT, P. I. H. The fat cell senescence hypothesis: A mechanism responsible for abrogating the resolution of inflammation in chronic disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 17, n. 4, p. 295–305, 2014.

PELLEGRINI, M. et al. Naringenin modulates skeletal muscle differentiation via estrogen receptor

Evento: XXVIII Seminário de Iniciação Científica

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

$\alpha$  and  $\beta$  signal pathway regulation. **Genes & Nutrition**, v. 9, n. 5, p. 425, 2014.

SELLARES, J. et al. Intracellular heat shock protein 70 deficiency in pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 60, n. 6, p. 629–636, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Health Observatory data repositior, Deaths by country in 2016. 2018. Acesso em 26 de junho de 2020. Disponível em: <https://apps.who.int/gho/data/node.main.BODAMBIENTAIRDTHS?lang=en>

**Parecer CEUA:** 076/15