

SÔNIA MARIA ROLIM ROSA LIMA¹

ADRIANE BELLÓ-KLEIN²

KARIN FLUES³

JANAÍNA PAULINI⁴

OSMAR MONTE⁵

MARIA CLÁUDIA IRIGOYEN⁶

KÁTIA DE ANGELIS⁷

Efeitos da suplementação do 17 β -estradiol no dano oxidativo cardíaco de ratas submetidas à privação dos hormônios ovarianos

Effects of 17 β -estradiol replacement on cardiac oxidative damage in rats submitted to ovarian hormone deprivation

Artigos originais

Palavras-chaves

Terapia de reposição hormonal
Terapia de reposição de estrogênios
Estresse oxidativo
Antioxidantes
Peroxidação de lipídeos

Keywords

Hormone replacement therapy
Estrogen replacement therapy
Oxidative stress
Antioxidants
Lipid peroxidation

Resumo

OBJETIVO: avaliar o estresse oxidativo em tecido cardíaco de ratas ooforectomizadas, com ou sem terapia hormonal. **MÉTODOS:** ratas *Wistar* foram divididas em três grupos: grupo controle (GC), grupo ooforectomizada (GO) e grupo ooforectomizada + suplementação hormonal (GOS). A privação estrogênica foi obtida pela ooforectomia bilateral. Uma semana após a ooforectomia, um *pellet* de 1,5 mg de 17 β -estradiol foi implantado nos animais do grupo GOS. Nove semanas após a ooforectomia, o tecido cardíaco foi obtido para a análise do estresse oxidativo por meio da medida da quimiluminescência e da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx). **RESULTADOS:** a quimiluminescência estava aumentada no GO (7348 \pm 312 cps/mg proteína) quando comparado ao GC (6250 \pm 41 cps/mg proteína, $p < 0,01$), mas não houve diferença significativa entre GC e GOS (6170 \pm 237 cps/mg proteína). A ooforectomia reduziu a atividade da SOD (22%, $p < 0,001$) e da CAT (35%, $p < 0,05$) no GO comparado ao GC. A terapia hormonal normalizou a atividade das enzimas antioxidantes no GOS. Não houve significância estatística na atividade da GPx quando os grupos estudados foram comparados. **CONCLUSÕES:** a privação dos hormônios ovarianos induziu aumento do estresse oxidativo e redução das defesas antioxidantes no tecido cardíaco. No entanto, a terapia hormonal preveniu o estresse oxidativo após a ooforectomia, provavelmente devido a um aumento das enzimas CAT e SOD no músculo cardíaco. Esses achados sugerem uma importante participação do estresse oxidativo nas disfunções cardiovasculares observadas em mulheres após a menopausa, reforçando a importância da terapia hormonal para o manejo dos riscos de doenças cardiovasculares neste grupo de mulheres.

Abstract

PURPOSE: to evaluate oxidative stress in cardiac tissue of ovariectomized rats, with and without hormonal therapy. **METHODS:** female *Wistar* rats were divided in three groups: control group (CG); ovariectomized group (OG); ovariectomized group with estrogen supplementation (ESG). The estrogen deprivation was done through bilateral ovariectomy. After one week from the ovariectomy, a pellet of 1.5 mg of 17 β -estradiol was implanted in the ESG animals. Nine weeks after the ovariectomy, cardiac tissue was obtained for the analysis of the oxidative stress through CL (chemiluminescence), and measurement of antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx). **RESULTS:** CL was increased in the OG (7348 \pm 312 cps/mg protein) when compared with the CG (6250 \pm 41 cps/mg protein, $p < 0.01$), but there was no significant difference between the CG and the ESG (6170 \pm 237 cps/mg protein). Ovariectomy reduced SOD (35%, $p < 0.05$) and CAT (22%, $p < 0.001$) activities in the OG as compared with the CG. Hormonal therapy normalized antioxidant enzymes activities in the ESG. There was no statistically significant difference in GPx activity among the groups studied. **CONCLUSIONS:** ovarian hormone deprivation induced an increase of oxidative stress with reduction of antioxidant defenses in the cardiac tissue. However, hormonal therapy prevented oxidative stress

Correspondência:

Sônia Maria Rolim Rosa Lima
Avenida Hélio Pellegrino, 250 apto. 142 – CEP 04513-100
Vila Nova Conceição – São Paulo/SP – Brasil
Fone/Fax (11) 3849 8277 – E-mail: lima@silber.com.br

Recebido

31/10/2006

Aceito com modificações

02/01/2007

Este estudo foi realizado com o apoio do Programa Institucional de Bolsas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq/PIBIC – Ministério da Ciência e Tecnologia – Brasil), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

¹ Professora Assistente do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – São Paulo (SP), Brasil.

² Professora Adjunta do Departamento de Fisiologia; Responsável pelo Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Porto Alegre (RS), Brasil.

³ Enfermeira e Pós-graduada do Departamento de Fisiopatologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

⁴ Enfermeira e Pós-graduada do Departamento de Cardiologia do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

⁵ Professor Adjunto, Chefe da Disciplina de Endocrinologia e do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – São Paulo (SP), Brasil.

⁶ Livre Docente pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP); Responsável pelo Laboratório de Hipertensão Experimental do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

⁷ Professora Adjunta do Curso de Pós Graduação em Educação Física da Universidade São Judas Tadeu (USJ); Responsável pelo Laboratório do Movimento Humano da Universidade São Judas Tadeu; Pesquisadora Colaboradora da Unidade de Hipertensão do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

after ovariectomy, probably due to an increase of the CAT and SOD activities in the cardiac muscle. These findings suggest an important oxidative stress contribution in cardiovascular dysfunctions observed in women after menopause, reinforcing the importance of hormonal therapy in the management of cardiovascular diseases risk in this group of women.

Introdução

A doença cardiovascular constitui, nos países desenvolvidos, a principal causa de morbi-mortalidade em mulheres após a menopausa, ultrapassando o total de óbitos causados por câncer. No Brasil, as doenças circulatórias representam a principal causa de morte tanto em homens quanto em mulheres. Mansur et al.¹, a partir de dados obtidos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), estudando homens e mulheres com doença circulatória e idade igual ou superior a 30 anos, observaram que, entre 1979 e 1996, o coeficiente médio de morte em mulheres foi de 439.58 por 100 mil habitantes por ano, tendo como principal causa a doença cérebro-vascular.

Estudos experimentais vêm colaborando para o melhor entendimento dos processos envolvidos no aumento do risco cardiovascular após a menopausa^{2,3}. Estes estudos sugerem que o principal mecanismo de cardioproteção dos estrogênios seria a preservação da função endotelial, pela inibição da proliferação da célula muscular lisa, das ações antioxidantes e da melhora da reatividade vascular, os quais induziriam um melhor equilíbrio na função vasodilatadora/vasoconstritora, com conseqüente diminuição dos riscos cardiovasculares⁴.

Considerando especificamente a ação antioxidante atribuída ao estrogênio, número crescente de trabalhos demonstra o papel fundamental do estresse oxidativo na patogênese das doenças cardiovasculares. O aumento da produção das espécies reativas de oxigênio (EAO) contribui para a desregulação de processos fisiológicos, o que resulta nas alterações estruturais e funcionais observadas nas doenças cardiovasculares⁵.

As EAO promovem estresse oxidativo quando as defesas antioxidantes da célula são insuficientes para deter a produção pró-oxidante⁶. Grandes quantidades de EAO, incluindo o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, são produzidas nas células endoteliais, e atuam como importantes sinalizadores intracelulares.

Como as EAO são continuamente formadas em pequenas quantidades pelos processos normais do metabolismo, todas as células aeróbias possuem mecanismos para combater seus efeitos agressivos. A organização estrutural da célula é, por si só, importante para a separação dos reagentes das reações de formação de EAO uns dos outros⁷. O perfeito equilíbrio entre as

enzimas antioxidantes é importante para a manutenção da integridade celular.

Diversos estudos têm evidenciado que a geração de EAO em maiores quantidades causa uma diminuição do óxido nítrico NO biodisponível, o que induz prejuízo na função endotelial, levando a uma redução na vasodilatação dependente do endotélio⁸. O NO pode ser destruído pelo radical superóxido e protegido por neutralizadores de EAO como a superóxido dismutase (SOD)⁹. Dessa forma, a redução na disponibilidade de NO pode resultar não só da diminuição da atividade das vias de produção de NO como também do aumento da inativação oxidativa do NO pelo radical superóxido. A disfunção da vasodilatação dependente do endotélio, associada ao aumento do estresse oxidativo, particularmente com a maior produção do radical superóxido, tem sido observada em pacientes com hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes, em fumantes e idosos^{5,10}.

O importante papel do estresse oxidativo na gênese e na manutenção da hipertensão tem sido confirmado por estudos que demonstram melhora nas disfunções induzidas pela hipertensão após o tratamento com antioxidantes^{11,12}. Não existem dados, entretanto, que relacionem alterações do estresse oxidativo com terapia com estrogênios. Considerando o aumento da prevalência de hipertensão assim como da ocorrência de eventos cardiovasculares fatais ou incapacitantes em mulheres após a menopausa ou durante a privação estrogênica, justifica-se o estudo dos mecanismos envolvidos nessas alterações.

Dentro deste contexto, este estudo experimental tem por objetivo avaliar as alterações do estresse oxidativo pelas medidas da lipoperoxidação (LPO) de membranas e das enzimas antioxidantes.

Métodos

Este trabalho foi submetido e aprovado no Comitê de Ética de Pesquisas em Animais da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Foram utilizadas ratas *Wistar* fêmeas, pesando entre 200 e 300 g, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Os animais foram mantidos agrupados, em ambiente com temperatura controlada (22 a 24°C) e com luz controlada em ciclo de 12:12 horas (claro:escuro). Água e comida foram oferecidas de modo irrestrito, sendo a dieta normoprotéica (12% de proteínas). Os animais foram divididos em

três grupos experimentais a seguir relacionados: grupo controle (GC, n=8), composto por ratas acompanhadas por nove semanas; grupo ooforectomizada (GO, n=10), composto por ratas submetidas à ooforectomia bilateral e acompanhadas por nove semanas e grupo ooforectomizada com suplementação hormonal (GOS), constituído por ratas submetidas à ooforectomia bilateral (nove semanas) e à suplementação com 17 β -estradiol por oito semanas.

■ Ooforectomia bilateral e suplementação hormonal

As ratas foram anestesiadas com cloridrato de cetamina (50 mg/kg, Ketalar[®], Parke-Davis[®]) e cloridrato de xilazina (12 mg/kg, Rompum[®], Bayer[®]), e colocadas em decúbito dorsal. Foi realizada uma pequena incisão (1 cm) em paralelo com a linha do corpo na pele e na musculatura no terço inferior da região abdominal. Os ovários foram então localizados e realizada ligadura dos ovidutos, incluindo os vasos sanguíneos. Os ovidutos foram seccionados e os ovários removidos. A musculatura e a pele foram suturadas e uma dose de antibiótico foi administrada (Benzetacil, 40.000 U/kg, im)^{13,14}.

Sete dias após a ooforectomia foi implantado na região dorsal, no tecido celular subcutâneo, um *pellet* contendo 17 β -estradiol (1,5 mg/8 semanas; Innovative Research of America, Toledo, OH) no grupo submetido à suplementação hormonal¹⁵.

■ Medida de lipoperoxidação e da atividade das enzimas antioxidantes

Nove semanas após a ooforectomia, os animais foram sacrificados por meio da decapitação. O coração foi coletado e congelado (-70°C) para análise de estresse oxidativo pela medida da quimiluminescência (QL) e da atividade das enzimas catalase (CAT), SOD e glutathione peroxidase (GPx).

Para análise, os tecidos foram homogeneizados durante 30 segundos em um homogeneizador Ultra-Turrax (Staufen, Alemanha), com KCl 1,15% (5 mL por grama de tecido) e fluoreto de fenil sulfonila (PMSF), na concentração de 100 mmol/L em isopropanol e na quantidade de 10 μ L/mL de KCl adicionado. O PMSF é um inibidor de proteases e foi utilizado para que não houvesse degradação das enzimas das quais a atividade seria medida. A seguir, os homogeneizados foram centrifugados por dez minutos a 3000 rpm, em centrífuga refrigerada entre 0 e 4°C (Sorval RC 5B-rotor SM24, Du Pont Instruments[®], EUA), e o sobrenadante retirado e congelado em freezer a -70°C para as dosagens posteriores^{14,16}.

Para a detecção da LPO adiciona-se hidroperóxido orgânico de origem sintética (hidroperóxido de tert-butila) ao homogeneizado de tecido, avaliando-se a capacidade

de resposta produzida pela amostra. Os hidroperóxidos são espécies químicas bastante instáveis, reagindo com lipídios da amostra e gerando produtos emissores de luz quantificável. A QL foi medida em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Bromma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. As determinações foram realizadas em câmara escura, em frascos de vidro mantidos na penumbra para evitar a fosforescência ativada pela luz fluorescente. O meio de reação no qual o ensaio foi realizado consistiu em 3,5 mL de uma solução tampão de fosfato 20 mmol/L, contendo KCl 140 mmol/L (pH 7,4), à qual adicionou-se 0,5 mL de homogeneizado. A seguir, foi realizada uma leitura inicial, considerada como a emissão basal de luz pelo homogeneizado. À solução de hidroperóxido de tert-butila na concentração de 400 mmol/L, foram adicionados em 30 μ L no meio de reação para obter-se uma concentração final de 3 mmol/L. Foi medida a emissão de luz e desta foi descontada a emissão basal do homogeneizado para fins de cálculo. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps) por mg de proteína^{14,16,17}.

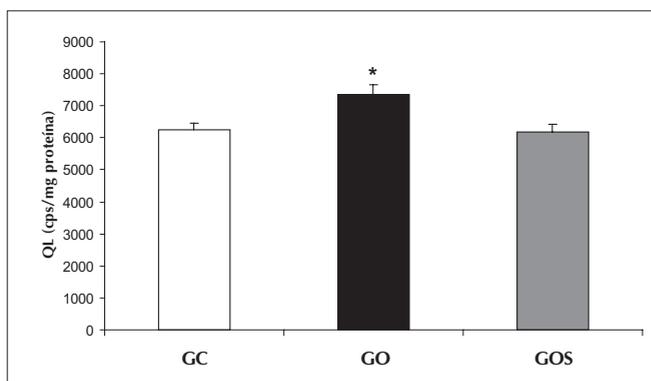
O consumo de H₂O₂ pode ser utilizado como uma medida de atividade da enzima CAT, pois a taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade da CAT, e obedece a uma cinética de pseudo-primeira ordem com relação a este. O ensaio consiste em medir a diminuição da absorvância a 240 nm, comprimento de onda no qual há a maior absorção pelo peróxido de hidrogênio, utilizando-se cubetas de quartzo devido à alta energia do comprimento de onda no qual realizaram-se as medidas. Para a realização das medidas foi usada uma solução tampão constituída de fosfatos a 50 mmol/L em pH 7,4. Após, adicionaram-se 9 μ L deste tampão e 10 μ L de amostra de tecido na cubeta do espectrofotômetro, sendo esta mistura descontada contra um branco de tampão fosfato. A seguir, foram adicionados 35 μ L de peróxido de hidrogênio 0,3 mol/L e monitorada a diminuição da absorvância no comprimento de onda selecionado. Os resultados foram expressos em pmoles por mg de proteína^{14,16}.

A técnica utilizada para determinação da SOD está baseada na inibição da reação do radical superóxido como o pirogalol. O superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol quando em meio básico. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado. No meio de reação, foram utilizados 20 μ L de homogeneizado, 973 μ L

de tampão trifosfato a 50 mmol/L (pH 8,2), 8 µL de pirogalol a 24 mmol/L e 4 µL de CAT a 30 µmol/L. A variação na absorbância foi então acompanhada a 420 nm durante dois minutos. A curva obtida foi utilizada como branco. Também foi feita uma curva padrão utilizando três concentrações distintas de SOD (0,25; 0,5; 1,0 U), por meio da qual obteve-se a equação da reta para realização dos cálculos. Os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector^{14,16}.

Como GPx catalisa a reação de hidroperóxidos com glutatona reduzida (GSH) para formar glutatona oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido, a atividade da enzima pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação da GPx. A atividade da GPx foi medida em um espectrofotômetro de marca Varian, modelo Cary. Foi monitorada a diminuição de absorbância do NADPH a 340 nm. Na cubeta do espectrofotômetro foram adicionados 330 µL de tampão, 50 µL de GSH e 10 µL de GR. A absorbância foi registrada por um período de aproximadamente dois minutos, para obtenção da linha de base. A seguir, foram adicionados 50 µL de hidroperóxido de tert-butila, e a diminuição da absorbância devido ao consumo de NADPH monitorada por mais três minutos. Os resultados foram expressos em mmoles por minuto por mg de proteína^{14,16}.

As proteínas do homogeneizado cardíaco foram quantificadas pelo método descrito por Lowry et al.¹⁸, o que permitiu a normalização das medidas de LPO e enzimas antioxidantes pela quantidade de proteína existente em cada amostra. Em tubos de ensaio, foram adicionados 20 µL de amostra em 0,78 mL de água destilada e 2 mL de reativo C preparado a fresco, guar-



*p<0,05 versus GC e GOS.

Figura 1 - Quiluminescência (QL em cps/mg proteína) no homogeneizado cardíaco nos grupos controle (GC), ooforectomizado (GO) e ooforectomizado + suplementação hormonal (GOS). Os resultados estão expressos como média ± EPM.

dando-se dez minutos. Depois, adicionava-se 0,2 mL do reativo de Folin Ciocalteu, aguardando-se mais 30 minutos. Após, a solução adquiria uma coloração azulada, que foi medida em espectrofotômetro, marca Varian modelo Cary, a 625 nm. O cálculo foi feito utilizando-se um fator de correção médio calculado a partir da curva de calibração construída utilizando-se a solução padrão de albumina bovina. Os resultados foram expressos em mg de proteína.

Dosagem dos níveis plasmáticos de estradiol

Para dosagem dos níveis plasmáticos de estradiol, amostras de sangue foram coletadas no momento da decapitação dos animais, centrifugadas e congeladas. O método utilizado para dosar os estrogênios foi o de QL por imunoensaio competitivo. O aparelho utilizado para esta medida foi o Immulite 2000.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média acompanhada do erro padrão. Para comparação dos grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de um caminho, seguida do teste complementar de Student Newman Keuls. A correlação de Pearson foi utilizada para testar associação entre variáveis. Valores de p<0,05 foram considerados significativos.

Resultados

A seguir, são apresentados os resultados de estresse oxidativo cardíaco, obtidos com o uso das técnicas já descritas, como a medida de QL e a medida da atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx e SOD.

Medidas de lipoperoxidação

A análise de variância de uma via mostrou diferença significativa entre os grupos (p<0,02; F=7,49) na LPO avaliada pelo método da QL. Foi observado que o GO (7348±312 cps/mg proteína) apresentou um aumento significativo da QL em relação ao GC (6250±211 cps/mg proteína, p<0,01) conforme Figura 1. A reposição hormonal reduziu a QL no GOS (6170±237 cps/mg proteína, p<0,01) em comparação ao GO. Não houve diferenças entre o GC e o GOS na QL do tecido cardíaco, evidenciando normalização da LPO de membrana após a reposição hormonal.

Medidas das enzimas antioxidantes

A análise de variância de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos quanto à atividade da enzima CAT (p<0,03; F=4,44). Foi observado que o GO apresentou uma redução significativa de 35% em

Tabela 1 - Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) no homogeneizado cardíaco nos grupos controle (GC), ooforectomizado (GO) e ooforectomizado + suplementação hormonal (GOS).

| Grupos/enzima | CAT (pmoles/mg proteína) | GPx (µmoles/min/mg proteína) | SOD (U SOD/mg proteína) |
|---------------|-----------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| GC | 3,9±0,1 | 3,5±0,3 | 42±3 |
| GO | 3,2±0,2* | 3,6±0,2 | 31±1* |
| GOS | 4,1±0,3 | 3,4±0,4 | 46±4 |

Os resultados estão expressos como média ± EPM.

*p<0,05 versus GC e GOS.

relação ao GC (p<0,05), enquanto que a atividade da CAT no GOS aumentou em 48% em relação ao GO (p<0,05) conforme Tabela 1.

Quanto à atividade da enzima GPx, a análise de variância de uma via não demonstrou diferença significativa entre os grupos estudados.

Houve diferença significativa quanto à atividade da enzima SOD, avaliada pelo método do pirogalol (p<0,0001; F=14,8). Houve diminuição de 22% na atividade da SOD no grupo GO em relação ao GC (p<0,001). No grupo GOS, houve aumento de 28% da atividade desta enzima em relação ao GO (p<0,001). Não houve diferença entre o GC e o GOS (Tabela 1).

Foi obtida uma correlação positiva (r=0,7; p<0,001) entre a atividade da CAT e da SOD nos grupos ooforectomizados, demonstrando que animais com maior atividade da CAT apresentavam maior atividade da SOD (Figura 2).

Concentrações séricas de estradiol

As concentrações séricas de 17 β-estradiol foram reduzidas no GO, confirmando a eficácia da cirurgia de ooforectomia (p<0,0001). Após a reposição hormonal, observaram-se concentrações séricas de 17β-estradiol semelhantes entre o GC e o GOS (p<0,0001), evidenciando que a suplementação hormonal normalizou as concentrações de estradiol (Figura 3).

Discussão

A partir dos resultados obtidos no Women's Health Initiativ, e os riscos e benefícios da terapia hormonal para cada mulher começaram a ser questionados. Desde então se busca um melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos desencadeados pela suplementação hormonal, a fim de que esta terapia possa ser aplicada com mais segurança e maior eficácia no manejo das disfunções observadas na mulher durante climatério.

Com o objetivo de entender os efeitos da terapia hormonal sobre o estresse oxidativo e nas enzimas antioxidantes no miocárdio, utilizamos um modelo experimental de menopausa aceito na literatura, a ooforectomia^{13-15,19}. As avaliações de estresse oxidativo

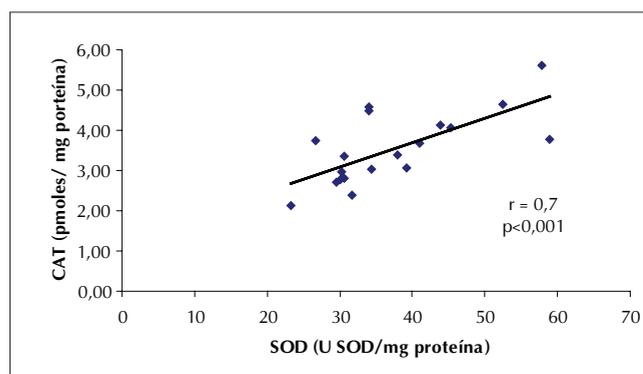
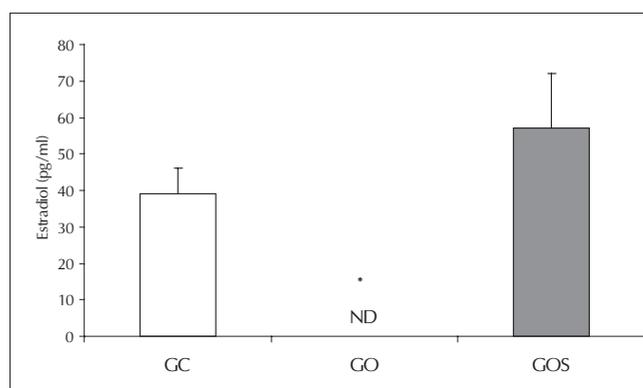


Figura 2 - Correlação positiva (r=0,7, p<0,001) obtida entre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e a atividade da enzima catalase (CAT) nos grupos ooforectomizados.



*p<0,05 versus GC e GOS. ND=não dosável.

Figura 3 - Níveis plasmáticos de 17β-estradiol (pg/ml) nos grupos controle (GC), ooforectomizado (GO) e ooforectomizado + suplementação hormonal (GOS). Os resultados estão expressos como média ± EPM.

no presente estudo foram efetuadas em tecido cardíaco de ratas submetidas ou não a um longo período (nove semanas) de privação dos hormônios ovarianos. Vale destacar que o risco de eventos cardiovasculares aumenta muito após a menopausa, sendo fundamental avaliar se o estresse oxidativo estaria participando nas disfunções cardiovasculares observadas durante climatério, bem como se a reposição hormonal poderia atenuar ou prevenir tais alterações. Além disto, vale destacar que, recentemente, o foco dos benefícios produzidos pelos estrogênios tem mudado do sistema vascular para o miocárdio. Isto porque foram identificados receptores

estrogênicos no coração, capazes de regular a expressão gênica de várias proteínas como a α -miosina de cadeia pesada, muito abundante no coração²⁰.

Os principais achados deste estudo foram que a privação dos hormônios ovarianos por nove semanas induziu aumento do estresse oxidativo associado à redução da atividade de enzimas antioxidantes em ratas e que a reposição com 17 β -estradiol (oito semanas) foi capaz de prevenir tais disfunções.

Para a avaliação dos níveis da LPO, foi utilizada a QL. Observou-se que houve um aumento significativo da LPO por QL no tecido cardíaco do GO e uma diminuição significativa após a reposição hormonal no GOS, não havendo diferença entre o GC e o GOS. Estes resultados demonstram claramente que a privação dos hormônios ovarianos induz aumento de estresse oxidativo no tecido cardíaco e que a presença do hormônio 17 β -estradiol pode evitar tal disfunção, possivelmente devido à potente ação antioxidante deste hormônio, já descrita²¹. Estes resultados obtidos em nosso estudo concordam com a literatura²²⁻²⁶. Este papel antioxidante do estrogênio é devido, em parte, a sua estrutura hidrofênolica, que pode doar átomos de hidrogênio para radicais lipídicos, como o peróxido, terminando assim com a reação em cadeia da LPO. Assim, o estrogênio age como um neutralizador de radical livre. Este papel é uma atividade *per se*, ou seja, do próprio hormônio. O estrogênio, além de agir como antioxidante direto, pode também ativar receptores, modular neurotransmissores²⁵ e estimular a expressão de enzimas antioxidantes²⁴.

A ooforectomia (nove semanas) reduziu significativamente a atividade da SOD e da CAT em relação a ratas controles. Um estudo anterior de nosso grupo demonstrou redução da SOD e manutenção da CAT sete dias após a ooforectomia¹⁹. A redução da SOD após a ooforectomia poderia estar associada a maior concentração de ânion superóxido, que poderia contribuir para a disfunção cardiovascular observada após a privação dos hormônios ovarianos²⁷. Todavia, a reposição hormonal normalizou a atividade destas enzimas antioxidantes. Estes resultados sugerem que a redução desta defesa enzimática possa contribuir para o aumento da LPO no GO. Esses resultados comprovam os achados de que o estrogênio administrado exogenamente aumenta a atividade da SOD no rim²⁸. A redução da atividade da CAT pela castração sugere que os animais ooforectomizados apresentam uma elevação na concentração de peróxido de hidrogênio, detoxificado pela CAT.

Esta hipótese foi comprovada pela demonstração de que a ooforectomia aumenta a LPO, por aumentar a produção de peróxido de hidrogênio²⁹. Além disto, nosso achado concorda com os resultados obtidos em

ratas fêmeas *Sprague-Dawley* ooforectomizadas de normalização da atividade da enzima CAT no fígado após reposição estrogênica²³.

A correlação positiva observada entre as atividades das enzimas CAT e SOD nos grupos ooforectomizados reforça a integração destas enzimas na eliminação das EAO. O radical superóxido é convertido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela SOD, que é encontrada em quantidades elevadas nas células de mamíferos. Por sua vez, o H₂O₂ é metabolizada pela catalase com a produção de água e oxigênio. Dessa forma, o aumento conjunto destas enzimas no GOS poderia estar relacionado à maior eficácia na eliminação de EAO, induzindo redução no estresse oxidativo nestes animais.

Ao contrário do observado para a atividade da CAT e da SOD, a atividade da enzima GPx não apresentou diferença entre os animais estudados em função da variação dos hormônios ovarianos. De fato, estudos anteriores de nosso grupo demonstraram que a privação dos hormônios ovarianos por sete dias não alterou a atividade da GPx no músculo cardíaco de ratas fêmeas¹⁹. Esses achados sugerem que a CAT e a SOD estejam mais envolvidas na detoxificação de espécies reativas de oxigênio no tecido cardíaco induzida pela privação dos hormônios ovarianos do que a GPx.

Recentemente, demonstramos que o treinamento físico aeróbio foi capaz de reduzir o estresse oxidativo e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes (CAT e SOD) no coração e no músculo gastrocnemius de ratas ooforectomizadas¹⁴. Nesse trabalho, a melhora do perfil oxidativo no miocárdio foi correlacionada à redução dos níveis pressóricos e melhora na sensibilidade dos pressoreceptores, o mais rápido regulador da pressão arterial em curto prazo¹⁴. Considerando que os dados do presente estudo demonstram que a reposição com 17 β -estradiol reduz o estresse oxidativo e aumenta as enzimas antioxidantes de forma semelhante ao observado por nós anteriormente, é plausível se supor que a melhora no balanço pró/antioxidante nos animais ooforectomizados com terapia de reposição hormonal estivesse associada à redução das disfunções cardiovasculares observadas após a privação dos hormônios ovarianos. Reforçando esta hipótese, foi demonstrado que a administração de estradiol reduziu a pressão arterial e aumentou a condutância vascular em ratas ooforectomizadas¹⁵. Esses efeitos foram relacionados à maior produção de NO e/ou redução do estresse oxidativo, os quais induziriam melhora da função endotelial.

Concluindo, os achados do presente estudo reforçam a participação do estresse oxidativo nas disfunções cardiovasculares observadas na mulher após a menopausa e sugerem um papel importante da reposição hormonal no manejo do risco cardiovascular no climatério.

Referências

- Mansur AP, Favarato D, Souza MFM, Avakian SD, Aldrighi JM, Cesar LAM, et al. Tendência do risco de morte por doenças circulatórias no Brasil de 1979 a 1996. *Arq Bras Cardiol.* 2001; 76(6):497-510.
- Adams S, Williams V, Vessey MP. Cardiovascular disease and hormone replacement treatment: a pilot case-control study. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1981; 282(6272):1277-8.
- Shwaery GT, Vita JA, Keaney JF Jr. Antioxidant protection of LDL by physiological concentrations of 17 beta-estradiol. Requirement for estradiol modification. *Circulation.* 1997; 95(6):1378-85.
- Lima SM, Aldrighi JM, Consolim-Colombo FM, Mansur Ade P, Rubira MC, Krieger EM, Ramires JA. Acute administration of 17beta-estradiol improves endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women. *Maturitas.* 2005; 50(4):266-74.
- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000; 87(10):840-4.
- Nordmann R. Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol Alcohol.* 1994; 29(5):513-22. Review.
- Dormandy TL. Free-radical oxidation and antioxidants. *Lancet.* 1978; 1(8065):647-50.
- Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* 1990; 323(1):22-7.
- Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature.* 1986; 320(6061):454-6.
- Berry C, Brosnan MJ, Fennell J, Hamilton CA, Dominiczak AF. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2001; 10(2):247-55.
- Atarashi K, Ishiyama A, Takagi M, Minami M, Kimura K, Goto A, Omata M. Vitamin E ameliorates the renal injury of Dahl salt-sensitive rats. *Am J Hypertens.* 1997; 10(5 Pt 2):116S-119S.
- Usui M, Egashira K, Kitamoto S, Koyanagi M, Kato M, Kataoka C, et al. Pathogenic role of oxidative stress in vascular angiotensin-converting enzyme activation in long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension.* 1999; 34(4 Pt 1):546-51.
- Latour MG, Shinoda M, Lavoie JM. Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *J Appl Physiol.* 2001; 90(1):235-41.
- Irigoyen MC, Paulini J, Flores LJ, Flues K, Bertagnoli M, Moreira ED, et al. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. *Hypertension.* 2005; 46(4):998-1003.
- Hernandez I, Delgado JL, Diaz J, Quesada T, Teruel MJ, Llanos MC, et al. 17- β -estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000; 279(5):R1599-605.
- De Angelis KL, Cestari IA, Barp J, Dall'Ago P, Fernandes TG, de Bittencourt PI, et al. Oxidative stress in latissimus dorsi muscle of diabetic rats. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33(11):1363-8.
- Gonzalez-Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Radic Biol Med.* 1991; 10(2):93-100.
- Lowry OH, Rosenbrough NT, Farr AL. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-75.
- Barp J, Araujo AS, Fernandes TR, Rigatto KV, Llesuy S, Bello-Klein A, et al. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35(9):1075-81.
- Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, Stimpel M, Karas RH, Vetter H, Neyses L. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett.* 1997; 416(1):107-12.
- Dubey RK, Jackson EK. Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical and molecular mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001; 280(3):F365-88.
- Ide T, Tsutsui H, Ohashi N, Hayashidani S, Suematsu N, Tsuchihashi M, et al. Greater oxidative stress in healthy young men compared with premenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22(3):438-42.
- Ozgonul M, Oge A, Sezer ED, Bayraktar F, Sozmen EY. The effects of estrogen and raloxifene treatment on antioxidant enzymes in brain and liver of ovariectomized female rats. *Endocr Res.* 2003; 29(2):183-9.
- Borras C, Sastre J, Garcia-Sala D, Lloret A, Pallardo FV, Vina J. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34(5):546-52.
- Oge A, Sezer ED, Ozgonul M, Bayraktar F, Sozmen EY. The effects of estrogen and raloxifene treatment on the antioxidant enzymes and nitrite-nitrate levels in brain cortex of ovariectomized rats. *Neurosci Lett.* 2003; 338(3):217-20.
- Tam NM, Ghatak S, Ho SM. Sex hormone-induced alterations in the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation status in the prostate of Noble rats. *Prostate.* 2003; 55(1):1-8.
- Barbacanne MA, Rami J, Michel JB, Souchard JP, Philippe M, Besombes JP, et al. Estradiol increases rat aorta endothelium-derived relaxing factor (EDRF) activity without changes in endothelial NO synthase gene expression: possible role of decreased endothelium-derived superoxide anion production. *Cardiovasc Res.* 1999; 41(3):672-81.
- Oberley TD, Shultz JL, Oberley LW. In vitro modulation of antioxidant enzyme levels in normal hamster kidney and estrogen-induced kidney tumor. *Free Radic Biol Med.* 1994; 16(6):741-51.
- Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohe C, Laufs K, et al. Modulation of antioxidant enzyme expression function by estrogen. *Circ Res.* 2003; 93(2):170-7.