

EFEITO DA OVARIETOMIA E DA REPOSIÇÃO ESTROGÊNICA SOBRE A ATIVIDADE ARILESTERASE DA PARAOXONASE-1 DE RATAS *WISTAR*

MAYARA SANDRIELLY PEREIRA SOARES¹; BIANCA DE OLIVEIRA SCHUMACHER¹, PAULO CAVALHEIRO SCHENKEL²; AUGUSTO SCHNEIDER³; SANDRA COSTA VALLE³

¹ *Graduandas da Universidade Federal de Pelotas - Faculdade de Nutrição - mayara_sandrielly@hotmail.com; bianca.ocs@hotmail.com*

² *Professor da Universidade Federal de Pelotas - Departamento de Fisiologia e Farmacologia - pcschenkel@yahoo.com.br*

³ *Professores da Universidade Federal de Pelotas - Faculdade de Nutrição - augustoschneider@gmail.com; sandracostavalle@gmail.com.*

1. INTRODUÇÃO

A deficiência estrogênica, a exemplo da observada na menopausa, implica em diversas alterações corporais, ginecológicas e extra-ginecológicas, além de elevar o risco para eventos cardiovasculares na pós-menopausa (GRINGS et al. 2009). A terapia de reposição hormonal com estrogênio nos últimos anos tem sido alvo de investigação quanto à dose e o período de início de sua administração (ZAHAR et al. 2005). Embora não desprovida de riscos, a reposição estrogênica está associada à prevenção de sintomas comuns na menopausa como a perda óssea, a atenuação dos sintomas vasomotores e seu efeito cardioprotetor, verificado pelo aumento do HDL (GRINGS et al. 2009). O efeito cardioprotetor atribuído ao estrogênio está ligado as suas ações antioxidantes e antiateroscleróticas, verificadas pelo aumento da catalase plasmática e melhora do perfil lipídico, com estímulo a síntese do HDL (GRINGS et al. 2009; CASTANHO et al. 2012). Este efeito tem sido associado ao aumento na atividade da Paraoxonase-1 (PON-1) (PEDROSA et al. 2009).

A Paraoxonase-1 (PON-1) é uma enzima associada ao HDL, com função antioxidante e antiinflamatória, que previne o dano oxidativo ao LDL e protege contra a aterosclerose (KLEEMOLA et al. 2002). Ata et al, avaliaram a associação do estrogênio com a atividade da PON-1 e constataram que mulheres na pós-menopausa, ao receberem reposição hormonal estrogênica, apresentam aumento na atividade da PON-1 quando comparadas ao grupo controle. O efeito do estrogênio sobre a enzima também foi constatado *in vitro*, aumentando a atividade da PON-1 sem, no entanto, alterar sua expressão gênica (AHMAD et al. 2010). O mecanismo de ação do estrogênio sobre a PON-1 permanece a ser elucidado, mas pode estar primariamente associado ao efeito antioxidante do hormônio.

Estudos clínicos e experimentais recomendam que sejam cuidadosamente equacionados os fatores de risco associados à saúde e os efeitos desejados da terapia de reposição estrogênica. Considerando os estudos prévios postulou-se no presente trabalho que a deficiência estrogênica reduzirá a atividade da PON-1 e o HDL-Col e, que a reposição hormonal com estrogênio em ratas ovariectomizadas, aumentará a atividade da enzima e a concentração de HDL-Col. Sendo a magnitude desse efeito associado ao período de início da reposição hormonal. Assim, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a atividade da PON-1 e a concentração de HDL-Col e analisar o ganho de peso em ratas submetidas à ovariectomia e a reposição hormonal estrogênica imediata e sete dias da ovariectomia.

2. METODOLOGIA

Utilizou-se 24 ratas *Wistar* provenientes do Biotério da Universidade Federal de Pelotas, que foram divididas em 4 grupos experimentais: 1) cirurgia fictícia-SHAM (n=6); 2) ovariectomizadas bilateralmente sem reposição estrogênica-OVX (n=5); 3) ovariectomizadas bilateralmente com reposição estrogênica imediata-RHI (n=8) e 4) ovariectomizadas bilateralmente com reposição estrogênica sete dias após-RH7 (n=5). A reposição estrogênica foi realizada com uma cânula de silicone, preenchida com 10 μ L de solução 5% (p:v) 17 β -estradiol (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) em óleo de girassol, sendo vedada após com silicone. As cápsulas foram mantidas em solução salina durante a noite precedente a sua utilização e implantadas, sob anestesia, na região subcutânea entre as escápulas. Animais dos grupos SHAM e OVX receberam cápsulas contendo somente óleo de girassol. Após 28^o dia do procedimento cirúrgico de simulação da ovariectomia bilateral, o ciclo estral foi determinado nas fêmeas SHAM, as quais foram sacrificadas na fase do diestro. Após 28 dias de tratamento as ratas foram pesadas e sacrificadas por decapitação com guilhotina. A coleta de sangue ocorreu imediatamente após a decapitação. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3500 *rpm*, por 10 min e armazenadas em freezer a -20°C para análises posteriores. O útero, o tecido adiposo peri-lombar e o fígado foram retirados por cirurgia e pesados em balança digital de alta precisão. Após a retirada dos órgãos os animais foram encaminhados ao biotério central para descarte. A atividade arilesterase da PON-1 foi medida através da velocidade de formação de fenol e para a dosagem do colesterol ligado ao HDL utilizou-se o método colorimétrico de *Trinder*.

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa BioEstat 5.3. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, sob protocolo número 2803.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características dos animais de cada grupo experimental quanto ao peso corporal, ganho de peso e peso dos órgãos são mostradas na Tabela 1. O peso corporal, a massa de tecido adiposo peri-lombar foi, significativamente, maior nas ratas OVX quando comparada ao presente no grupo SHAM, RHI e RH7, $p < 0,05$). A reposição estrogênica sete dias após ovariectomia-RH7 resultou em menor massa de tecido adiposo peri-lombar em relação ao grupo controle

TABELA 1: Peso corporal, do fígado, do tecido adiposo peri-lombar e razão órgão/peso corporal em ratas *Wistar* submetidas a cirurgia fictícia-SHAM, a ovariectomia sem reposição estrogênica- OVX e a ovariectomia seguida de reposição estrogênica imediata-RHI e de reposição estrogênica sete dias após-RH7.

TRATAMENTO	PESO (g)			RAZÃO TECIDO/PESO CORPORAL		
	CORPORAL	FÍGADO	GORDURA PL	PF/PC	PTA/PC	PU/PC
SHAM (6)	247.5 ± 22.0	8.8 ± 0.9	1.5 ± 0.2	3.3 ± 0.3	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.05 ^{***}
OVX (8)	283.1 ± 28.7 [‡]	9.6 ± 0.6 [†]	1.8 ± 0.7*	3.2 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.06 ± 0.01 ^{**}
RHI (8)	241.9 ± 20.0	9.9 ± 1.0 [†]	1.3 ± 0.3	4.1 ± 0.4 [#]	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1 [∞]
RH7 (5)	221.3 ± 19.0	8.1 ± 0.7	1.0 ± 0.1	3.6 ± 0.3	0.5 ± 0.06	0.2 ± 0.05 [∞]

[‡]p < 0,05 comparado aos grupos SHAM, RHI e RH7, *one way ANOVA, Post Hoc Tukey*

[†]p < 0,05 comparado aos grupos SHAM e RH7, *one way ANOVA, Post Hoc Tukey*

[#]p < 0,05 comparado aos grupos RHI e RH7, *one way ANOVA, Post Hoc Tukey*

^{*}p < 0,05 comparado aos grupos SHAM e OVX, *one way ANOVA, Post Hoc Tukey*

^{**}p < 0,05 comparado aos grupos SHAM, RHI e RH7, *Kruskal-Wallis, Post Hoc SNK*

[∞]p < 0,05 comparado aos grupos OVX, RHI e RH7, *Kruskal-Wallis, Post Hoc SNK*

[∞]p < 0,05 comparado ao grupo SHAM, *Kruskal-Wallis, Post Hoc SNK*

A atividade da enzima PON-1, a concentração sérica de HDL-Colesterol e a razão entre a atividade da PON-1/ [HDL-Col] são apresentadas na Figura 1 A, B e C. A atividade da PON-1 alterou-se em resposta ao período de início da reposição estrogênica (Fig.1A). A atividade da PON-1 no soro de ratas OVX foi similar a das ratas SHAM. Entretanto, a atividade da PON-1 no soro de ratas ovariectomizadas com reposição estrogênica imediata-RHI foi, significativamente, superior a encontrada no soro de ratas submetidas a reposição com estrogênio sete dias após-RH7, p<0,05. A atividade da PON-1 no grupo RHI também foi maior comparada a OVX e SHAM (Fig.1A).

A concentração sérica de HDL-Colesterol foi 1,17 vezes mais elevada (p>0,05) no grupo RHI em relação aos grupos OVX e RH7 (Fig.1B).

A razão da atividade enzimática da PON-1 em relação à concentração sérica de HDL-Colesterol também se modificou em resposta ao tempo de início da reposição estrogênica (Fig.1C). A relação foi similar entre OVX e SHAM. Já a reposição imediata-RHI aumentou a relação PON-1/HDL-Col de maneira significativa em relação a RH7, a OVX e ao controle (Fig.1C).

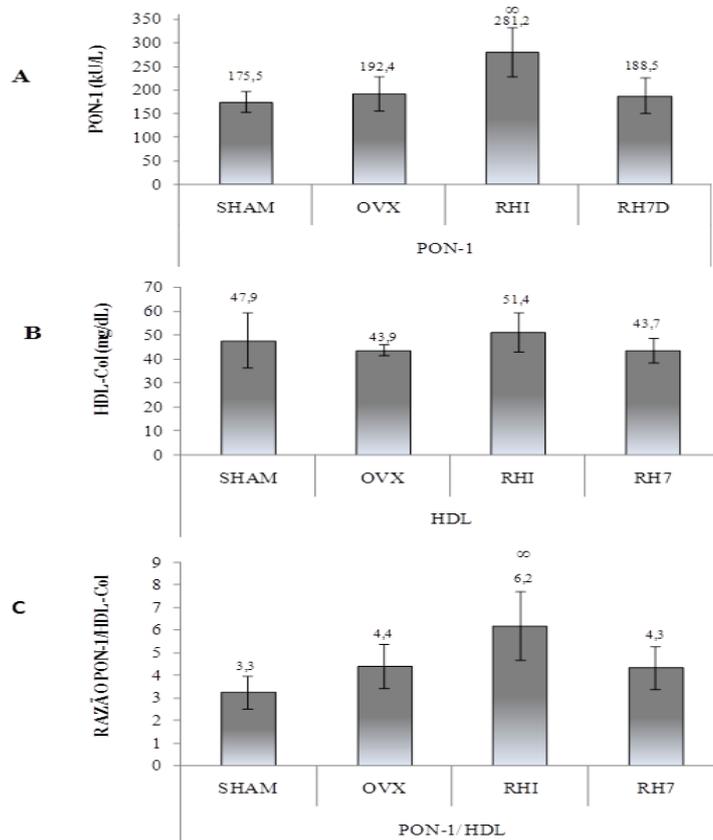


FIGURA 1: **A**-Atividade da enzima PON-1 (kU/L), **B**-Concentração sérica de HDL-Colesterol e **C**- Razão da Atividade de PON-1/[HDL-Col], em ratas *Wistar* submetidas a cirurgia fictícia-SHAM, a ovariectomia sem reposição estrogênica- OVX e a ovariectomia seguida de reposição estrogênica imediata-RHI e de reposição estrogênica sete dias após-RH7. N= 5 a 8. ∞ indica $p < 0,05$ comparado aos grupos SHAM, OVX e RH7, *one way ANOVA, Post Hoc Tukey*.

Este trabalho mostrou que a atividade da PON-1 pode sofrer influência do período de início da reposição estrogênica. Por outro lado, diferente do esperado a atividade da PON-1 não se alterou na presença ou ausência fisiológica de estrogênio e pela reposição hormonal sete dias após ovariectomia. Ainda, mostrou uma diferença significativa no ganho de peso total e na massa adiposa peri-lombar nas ratas sem reposição estrogênica após ovariectomia.

4. CONCLUSÕES

É possível admitir que a atividade da PON-1 sofre influência do período de início da reposição estrogênica em ratas *Wistar*, sendo que a ausência do hormônio associou-se ao aumento da adiposidade e do peso corporal. Esses resultados motivam a ampliação da pesquisa sobre este tema.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHAMAD, S; SCOTT, JE; Estradiol enhances cell-associated paraoxonase 1 (PON 1) activity in vitro without altering PON 1 expression. S. Ahmad, J.E. Scott/ Biochemical and Biophysical Research Communications 397 (2010) 441-446.
- CASTANHO, VS; NAKAMURA, RT; PINTO-NETO, AM; FARIA, EC. Tratamento pós-menopausa reduz a atividade da catalase e atenua o risco cardiovascular. Arq. Bra. Cardiol. 2012; [online].ahead print, PP.0-0.
- GRINGS, AC; KÜHNE, J; GOMES, AP; JACOBSEN, T; CASCAES, AC; LARA, GM. Riscos e benefícios da terapia de reposição hormonal (TRH) em mulheres na menopausa. RBAC, vol (3): 229-233, 2009.
- KLEEMOLA, P; FREESE, R; JAUHAINEN, M; PAHLMAN, R; ALFTHAN, G; MUTANEN, M. Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. Atherosclerosis. 2002;160:425-32.
- PEDROSA, DF; REZENDE, LCL; SILVA, IV; RANGEL, I LBA; GONÇALVES, WLS; GRACELI, JB. Efeitos benéficos do estrogênio no sistema cardiovascular. Perspectiva online vol.3 n.12,2009.
- TOPÇUOĞLU, A; UZUN, H; AYDIN, S; KAHRAMAN, N, VEHID, S; ZEYBEK, G; TOPÇUOĞLU, D. The effect of hormone replacement therapy on oxidized low density lipoprotein levels and paraoxonase activity in postmenopausal women. Tohoku J Exp. Med., 2005, 205, 79-86.
- ZAHAR, SEV; ALDRIGHI, CJM; NETO, AMP; CONDE, DM; ZAHAR, LO; RUSSOMANO, F. Qualidade de vida em usuárias e não usuárias de terapia de reposição hormonal. Rev Assoc Med Bras 2005;51(3):133-8