



## **EFEITOS DA TIBOLONA SOBRE O POTENCIAL REDOX NO FÍGADO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS E ESTEATÓTICAS**

Leticia Tami Taniguti Hinobu<sup>1</sup>(PIC/CNPq-UEM), Lilian Campos Brites-Shimada<sup>2</sup>, Franciele Neves Moreno<sup>1</sup>, Eduardo Hideo Gilglioni<sup>1</sup>, Clairce Luzia Salgueiro-Padigorria<sup>3</sup> (co-orientadora), Elismari Rizato Martins Maciel<sup>1</sup> (orientadora) ([ermmaciel@uem.br](mailto:ermmaciel@uem.br))

<sup>1</sup>Laboratório de Oxidações Biológicas e Esteatose Hepática, Departamento de Bioquímica, 87020900 Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade Integrado, 87300970 Campo Mourão, PR, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, 87020900 Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil.

**Bioquímica (2.08.00.00-2), Metabolismo e Bioenergética (2.08.03.00-1)**

**Palavras-chave:** Deficiência estrogênica, estresse oxidativo, Tibolona.

**Resumo:** O climatério está associado a uma maior incidência de síndrome metabólica (SM). A tibolona é um esteroide sintético utilizado como forma alternativa de reposição hormonal após a menopausa. Neste trabalho foi analisado o estado redox do fígado de ratas Wistar ovariectomizadas e esteatóticas tratadas com Tibolona (OVX+EHT) e não tratadas (OVX+EH), por meio da avaliação das reações de carbonilação de proteínas no homogenato de fígado e mitocôndrias isoladas. Foi observado que ratas OVX+EH apresentaram maior índice de estresse oxidativo, constatado pelo maior conteúdo de proteínas carboniladas no homogenato e nas mitocôndrias do fígado, comparado às ratas controles. O grupo OVX+EHT mostrou uma melhora desses parâmetros, uma vez que o conteúdo de proteínas carboniladas foi semelhante ao encontrado para o grupo controle e diferentes significativamente do grupo OVX+EH. Isto mostra que a tibolona reduz o dano oxidativo do fígado.

### **Introdução**

O climatério aumenta a incidência de síndrome metabólica (SM), um conjunto de distúrbios metabólicos que incluem obesidade, diabetes, resistência à insulina, dislipidemias, esteatose hepática (EH) e hipertensão arterial. A tibolona, um esteroide sintético, muito utilizado no alívio dos sintomas do climatério, representa uma alternativa ao uso da terapia hormonal (TH) em mulheres na após a menopausa. Apresenta-se como um regulador da atividade estrogênica tecido-específico (STEAR – *selective tissue estrogenic activity regulator*) que tem propriedades estrogênicas,



progestagênicas e androgênicas. O tratamento com tibolona tem-se demonstrado eficiente no controle de algumas anormalidades da SM após a menopausa (HÄNGGI et al., 1998) e em modelos animais de deficiência estrogênica (Henriques et al., 2010).

Estudos anteriores já conduzidos por nosso grupo de pesquisa indicam alto potencial antioxidante para a tibolona em ratas OVX, como restauração dos níveis de glutathione reduzida e diminuição nos níveis de lipoperoxidação. Neste trabalho as reações de carbonilação de proteínas foram investigadas na busca por possíveis efeitos do tratamento de ratas ovariectomizadas esteatóticas (OVX+EH) com tibolona (OVX+EHT), com o intuito de complementar as análises pela busca dos mecanismos de ação da tibolona sobre o estado redox do fígado.

## **Materiais e métodos**

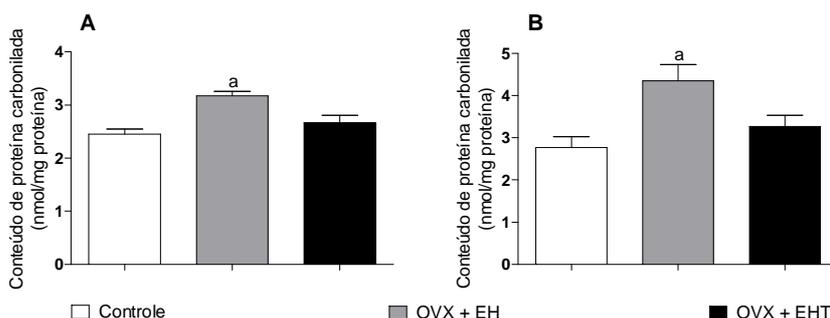
Ratas Wistar provenientes do biotério central da Universidade Estadual de Maringá, (130 a 160 g) foram aleatoriamente divididas em dois grupos: ovariectomizadas (OVX+EH) e *sham*-operadas (Controle). Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno (4 animais por gaiola) e alimentados com dieta padrão e água à vontade, à temperatura constante (25°C) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Onze semanas após o procedimento cirúrgico, as ratas OVX foram subdivididas em dois grupos: ratas tratadas diariamente com tibolona (OVX+EHT) e não tratadas (OVX+EH). A tibolona (0,08 mg/kg) foi administrada diariamente como suspensão em solução aquosa de goma arábica 1%, por gavagem esofageal, por um período de 15 dias. As ratas OVX + EH e controles foram tratadas diariamente, pelo mesmo período e com o mesmo volume de goma arábica 1%. Após o período de tratamento de 15 dias, os animais em jejum de 12 horas, foram anestesiados, o fígado foi removido e, então, o animal foi eutanasiado por perfusão diafragmática. Fragmentos de fígado foram utilizados para fazer o homogenato e para o isolamento das frações mitocondriais, que foram utilizados para medida do conteúdo de proteínas carboniladas (GUARNIER et al., 2010). O conteúdo de grupos carbonila foi calculado usando o coeficiente de absorção molar de hidrazonas alifáticas a 370 nm de  $22,000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ , e expresso em nmol/mg proteína. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. O teste de análise de variância (ANOVA) one way, seguido do pós-teste de Newman-Keuls, foi aplicado para análise dos dados entre todos os grupos. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos. As análises foram realizadas no software Graphpad Prism (versão 5.0). Todos os experimentos foram realizados em observância às orientações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (Certificado nº 056/2011).



## Resultados e Discussão

As médias do conteúdo de proteínas carboniladas obtidas para as ratas controle, OVX+EH e OVX+EHT no homogenato e na mitocôndria estão apresentados nas figuras 1A e 1B. É possível observar que ratas OVX+EH apresentaram alto índice de estresse oxidativo pelo maior conteúdo de proteínas carboniladas no homogenato (cerca de 33%, Fig. 1A) e nas mitocôndrias (cerca de 36%, Fig. 1B) do fígado, comparado às ratas controles. O grupo OVX+EHT mostrou uma melhora do estresse oxidativo, uma vez que o conteúdo de proteínas carboniladas no homogenato (Fig.1A) e nas mitocôndrias (Fig.1B) do fígado foi semelhante ao grupo controle e diferente significativamente do grupo OVX + EH. Isto mostra que a tibolona é eficaz, pelo menos em parte, em reduzir o dano oxidativo.

Esta melhora do estado redox do fígado no grupo tratado pode estar relacionada com propriedades antioxidantes inerentes à molécula da tibolona, uma vez que a mesma possui propriedade estrogênica. (REED e KLOOSTERBOER, 2004). Sabe-se que o estrógeno tem funções antioxidantes *in vitro* e *in vivo*, (BORRÁS, 2010) não apenas pela sua estrutura fenólica, mas devido a sua ação no fígado vinculada aos receptores estrogênicos, reduzindo a geração ROS e controlando a expressão e a atividade de várias enzimas antioxidantes. Assim, em uma condição de deficiência estrogênica, como é o caso das ratas OVX+EH, o estresse oxidativo observado pode ser resultado de um aumento na geração de ROS ou uma diminuição da defesa do sistema antioxidante (GILGLIONI et. al 2013).



**Figura 1.** Conteúdo de proteína carbonilada do homogenato (painel A,  $n = 6 - 8$ ) e da mitocôndria (painel B,  $n = 8$ ) do fígado dos animais Controle, OVX+EH e OVX+EHT. A barra vertical representa o erro padrão. (<sup>a</sup> $p < 0,005$  vs. Controle e OVX+EHT).

## Conclusões

O tratamento com tibolona, em dose terapêutica, exerce efeito benéfico ao estado redox do fígado, uma vez que os animais OVX+EHT apresentaram conteúdo de proteínas carboniladas semelhantes aos animais



controle. O conteúdo de proteína carbonilada é apenas um parâmetro utilizado para verificar o estado redox do fígado, desta forma, se faz necessários estudos adicionais.

### Agradecimentos

Ao PIC e ao CNPq pelo apoio à iniciação científica dos acadêmicos.

### Referências

BORRÁS, C.; GAMBINI, J.; LÓPEZ-GRUESO, R.; PALLARDÓ FV.; VIÑA, J. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1802, p.205-211, 2010.

GILGLIONI, E. H.; CAMPOS, L. B.; OLIVEIRA, M. C.; GARCIA, R. F.; AMBIEL, C. R.; BUZZO, A. J.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; SALGUEIRO-PADIGORRIA, C. L. Beneficial effects of tibolone on blood pressure and liver redox status in ovariectomized rats with renovascular hypertension. **The Journals of Gerontology**, v. 68, p. 510-520, 2013.

GUARNIER, F. A.; CECCHINI, A. L.; SUZUKAWA, I. A.; MARAGNO, A. L. G. C; SIMA, A. A. N. C; GOMES, M. D.; CECCHINI, R. Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with walker 256 solid tumor. **Muscle Nerve**, v. 42, p. 950-958, 2010.

HÄNGGI, W.; LIPPUNER, K.; JAEGER, P.; BIRKHÄUSER, M. H.; HORBER, F. F. Differential impact of conventional oral or transdermal hormone replacement therapy or tibolone on body composition in postmenopausal women. **Clinical Endocrinology**, v. 48, p. 691-699, 1998.

HENRIQUES, H. N.; CÂMARA, N. R.; CARVALHO, A. C. B.; PANTALHÃO, J. A. S.; GUZMÁN-SILVA, M. A. Efeitos de doses elevadas de tibolona sobre o peso corporal e perfil lipídico de ratas ooforectomizadas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, p. 88-93, 2010.