

MARCADORES DE DANO HEPÁTICO NO SANGUE DE RATAS OVARIETOMIZADAS E HIPERTENSAS

Adeline Beatriz Kist (PIC/CNPq/FA/Uem), Rodrigo Polimeni Constantin (Orientador), Eduardo Hideo Gilglioni (Co-Orientador) e-mail: ra116347@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas/Maringá, PR.

Ciências Biológicas – Bioquímica Metabolismo e Bioenergética

Palavras-chave: dano hepático, deficiência estrogênica, hipertensão.

Resumo:

Muitas mudanças fisiológicas importantes estão associadas com a deficiência estrogênica em mulheres e muitas destas alterações aumentam a incidência da síndrome metabólica e suas comorbidades. A hipertensão é um componente comum dessa síndrome em mulheres após a menopausa uma vez que o estrógeno exerce ações vasodilatadoras e controla elementos do sistema renina-angiotensina. A associação da hipertensão com a falta do estrógeno pode prejudicar a integridade de alguns tecidos. Nesse contexto, este trabalho buscou avaliar os efeitos da deficiência estrogênica e da hipertensão renovascular sobre parâmetros indicativos de dano hepático em ratas ovariectomizadas e com hipertensão renovascular. Esses dados eventualmente poderão contribuir no entendimento das alterações fisiológicas em mulheres hipertensas após a menopausa.

Introdução

O período após a menopausa é marcado por alterações em inúmeras funções fisiológicas, aumentando o risco de desenvolvimento de doenças e distúrbios como a síndrome metabólica. Entre os sinais e sintomas dessa síndrome, a hipertensão arterial se destaca como um dos mais importantes fatores de risco associados à menopausa (Coylewright et al., 2008; Maas & Franke, 2009) que muitas vezes está secundariamente relacionado à deficiência de estrógeno, por meio de mecanismos envolvendo obesidade (Rappelli, 2002), resistência à insulina (Lind et al., 1995; Carr, 2003), dislipidemias (Ley et al., 1996), entre outros. O estradiol controla também diretamente componente do sistema renina angiotensina, promovendo diminuição na expressão do receptor da angiotensina II (AT1) nos vasos e rins (Harrison-Bernard & Schulman, 2003; Coylewright et al., 2008) e redução da atividade da enzima conversora da angiotensina I (ECA) (Dubey et al., 2002) de modo que sua falta favorece o aumento da pressão arterial média.

Sabe-se que a hipertensão pode ocasionar a uma maior produção de marcadores inflamatórios e estresse oxidativo (Chilsum & Steinberg, 2000; Lerman et al., 2001; Dobrian et al., 2001) que, por sua vez, causa danos em diversos órgãos (Raij et al., 1998; Chilsum and Steinberg, 2000). Considerando que o estrógeno apresenta propriedades antioxidantes diretas e indiretas e que tanto a esteatose hepática quanto a hipertensão podem, sob algumas circunstâncias, tornar o fígado mais susceptível a danos que eventualmente resultam em progressão para doenças hepáticas mais graves, este trabalho investigou os efeitos da deficiência de estrógeno e da hipertensão sobre parâmetros indicativos de dano hepático além do peso de diferentes órgãos.

Materiais e métodos

Animais: Neste projeto foram utilizadas ratas Wistar com 60 dias de idade provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá (CEUA 1335211019).

Procedimentos Cirúrgicos: Para os procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de xilazina (10 mg/kg), ketamina (50 mg/kg) e fentanil (0.06 mg/kg). Foi realizada a tricotomia seguida por assepsia da região abdominal para posterior incisão de 1 a 1,5 cm na pele, seguida de uma incisão na camada muscular, abrindo a cavidade peritoneal para posterior remoção dos ovários, e ligadura da trompa uterina. A indução da hipertensão foi induzida pela constrição da artéria renal esquerda por meio da aplicação de um clipe de prata (diâmetro interno 0,2 mm), seguindo o modelo de Goldblatt (1934), chamado 2K1C (“2 kidneys, 1 clip” ou 2 rins, 1 clipe), através da incisão do lado esquerdo. A sham-cirurgia para a ovariectomia não inclui a remoção dos ovários e para a hipertensão não inclui a clipagem da artéria. De acordo com o procedimento cirúrgico as ratas foram divididas nos grupos controle (sham-operadas para ovariectomia e hipertensão), OVX (ovariectomizadas e sham-operadas apenas para hipertensão), 2K1C (hipertensas e sham-operadas para a ovariectomia) e OVX+2K1C (ovariectomizadas e hipertensas).

Procedimento de Eutanásia: Após os períodos de 6 ou 16 semanas dos procedimentos cirúrgicos os animais foram pesados e submetidos à eutanásia por métodos aprovados pelo CONCEA.

Coleta de sangue e obtenção do soro ou plasma: O sangue foi coletado em tubos previamente heparinizados (heparina sódica – 25.000 UI/5 mL) para obtenção de plasma e tubos sem heparina para obtenção do soro após centrifugação a 3000g por 10 min.

Dosagens no sague: Para medida da creatinina, uréia, e para determinar as atividades das enzimas AST e ALT foram utilizados kits comerciais, seguindo as instruções do fabricante.

Coleta do fígado, rins, útero e coração: Para a coleta e o preparo de amostras do fígado, após a anestesia, as ratas foram inicialmente

submetidas ao procedimento de perfusão hepática in situ. Na sequência, o fígado foi rapidamente removido, pesado, clampeado em nitrogênio líquido e macerado com o uso de um almofariz. O pó homogêneo resultante foi então armazenado em freezer -80°C até a realização dos experimentos. Já os rins, o útero e o coração foram apenas removidos e pesados.

Tratamento dos resultados: Os dados foram expressos como média \pm erro padrão (SEM). As análises estatísticas foram feitas utilizando test t de Student, usando o programa GraphPad Prisma 3.0. Valores de $p < 0,05$ foram adotados como critério de significância.

Resultados e Discussão

Na análise do peso dos órgãos, o útero dos grupos SHAM e 2K1C foram significativamente maiores em comparação com os grupos OVX e OVX+2K1C com 6 semanas e com 16 semanas de experimento. Esses resultados são esperados uma vez que a deficiência de estrogênio leva a atrofia uterina. Além disso, as ratas submetidas ao procedimento para induzir a hipertensão, os grupos 2K1C e OVX+2K1C, apresentaram atrofia no rim esquerdo, indicada por valores de peso do rim significativamente menores quando comparado aos grupos SHAM e OVX com 6 semanas e 16 semanas de experimento. Além disso, os pesos do rim direito desses animais apresentaram valores maiores. Já o fígado e o coração, não apresentaram diferenças significativas em seus pesos nos diferentes grupos experimentais. Embora o peso do fígado não tenha apresentado mudanças, a atividade da AST no plasma foi maior no grupo OVX+2K1C em comparação com os demais grupos após 6 semanas. Após 16 semanas os grupos OVX+2K1C e 2K1C apresentaram maior atividade da AST em comparação com os grupos SHAM e OVX. Ambas AST e ALT são utilizadas como marcadores de injúria hepática, caso ocorra uma elevação da atividade dessas enzimas na corrente sanguínea, as mesmas são medidas para determinar e avaliar disfunção hepática.

Os níveis de ureia com 6 semanas de experimento foram significantes maiores nos grupo 2K1C e OVX+2K1C em comparação com os grupo SHAM e OVX, já com 16 semanas apenas o grupo OVX+2K1C apresentou elevado níveis de ureia em comparação com os grupos SHAM e OVX. Nos grupo 2K1C e OVX+2K1C com 6 semanas os níveis de creatinina foram significativamente maiores em comparação com os grupos SHAM e OVX e com 16 semanas os grupos 2K1C e OVX+2K1C apresentaram valores significativamente maiores em comparação com o grupo OVX. Alterações na função renal neste trabalho nas ratas submetidas ao procedimento de 2K1C foram evidenciadas pelos maiores níveis de creatinina e ureia no plasma, corroborando com um estágio inicial de insuficiência renal.

Conclusões

Os procedimentos cirúrgicos de ovariectomia e indução da hipertensão arterial levam a mudanças profundas nas dimensões de órgãos como o

útero e os rins, mas não afetam o peso do fígado e do coração nos períodos experimentais avaliados. A atrofia do rim esquerdo foi acompanhada de alterações em marcadores de função renal e apesar de não terem sido observadas mudanças no peso do fígado, a hipertensão associada com a ovariectomia aumentou a atividade da AST no plasma das ratas após 6 semanas e após 16 semanas mesmo sem associação com a ovariectomia elevação nos valores de AST foram observadas nos animais submetidos à hipertensão. Análises complementares poderão confirmar a evidência de dano hepático e os resultados aqui descritos irão auxiliar a interpretação de outros dados a serem coletados a partir de amostras de tecidos e plasma coletados ao longo deste trabalho.

Agradecimentos

Agradeço ao meu coordenador de projeto, professor Eduardo Hideo Gilgioni por todas as orientações, ao doutorando Paulo Francisco Veiga Bizerra e aos meus colegas Lucas Zandonadi dos Santos e Maria Eduarda Facci de Castro, que me auxiliaram durante todo o projeto. À minha família, que sempre me apoiou e me incentivou.

Referências

Coylewright, M.; Reckelhoff, J. F.; Ouyang, P. **Menopause and hypertension. An age-old debate.** *Hypertension*. 51:952-959; 2008.

Dubey, R. K.; Oparil, S.; Imthurn, B.; Jackson, E. K. **Sex hormones and hypertension.** *Cardiovasc. Res.* 53:688-708; 2002.

Lind, L.; Berne, C.; Lithel, H. **Prevalence of insulin resistance in essential hypertension.** *J. Hypertens.* 13:1457-1462; 1995.

Maas, A. H. E. M.; Franke, H. R. **Women's health in menopause with a focus on hypertension.** *Neth. Heart. J.* 17:68-72; 2009.

Rappelli, A. **Hypertension and obesity after menopause.** *J. Hypertens.* 20:S26-S28; 2002.