

Marina Delgobo

Efeito da N-acetilcisteína e Ácido- α -Lipóico sobre as alterações oxidativas, inflamatórias e metabólicas em modelo de depleção hormonal induzida por ovariectomia

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Alfeu Zanotto Filho

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Delgobo, Marina

Efeito da N-acetilcisteína e Ácido-alfa-Lipóico sobre as alterações oxidativas, inflamatórias e metabólicas em modelo de depleção hormonal induzida por ovariectomia / Marina Delgobo ; orientador, Alfeu Zanotto Filho, 2019.

93 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

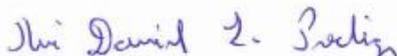
1. Farmacologia. 2. Antioxidantes. 3. Estradiol. 4. Estresse Oxidativo. 5. Menopausa. I. Zanotto Filho, Alfeu. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

"Efeito da N-acetilcisteína e Ácido- α -Lipóico sobre as alterações oxidativas, inflamatórias e metabólicas em modelo de depleção hormonal induzida por ovariectomia"

Por

Marina Delgobo

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (007/2018/PPGFMC) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

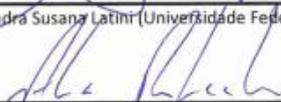
Banca examinadora:



Dr. Alfeu Zanotto Filho (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador



Dr.ª Alexandra Susana Latini (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. Alex Rafacho (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 22 de fevereiro de 2019.

*Aos meus pais Bernadeth e Luiz e ao meu
irmão Murilo, por tudo que me proporcionaram em
minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, de modo geral, a todos que fizeram parte deste trabalho, seja me ajudando em minha vida pessoal ou profissional, cada um, de alguma forma, contribuiu para que eu chegasse aqui. Passou rápido, foram muitos desafios, conquistas, alegrias e frustrações, mas que serviram para o meu crescimento.

Segundo Augusto Cury “Professores brilhantes ensinam para uma profissão. Professores fascinantes ensinam para a vida”, eu tive a honra de ter “os dois” em uma pessoa só, o qual com certeza teve maior influência sobre o meu crescimento e que sou extremamente grata por tudo. Nestes dois anos tive o prazer de ter um orientador que fez muito mais que orientar, que me mostrou o caminho, sempre disposto, sempre me ajudando, sempre muito paciente, muito mais que um admirável Professor, um amigo em que pude contar e desabafar em qualquer momento. Muito obrigada por tudo Professor Alfeu!

O laboratório foi por muitas vezes minha segunda casa, ou até mesmo a primeira. Gostaria de agradecer aos meus colegas de “lab” que me ajudaram e incentivaram, em momentos tristes e felizes, Rosângela, Jonathan e Vitória; com certeza o dia a dia ficou mais leve com vocês! Aos meus colegas da pós, por mais que não nos víamos todos os dias, foram muito importantes nesta jornada, bem como todos os professores que conheci, foram muitos ensinamentos e motivações!

Creio que tive uma terceira casa, o LAMEB, agradeço muito a todos, em especial ao Denis, Vanessa e Laise. Este trabalho pode ser realizado graças aos equipamentos, ajuda e suporte deles! Assim como o uso dos equipamentos do laboratório Nolab (Dr. Jamil Assreuy Filho) e Lidi (Dr. André Báfica) pelo suporte técnico e infraestrutura laboratorial. Também, não posso deixar de mencionar e agradecer a Dra. Luciana Aparecida Honorato, a qual me ajudou e ensinou as técnicas para fazer a cirurgia (ovariectomia), e ao Professor Dr. Tonussi por conceder o uso do biotério.

Aos professores que compuseram a banca de avaliação desse trabalho: Alex Rafacho e Alexandra Susana Latini e aos membros suplentes Aurea Elizabeth Linder e Rozangela Curi Pedrosa, obrigada por aceitarem o convite, pela disponibilidade e contribuições.

Gostaria de agradecer ao CNPq pela concessão de bolsa de mestrado, ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, à UFSC e a agência de fomento CAPES por todo suporte.

Aos meus amigos, desde os mais antigos aos mais recentes, todos tiveram uma importância para mim, aos de Ponta Grossa, Rafa, Vane, Karol, Tali e Rayson, obrigada por sempre estarem presente, em todos os momentos, em especial gostaria de agradecer a Rafa, uma amiga que sempre pude contar, para qualquer coisa. Aos meus amigos de Floripa, Fran, Andy e Carol, acredito muito que o destino colocou vocês em meu caminho, em especial gostaria de agradecer a Fran, que em meus altos e baixos sempre esteve presente, foi mais que uma amiga, foi como uma irmã!

Com certeza tudo isto foi possível graças aos meus pais, Bernadeth e Luiz, que não mediram esforços para sempre me dar um ótimo ensino e me apoiar em minhas decisões, é difícil ficar longe de vocês, a saudade sempre é grande, mas saber e ter o incentivo e amor de vocês me dá muita força para eu seguir em frente para onde quer que seja, obrigada por todo carinho e compreensão. Agradeço também ao meu irmão Murilo por toda ajuda e incentivo na pesquisa! Por fim, gostaria de deixar minha singela homenagem a minhas avós Mama e Denny que partiram em 2018, mas que sempre estarão presentes em meu coração.

“Antes que você possa alcançar o topo de uma árvore e entender os brotos e as flores, você terá de ir fundo nas raízes, porque o segredo está lá. E, quanto mais fundo vão as raízes, mais alto vai a árvore.”

(Nietzsche, 1883)

RESUMO

O envelhecimento celular e as alterações metabólicas, de modo geral, estão associados ao aumento do estresse oxidativo e da inflamação crônica e de baixo grau, os quais afetam e causam danos teciduais mais frequentemente em mulheres na fase da menopausa e pós-menopausa. O objetivo deste estudo foi avaliar os marcadores enzimáticos e não-enzimáticos de estresse oxidativo, disfunções do perfil lipídico e parâmetros pró-inflamatórios em ratas ovariectomizadas (OVX), avaliando o impacto e as diferenças entre o perfil destes animais com uma curta duração da retirada dos ovários (OVX com 15 dias) e uma longa duração (OVX com 60 dias). No protocolo de curta duração, os animais foram operados e randomizados em grupos falso-operados (SHAM) ou OVX, tratados com veículo ou Estradiol (E2) durante 15 dias. No protocolo de 60 dias, os grupos SHAM e OVX foram tratados com veículo (10 mM PBS), e os outros quatro grupos OVX foram tratados com NAC (N-acetilcisteína) 10 e 25 mg/kg, ou LA (ácido-alfa-lipoico) 25 e 50 mg/kg, a cada 48 h, todos por gavagem. Os resultados demonstraram que os animais OVX apresentaram ganho de peso corporal e de gordura retroperitoneal, atrofia uterina, aumento dos níveis séricos de TNF- α , IL-6 e colesterol total, quando comparados aos animais SHAM. Além disso, marcadores de estresse oxidativo no soro, coração, fígado e rim (como TBARS, carbonil e sulfidril) foram alterados para um status pró-oxidante pela OVX, havendo também a depleção de GSH e antioxidantes totais não enzimáticos, bem como a diminuição da atividade de Glutaciona Peroxidase (GPx) e Glutaciona redutase (GR). Entretanto isto não ocorreu com as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). A suplementação com NAC e LA preveniu a depleção de GSH e dos antioxidantes não enzimáticos, bem como impediu a diminuição da atividade de GPx e GR, e o aumento de TNF- α , IL-6 e colesterol induzidos pela OVX de longa duração. Os efeitos da NAC e LA demonstraram ser independentes da ativação de NRF2 ou da atividade similar ao E2, uma vez que estes antioxidantes não promoveram a ativação de NRF2 e não foram capazes de simular os efeitos fenotípicos observados em ratas OVX suplementadas com E2. Esses achados nos fornecem evidências para uma relação entre a depleção de hormônios sexuais femininos, o aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a inflamação crônica e de baixo grau juntamente com distúrbios metabólicos. O tratamento com antioxidantes como NAC e LA pode ser útil para melhorar essa condição por meio de mecanismos independentes de ação tipo-estrogênio, podendo ser

utilizados para amenizar os danos causados pelo envelhecimento celular e perda hormonal, especialmente em mulheres em menopausa que não são elegíveis ou não respondem à terapia de reposição hormonal.

Palavras-chave: Menopausa. Estradiol. Antioxidantes. Estresse Oxidativo. Citocinas. Envelhecimento.

ABSTRACT

Sexual hormone deficiency has been associated with metabolic changes, oxidative stress and subclinical inflammation in postmenopausal women. Hormone replacement therapies are effective in many instances, even though many patients either do not respond or are not eligible. The aim of this study was to evaluate the impact of short- (15 d) versus long-term (60 d) sexual hormone depletion and whether antioxidant supplementation with N-acetylcysteine (NAC) and alpha-Lipoic acid (LA) improves oxidative stress, metabolic, and inflammatory parameters in ovariectomized (OVX) rats. Short-term OVX rapidly depleted circulating estrogen, causing uterine atrophy and body weight gain without affecting oxidative damage, inflammatory and lipid metabolism markers. In contrast, long-term OVX augmented oxidative damage in serum and peripheral tissues as well as increased serum total cholesterol, TNF- α and IL6 levels. Triglycerides, glucose and HDL cholesterol were not altered. Long-term OVX-induced oxidative stress was associated with depletion of GSH and total non-enzymatic antioxidants as well as decreased activity of Glutathione Peroxidase (GPx) and Glutathione Reductase (GR), but not superoxide dismutase and catalase. NAC and LA supplementation prevented GSH and total non-enzymatic antioxidants depletion as well as restored GPx and GR enzyme activities, TNF- α , IL6 and cholesterol in OVX rats. NAC and LA effects appear to be independent on NRF2 activation or estrogen-like activity, since NAC/LA did not promote NRF2 activation and were not able to emulate estrogen effects in OVX rats and estrogen-receptor-positive cells. The herein presented data suggest that NAC and LA may improve some deleterious effects of sexual hormone depletion via estrogen-independent mechanisms.

Keywords: Menopause. Estradiol. Antioxidants. Oxidative Stress. Cytokines. Aging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Perda da função ovariana na menopausa.....	21
Figura 2: Síntese de estrogênio no ovário	23
Figura 3: Mecanismos de ação dos estrogênios	26
Figura 4: Consequências do aumento de ERO nuclear e citoplasmático	28
Figura 5: Manutenção celular da homeostase redox	33
Figura 6: Ciclo catalítico da Glutaciona.	34
Figura 7: Estrutura química do Ácido- α -lipóico.....	41
Figura 8: Estrutura química da N-acetilisteína	42
Figura 9: Efeito temporal da OVX no ganho de peso corporal, inflamação, metabolismo lipídico e marcadores de estress oxidativo	53
Figura 10: Efeito da suplementação de NAC e LA sobre marcadores de danos oxidativos em tecidos periféricos de ratas OVX.....	55
Figura 11: Efeito da suplementação antioxidante sobre o potencial antioxidante não enzimático e os níveis de glutaciona em tecidos periféricos de ratas OVX.....	56
Figura 12: Efeito da atividade das enzimas antioxidantes em tecidos periféricos de ratas OVX tratados com NAC e LA.....	58
Figura 13: Efeitos de NAC e LA são independentes da ativação de NRF2 ou atividade estrogênica.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito da suplementação com os antioxidantes NAC e LA sobre o perfil lipídico, citocinas inflamatórias e marcadores séricos de toxicidade tecidual no modelo OVX de longa duração.....	59
Tabela 2: Efeito da suplementação com os antioxidantes NAC e LA sobre o perfil hematológico de animais OVX.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH – Dicloridrato do 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina);
ALT - Alanina aminotransferase;
AP1 – Proteína ativadora 1
CAT – Catalase;
CDNB – 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno;
COX – Cicloxigenase;
DMEM – (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*);
DMSO – Dimetilsulfóxido;
DNPH – 2,4-Dinitrofenilhidrazina;
DTNB – Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico);
E2 – Estradiol;
EREs – Elemento responsivos ao estrogênio (do inglês *Estrogen Response Elements*);
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético;
ERO – Espécies reativas de oxigênio;
ERN – Espécies reativas de nitrogênio;
FSH – Hormônio folículo-estimulante;
GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina;
GPx – Glutaciona peroxidase;
GR – Glutaciona redutase;
GSH – Glutaciona;
GSSG – Glutaciona oxidada;
HCL – Ácido clorídrico;
HDL – Lipoproteína de alta densidade;
IL-x – Interleucina x;
i.p – Intraperitoneal
LA – Ácido- α -lipóico;
LH – Hormônio luteinizante;
LDL – Lipoproteína de baixa densidade;
MCF-7 – Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano;
MDA – Malondialdeído;
MTT – (3-(4,5-dimetil)-2,5-difenil tetrazólio);
NAC – N-acetilcisteína;
NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina;
NF-kB – (do inglês, *Factor Nuclear Kappa B*);
NRF2 – (do inglês, *Nuclear Factor E2-related factor 2*);
OVX – Ovariectomia;
S.C – Subcutâneo;
SOD – Superóxido Dismutase;

TBA – Ácido Tiobarbitúrico;

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α ;

TRH – Terapia de reposição hormonal;

VLDL – Lipoproteína de densidade muito baixa.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 MENOPAUSA: ASPECTOS CLÍNICOS DA DEPLEÇÃO HORMONAL	19
1.2 ESTRADIOL	22
1.2.1 Ações	22
1.2.2 Sinalização	24
1.3 ESPÉCIES REATIVAS, ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO	26
1.4 ALTERAÇÕES OXIDATIVAS ASSOCIADAS À “DEPLEÇÃO” DE HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS	35
1.5 ALTERAÇÕES METABÓLICAS E INFLAMATÓRIAS NA MENOPAUSA.....	36
1.6 REPOSIÇÃO HORMONAL: BENEFÍCIOS E LIMITAÇÕES	38
1.7 ÁCIDO- α -LIPÓICO (LA) E N-ACETÍLCISTEINA (NAC)	40
2. OBJETIVOS	43
2.1 OBJETIVO GERAL	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 MATERIAIS.....	44
3.2 OVARECTOMIA BILATERAL (OVX)	44
3.3 TRATAMENTO.....	45
3.4 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS	45
3.5 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	46
3.6 ELISA: TNF- α , IL-6 e 17- β -estradiol	46
3.7 PRODUTOS FINAIS DE LIPOPEROXIDAÇÃO (TBARS) ..	46

3.8	CARBONIL (PROTEÍNAS CARBONILADAS)	47
3.9	TIOL REDUZIDO TOTAL (R-SH)	47
3.10	QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONA (GSH)	47
3.11	MEDIDA DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES TOTAIS NÃO ENZIMÁTICAS (ENSAIO TRAP)	48
3.12	ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx) ..	48
3.13	ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE (GR)	49
3.14	ATIVIDADE DA CATALASE (CAT).....	49
3.15	ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)....	49
3.16	CULTURA CELULAR.....	50
3.17	VIABILIDADE CELULAR	50
3.18	WESTERN BLOTTING	50
3.19	ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4.	RESULTADOS	52
4.1	EFEITOS A CURTO E LONGO PRAZO ASSOCIADOS À DEPLEÇÃO HORMONAL ATRAVÉS DA OVARECTOMIA (OVX) EM RATAS Wistar.....	52
4.2	EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE NAC E LA SOBRE MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS EM TECIDOS PERIFÉRICOS DE RATAS OVX	54
4.3	EFEITO PÓS-OVX DE LONGA DURAÇÃO (60 DIAS) PERMITIU A DEPLEÇÃO DE ANTIOXIDANTES NÃO- ENZIMÁTICOS E AFETOU O SISTEMA GPX/GR/GSH.....	54
4.4	EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE NAC E LA SOBRE O PERFIL LIPÍDICO; CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E MARCADORES SÉRICOS DE TOXICIDADE TECIDUAL NO MODELO OVX DE LONGA DURAÇÃO	58
4.5	EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM OS ANTIOXIDANTES NAC E LA SÃO INDEPENDENTES DA ATIVIDADE DE NRF2 E DE ATIVIDADE ESTROGÊNICA.....	60
5.	DISCUSSÃO	64

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
REFERÊNCIAS.....	73
APÊNDICE A.....	86

1. INTRODUÇÃO

1.1 MENOPAUSA: ASPECTOS CLÍNICOS DA DEPLEÇÃO HORMONAL

O envelhecimento é um processo multifatorial determinado pelo declínio fisiológico, bioquímico e funcional dos órgãos. Segundo dados da OMS (Organização Mundial da Saúde, 2016), de modo global, a expectativa de vida está crescendo consideravelmente, logo cresce o número de mulheres que atingem a fase da menopausa e pós-menopausa, podendo esta fase preencher até um terço do tempo de suas vidas.

O termo "menopausa" foi usado pela primeira vez em um artigo em 1821 por Gardanne. Entretanto, há relatos de que há mais de dois mil anos atrás, o filósofo Aristóteles (384-322 A.C) já observava que a maioria das mulheres perdia a fertilidade a partir dos 40 anos de idade. De fato, apenas no final do século XIX obteve-se uma compreensão clara da ligação entre o final da menstruação, perda da função ovariana, e os sintomas fisiológicos desta condição. Os tratamentos eram em sua maioria ineficazes e muitas vezes perigosos (BABER; WRIGHT, 2017). Um importante ginecologista britânico, Edward Tilt, fundador da *London Obstetric Society* e o psiquiatra britânico Henry Maudsley, acreditavam que a menopausa era uma espécie de loucura, a qual levava à instabilidade mental. Alguns dos tratamentos utilizados incluíam sedativos, emplastros de beladona, ópio entre outros. No século XX, houve uma revolução na endocrinologia reprodutiva. Em 1923, Allen e Doisy conseguiram isolar a molécula de estrogênio e, em 1929, Butenandt ganhou o Prêmio Nobel por isolar os estrogênios da urina de mulheres grávidas e identificar a fórmula estrutural da substância pura, conhecida como estrona (BUTENANDT, 1929; HERTIG, 1983; FOXCROFT, 2011).

Em 1966, Robert Wilson publicou: *Feminine Forever*, em que ele traz a menopausa como sendo uma condição ocasionada pela deficiência hormonal, sendo curável e totalmente evitável. Após este achado, teve-se outra visão sobre a menopausa e, em 1978, foi criada a Sociedade Internacional de Menopausa, a qual durante o período de 2014 – 2016 esteve presente em 30 congressos científicos em todo o mundo, com o objetivo principal de melhorar a saúde e o bem-estar das mulheres na menopausa e pós-menopausa (BABER e WRIGHT, 2017).

A menopausa é um evento que comumente inicia-se por volta dos 45 até 55 anos de idade e que determina, paulatinamente, o fim da fase

fértil feminina (Consenso Nacional de Menopausa, 2016), sendo a mulher considerada menopáusicas após completar 12 meses de ausência de menstruação (MIQUEL et al., 2006). Esta condição pode ser por condições genéticas; deficiências enzimáticas; doenças autoimunes; secundária à quimioterapia e/ou radioterapia; infecções; menopausa cirúrgica; histerectomia; embolização das artérias uterinas; entre outros (BABER; PANAY; FENTON, 2016).

Este evento é caracterizado pela falência ovariana, que afeta os níveis dos hormônios sexuais circulantes, estrogênio e progesterona, cuja diminuição está associada com o aumento da incidência de disfunções e patologias típicas do processo do envelhecimento celular, direcionando ao sobrepeso e obesidade, hipotireoidismo, hipercolesterolemia, disfunções cardiovasculares (aterosclerose e hipertensão), osteoporose, alterações climatéricas, cânceres como o de mama, bem como transtornos de humor (ansiedade e depressão) (PHILLIPS et al., 1997; GU et al., 2011; HUSSAN et al., 2012 e GRAZIOTTIN e SERAFINI, 2009). Adicionalmente, o processo de envelhecimento acentuado pela menopausa está intimamente relacionado com o aumento nos níveis de agentes pró-oxidantes nos tecidos e citocinas pró-inflamatórias circulantes e teciduais, os quais afetam de modo crônico e gradual a função celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Dentre todas essas possíveis alterações que surgem com o envelhecimento celular, está a produção dessincronizada de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) e diminuição da liberação de LH (hormônio luteinizante) pela adeno hipófise. Essas alterações do sistema nervoso central, juntamente com o declínio ovariano prejudicam a maturação dos folículos ovarianos, a produção de hormônios (inibina B, hormônio anti-Mülleriano (AMH) e estradiol) e a ovulação, levando a irregularidades e alterações no ciclo reprodutivo, igualmente como o aumento da expressão de FSH (hormônio folículo-estimulante) (Figura 1) (DAVIS et al., 2015).

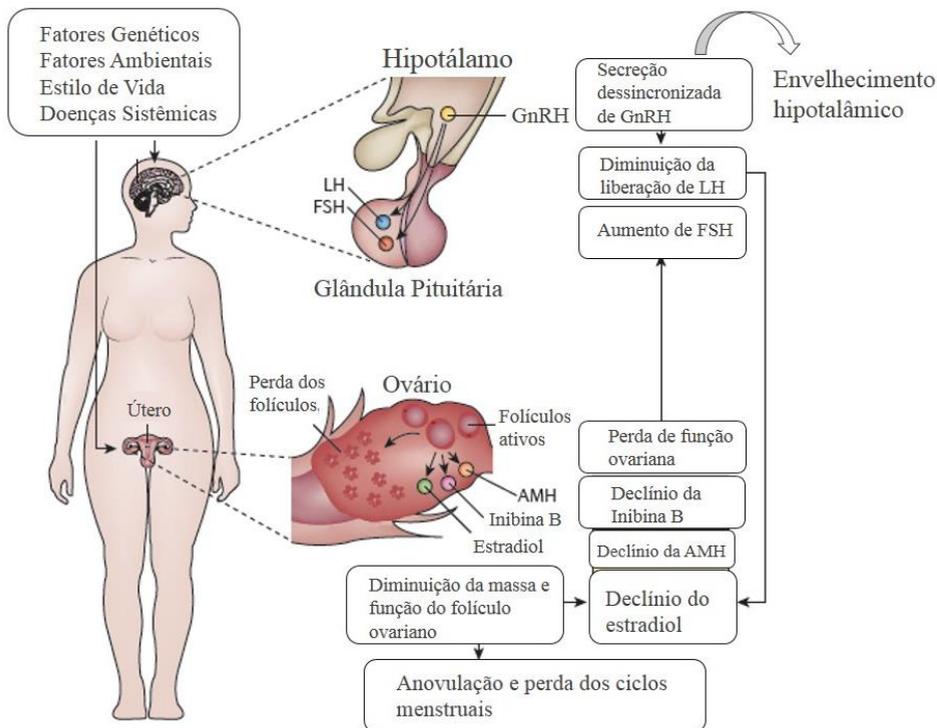


Figura 1: Perda da função ovariana na menopausa. O envelhecimento hipotalâmico e ovariano causam a produção dessincronizada de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) e diminuição da liberação de LH (hormônio luteinizante) pela adeno hipófise. Essas alterações do sistema nervoso central, juntamente com o declínio ovariano prejudicam a maturação dos folículos ovarianos, a produção de hormônios (inibina B, hormônio anti-Mülleriano (AMH) e estradiol) e a ovulação, levando a irregularidades e alterações no ciclo reprodutivo, igualmente como o aumento da expressão de FSH (hormônio foliculo-estimulante) (Adaptado de: DAVIS et al., 2015).

1.2 ESTRADIOL

1.2.1 Ações

O hormônio estrogênio é produzido principalmente nos ovários, corpo lúteo e placenta. No entanto, uma quantidade pequena, porém significativa, pode ser produzida por órgãos não gonadais como fígado, coração, tecido adiposo, pele e cérebro. Há três formas principais de estrogênios fisiológicos em mulheres: estrona (E1), estradiol (E2 ou 17- β -estradiol) e estriol (E3), sendo que cada um representa diferentes produtos formados a partir do colesterol por reações em série ao longo de sua biossíntese (SHUPNIK, 2002).

O principal produto de todo o processo de biossíntese do estrogênio é o E2, sendo o mais potente durante o período de pré-menopausa na vida de uma mulher, enquanto que o E1 desempenha um papel maior na pós-menopausa, quando é sintetizado a partir da desidroepiandrosterona no tecido adiposo. O estrogênio menos potente é o E3, sendo formado a partir do E1 por meio da 16 α -hidroxilação, desempenhando um papel maior durante a gravidez quando produzido em grandes quantidades pela placenta (SHUPNIK, 2002).

A fonte primária do estradiol na mulher ocorre através das células da teca e células da granulosa dos ovários. As células tecais não produzem estrogênio, mas produzem andrógenos, por outro lado, as células da granulosa não produzem andrógenos, mas podem convertê-los em E2. Os estrogênios derivados dos ovários são liberados na circulação geral e atingem tecidos responsivos ao estrogênio, incluindo órgãos reprodutivos e não reprodutivos (HILLIER, 1994). O córtex suprarrenal sintetiza o estrogênio a partir do colesterol, a enzima P450_{scc}, medeia a conversão do colesterol em pregnenolona. Em nível celular, em astrócitos e neurônios, encontra-se a enzima aromatase e, sua expressão é específica para células nessa região do cérebro, sugerindo que a produção local de E2 é importante para certas funções cerebrais (REGO et al., 2009).

A aromatase é um membro da superfamília de enzimas do citocromo P450, e é amplamente expressa em tecidos, incluindo cérebro, gônadas, vasos sanguíneos, fígado, ossos, pele, tecido adiposo e endométrio. No ovário, a aromatase é encontrada apenas nas células da granulosa e luteais, sendo responsável pelo último passo na síntese de E2 (Figura 2). Em ambos os sexos, foi demonstrado que a atividade da

aromatase nas células estromais adiposas subcutâneas, igualmente como nos níveis da aromatase no RNAm do tecido adiposo, aumentam com o envelhecimento, o que pode causar uma série de sintomas e distúrbios no organismo, como exemplo, a contribuição para o surgimento de câncer de mama ER-positivo (receptor de estrogênio positivo) (SANTEN et al., 2009; CARREAU; VIENNE; GALERAUD-DENIS, 2008).

A produção de estrogênio começa com a síntese da pregnenolona a partir do colesterol, catalisada pela enzima de clivagem do citocromo P450 (P450_{scc}). A pregnenolona é então convertida nas células da teca e da granulosa em progesterona pela 3-β-hidroxiesteróide desidrogenase (3β-HSD), sendo então convertida em andrógenos via citocromo P450 17α-hidroxilase (P450_{17α}) e 17-β-hidroxiesteróide desidrogenase (17β-HSD) nas células da teca durante a fase folicular, e a conversão de E2 é catalisada pela aromatase (P450_{Arom}) nas células da granulosa (Figura 2) (CUI; SHEN; LI, 2013).

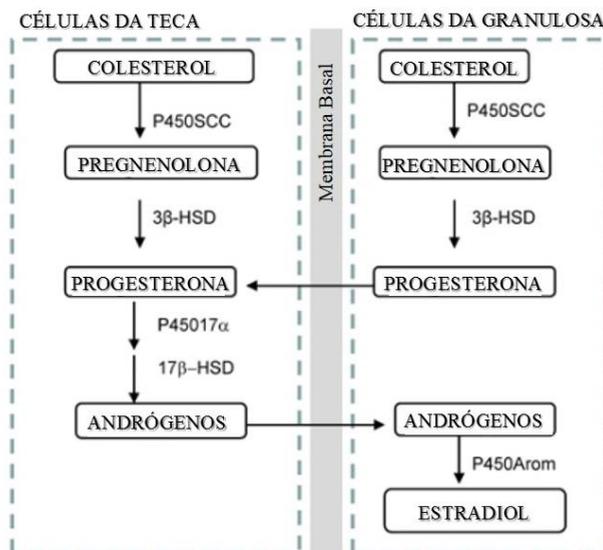


Figura 2: Síntese de estrogênio no ovário (Adaptado de: CUI; SHEN; LI, 2013).

Algumas ações do E2 são capazes de aumentar os receptores de lipoproteínas no fígado, resultando na diminuição das concentrações séricas da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Outras ocorrem por meio de diferentes mecanismos intracelulares devido à sua atividade

como antioxidante, pois, a molécula de E2 possui grupamentos hidrofênicos, o que lhe confere ação como sequestradores de radicais livres, diminuindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (NIKI; NAKANO, 1990).

Sabe-se que o E2 também aumenta a expressão da enzima superóxido dismutase (SOD), aumentando a síntese de mediadores vasoativos derivados do endotélio e diminuindo a expressão de enzimas pró-oxidantes como a NADPH oxidase. Outra função em que participam é a vasodilatação, através do aumento da formação e liberação do óxido nítrico (NO) e prostaciclina nas células endoteliais, reduzindo o tônus vascular através da abertura de canais de cálcio por um mecanismo dependente de GMPc (guanosina monofosfato cíclica) (NIKI, 1992; KIM et al., 1996).

1.2.2 Sinalização

Os efeitos fisiológicos e específicos do E2 são mediados pelos RE (receptores estrogênicos) intracelulares, os quais compreendem dois subtipos distintos de receptores: RE- α e RE- β , e seus co-reguladores, regulando a transcrição de genes alvo através da ligação a sequências-alvo específicas de DNA (MOGGS e ORPHANIDES, 2001). A maioria destes RE são encontrados no citoplasma e no núcleo, sendo que os RE- α predominam no útero e na glândula mamária e os RE- β se encontram principalmente no sistema nervoso central; cardiovascular; imunológico; trato urogenital; ossos; rins e pulmões (GUSTAFSSON, 2000).

Os receptores RE- α e RE- β possuem igual afinidade de ligação com o E2 e com outras substâncias, como os fitoestrogênios e moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERMs), os quais podem se ligar ao RE- α e ao RE- β seletivamente. O RE- α e o RE- β são codificados por genes diferentes, ESR1 e ESR2, respectivamente. O gene para o RE- α está localizado no locus cromossomal 6q25.1 e para o RE- β está na posição 14q22-24 (SIGNORETTI, LODA, 2001; KOEHLER et al., 2005).

Estes receptores são classificados como receptores nucleares do tipo I, pois ambos são encontrados no citosol e fazem translocação nuclear depois da ligação com o ligante, formando homodímeros ou heterodímeros. A sinalização é dependente da ligação ao estrogênio e começa com a ligação deste ao receptor, entretanto, a resposta transcricional celular específica ao estrogênio depende de múltiplos fatores. O fator mais imediato é a composição de proteínas co-

reguladoras em uma determinada célula e as características dos promotores de genes responsivos ao estrogênio. Mesmo que os hormônios sejam moduladores da transcrição, o padrão de modulação de genes também dependerá de outras vias sinalizadoras que estejam ativas na célula no momento da exposição ao hormônio (HELDRING et al., 2007).

Os estrogênios induzem mudanças celulares através de diferentes mecanismos, no mecanismo conhecido como clássico, há a difusão para o citosol, se ligando ao RE localizado no núcleo ou citoplasma. Este complexo nuclear estrogênio-RE se liga aos elementos responsivos ao estrogênio (EREs), direta ou indiretamente, por meio de interações proteína-proteína com a proteína ativadora 1 (AP1) ou, através de regiões promotoras de genes responsivos ao estrogênio. Esse processo resulta no recrutamento de proteínas co-reguladoras da transcrição gênica para promover uma resposta fisiológica de aumento ou diminuição dos níveis de RNAm associados à síntese de proteínas (dependendo do contexto/tipo celular), ocorrendo dentro de algumas horas (DEROO, 2006).

Um segundo mecanismo de ação para a via clássica envolve interações proteína-proteína, em que os complexos RE-ligante interagem com fatores de transcrição, como exemplo com o Nrf2 e NF- κ B, influenciando na transcrição gênica (MOGGS; ORPHANIDES, 2001).

Os estrogênios possuem um outro mecanismo, conhecido como mecanismo não-clássico, o qual ocorre dentro de segundos ou minutos. A ação ocorre por meio do RE localizado na membrana plasmática ou no citoplasma, resultando em respostas celulares a partir da ativação de vias intracelulares de transdução de sinal, como exemplo, o aumento dos níveis de Ca^{2+} ou NO e a ativação de cinases (DEROO, 2006).

Os mecanismos de ação descritos anteriormente estão ilustrados na Figura 3, em que: (i) demonstra a via clássica dos estrogênios; (ii) via não-clássica e (iii) outras proteínas de ligação ao estrogênio (EBP) associadas à membrana não-RE, podendo também desencadear uma resposta intracelular.

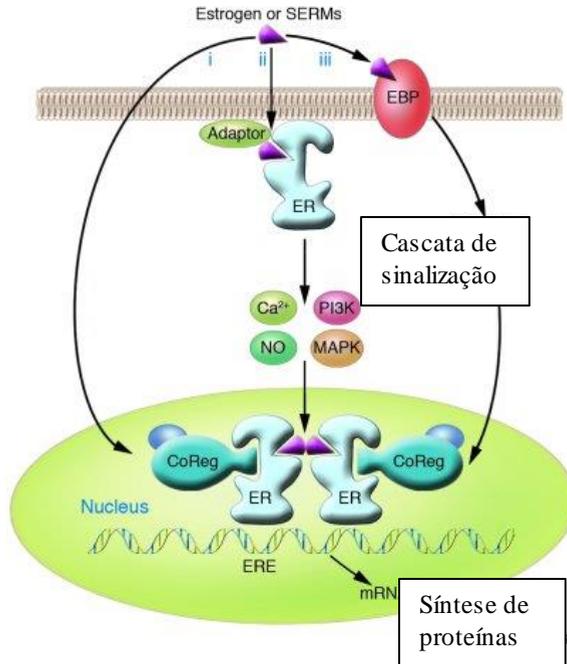


Figura 3: Mecanismos de ação dos estrogênios. Sendo: SERMs (Moduladores seletivos do receptor de estrogênio); ER (Receptor de estrogênio); CoReg (Co-regulador); ERE (Elemento responsivo ao estrogênio) e EBP (Proteínas de ligação ao estrogênio) (DEROO, 2006).

1.3 ESPÉCIES REATIVAS, ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO

Em sistemas biológicos, diversos oxidantes radiculares e não-radicalares são produzidos constantemente. Os radicais livres são definidos como moléculas ou fragmentos moleculares contendo um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais externos. Este desemparelhamento de elétrons confere alta reatividade, tornando-os capazes de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, causando reações de óxido-redução (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1995).

Por outro lado, compostos oxidantes não-radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o hipoclorito/ácido hipocloroso, também são oxidantes fortes que participam da sinalização redox e do

dano oxidativo em sistemas biológicos. Assim, as espécies reativas (radicais livres e oxidantes não-radicalares) derivados de oxigênio e nitrogênio, mais conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), são moléculas altamente instáveis, com meia-vida curta (comparado a outras biomoléculas) e quimicamente muito reativas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1995). Embora a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial seja um dos principais sítios de produção de ERO, há outras fontes que podem produzir estas espécies, como os neutrófilos durante o *burst* respiratório, os peroxissomos quando uma quantidade alta de ácidos graxos de cadeias longas é metabolizada e, em casos de reperfusão, quando a molécula de adenosina monofosfato (AMP) é continuamente degradada a hipoxantina, podendo ser convertida a xantina e ácido úrico através da ação da xantina oxidase (CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979; DOWNEY, 1990; PYNE, 1994; RECZEK e CHANDEL, 2015).

Os mecanismos que envolvem os compostos atuantes e formados a partir do aumento de ERO nuclear e citoplasmático são muito complexos, sendo ocasionados, muitas vezes, por patologias e/ou processos fisiológicos em busca da homeostase celular. As ERO podem alterar a expressão gênica, modulando tanto a proliferação e adaptação celular (em baixos níveis), assim como induzindo mutagênese ou morte celular (quando em altos níveis) (Figura 4) (KREUZ e FISCHLE, 2016).

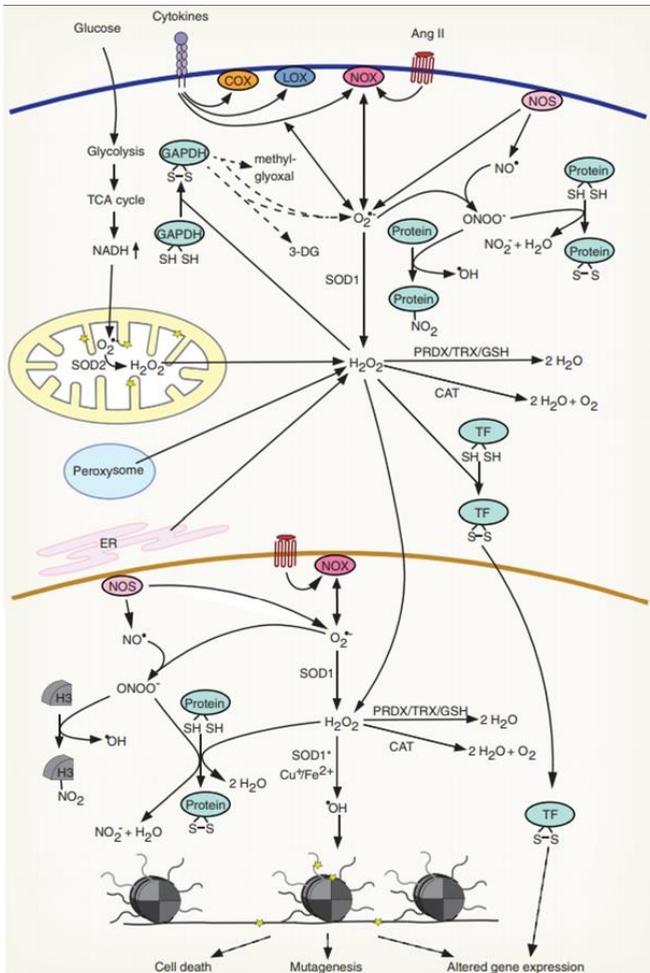


Figura 4: Consequências do aumento de ERO nuclear e citoplasmático. (Sendo: 3-DG: 3-desoxiglicose; Ang II: Angiotensina II; CAT: catalase; COX: ciclooxigenase; ER: retículo endoplasmático; GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; GSH: glutationa; LOX: lipoxigenase; NO: óxido nítrico; NOS: óxido nítrico sintase; NOX: NADPH oxidase; PRDX: Peroxirredoxina; ROS: espécies reativas de oxigênio; SOD: superóxido dismutase; SOD*: SOD (com mutação); TF: fator de transcrição; TRX: Tiorredoxina. * indicam dano macromolecular) (KREUZ e FISCHLE, 2016).

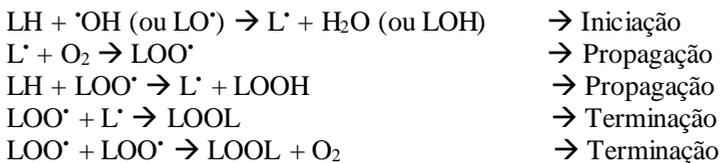
A geração de ERO ocorre durante o metabolismo oxidativo fisiológico na cadeia respiratória mitocondrial. Sob condições normais 95 - 98% do oxigênio molecular consumido pelas células é reduzido à água, porém, 2 - 5% do oxigênio sofre redução ao longo da cadeia respiratória, formando elementos intermediários reativos, como os radicais ânion superóxido (O_2^-) (JÚNIOR et al, 1998; FRIDOVICH, 1998). O O_2^- é considerado o principal produto da atividade mitocondrial, uma vez que as demais ERO são formadas a partir deste radical. Embora seja considerado um radical pouco reativo e pouco difusível, pode estar associado a lesões biológicas secundárias, dado que é precursor de outras ERO. O H_2O_2 , apesar de não ser um radical livre, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, pois participa da Reação de Fenton, que origina o radical hidroxila (OH), o qual é altamente reativo. Além disso, o H_2O_2 é capaz de atravessar camadas lipídicas e se difundir pela célula e meio extracelular, modificando resíduos redox em algumas proteínas, caracterizando-o como um segundo mensageiro redox, especialmente em baixas concentrações (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). O radical HOO^\bullet é considerado mais reativo que o radical O_2^- devido a sua maior facilidade em interagir e propagar reações radiculares em membranas biológicas, entretanto possui poder de oxidação menor do que o OH . O OH é um radical com alta reatividade e extremamente deletério ao organismo devido à sua meia-vida curta (YU, 1994), sendo associado a danos em DNA, RNA, proteínas e lipídios de membranas celulares (VALKO et al., 2007). Outra espécie reativa importante é o oxigênio singlete $\text{O}_2 (^1\Delta\text{g})$, o qual é conhecido por ser a forma mais reativa do oxigênio no organismo humano, representando a forma excitada do oxigênio molecular e não possuindo elétrons desemparelhados no orbital externo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990). Os alvos preferenciais do oxigênio singlete são os ácidos graxos; proteínas e DNA (DIPLOCK et al., 1998).

O nível de ERO celular é estável em um equilíbrio dinâmico e esse equilíbrio é modulado por processos celulares que produzem ERO e os eliminam. O produto inicial da cadeia respiratória mitocondrial é o O_2^- e pode ser rapidamente transformado em H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (SOD), sendo depois reduzido à água através da enzima catalase e/ou glutathione peroxidase (GPx). A NADPH oxidases (Nox) catalisam a redução de NADPH-dependente de oxigênio para formar o superóxido, que pode ser posteriormente dismutado e formar H_2O_2 . Enquanto isso, sabe-se que estímulos externos, incluindo $\text{TNF-}\alpha$, fator de crescimento epidérmico (EGF), $\text{IL-1}\beta$ também estimulam a

formação de ERO (TURRENS, 2003; BRAND, 2010; CLAUZURE et al., 2014).

Dos componentes celulares, a membrana é a mais susceptível à ação deletéria das espécies reativas, devido à peroxidação lipídica que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana celular com consequente perda de seletividade nas trocas iônicas. As membranas celulares contêm elevadas quantidades de ácidos graxos poliinsaturados, tornando-as alvos para o ataque de radicais livres, sendo mais vulneráveis ao processo de iniciação e propagação aqueles que estão nas membranas biológicas e no LDL do sangue, devido às suas múltiplas duplas ligações ao longo de sua cadeia. O dano oxidativo resultará na formação de ligações cruzadas entre proteínas e fosfolipídios, destruindo o arranjo espacial da membrana e afetando sua funcionalidade, às vezes irreversivelmente (SIES, 1985; CLARKSON e THOMPSON, 2000; HONG et al., 2004).

A peroxidação lipídica descontrolada é um das principais fontes de produtos citotóxicos, como os aldeídos, produzidos pela decomposição de hidroperóxidos, os quais podem desempenhar atividades mutagênicas (SEIFRIED et al., 2007). A interação entre radicais livres e lipídeos envolve reações em cadeia em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Essas reações em cadeia podem ser verificadas abaixo, onde: (L) representa lipídeo.



Na etapa de iniciação ocorre o sequestro do hidrogênio do ácido graxo insaturado da membrana celular, podendo ser realizado pelo $\cdot OH$ ou pelo radical alcoxil ($O\cdot$) com consequente formação do radical lipídico $L\cdot$. Na propagação, o radical $L\cdot$ reage com O_2 , resultando no radical peroxil ($LOO\cdot$) que, por sua vez, sequestra um novo hidrogênio de um ácido graxo insaturado, tornando-o novamente $L\cdot$ e dando continuidade a etapa da propagação. O término da peroxidação lipídica ocorre quando $L\cdot$ ou $LOO\cdot$ se propaga até se neutralizar (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

As moléculas proteicas também podem sofrer importantes alterações por meio da ação danosa das espécies reativas, desencadeando o processo de oxidação dos aminoácidos, que alteram a

capacidade funcional das proteínas (LEVINE et al., 1990). Uma modificação oxidativa das proteínas predominante é a carbonilação, um processo não enzimático que resulta na formação, em sua maioria irreversível, de vários grupos carbonila na forma de aldeído ou cetona. Estes grupos podem ser introduzidos na estrutura proteica em diferentes locais e seguir certos mecanismos, os quais podem ser: 1) clivagem oxidativa da cadeia principal da proteína; 2) oxidação direta das cadeias laterais de prolina, arginina, lisina e treonina; 3) adição de espécies carbonil reativas, geradas durante a peroxidação lipídica (acroleína e/ou malondialdeído) à cadeia lateral nucleofílica da cisteína, histidina ou lisina, levando à formação de produtos finais avançados de lipoxidação e; 4) adição de derivados de carbonil reativos (metilglicoxal e/ou glicoxal) às proteínas geradas pela oxidação de açúcares; ascorbato; ácidos graxos poliinsaturados ou espécies de Base de Schiff (BERLETT e STADTMAN, 1997; DALLE-DONNE et al., 2003; BACH et al., 2013).

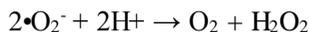
Acredita-se que a carbonilação de proteínas desencadeie a inativação funcional de proteínas celulares cruciais, por induzir a agregação proteica e promover a inibição do proteossoma por produtos de glicoxidação e peroxidação lipídica (SULTANA et al., 2013; PIZZIMENTI et al., 2013). Os agregados de proteínas são uma consequência direta de seus danos estruturais e podem, por sua vez, modificar o metabolismo celular, influenciando na funcionalidade celular. Portanto, a carbonilação de proteínas é um biomarcador bem reconhecido de doenças e contextos relacionados ao estresse oxidativo (FENG et al., 2008; DALLE-DONNE et al., 2006).

Os grupos sulfidril (SH), por sua vez, são considerados os maiores e mais frequentes antioxidantes no plasma, sendo caracterizados por um átomo de enxofre ligado a um átomo de hidrogênio. Os tióis formam tioéteres; tioacetais e tioésteres e participam de reações de alquilação S, em que os tióis são facilmente alquilados resultando em tioéteres e reações em que os tióis são facilmente oxidados por reagentes como o iodo ou o bromo, gerando dissulfeto orgânico (R-S-S-R). (KOLAGAL et al., 2009; GLANTZOUNIS et al., 2005).

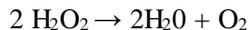
Os tecidos apresentam mecanismos de defesa intrínsecos e extrínsecos para neutralizar efeitos e evitar danos causados nas biomoléculas pela produção excessiva de ERO e ERN, os quais são conhecidos como defesas antioxidantes. Os antioxidantes são responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres e oxidantes não radicalares nas células (BIANCHI e ANTUNES, 1999). De acordo com a definição proposta por Halliwell e Gutteridge (1995) antioxidante é qualquer substância que, quando presente em

baixa concentração comparada aquela do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo. O sistema de defesa humano inclui antioxidantes produzidos no próprio organismo e outros obtidos por meio de fontes externas (dietéticas), os quais podem ser classificados como enzimáticos ou não-enzimáticos, dependendo de sua estrutura. Os principais antioxidantes enzimáticos existentes no organismo humano são a enzima superóxido dismutase (SOD); glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). Entre os componentes não enzimáticos de defesa antioxidante, destacam-se algumas vitaminas, minerais e flavonóides, como vitamina A, C, E, carotenoides, selênio, zinco, manganês, entre outros, os quais são capazes de limitar a propagação das lesões causadas pelas espécies reativas (BIANCHI e ANTUNES, 1999; BARREIROS et al., 2006).

A enzima SOD está presente em todas as células do corpo e há três formas distintas em que ela se encontra no organismo: cobre/zinco-dependente (Cu/Zn-SOD) conhecida como SOD1, localizada no citoplasma; manganês-dependente (Mn-SOD), conhecida como SOD2 e com localização mitocondrial, e a SOD3 (Cu/ZnSOD), a qual é extracelular. Ambas as formas catalisam a dismutação do radical ânion superóxido, convertendo-o a H_2O_2 e O_2 através da reação abaixo (YU, 1994; DIPLOCK et al., 1998).



Outra enzima antioxidante importante é a CAT, a qual converte H_2O_2 em oxigênio e água, demonstrado na reação abaixo:



Ela está presente em quase todos os organismos aeróbios e em algumas células anaeróbias, controlando os processos de oxidação em tecidos quando ocorre o aumento na concentração de H_2O_2 . Possui uma concentração elevada em eritrócitos e no fígado (MASTERS et al., 1986). A catalase está localizada principalmente nos peroxissomos, podendo estar em baixas concentrações na mitocôndria e no núcleo celular (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2006).

O estresse oxidativo pode induzir à uma despolarização rápida do potencial interno da membrana mitocondrial e subsequente comprometimento da fosforilação oxidativa. Mitocôndrias danificadas produzem mais ERO, particularmente o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, os quais potencializam a propagação de ERO induzida pelas

mitocôndrias. Durante a respiração celular, por exemplo, as ERO são inevitavelmente produzidas, o que pode causar danos oxidativos a muitos componentes celulares, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e membranas lipídicas de diversas organelas (ORRENIUS; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY, 2007; WALLACE, 2005; TURRENS, 2003).

Durante as condições celulares em estado estacionário, os níveis intracelulares de ERO são rigidamente regulados para manter a homeostase por sistemas de defesa antioxidante, incluindo: catalase; SOD; glutatona peroxidase (GPx); glutatona redutase (GR); peroxirredoxinas (Prx) e tioredoxina (Trx) (Figura 5) (WANG et al., 2013).

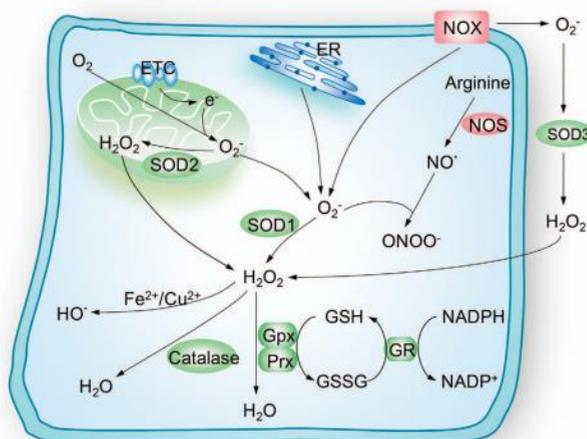
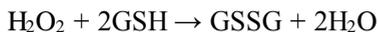


Figura 5: Manutenção celular da homeostase redox. Sendo: ETC (cadeia de transporte de elétrons mitocondrial); NOX (complexo NADPH oxidase) ligado à membrana e ao ER (retículo endoplasmático) (WANG et al., 2013).

A enzima GPx catalisa a redução de H₂O₂ em H₂O, utilizando a glutatona na sua forma reduzida (GSH) como substrato:



A GPx possui isoformas intra e extracelulares, com papel central na decodificação dos peróxidos gerados nos sistemas biológicos, principalmente nos peróxidos de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos, catalisando a redução de H₂O₂. Esta enzima utiliza o grupo sulfidril da glutatona reduzida (GSH), que pode ser regenerada pela interação da

glutathiona oxidada (GSSG) com NADPH através da glutathiona redutase (GR). A regeneração da GSH favorece a manutenção da concentração intracelular elevada de GSH em relação à GSSG (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glicina; cisteína e ácido glutâmico. Quando oxidada na reação, há interligação de duas moléculas do tripeptídeo por uma ponte dissulfeto, formando GSSG (Figura 6). A queda nos níveis endógenos de GSH podem prejudicar as defesas celulares contra a ação tóxica dos radicais livres. As células íntegras mantêm uma razão elevada de GSH/GSSG para garantir a disponibilidade de GSH. Para tanto, é necessária a constante regeneração de GSH, a qual se dará por meio da ação da enzima GR (ROVER; HOEHR; VELLASCO, 2004).

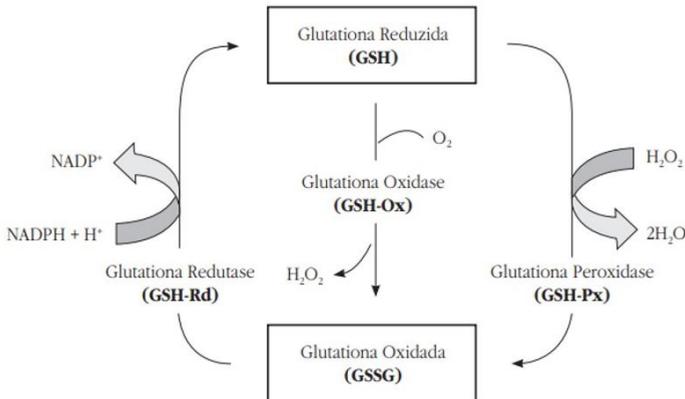


Figura 6: Ciclo catalítico da Glutathiona. (ROVER; HOEHR; VELLASCO, 2004).

Após exposição da GSH às espécies reativas, ocorre sua oxidação a GSSG, via glutathiona oxidase (GSH-Ox), gerando H_2O_2 . A GPx catalisa a redução do H_2O_2 e o excesso de GSSG resulta em um ambiente oxidante, favorecendo a formação de pontes dissulfeto (-SS) em proteínas, alterando sua conformação e, eventualmente, alterando suas funções. Entretanto, esta oxidação pode ser revertida pela ação antioxidante da GSH. A GR não age diretamente na remoção dos radicais livres, porém é responsável pela recuperação da GSH na presença de NADPH, tal recuperação tem como objetivo impedir a

paralisação do ciclo de GSH-GPx-GR (ROVER; HOEHR; VELLASCO, 2004). Em condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema antioxidante, há o desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, caracterizando o estresse oxidativo (ROVER; HOEHR; VELLASCO, 2004).

1.4 ALTERAÇÕES OXIDATIVAS ASSOCIADAS À “DEPLEÇÃO” DE HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS

Massafra e colaboradores (2000) avaliaram as enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx), durante o ciclo menstrual de mulheres. Coletaram o sangue em diferentes períodos do ciclo e avaliaram as enzimas nos eritrócitos. Foi observado que no período de pico do estradiol há alta atividade da enzima GPx, o que não ocorreu no período em que havia baixa concentração deste hormônio; ao passo que SOD e CAT não foram alteradas. Estes achados indicaram que a produção fisiológica de E2 pelos ovários durante o ciclo hormonal pode ter um papel importante na regulação eritrocitária da atividade da GPx.

Em um estudo realizado por Kolesnikova et al. (2015), foram avaliadas 119 mulheres com idades entre 21-61 anos, sendo 37 consideradas na idade reprodutiva ($26,3 \pm 0,27$ anos); 41 na perimenopausa ($49,1 \pm 0,32$ anos) e 41 na pós-menopausa ($56,3 \pm 0,45$ anos). Os resultados mostraram que a atividade antioxidante total no soro foi reduzida em 26% em mulheres na pós-menopausa em comparação com as reprodutivas, não havendo diferença estatística nos níveis de GSH, enquanto que, os níveis de glutatona oxidada aumentaram na peri-menopausa em 21% das mulheres e na pós-menopausa em 19%, quando comparados com mulheres em idade reprodutiva, indicando desbalanço pró-oxidativo.

No trabalho realizado por Há (2004), o estresse oxidativo induzido por ovariectomia aumentou os níveis de MDA, um dos compostos marcadores no processo de peroxidação lipídica. Morrone et al. (2016) trouxe em seu trabalho que animais OVX demonstraram uma diminuição no potencial de remoção de radicais livres não enzimáticos, detectados no soro e no fígado, sendo que no fígado, a atividade de GPx diminuiu nas amostras dos animais OVX quando comparado aos animais Sham. As atividades das enzimas SOD e CAT nos grupos OVX não se alteraram. Os níveis de TBARS e proteínas carboniladas aumentaram nos eritrócitos de animais OVX tratados com veículo,

enquanto que, valores não proteicos e proteicos diminuíram quando comparados aos animais Sham, sugerindo que estas mudanças se devem a um estado pró-oxidante típico, danificando ambas as proteínas e lipídios no sangue destes animais OVX.

1.5 ALTERAÇÕES METABÓLICAS E INFLAMATÓRIAS NA MENOPAUSA

A inflamação é um processo fisiológico acionado toda vez em que um agente agressor biológico, físico ou químico ultrapassa uma barreira primária de defesa do corpo humano, a camada epitelial e/ou endotelial e suas estruturas especializadas, possuindo o objetivo de recompor a homeostase do tecido lesado através da ativação dos componentes específicos e não específicos da imunidade. Inicialmente, são importantes o processo de reconhecimento e a geração de células efetoras e seus produtos (citocinas e anticorpos), envolvendo a ação de células fagocíticas e de mediadores, bem como a migração destas células para o sítio lesionado (GALLIN et al., 1999; PAUL, 1998).

Muitos estudos demonstraram que o declínio da função ovariana na menopausa está associado com simultâneas elevações de citocinas pró-inflamatórias, incluindo: IL-1 β , IL-6 e TNF- α (PFEILSCHIFTER et al., 2002). Um dos possíveis efeitos sistêmicos causados pela queda do E2 é o surgimento e manutenção de ambientes séricos e teciduais pró-oxidantes e pró-inflamatórios. Sabe-se que o E2 atua como um antioxidante endógeno e sua redução está associada a uma ineficiência na remoção das ERO (MIQUEL et al., 2006). Uma plausível definição para o quadro de estresse oxidativo seria o aumento da produção das espécies reativas concomitante a uma ineficiência dos sistemas antioxidantes, resultando em um excesso de ERO (HALLIWELL e GUTERIDGE, 2007).

A falta de E2 também pode levar a redução de sensibilidade à insulina. Quando isso ocorre é necessário que o pâncreas secrete mais insulina a fim de estimular a captação de glicose pelas células menos sensíveis à insulina. Logo, há mais insulina circulante, isto resulta em um aumento da lipogênese e de triglicerídeos, os quais são o principal fator de risco cardiovascular em mulheres. Além disso, flutuações hormonais presentes durante a menopausa favorecem não só o aumento do peso corporal, como também maior adiposidade abdominal devido a redistribuição do tecido adiposo (BINFA et al., 2001; CARVALHEIRA et al., 2006). Quando ocorre aumento da adiposidade corporal, uma desregulação na expressão gênica e secreção de adipocinas são

observadas, resultando em disfunções metabólicas associadas à obesidade, tais como hipertensão, diabetes e dislipidemias (VIRTANEN e LIDELL, 2009; YAMAUCHI et al, 2002). A inflamação parece estar associada à etiologia destas doenças e o desenvolvimento de um estado inflamatório crônico de baixo grau é considerado um fator de risco para algumas doenças, principalmente as mencionadas anteriormente (TRAYHURN e WOOD, 2004; HAUNER, 2005). O aumento da adiposidade abdominal pela redistribuição do tecido adiposo facilita a mobilização de ácidos graxos para o fígado, causando desequilíbrios na função hepática, além de promover o surgimento de complicações metabólicas (BOUCHARD; DEPRÉS; MAURIEGE, 1993; WAJCHENBERG, 2000).

O acúmulo de gordura visceral é um fator preocupante, sabendo que a deposição de gordura, além de possuir um papel fundamental no desenvolvimento da síndrome metabólica, resulta em um aumento na produção local de citocinas pró-inflamatórias e consequente liberação na corrente sanguínea de TNF- α , IL-1 β e principalmente IL-6 (PFEILSCHIFTER et al., 2002). Os adipócitos derivados da região visceral podem ser responsáveis por aumentar de duas a três vezes o conteúdo sérico de IL-6 (FRIED; BUNKIN; GREENBERG, 1998).

O TNF- α é uma citocina multifuncional que apresenta a capacidade de regular vários processos celulares e biológicos tais como: função imunológica, diferenciação, proliferação, apoptose celular e metabolismo energético. Isso sugere que ele apresente função endócrina por mediar sinais autócrinos e parácrinos. Essas funções endócrinas dependem da manutenção dos seus níveis circulantes, o que geralmente ocorre na presença de doenças catabólicas como sepse e câncer. As ações do TNF- α nos adipócitos podem alterar o metabolismo lipídico através da inibição da absorção dos ácidos graxos livres na lipogênese e estimulação da lipólise com a hidrólise e lançamento dos mesmos na corrente sanguínea. Dessa forma, TNF- α derivado do tecido adiposo pode contribuir para o desenvolvimento de dislipidemias e resultar em complicações metabólicas (SETHI e CAWTHORN, 2007).

O TNF- α participa da migração de monócitos e sua conversão em macrófagos na parede endotelial, por meio da ativação do NF-kB, que modula uma série de alterações inflamatórias no tecido vascular, como a expressão da molécula de adesão na superfície das células endoteliais e musculares lisas. Além disso, induz a hipertrigliceridemia por meio do estímulo da síntese da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), paralelamente à diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL) (HERMSDORFF e MONTEIRO, 2004).

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina com atuação tanto na resposta imune inata como na adaptativa. Ela é sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a microrganismos e também pela estimulação de outras citocinas, principalmente IL-1 e TNF- α (SOUZA et al., 2008). Normalmente, a IL-6 é expressa em níveis baixos, exceto durante infecções, trauma ou outros fatores estressantes. Entre os vários fatores que regulam a expressão do gene da IL-6, estão o E2 e a testosterona. Após a menopausa ou andropausa, os níveis de IL-6 são elevados mesmo na ausência de infecção, trauma ou estresse. No tecido adiposo, a IL-6 aumenta o processo de lipólise, aumentando dessa forma a mobilização de ácidos graxos livres na circulação. Em doenças como a obesidade os níveis de IL-6 estão aumentados, sendo um importante preditor de anormalidades no adipócito e metabolismo sistêmico (TRUJILLO et al, 2004).

Concentrações elevadas de IL-6, por exemplo na obesidade, estão associados com a expressão aumentada de proteína-C reativa (PCR), e sabe-se que a IL-6 é o principal mediador que estimula a expressão do gene para PCR (COPPACK, 2001). Tal conclusão foi observada inicialmente por Visser et al. (1999) em um estudo que avaliou as concentrações de PCR em indivíduos adultos com sobrepeso e obesidade. A PCR em quantidades elevadas, por sua vez, está correlacionada com quantidades elevadas de marcadores de peroxidação lipídica (BLOCK et al., 2002), mostrando uma associação entre estresse oxidativo e inflamação em um mesmo contexto.

1.6 REPOSIÇÃO HORMONAL: BENEFÍCIOS E LIMITAÇÕES

A terapia de reposição hormonal (TRH) tem sido alvo de muita discussão desde 1960, período este em que se prescrevia estrogoterapia isolada para mulheres menopáusicas, levando muitas vezes ao surgimento de complicações endometriais (ROZENBERG; VANDROMME; ANTOINE, 2013). Porém, ensaios clínicos randomizados concluem que a TRH de qualquer tipo proporciona alívio dos sintomas climatéricos durante a pós-menopausa, não havendo tratamento alternativo que produza efeito semelhante (SKOUBY et al., 2004), muito embora nem todos os pacientes respondam ao tratamento.

O tratamento com a TRH pode gerar, dependendo da duração e da dose utilizada, aumento do risco de hiperplasia e de câncer do endométrio e mama, e eventos tromboembólicos, especialmente quando utilizados estrogênios isolados. Quando a reposição é administrada por

via oral, pode ocorrer aumento de triglicerídeos séricos, bem como aumento do risco de coledocolitíase, litíase na vesícula biliar e risco de broncoespasmos, e eventos trombóticos (CIRILLO et al., 2005). Este aumento está relacionado com a dose, sendo relacionado apenas para doses de estrogênios equinoconjugados de 0,625 mg/d (ANDERSON et al., 2004).

Diferentes terapias hormonais, mesmo dentro da mesma classe, podem ter diferentes efeitos nos órgãos-alvo. A formulação apropriada; dose e a via de administração da progesterona são necessárias para combater os efeitos proliferativos do estrogênio sistêmico no endométrio. Por exemplo, na via transdérmica de administração, não há envolvimento com o fígado, sendo esta uma maneira de reduzir o risco de doença da vesícula biliar. Sendo assim, é indicado o uso da terapia de reposição hormonal, segundo FDA, para sintomas vasomotores como o excesso de calor, prevenção da osteoporose, hipoestrogenismo prematuro e sintomas geniturinários na menopausa. A TRH na atenção à saúde das mulheres passou por muitas mudanças. Dados mais recentes mostram que mulheres mais jovens (com idade inferior a 60 anos) geralmente saudáveis no início da menopausa possuem um perfil de risco-benefício muito favorável ao usar a TRH. De fato, o benefício da mortalidade por todas as causas, que é semelhante ao relatado em estudos observacionais há muitos anos, faz um forte argumento para considerar a TRH para a prevenção primária em mulheres jovens (LOBO, 2017).

Entretanto, sabe-se que muitas mulheres ainda não respondem à TRH ou não são elegíveis devido aos danos já relatados acima. Com isto, o uso de substâncias com atividade antienvelhecimento celular, incluindo extratos vegetais com propriedades antioxidantes e/ou antioxidantes puros, vêm sendo estudado como potenciais adjuvantes terapêuticos com a meta de retardar o desbalanço sistêmico e a progressão das doenças e disfunções associadas à menopausa. Especialmente em relação à suplementação com antioxidantes, tema deste trabalho, pois pouco se sabe sobre o seu real impacto na saúde, mesmo após mais de trinta anos de pesquisa em outros contextos biológicos (CONTI et al., 2016).

1.7 ÁCIDO- α -LIPÓICO (LA) E N-ACETÍLCISTEINA (NAC)

O ácido- α -lipóico livre (LA) tem a capacidade de eliminar superóxido; peróxido de hidrogênio; radicais hidroxila e peroxinitrito, também é capaz de reciclar a glutatona (GSH); α -tocoferol e o ácido ascórbico. O LA pode atuar tanto na fase hidrofílica como na porção da membrana hidrofóbica, sendo um produto natural que é sintetizado *in vivo* e está covalentemente ligado a um resíduo de lisina. É um cofator para as enzimas mitocondriais piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase e desempenha um papel importante no metabolismo energético mitocondrial (KOUFAKI, 2014).

Especificamente, o LA transfere o grupo acetil formado pela descarboxilação oxidativa do ácido pirúvico na CoenzimaA. O NAD⁺ é o agente oxidante e a reação produz um equivalente de NADH na mitocôndria, iniciando as reações do ciclo de Krebs, podendo exercer efeitos antioxidantes extinguindo as ERO; poupando as vitaminas antioxidantes C e E; inibindo a peroxidação lipídica; quelando íons de metais de transição e aumentando os níveis intracelulares de glutatona via ativação de NRF2 (PACKER e CADENAS, 2010; FRATANTONIO et al., 2018; FAYEZ; ZAKARIA; MOUSTAFA, 2018).

Alguns estudos documentaram um efeito positivo do LA no metabolismo do tecido ósseo (AKMAN et al. 2013; POLAT et al. 2013). Há et al. (2006) revelaram que o LA restringiu a formação dos osteoclastos dependentes de IL-1 inibindo a síntese de prostaglandinas E2 (PGE2), enquanto Zhang e Frei (2001) observaram uma diminuição no nível de TNF- α na expressão de RANKL (receptor ativador do fator nuclear NF-kB ligante).

O LA contém dois grupos tiol (enxofre) em sua estrutura, os quais podem ser oxidados ou reduzidos. Também contém um carbono assimétrico, ou seja, o LA pode existir como um dos dois isômeros ópticos possíveis, também chamados enantiômeros. Esses enantiômeros são imagens espelhadas um do outro, apenas a estrutura química abaixo é endogenamente sintetizada (Figura 7) (REED, 2001; SMITH et al., 2004).

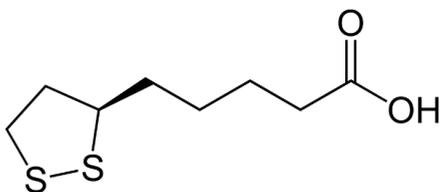


Figura 7: Estrutura química do Ácido- α -lipóico. (Retirado de: <<https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/lipoic-acid>>).

A NAC é derivada da N-acetil da L-cisteína e é rapidamente absorvida por via oral, embora sua biodisponibilidade oral total seja baixa (~ 9%). Este composto atravessa a barreira hematoencefálica, embora sua eficiência possa depender da dose; administração e formulação. A NAC é oxidada de L-cisteína para cisteína, a qual está envolvida na regulação dos níveis de glutamato extracelular, sendo permeável à membrana celular e reduzido à cisteína intracelularmente, componente chave da GSH (WINK et al., 2016).

Por décadas, a NAC vem sendo utilizada no tratamento de condições de overdose, como por exemplo, overdose por acetaminofeno, bem como é utilizada como um mucolítico em doenças pulmonares e protetor renal na nefropatia induzida por contraste (CLARK et al., 2010). Pode influenciar na atividade de vários fatores de transcrição, incluindo o aumento de NF- κ B, sendo observado em modelos de doença de Parkinson, bem como a inibição de NF- κ B, em células gliais, sendo uma proposta de tratamento neuroprotetora (ZAFARULLAH et al., 2003). Possui um grupo tiol (SH) em sua estrutura química. Grupamentos tíois tem um papel importante em sistemas biológicos, pois é um grupo facilmente oxidável e este aspecto pode ser ressaltado no aminoácido cisteína da NAC, por exemplo. Quando oxidada, a cisteína forma a cistina, transformando o tiol (-SH, forma reduzida) em uma ponte de dissulfeto covalente (-S-S-, forma oxidada), que fornece maior estabilidade e resistência à quebra da proteína que contém o aminoácido (JYOTHI; PASHA, 2014).

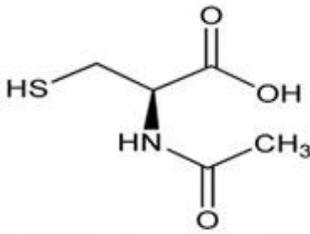


Figura 8: Estrutura química da N-acetilcisteína. (JYOTHI e PASHA, 2014).

HIPÓTESE

A hipótese deste trabalho é que o estresse oxidativo associado à depleção estrogênica colabora com as alterações oxidativas, metabólicas e inflamatórias observadas no período da menopausa e pós-menopausa. Como o estresse oxidativo está envolvido na geração e manutenção do estado inflamatório, e estes também se correlacionam com alterações metabólicas, a suplementação com antioxidantes poderia reverter, ou pelo menos retardar, o desenvolvimento de algumas disfunções fisiológicas observadas ao longo desta fase do decaimento hormonal e envelhecimento celular.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos da administração dos antioxidantes N-Acetilcisteína e Ácido- α -Lipóico sobre parâmetros oxidativos, metabólicos e inflamatórios em ratas *Wistar* ovariectomizadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar o impacto da ovariectomia de curto e longo prazo sobre parâmetros oxidativos, metabólicos e inflamatórios em ratas *Wistar*;
2. Avaliar parâmetros de estresse oxidativo como o dano em lipídeos (TBARS), proteínas (carbonilação e tióis proteicos) e os níveis do potencial antioxidante reativo total (TRAP), níveis de glutatona (GSH/GSSG), assim como a atividade das enzimas antioxidantes (catalase; superóxido dismutase e glutatona peroxidase) e glutatona redutase em fígado, coração e rim;
3. Determinar parâmetros metabólicos como ganho de peso, gordura retroperitoneal, marcadores lipídicos séricos (colesterol total e suas frações e triglicerídeos), glicemia e marcadores séricos de toxicidade;
4. Quantificar os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α /IL-6);
5. Avaliar o efeito da NAC e LA sobre o imunocnteúdo/ativação do fator de transcrição antioxidante NRF2;
6. Avaliar se NAC e LA possuem efeitos similares ao E2, *in vitro* e *ex vivo*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF), Glutationa reduzida (GSH), Dodecil sulfato de sódio (SDS), EDTA, Epinefrina, Ácido tiobarbitúrico (TBA), 2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNPH), Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina) (AAPH), NADPH, Guanidina, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT). Os reagentes utilizados na cultura celular, como soluções de DMEM, antimicótico:antibiótico e tripsina/ EDTA, N-acetilcisteína (NAC) e metilmetano-sulfonato (MMS) foram adquiridos da *Sigma Chemical Co* (St. Louis, USA). Para os tratamentos animais, a N-acetilcisteína (NAC), Ácido- α -Lipóico (LA) e 17- β -Estradiol (E2) foram adquiridos da *Essentia Pharma* (Santa Catarina, Brasil). Os kits de ensaios bioquímicos, ELISA e *Western Blotting* estão descritos abaixo.

3.2 OVARECTOMIA BILATERAL (OVX)

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Guia do Instituto Nacional de Saúde para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório, sendo aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo da CEUA-UFSC: 2231170317). Ratas (90 dias, 160-230 g) foram obtidos através de uma colônia própria de reprodução do Biotério Central (UFSC). Os animais foram separados em grupos de cinco com alimento e água *ad libitum*, sendo mantidos em ciclo de 12 horas claro-escuro (7-19h) em uma sala com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) ao longo do experimento. Antes do início de qualquer experimento os animais permaneceram ambientados por duas semanas no biotério.

Para ovariectomia bilateral (OVX), os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de cetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), e ambos os lados dorsolateral do abdômen foram raspados e esterilizados com 70% etanol/iodo. Para a retirada de cada ovário foi realizada uma pequena incisão (~ 1 cm) feita na pele e no músculo, em seguida, o ovário foi localizado e foi realizada uma sutura estéril em torno do corno uterino. O ovário foi removido e, em seguida, os cortes do músculo e da pele foram suturados com a sutura Catgute

4.0. Os animais Sham foram igualmente manipulados, entretanto sem a remoção dos ovários.

Após a cirurgia, os animais permaneceram por 6 horas em um ambiente aquecido para a recuperação e, em seguida, foram reagrupados em suas respectivas caixas. Foi administrado Acetaminofeno (150 mg/kg/dia, por gavagem) por quatro dias com o objetivo de controle da dor no pós-operatório.

3.3 TRATAMENTO

Cinco dias após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram randomizados e deu-se início ao tratamento. As ratas *Wistar* foram divididas em grupos sham-operados (n = 8/grupo); OVX (n = 8/grupo) e OVX + E2 (E2: 17- β -estradiol, 25 μ g/kg/dia; n = 6, e dose baseada em MA Y. L. et al (2013)).

Os animais foram mantidos por 15 ou 60 dias pós-OVX, conforme demonstra o esquema da Figura 9 A (linha do tempo superior). Para avaliar o impacto de NAC/LA sobre a OVX, um total de 47 ratas *Wistar* foram divididas do seguinte modo: Sham (tratado com veículo, n = 7); OVX (tratado com veículo, n = 8); OVX + NAC 10 (NAC 10 mg/kg, n = 8); OVX + NAC 25 (NAC 25 mg/kg, n = 8); OVX + LA 25 (LA 25 mg/kg, n = 8); OVX + LA 50 (LA 50 mg/kg, n = 8). Todos foram administrados por gavagem (0,5 mL/rata), sendo realizada em dias alternados durante um total de 60 dias (Figura 9 A - linha do tempo inferior). Os compostos NAC e LA foram preparados dissolvendo-os em solução salina tamponada com fosfato 50 mM, aumentando a solubilidade com 1 N NaOH, e ajustando para um pH final \sim 7. Os tratamentos foram preparados todos os dias à fresco. O 17- β -estradiol foi dissolvido em óleo de gergelim e administrado por via subcutânea (100 μ L/rata).

O peso corporal foi monitorado semanalmente e o delta do ganho de peso corporal foi expresso em g% (g por 100 g de peso corporal) em comparação com o peso corporal do dia da cirurgia OVX (protocolo dia 0 – Figura 9 A).

3.4 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

Ao final dos tratamentos, os animais foram eutanasiados por anestesia seguida por decapitação, não sendo submetidos a jejum antes da coleta de sangue. Amostras de sangue total foram coletadas em tubos de EDTA, e parte foi colhida sem anticoagulante para separação do soro

por centrifugação (1.300 x g, 10 minutos) e armazenada a -80°C. O útero foi cortado acima da junção cervical e pesado. O tecido adiposo foi dissecado na região retroperitoneal e ponderado pelo peso total de cada animal (g%). Além de amostras de sangue, cerca de 300 a 400 mg dos tecidos - fígado, coração e rim - foram coletados e homogeneizados em 1,5 mL 10 mM PBS (pH 7,4) contendo 1 mM PMSF, seguido de centrifugação a 10.000g/15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado em diferentes tubos e armazenado a -80°C, minimizando os efeitos de congelamento e degelo na atividade das enzimas. O método de Lowry foi utilizado para quantificação de proteínas.

3.5 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Colesterol sérico (total), lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicérides, alanina aminotransferase (ALT), atividade de fosfatase alcalina (ALP), creatinina e glicose em amostras de soro foram quantificadas por meio de kits comerciais (Labtest, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. A fosfatase alcalina óssea, que é termolábil, foi estimada pela diferença entre a atividade de ALP sérica total e a atividade dosada após o aquecimento das amostras (56°C por 15 minutos); para desnaturação da isoforma óssea. Todas as análises colorimétricas foram realizadas em um espectrofotômetro (SpectraMax® Paradigm® Multi-Mode Detection Platform). As análises do hemograma foram realizadas em amostras de sangue fresco coletadas em EDTA usando o equipamento ABX Micros 60, HORIBA ABX Diagnostics (Montpellier, França).

3.6 ELISA: TNF- α , IL-6 e 17- β -estradiol

Os níveis séricos de TNF- α , IL-6 e E2 foram quantificados por ELISA de acordo com as instruções do fabricante. Sendo: kit IL-6 ELISA de rata (RAB0311), kit ELISA de TNF- α de rata (RAB0479) *Sigma-Aldrich*. Kit ELISA de 17- β -estradiol (ab108667) *Abcam*.

3.7 PRODUTOS FINAIS DE LIPOPEROXIDAÇÃO (TBARS)

A oxidação lipídica endógena foi estimada pela determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com o método descrito por Draper e Hadley (1990). As amostras (~ 5 mg de proteína) foram incubadas na presença de 10% do ácido

tricloroacético (TCA) para precipitação das proteínas e depois foram centrifugadas a 10.000 x g durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e colocados para reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%, em banho-maria (80°C), produzindo assim uma Base de Schiff de coloração rosa, a qual foi medida a 532 nm em espectrofotômetro. Os níveis de TBARS foram expressos como nmol/mg de proteína.

3.8 CARBONIL (PROTEÍNAS CARBONILADAS)

A modificação oxidativa das proteínas foi medida por meio da quantificação dos grupos carbonila, como previamente descrito por Levine et al. (1990). De ~ 2 a 5mg de proteínas foram incubadas na presença de DNPH 10 mM e HCl 2 M, durante uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, as proteínas foram precipitadas com TCA 20%, centrifugadas a 13.500 g por 5 minutos e lavadas 3 vezes com etanol/acetato de etila (1:1). Ao final das lavagens os pellets foram ressuspensos e solubilizados com Guanidina 6 M (pH 6.0). As amostras foram lidas em 380 nm em um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

3.9 TIOL REDUZIDO TOTAL (R-SH)

Este método tem como princípio a reação do Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) 10mM, conhecido por DTNB ou Reagente de Ellman, com os grupamentos SH das proteínas e outros compostos tíóis como a Glutaciona. As amostras (~ 100 a 200 µg proteína) foram diluídas em 10 mM PBS (180 µL), adicionando-se 35 µL de tampão de ácido bórico (100 mM de ácido bórico, 0,2 mM EDTA, pH 8,5) e, após, 10 µL de 10 mM DTNB foi adicionado e incubado durante uma hora a temperatura ambiente. As amostras foram lidas em um espectrofotômetro a 412 nm, e as leituras comparadas com amostras “branco controle” incubadas sem DTNB. Foram utilizadas curvas padrão de NAC para o cálculo do teor de tíóis reduzidos. Os resultados foram expressos como nmol R-SH/mg de proteína (ELLMAN, 1959).

3.10 QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONA (GSH)

Foram medidos fluorometricamente de acordo com o protocolo do Kit de ensaio Glutathione (GSH/GSSG/Total) Fluorometric Assay Kit (*BioVision Incorporated*, CA). As amostras preservadas em ácido

perclórico foram neutralizadas com KOH, foram adicionadas a um meio contendo tampão fosfato 0,1 M e EDTA 5,0 mM (pH 8.0). Para a determinação de GSH, 10 µl da sonda OPA foi adicionada às amostras e incubadas por 40 min em temperatura ambiente. O produto fluorescente GSH-OPA foi medido fluorometricamente com excitação em 350 nm e emissão em 420 nm. Para Glutathione total (GSH+GSSG) as amostras foram previamente reduzidas com Mix de Reagente Redutor antes da reação com OPA. Os valores de fluorescência foram normalizados por proteína (UFR/mg de proteína) e expressos em % em comparação com o grupo sham.

3.11 MEDIDA DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES TOTAIS NÃO ENZIMÁTICAS (ENSAIO TRAP)

O ensaio TRAP foi usado como uma estimativa de antioxidantes não enzimáticos presentes nas amostras. Este método avalia a capacidade das amostras para eliminar os radicais peroxil gerados através da decomposição de AAPH (2,2'-azobis [2-amidinopropano]) em 0,1 M de tampão glicina (pH 9.0). Os radicais peroxil não-inibidos reagem com o luminol e a leitura é feita por quimiluminescência. Foi preparado uma solução de AAPH e adicionado luminol (100 % de luminescência) e, após duas horas para a estabilização do sistema, adicionou-se 10, 20 e 50 µg de amostra, monitorando a quimiluminescência por 70 minutos. Para cada tempo cinético, os valores de luminescência foram transformados em porcentagem em relação ao sistema e a área sob a curva foi usada para calcular a porcentagem de eliminação de peroxil, quanto mais baixo o valor da área sob a curva, maior é a presença de antioxidantes não enzimáticos na amostra. Utilizou-se o antioxidante Trolox 100 nM como controle positivo (LISSI et al., 1995; EVELSON et al., 2001; DRESCH et al., 2009).

3.12 ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)

Foi determinada medindo a taxa de oxidação de NADPH no espectrofotômetro a 340nm. O meio de incubação enzimático continha GSH, NADPH, glutathione redutase (GR) e terc-butil-hidroperóxido como substratos em tampão (20 mM tampão de fosfato de potássio, pH 7.2, EDTA 2 mM e azida sódica 0.8 mM). A taxa de diminuição da absorbtividade foi monitorada por um total de 9 minutos, com leituras sendo realizadas em intervalos de 30 segundos. O decaimento linear da

cinética foi selecionado e a atividade da GPx foi expressa em mU/mg de proteína (1 U = 1 μ mol de NADPH oxidado por minuto a 25°C, pH 7.0), utilizando o coeficiente de extinção molar de NADPH a 340 nm (6,22 mM⁻¹cm⁻¹) (WENDEL, 1981).

3.13 ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE (GR)

Foi determinada monitorando o decaimento da absorbância de NADPH a 340 nm. O sistema de incubação consistiu em tampão de fosfato de potássio 100 mM, pH 7.6, EDTA 1mM, glutationa oxidada (GSSG) e NADPH. O decaimento na absorbância de 340 nm foi monitorada em um tempo total de 5 minutos, com leituras realizadas em intervalos de 15 segundos, a 25°C. A partir da porção linear da curva, a atividade enzimática foi calculada e expressa em nmol de NADPH consumido por minuto por mg de proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar de NADPH a 340 nm (6,22 mM⁻¹cm⁻¹) (MANNERVIK, 1999).

3.14 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)

A atividade da CAT foi avaliada através do decaimento da taxa do peróxido de hidrogênio em 240 nm (UV) de acordo com o protocolo de Aebi (1984). A incubação foi realizada em tampão fosfato 10 mM (pH 7.0) contendo H₂O₂ 25 mM, a 25°C. A cinética de degradação de H₂O₂ foi monitorada em um tempo total de 5 minutos, com leituras em intervalos de 30 segundos. A partir da porção linear da curva, a atividade enzimática foi calculada e expressa em U/mg de proteína usando o coeficiente de extinção molar de H₂O₂ a 240 nm (43.6M⁻¹cm⁻¹), sabendo-se que 1U CAT degrada 1 μ mol H₂O₂ por minuto a 25°C.

3.15 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade total da SOD (isoenzimas SOD1/2/3) foi avaliada por meio da inibição da autooxidação da adrenalina dependente de superóxido em um espectrofotômetro a 480 nm. A absorbância foi monitorada por um período total de 5 minutos, com leituras em intervalos de 30 segundos. Quatro quantidades de proteína (5, 10, 20 e 30 μ g) foram testadas e 1 U SOD foi expressa como a quantidade de amostra necessária para 50 % de inibição da formação de adrenocromo (C₉H₉NO₃). Os dados foram expressos como U SOD/mg de proteína (MISRA; FRIDOVICH, 1972).

3.16 CULTURA CELULAR

Utilizamos a linhagem celular MCF-7, obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC) (Rockville, Maryland, EUA). As células foram mantidas em meio DMEM *High Glucose* (*Dulbecco's modified eagle's medium*) contendo 10 % de soro fetal bovino (Cripion Biotecnologia, Brasil) e (1:1) antibiótico:antimicótico (Sigma-Aldrich) a 37°C em uma estufa umidificada. Para os tratamentos de cultura celular, NAC e LA foram dissolvidos em PBS 50 mM estéril, com o pH sendo ajustado para ~7. O 17- β -estradiol foi dissolvido em DMSO.

3.17 VIABILIDADE CELULAR

As células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas com NAC (0,1; 0,5 e 5 mM), LA (0,1; 0,5 e 5 mM) ou 17- β -estradiol (10 nM), sendo incubadas durante um período de 72 horas. Ao final dos tratamentos, as células foram incubadas com 100 μ L de DMEM 1 % contendo 0,5 mg/mL de MTT (3-(4,5-dimetil)-2,5-difenil tetrazólio), por 30 minutos em estufa umidificada a 37°C. Após, o meio foi descartado e 100 μ L de DMSO foi adicionado, incubando por 15 minutos sob agitação para solubilizar os cristais de formazan. A absorbância em 560 nm (filtro MTT) e 630 nm (filtro referencia) foi lida em espectrofotômetro, e a viabilidade foi expressa em porcentagem comparado ao grupo controle (ZANOTTO-FILHO et al., 2017).

3.18 WESTERN BLOTTING

Esta técnica foi utilizada para analisar a presença de NRF2 (*Nuclear Factor E2-related factor 2*). As amostras foram preparadas utilizando o tampão RIPA (*radioimmunoprecipitation assay buffer*), contendo PMSF 1 mM, ortovanadato de sódio 1mM, NaF 1mM e coquetel inibidor de proteases (*Sigma-Aldrich*). Cerca de 50 μ g de proteína foram corridas em 10 % SDS-PAGE, eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (*Hybond-ECL*, *GE Healthcare*), coradas com Ponceau S e bloqueadas com 5 % de BSA por 1 hora à temperatura ambiente. Os anticorpos primários incluíram o NRF2 (D1Z9C - *Cell Signalling Technologies*) para as análises na linhagem celular MCF-7 (humano), e o NRF2 (C-20 - sc-722 Santa Cruz) para detecção da proteína NRF2 de rato. A proteína housekeeping escolhida foi a beta-

actina, detectada com auxílio do anticorpo Ab8227, da empresa Abcam. Os anticorpos primários foram incubados *overnight* a 4°C (diluição 1:1000) em tampão TBS-T (*Tris Buffered Saline - Tween*) contendo 5 % de BSA. Após, o anticorpo secundário conjugado a enzima HRP foi incubado a uma diluição 1:2000, em TBS-T, durante 2 horas à temperatura ambiente. As proteínas foram detectadas utilizando substrato 20x *Lumiglo* (*Cell Signaling Technology, CA*) e as imagens foram capturadas e obtidas em um sistema de imagem ChemiDoc (Biorad).

3.19 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A maioria dos resultados deste estudo foram representados como Boxplot (*whiskers*: min-max). Em outros tipos de gráficos, os dados estão expressos como a média \pm desvio padrão.

As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via ou duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey ou Bonferroni, respectivamente. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises foram realizadas usando *GraphPad Prism* versão 5.01 para *Windows* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1 EFEITOS A CURTO E LONGO PRAZO ASSOCIADOS À DEPLEÇÃO HORMONAL ATRAVÉS DA OVARECTOMIA (OVX) EM RATAS *WISTAR*

Inicialmente, foi investigado o impacto da depleção hormonal em curto (15 dias) e longo prazo (60 dias) em disfunções relacionadas à menopausa no modelo animal de OVX. As concentrações séricas de estradiol e a massa uterina diminuíram, significativamente, no período curto pós-OVX (15 dias) (Figura 9 B - C). A OVX quase duplicou o ganho de peso corporal, como foi verificado em 15 dias pós-OVX, o qual manteve-se durante todo o protocolo experimental, quando comparado ao grupo Sham (Figura 9 D). Em contraste com as alterações que obtivemos em OVX de curto prazo, foi observado que o acúmulo de gordura retroperitoneal (Figura 9 E); colesterol total sérico (Figura 9 F) e os níveis séricos de citocinas inflamatórias, TNF- α e IL-6 (Figura 9 G), aumentaram apenas após a OVX de longo prazo. Os níveis de glicose e triglicerídeos não mostraram diferença entre os grupos (dados não mostrados).

Os danos oxidativos são outra consequência da depleção hormonal na OVX. Sabendo disso, foi analisado em nossos dados como estes danos se comportavam em um curto e longo período pós-OVX. Os marcadores de estresse oxidativo aumentaram somente após 60 dias pós-OVX. A lipoperoxidação, realizada através da quantificação por TBARS, aumentou tanto no soro quanto no fígado, enquanto a carbonilação de proteínas aumentou apenas no fígado dos animais em 60 dias pós-OVX (Figura 9 H - I). A OVX a curto prazo não teve impacto na lipoperoxidação e carbonilação nos tecidos renais e cardíacos (dados não mostrados).

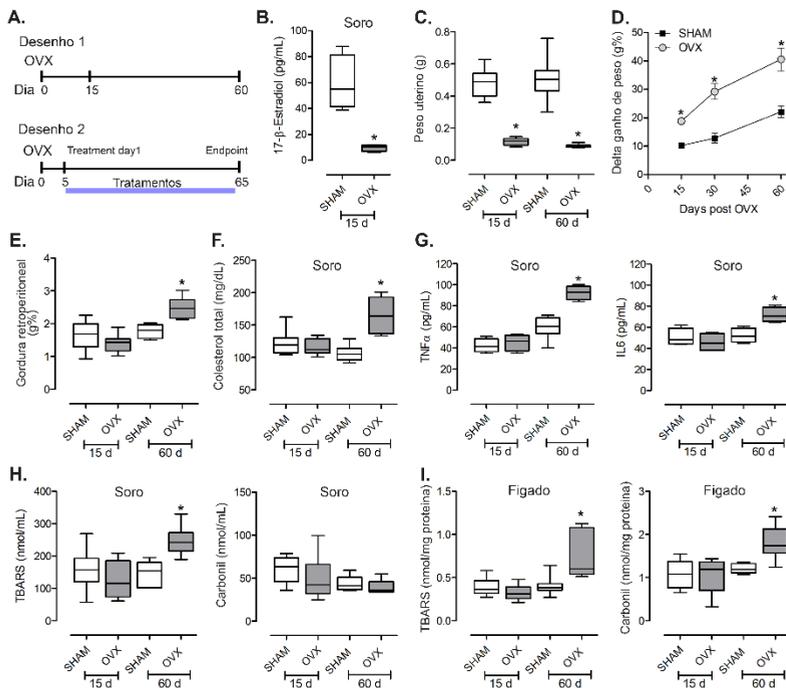


Figura 9: Efeito temporal da OVX no ganho de peso corporal, inflamação, metabolismo lipídico e marcadores de estresse oxidativo. (A) Desenho experimental da OVX e dos protocolos de tratamento utilizados para avaliar o efeito da OVX de curto e longo prazo; (B) níveis séricos de 17-β-estradiol em curto prazo; (C) Peso uterino aos 15 e 60 dias pós-OVX. (D) Delta do ganho de peso corporal em 15, 30 e 60 dias pós-OVX/Sham. (E) Gordura retroperitoneal; (F) colesterol sérico total; (G) níveis séricos de TNF-α e IL-6. (H) e (I) TBARS e carbonil em amostras de soro e fígado aos 15 e 60 dias pós-OVX. * indica a diferença estatística entre os grupos sham e OVX no mesmo ponto final experimental (15 ou 60 dias). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias (Sham/OVX vs 15/60 dias), $p < 0,05$.

Com base nesses achados, decidimos estudar mais detalhadamente o impacto da OVX de longo prazo, e como a suplementação com NAC e LA poderia atuar nas alterações metabólicas, oxidativas e inflamatórias relacionadas à OVX.

4.2 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE NAC E LA SOBRE MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS EM TECIDOS PERIFÉRICOS DE RATAS OVX

Ao avaliar os níveis de alguns marcadores clássicos de dano oxidativo a biomoléculas, observamos que a OVX induziu dano oxidativo principalmente no fígado e no coração, não afetando o tecido renal (Figura 10 A - C). A lipoperoxidação aumentou no fígado, coração e soro, enquanto o conteúdo de proteínas carboniladas aumentou apenas no fígado. A OVX não teve efeito sobre o teor de tiol reduzido nos diferentes tecidos estudados (Figura 10 C). A suplementação de NAC e LA em ambas as doses foram capazes de diminuir os níveis de TBARS e proteína carbonil para valores comparáveis aos animais Sham (Figura 10 A - C). Curiosamente, 25 mg/kg de NAC e ambas as doses de LA aumentaram o teor de tiol reduzido no soro de ratas OVX (Figura 10 C). Apesar de não investigarmos este dado mais a fundo, este efeito pode ser atribuído tanto ao estado redox alterado dos grupos tiol proteicos séricos ou, simplesmente, à reatividade direta do DTNB com os grupamentos tiol livres nas moléculas de NAC e LA presentes no soro dos animais suplementados com estes antioxidantes. Baseado nos dados obtidos, decidimos investigar alguns mecanismos envolvidos no dano oxidativo induzido pela OVX.

4.3 EFEITO PÓS-OVX DE LONGA DURAÇÃO (60 DIAS) PERMITIU A DEPLEÇÃO DE ANTIOXIDANTES NÃO-ENZIMÁTICOS E AFETOU O SISTEMA GPX/GR/GSH

Inicialmente, foi utilizado o ensaio de TRAP para estimar o total de antioxidantes não enzimáticos presentes nos tecidos. Os resultados mostraram que os homogenatos de fígado, coração e rim dos animais OVX foram menos capazes de “sequestrar” os radicais peroxil gerados pelo sistema AAPH quando comparados aos animais controle Sham (Figura 11 A - B). A suplementação de NAC e LA, principalmente com as doses mais altas, foram capazes de restaurar o potencial antioxidante não enzimático a níveis semelhantes aos do grupo Sham (Figura 11 B).

Dado os resultados acima descritos, foi hipotetizado que a OVX poderia estar afetando o metabolismo da GSH, a qual é um importante antioxidante não enzimático. De fato, enquanto a OVX de longa duração não alterou os níveis de glutatona total (GSH + GSSG) no fígado, rim e

coração (Figura 11 C), os níveis de GSH diminuam (Figura 11 D), sendo contrabalanceada pelo aumento de GSSG (dados não mostrados).

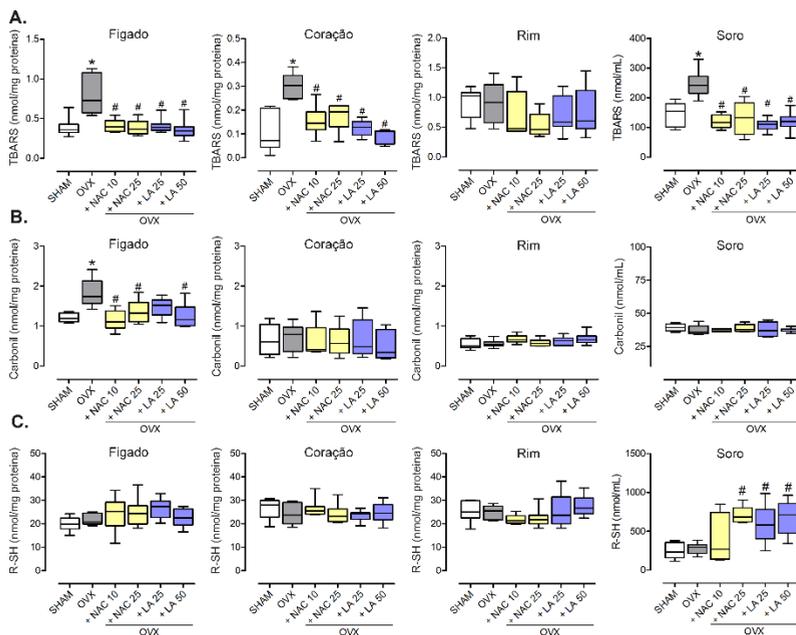


Figura 10: Efeito da suplementação de NAC e LA sobre marcadores de danos oxidativos em tecidos periféricos de ratas OVX. (A) TBARS, (B) Proteína carbonila e (C) sulfidril total/grupos R-SH no fígado, coração, rim e soro de animais Sham, OVX e OVX tratados com diferentes doses de NAC e LA, 60 dias pós-OVX. Legenda: Sham: falso-operado; OVX (OVX tratado com veículo); +NAC 10 (NAC 10 mg/Kg); +NAC 25 (NAC 25 mg/kg); +LA 25 (LA 25 mg/kg) e +LA 50 (LA 50 mg/kg), respectivamente. * indica diferença estatística em comparação ao grupo Sham; # indica a diferença estatística entre o grupo tratado com antioxidante e o grupo OVX (ANOVA de uma via, post-hoc de Tukey; $p < 0,05$).

Estes dados nos indicaram que a depleção de GSH em ratas OVX é provavelmente uma consequência da conversão de GSH em GSSG e não da diminuição da síntese “*de novo*” de GSH. A suplementação com NAC a 25 mg/kg e LA a 25 e 50 mg/kg impediram, ou pelo menos atenuaram, a depleção de GSH induzida por OVX (Figura 11 D). Assim,

os dados de dano oxidativo e as alterações provocadas pela OVX sobre sistema GSH/GSSG, acima descritos, nos levaram a testar os efeitos da OVX e da suplementação com NAC e LA sobre as principais enzimas antioxidantes SOD; CAT e GPx, e da GR.

Embora a OVX não tenha alterado a atividade total da SOD e CAT (Figura 12 A - B), a atividade da GPx diminuiu nos tecidos do fígado, rim e coração (Figura 12 C). A atividade da GSSG redutase (GR) foi encontrada diminuída nas amostras de fígado e coração quando comparados com o grupo Sham, não ocorrendo diferença significativa no rim dos animais OVX (Figura 12 D). Embora com eficácia de dose variada nos diferentes tecidos, o tratamento com NAC e LA impediu a diminuição da atividade da GPx e GR causada pela OVX de longo prazo (Figura 12 C - D).

Em suma, com base neste bloco de resultados, foi concluído que a depleção dos hormônios sexuais pela OVX afetou o sistema GPx/GR/GSH, bem como o potencial antioxidante não enzimático dos tecidos periféricos, os quais provavelmente estão associados ao aumento dos marcadores de dano oxidativo observados em animais OVX. Entretanto, essas alterações puderam ser restauradas/prevenidas com a suplementação oral de NAC e LA.

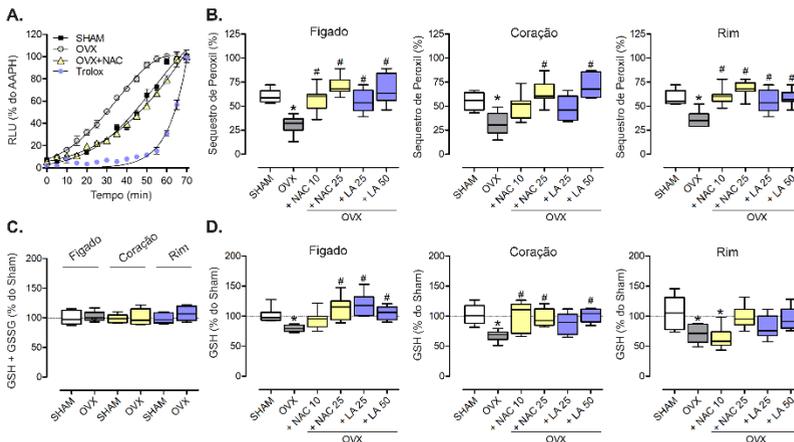


Figura 11: Efeito da suplementação antioxidante sobre o potencial antioxidante não enzimático e os níveis de glutatona em tecidos periféricos de ratas OVX. (A) Análise de TRAP mostrando a atividade de eliminação dos radicais peroxila de tecidos do fígado utilizando o Trolox (100 nM) como controle positivo. RLU (*Relative light units*) em

cada condição e tratamento são expressos como % em comparação com a luminescência do sistema AAPH na ausência de amostras (100 % RLU). Lembrando que, quanto menor a área sob a curva, mais antioxidante é a amostra. (B) Atividade da eliminação dos radicais peróxido de amostras de fígado, coração e rim em que a área sob a curva de cada amostra foi convertida em % de eliminação de radicais peróxido. (C) Níveis totais de glutathiona (GSH + GSSG). (D) Níveis de GSH em animais Sham, OVX e OVX tratados com antioxidantes 60 dias pós-OVX. Resultados sendo expressos com média \pm erro padrão da média. * indica a diferença estatística em comparação ao grupo Sham e # representa a diferença estatística entre o grupo tratado com antioxidante e o grupo OVX veículo (ANOVA de uma via, *post-hoc* de Tukey; $p < 0,05$).

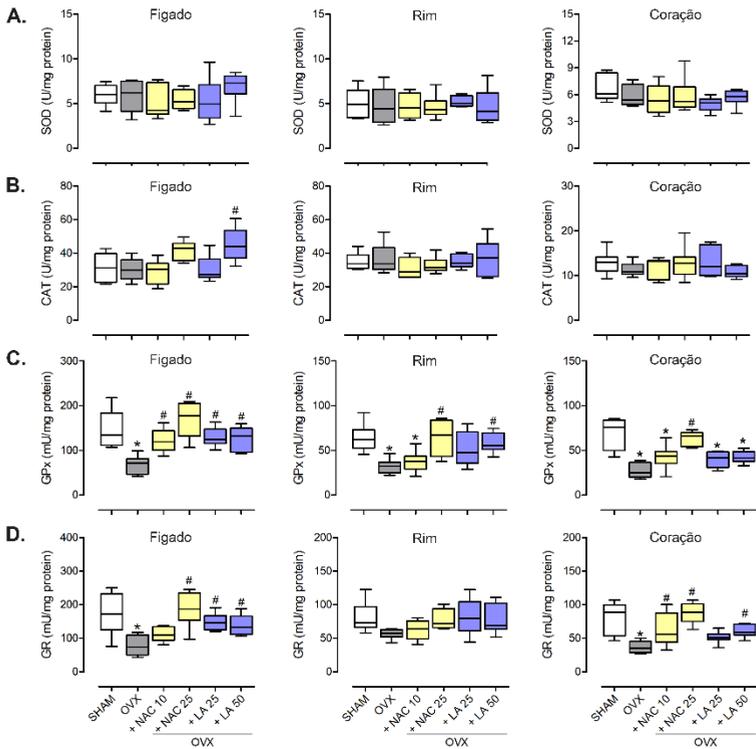


Figura 12: Efeito da atividade das enzimas antioxidantes em tecidos periféricos de ratas OVX tratados com NAC e LA. (A) Atividade total da SOD; (B) Catalase; (C) Glutathiona Peroxidase (GPx); (D) Glutathiona redutase (GR) em amostras de fígado, coração e rim de ratas Sham, OVX e OVX tratados com antioxidantes com 60 dias pós-OVX. Resultados expressos com média \pm erro padrão da média. * indica a diferença estatística em comparação ao grupo Sham e # representa a diferença estatística entre o grupo tratado com antioxidante e o grupo OVX veículo (ANOVA de uma via, *post-hoc* de Tukey; $p < 0,05$).

4.4 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE NAC E LA SOBRE O PERFIL LIPÍDICO; CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E MARCADORES SÉRICOS DE TOXICIDADE TECIDUAL NO MODELO OVX DE LONGA DURAÇÃO

Além de amenizar o estresse oxidativo, a suplementação com NAC e LA preveniram a elevação dos níveis séricos de IL-6 e TNF- α em ratas OVX, como determinado por ensaio de ELISA (Tabela 1). Nos marcadores metabólicos, foi prevenido o aumento dos níveis de colesterol total nas ratas OVX, tratadas com NAC e LA, especialmente nas doses mais altas. A OVX e os antioxidantes não foram capazes de afetar os níveis de HDL, triglicérides ou glicose (Tabela 1).

Também não houve nenhuma evidência de toxicidade hematológica, como alterações em leucócitos; plaquetas ou parâmetros de hemácias (Tabela 2). A análise bioquímica sérica não mostrou alterações na transaminase ALT, fosfatase alcalina (ALP) (Tabela 1), indicando uma ausência de toxicidade sistêmica importante. A ALP específica de osso (BS-ALP) aumentou após o uso de OVX a longo prazo e este efeito foi revertido pela suplementação de NAC e LA.

Tabela 1: Efeito da suplementação com os antioxidantes NAC e LA sobre o perfil lipídico, citocinas inflamatórias e marcadores séricos de toxicidade tecidual no modelo OVX de longa duração

	SHAM	OVX	OVX + NAC 10	OVX + NAC 25	OVX +LA 25	OVX +LA 50
TNF- α (pg/mL)	66.5 \pm 8.4	92.4 \pm 6.5*	64.7 \pm 16.1#	58.4 \pm 4.7#	57.4 \pm 5.8#	55.7 \pm 1.8#
IL-6 (pg/mL)	55 \pm 6.8	69.2 \pm 3.5*	61.2 \pm 9.1	53 \pm 5.4#	63.7 \pm 8.8	46 \pm 9.5#
Colesterol total (mg/dL)	106 \pm 12.5	165 \pm 26*	142.6 \pm 21.8#	135.1 \pm 20.1#	144 \pm 15#	123.9 \pm 17.2#
HDL (mg/dL)	75.5 \pm 15.5	71.8 \pm 9.5	74.1 \pm 11.8	90 \pm 11.8#	70.2 \pm 11.2#	75.2 \pm 15
LDL (mg/dL)	13.5 \pm 10.7	61.7 \pm 31.1*	44.5 \pm 20.5	24.9 \pm 8.7#	45 \pm 23.2	27.7 \pm 18.3
Triglicerídeo s (mg/dL)	133.8 \pm 15.1	157.2 \pm 40.5	153.9 \pm 42.1	165.6 \pm 49.1	144.3 \pm 20.5	148.9 \pm 32.5
Glicose (mg/dL)	105 \pm 9.6	114.7 \pm 13.8	105.8 \pm 10.1	94 \pm 15	89.7 \pm 18.1#	100.8 \pm 21.6
ALT (U/L)	23.1 \pm 6.1	23.5 \pm 9.6	25.7 \pm 8.5	25.8 \pm 10.1	28.2 \pm 4.6	25.2 \pm 7.1
ALP (U/L)	107 \pm 32.1	106 \pm 22.6	118 \pm 55.8	121 \pm 73.8	122 \pm 60.8	119 \pm 38.7
BS-ALP (U/L)	18.6 \pm 7.6	43.3 \pm 15*	15.8 \pm 8.5#	21 \pm 7.5#	19.5 \pm 11#	23.3 \pm 12.5

Nesta tabela estão descritos os parâmetros inflamatórios, como TNF- α e IL-6, assim como parâmetros metabólicos como colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos, glicose, creatinina, ALT, ALP, BS-ALP de animais pós-OVX de longa duração, sham, e OVX tratados com NAC ou LA. O soro foi coletado de ratas não jejuadas. Resultados expressos com a média \pm desvio padrão. * indica a diferença estatística em comparação ao grupo Sham e # representa a diferença estatística entre o grupo tratado com antioxidante e o grupo OVX veículo (ANOVA de uma via, post-hoc de Tukey; $p < 0,05$).

Tabela 2: Efeito da suplementação com os antioxidantes NAC e LA sobre o perfil hematológico de animais OVX.

PERFIL HEMATOLÓGICO	SHAM	OVX	OVX + NAC 10	OVX + NAC 25	OVX + LA 25	OVX + LA 50
LEUCÓCITOS TOTAIS (mil / mm ³)	3.3 ± 1.4	4.9 ± 1.5	4.5 ± 2.3	5 ± 1.4	6.1 ± 2 *	5.5 ± 2
HEMATÓCRITO (%)	36.16 ± 2.25	36.69 ± 1.55	35.75 ± 2.68	35.91 ± 2.04	34.25 ± 3.28	34.09 ± 3.28
PLAQUETAS (mm)	916.7 ± 204	866.7 ± 169.4	867.1 ± 127.6	892.4 ± 131.6	788 ± 218	683.1 ± 133.5

Observamos alguns parâmetros hematológicos, como, leucócitos totais, hematócrito e plaquetas em animais Sham, OVX e OVX tratados com antioxidantes avaliados durante 60 dias pós-OVX. Os resultados estão expressos com a média ± desvio padrão. * indica a diferença estatística em comparação ao grupo Sham. (ANOVA de uma via, post-hoc de Tukey; p <0,05).

4.5 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM OS ANTIOXIDANTES NAC E LA SÃO INDEPENDENTES DA ATIVAÇÃO DE NRF2 E DE ATIVIDADE ESTROGÊNICA

O NRF2 é um importante fator de transcrição envolvido em respostas antioxidantes e de detoxificação de xenobióticos. Uma vez ativado, o NRF2 promove a transcrição de genes de síntese de GSH (GCLC e GCLM); tioredoxina redutase 1 (TXNRD1); tioredoxina (TXN) e outros componentes envolvidos em processos de desintoxificação.

Foi hipotetizado que os efeitos antioxidantes de NAC e LA estavam associados à ativação de NRF2. Através do *Western Blotting*, não conseguimos detectar a supregulação de NRF2 em nenhum dos tecidos avaliados (Figura 13 A). Nossos immunoblots de NRF2 mostraram uma banda facilmente detectável, com ~ 55-70 KDa. Entretanto, embora em estudos anteriores tenham descrito esta banda como NRF2, dois estudos importantes de Kemmerer et al. (2015) e Lau et al. (2013) relataram que esta é uma banda inespecífica, uma vez que o

esperado é que NRF2 ativo corra na faixa de ~ 95-110 KDa na técnica de SDS/PAGE. Confirmamos esta evidência utilizando um controle positivo de células MDA-MB231 de câncer de mama tratadas com o agente alquilante MMS (metil-metano-sulfonato), o qual foi relatado anteriormente por Zanotto-Filho et al. (2016) como indutor de NRF2, da assinatura de expressão de genes alvo de NRF2, assim como um ativador do Elemento de Resposta Antioxidante (ARE) em ensaios de gene repórter. De fato, a banda de NRF2 induzida por MMS foi detectada a ~ 95-110 Kda (Figura 13 A, gel inferior, com marcação: #).

Com relação às atividades dos antioxidantes testados serem ou não “tipo-estrogênio”, realizamos uma comparação dos fenótipos desencadeados por NAC e LA com os fenótipos dos animais OVX tratados com estrogênio. Com relação ao útero, órgão alvo primário da ação estrogênica, o tratamento com estrogênio (E2) evitou a atrofia deste órgão, evento típico induzido pela OVX, enquanto que NAC e LA não foram capazes de reverter a atrofia uterina em animais OVX (Figura 13 B). Além disso, a suplementação com NAC e LA não teve efeito nos níveis séricos de estrogênio na OVX, enquanto que a reposição com E2 foi eficiente para a restauração dos níveis de estrogênio, para valores até maiores que os observados no grupo Sham (Figura 13 C). Ainda, a suplementação com NAC e LA não foi capaz de impedir o ganho de peso corporal em animais OVX, porém, o E2 conseguiu exercer efeitos preventivos no ganho de peso (Figura 13 D). Curiosamente, a deposição do tecido adiposo retroperitoneal induzida por OVX foi atenuada por NAC, LA e estrogênio (Figura 13 E).

De modo complementar, em uma abordagem celular, foi avaliado os possíveis efeitos estrogênicos de NAC e LA na linhagem MCF-7 de câncer de mama ER+ (Receptor de estrogênio positivo). Esta linhagem prolifera na presença de estrogênio e, de fato, obtivemos que o tratamento com E2 promoveu a proliferação da linhagem celular MCF-7, em baixa concentração (10 nM), enquanto que NAC e LA, mesmo em uma faixa de milimolar, não tiveram efeito estimulador sobre a proliferação da MCF-7 em ensaio MTT realizado após 72 horas de tratamento. Em contraste, 5 mM de LA causou citotoxicidade às células (Figura 13 F).

Por fim, foi avaliado o efeito de NAC e LA sobre a ativação de NRF2 em células MCF-7 *in vitro*. Os immunoblots de MCF-7 nos mostraram um padrão de duas bandas, com uma banda a ~ 70 KDa, a qual é não específica (ns) e uma banda de proteína NRF2 a ~ 95-100 KDa. Os resultados mostraram que o LA 1 mM promoveu a ativação de NRF2, como detectado após 8 horas de tratamento, ao passo que a NAC

não teve nenhum efeito. O efeito de LA e NAC não foram alterados na presença do tratamento combinado com estrogênio ou MMS (Figura 13 G).

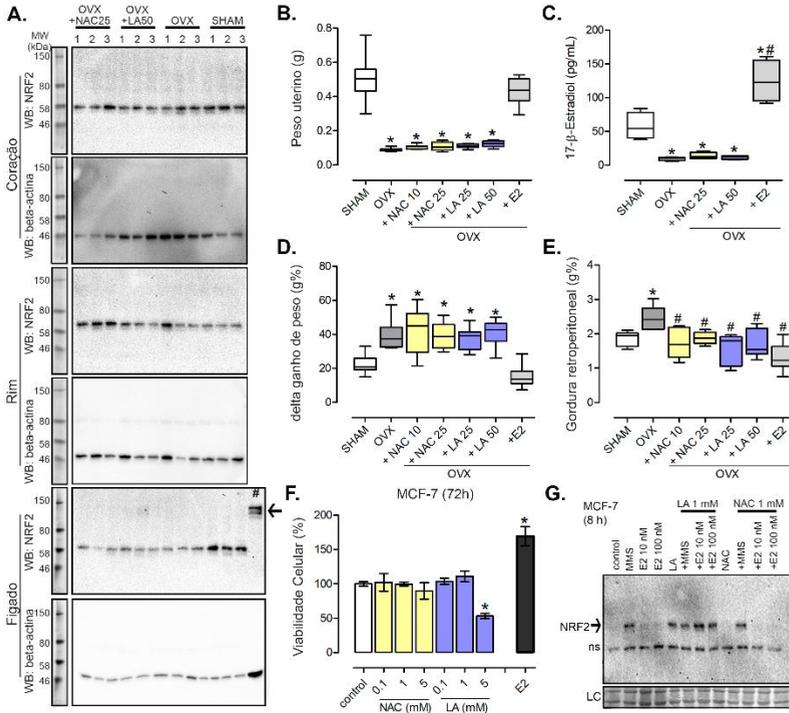


Figura 13: Efeitos de NAC e LA são independentes da ativação de NRF2 ou atividade estrogênica. (A) Western Blotting de NRF2 de fígado, coração e rim em animais Sham, OVX e OVX tratados com antioxidantes. Três animais por grupo são mostrados para cada tecido. No painel inferior (fígado), uma linha adicional com 40 μ g/mL de células MDA-MB231 tratadas com MMS também é mostrada como um controle positivo para ativação de NRF2. Sendo neste painel inferior com uma seta indicando o peso molecular específico/esperado de NRF2. (B) Peso do útero; (C) 17- β -estradiol (E2) em amostras de soro; (D) ganho de peso corporal e (E) gordura retroperitoneal em animais Sham, OVX e OVX tratados com antioxidantes. A reposição hormonal com E2 foi utilizada como controle positivo para a atividade estrogênica. (F)

Viabilidade celular em células MCF-7 após 72 horas de tratamento com NAC (0.1, 1 e 5 mM), LA (0.1, 1 e 5 mM) e estrogênio (E2, 10 nM). (G) Western Blotting mostrando o efeito de NAC e LA (sozinhos ou combinados com MMS ou E2) após a ativação de NRF2 em células MCF-7 tratadas por 8 horas. * indica a diferença estatística em comparação ao grupo Sham/grupos controle e # representa a diferença estatística entre o grupo OVX (ANOVA de uma via, post-hoc de Tukey; $p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A menopausa é caracterizada pela perda efetiva dos hormônios estrogênio e progesterona ocasionados pela falência ovariana, representando uma condição de envelhecimento celular acelerado. O tratamento é baseado no alívio dos sintomas e também na terapia da reposição hormonal (TRH). Embora as últimas décadas tenham trazido grande salto nas pesquisas e protocolos de TRH para mulheres em menopausa e, apesar dos seus benefícios, ainda é tema de preocupações e debates, resistência por parte de alguns clínicos, bem como de alguns equívocos em relação aos seus prós e contras. Muito disso em função de dados e desinformações lançados na grande mídia à data dos primeiros estudos com TRH. Aparte dessas discussões, é fato que muitos pacientes não respondem, especialmente aqueles que iniciam a terapia tardiamente, ou apresentam efeitos adversos e, ainda, há aqueles cuja TRH é contraindicada devido ao risco de câncer de mama e útero e eventos tromboembólicos. Por isso, muito se busca alternativas não hormonais para atenuação dos sintomas e, principalmente, do envelhecimento celular associado à carência de hormônios sexuais em mulheres. Ou seja, ainda é desafiador tratar os sintomas e as mudanças na qualidade de vida das mulheres em menopausa (DAVINELLI et al., 2017; LOBO, 2017; WANG et al., 2018; SCHULLER et al., 2018). Na menopausa, há uma drástica diminuição dos níveis de estrogênio, o que desencadeia no desequilíbrio do balanço redox em virtude dos mecanismos de produção de defesas antioxidantes, os quais são ativadas pelos estrogênios através da ativação de fatores de transcrição e, na opinião de alguns autores, da própria característica molecular desses hormônios, o que poderia fazê-los atuar diretamente como antioxidantes não enzimáticos (RETTBERG et al., 2014).

Atualmente, não existe um modelo único experimental que represente especificamente a falha progressiva da função ovariana que ocorre, principalmente, na transição natural da menopausa. Devido às limitações com o estudo clínico em mulheres na menopausa, seja por parte da paciente, dificuldades burocráticas, e variabilidade intrínseca e dificuldades protocolares de estudos de longo prazo em humanos, são realizados estudos em animais OVX, ou seja, em que há retirada dos ovários como um modelo de menopausa/depleção hormonal e pós-menopausa. Na deprivação hormonal por OVX, uma semana após a ovariectomia, os níveis dos hormônios ovarianos já estão indetectáveis no sangue (CHAKRABORTY e GORE, 2004), como observado em nossos dados. Este modelo é considerado um modelo animal que melhor

reproduz as características clínicas mais importantes da mulher nesta fase, como: perda óssea, disfunções circulatórias, inflamatórias, e do metabolismo energético (MUTHUSAMI et al., 2005; LEE et al., 2005; BAEZA et al., 2010; SAVONENKO e MARKOWSKA, 2003). Alterações nesses processos biológicos condizem com várias condições já relatadas e relacionadas ao envelhecimento, outras alterações podem envolver doenças cardiovasculares, depressão, diabetes e câncer entre outras, que, de fato, são mais incidentes na fase da menopausa e principalmente na pós-menopausa (CHANG et al., 2000; CARR, 2003; UPPOOR et al., 2015; PAIK et al., 2015). Os animais OVX também são capazes de apresentar níveis aumentados de estresse oxidativo e, conseqüentemente, um processo de envelhecimento celular acelerado em diferentes tecidos (AGARWAL et al., 2005; MUTHUSAMI et al., 2005; LEE et al., 2005).

Devido às alterações no componente redox observadas na menopausa e pós-menopausa é que foi levantada a hipótese de que o estresse oxidativo causado pela falência ovariana, e especialmente a depleção de estrogênio, é um dos componentes centrais nas mudanças fisiológicas associadas à menopausa e pós-menopausa, e que algumas das disfunções poderiam ser revertidas ou, pelo menos, atenuadas com o uso de antioxidantes. Com isso, nosso objetivo foi investigar se o uso de antioxidantes, neste caso a N-acetilcisteína (NAC) e Ácido- α -lipóico (LA), poderia atenuar algumas das alterações metabólicas, inflamatórias e de estresse oxidativo associadas à depleção de hormônios sexuais femininos. Foi optado por estudar as alterações moleculares em um curto período (15 dias) *versus* longo período (60 dias) pós-OVX em ratas *Wistar*, para analisar e comparar os efeitos e danos iniciais e/ou mais prolongados associados à OVX. Nossos dados demonstraram que, de fato, a suplementação com NAC e AL melhorou parâmetros oxidativos, inflamatórios e metabólicos; embora com efeito menos pronunciado sobre o metabolismo.

A NAC é um derivado da L-cisteína e é rapidamente absorvida pela via oral, embora sua biodisponibilidade oral seja baixa (~ 9%). Este composto é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, mesmo que sua eficiência dependa da dose; via de administração e formulação (NEUWELT et al., 2001; DOSA, 2017). Na célula, a NAC forma cisteína que está envolvida na regulação dos níveis de glutamato extracelular, bem como na restauração de *pools* de GSH intracelulares (MINARINI et al., 2017). LA, por sua vez, é um cofator para as enzimas mitocondriais piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase e desempenha um papel importante na fase do ciclo de Krebs no

metabolismo energético mitocondrial. Este composto interage tanto na fase hidrofílica como na porção hidrofóbica das membranas celulares e tem a capacidade de extinguir espécies reativas de oxigênio, como: superóxido; peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, bem como a reciclagem de antioxidantes não enzimáticos, como: GSH; vitamina E e ácido ascórbico. Além disso, o LA também atua como um antioxidante via ativação de NRF2 (SHAY et al., 2009; FRATANTONIO et al., 2018; FAYEZ; ZAKARIA; MOUSTAFA, 2018). Ademais, os antioxidantes NAC e LA mostraram-se seguros em ensaios clínicos, mesmo em altas doses e com esses dados foi decidido trabalhar com estes dois antioxidantes, bem como com a escolha das doses utilizadas (WINK et al., 2016; HOLMAY et al., 2013; COLES et al., 2018; PAPANAS; ZIEGLER, 2014; KOUFAKI, 2014; DOSA, 2017).

A produção dos radicais livres e de outras substâncias altamente reativas em decorrência do metabolismo do oxigênio são contrabalanceadas por muitos mecanismos de defesa antioxidante, que são capazes de limitar os níveis destes radicais livres, bem como impedir a indução de danos celulares (HALLIWELL, 2007). Em nosso modelo, de modo geral, a suplementação com NAC e LA foi capaz de melhorar os marcadores de dano de estresse oxidativo induzidos pela OVX. Lembrando que, as alterações de dano oxidativo, perfil inflamatório e metabólico induzidos pela OVX ocorreram após a depleção mais prolongada dos hormônios sexuais (60 dias). Contudo, o estresse oxidativo induzido pela OVX demonstrou ser leve, dado que o aumento da magnitude nos marcadores de dano foi ~1,5 - 2 vezes maior quando comparado aos animais do grupo Sham.

Os danos de estresse oxidativo como peroxidação de lipídios e danos proteicos (carbonilação e tióis proteicos) foram atenuados pela suplementação com os antioxidantes NAC e LA, impedindo o dano ocasionado pela OVX. Shi e colaboradores (2015) demonstraram que a peroxidação lipídica quantificada pelo método de TBARS aumentou no soro e no fígado de ratas OVX, corroborando com nossos dados, e que apenas a OVX promoveu lipoperoxidação e produção de H₂O₂ em tecido ósseo de camundongos, obtendo que a administração de N-acetilcisteína (100 mg/kg, i.p.) foi capaz de atenuar as anormalidades na osteogênese e renovação óssea causada pela OVX. Em outro estudo, o LA também foi capaz de estimular a formação óssea a 50 e 100 mg/kg no modelo OVX em ratas (RADZKI et al., 2016). Embora a perda óssea induzida por OVX não tenha sido um desfecho primário de nosso estudo, observamos que a suplementação de NAC/LA preveniu o aumento de BS-ALP em ratas OVX, o que está de acordo com uma

melhora no metabolismo ósseo; corroborando os estudos acima mencionados, dado que a BS-ALP é um marcador sérico associado à perda óssea em modelos OVX em ratas e também é útil para monitorar a osteoporose em mulheres na fase de pós-menopausa.

Abbas e Elsamanoudy (2011) demonstraram que, em tecidos como o córtex cerebral e o fígado, a OVX foi capaz de aumentar a lipoperoxidação e diminuir os níveis de GSH, e da atividade da GPx, CAT e SOD. A TRH com estrogênio e estrogênio combinado com a vitamina E conseguiu atenuar essas alterações, um efeito corroborado parcialmente por Behling et al. (2015) e por nosso trabalho, em que a OVX tratada com veículo também foi capaz de aumentar a lipoperoxidação, bem como, diminuir as a GSH, GPx e GR em amostras de fígado, coração e rim. Por outro lado, tanto a OVX quanto os antioxidantes não foram capazes de alterar os níveis de glutathiona total (GSH + GSSG), indicando que os antioxidantes que utilizamos NAC/LA foram capazes de preveniros defeitos induzidos pela OVX no consumo/reciclagem de GSH, restaurando a atividade do par enzimático GPx/GR, e não induzindo a biossíntese de GSH *de novo*. Isto pode explicar, pelo menos em parte, os mecanismos pelos quais a NAC/LA protegeram os tecidos do dano oxidativo ocasionados pela OVX. Apesar de algumas diferenças em relação às modulações de SOD e CAT nos estudos e em tecidos avaliados, há uma clara regulação negativa das defesas antioxidantes em muitos tecidos após a depleção dos hormônios sexuais, especialmente no sistema GPx/GR/GSH. Nossos dados, juntamente com as evidências descritas acima, sugerem que a falta dos hormônios sexuais na pós-menopausa contribui para um desequilíbrio oxidativo sistêmico, o que pode levar ao aumento da susceptibilidade dos tecidos periféricos aos danos de oxidantes fisiológicos e exógenos.

O NRF2 é um indutor clássico da biossíntese de GSH *de novo*, (ZANOTTO-FILHO et al., 2016). Em nosso estudo, não foi observado o aumento da síntese de GSH+GSSG, bem como, não obtivemos a indução de NRF2, tanto pela OVX, quanto pelos antioxidantes. No entanto, é importante destacar que a proteína NRF2 foi analisada apenas no final do estudo, ou seja, 24 horas após a última dose de NAC/LA. Sendo assim, não podemos excluir que talvez a NAC e LA promovam uma ativação transitória de NRF2. *In vitro*, foi demonstrado que o LA tem maior probabilidade de induzir a ativação de NRF2 do que a NAC. Contudo, em um trabalho realizado por Yoo, Liu e Kim (2016) foi demonstrado que a OVX em animais *Sprague-Dawley* foi capaz de diminuir a ativação de NRF2 no fígado desses animais; o mesmo foi encontrado por Li e colaboradores (2018) em amostras de osteoclastos.

Há evidências convincentes de alterações oxidativas em modelos OVX em murinos (SCHULLER et al., 2018; HERMOSO et al., 2016; RODRIGUES et al., 2013), embora os resultados se divergem entre os modelos e linhagens, especialmente no que diz respeito à modulação das enzimas antioxidantes. Por exemplo, Hermoso e colaboradores (2016) relataram um aumento de TBARS e carbonila e diminuição dos níveis de GSH e GPx sem alterações em GR, SOD e CAT no fígado de ratas *Wistar* em cerca de 50 dias pós-OVX, enquanto que Rodriguez e colaboradores (2013) observaram que a OVX diminuiu os níveis de GPx, GSH e Vitamina E, sendo que as atividades de SOD, CAT e TBARS não sofreram alterações. Por outro lado, Schuller et al. (2018) mostraram níveis mais baixos de SOD1 e SOD2 no fígado de ratas OVX quando suplementados com LA.

A OVX e a menopausa estão devidamente associadas ao ganho de peso corporal e ao metabolismo mais lento. A maioria dos estudos demonstram um aumento na gordura abdominal em mulheres durante a transição para a pós-menopausa (CARR, 2003). É sabido que os RE estrogênicos ativados modulam o peso corporal e o consumo de energia por múltiplos mecanismos, incluindo a regulação do metabolismo da gordura, o núcleo central do apetite, da saciedade e da diferenciação dos adipócitos, ademais, algumas ações do estrogênio podem aumentar os receptores de lipoproteínas no fígado (LIZCANO e GUZMAN, 2014). De fato, nossos dados demonstraram que a reposição realizada com o estrogênio foi capaz de prevenir o ganho de peso corporal e a atrofia uterina nos animais OVX, sendo que, NAC e LA não tiveram efeitos sobre esses parâmetros.

Além disso, NAC e LA não afetaram os níveis de estrogênio, bem como, não exerceram efeitos semelhantes ao estrogênio no modelo de células MCF-7. Esses resultados nos sugeriram que os benefícios associados às suplementações de NAC e LA não são devidos a uma atividade estrogênica. Nas células MCF-7 foi obtido que o tratamento com E2 promoveu sua proliferação, em baixa concentração (10 nM), enquanto que NAC e LA não tiveram efeito estimulador sobre a proliferação da MCF-7 em ensaio MTT realizado após 72 horas de tratamento, como já descrito anteriormente, entretanto, LA 5 mM foi capaz de causar citotoxicidade celular. Dozio e colaboradores (2010) também obtiveram que o LA, em doses de 0,5 – 2,5 mM, foram suficientes para causar citotoxicidade em células MCF-7, concluindo que o LA pode atuar como um agente antioxidante capaz de reduzir o crescimento celular, e isto pode depender, principalmente, do estado redox da linhagem celular utilizada. Sandhya e Mishra (2006)

demonstram que o composto Triphala, um combinado de antioxidantes, foi capaz de reduzir a proliferação de células MCF-7 de maneira dependente de dose e tempo, com isso, dependendo do antioxidante de escolha, bem como, da dose e tempo, há a possibilidade de reduzir a proliferação destas células com o uso de compostos antioxidantes.

Em nossos dados, foi demonstrado que o ganho de peso, em paralelo com a depleção de estrogênio ocorreu no período mais curto, a partir de 15 dias pós-OVX, enquanto que, às alterações oxidativas, inflamatórias e de colesterol apareceram somente após 60 dias pós-OVX. Além do ganho de peso corporal, vários estudos mostram o aumento do colesterol total sérico, resistência à insulina, deposição do tecido adiposo e inflamação subcrônica pós-OVX (ABBAS e ELSAMANOUDY, 2011). Babaei e colaboradores (2010) demonstraram não haver alterações na glicose de ratas OVX quando comparadas ao grupo Sham, sendo estes dados condizentes com os do nosso estudo; embora isso não exclui uma possível resistência à insulina em nosso modelo. Ademais, em nossos dados, foi apenas encontrado alterações no colesterol total, não havendo alterações na fração HDL, indiretamente indicando que possivelmente a fração LDL está aumentada em animais OVX. Valores de triglicerídeos séricos no sangue não foram alterados, concordando com achados de Zhu et al. (2013); Agacayak et al. (2015) e Morrone et al. (2016). Os antioxidantes que foram utilizados neste trabalho foram capazes de reduzir o colesterol induzido pela OVX, embora não possamos afirmar que este efeito metabólico esteja relacionado à melhora do equilíbrio oxidativo associado à suplementação com NAC e LA.

O estrogênio e seus derivados possuem uma capacidade antioxidante que pode atenuar os malefícios das espécies reativas geradas durante os processos inflamatórios (WANG et al., 2013). Há trabalhos que apontam que uma das causas do declínio das funções ovarianas seja o aumento das citocinas inflamatórias como IL-1 β ; IL-6 e TNF- α . Além disso, concentrações fisiológicas de estrogênio são capazes de inibir a secreção de cada uma dessas moléculas (AYALA et al., 1992) e reduzir os níveis das mesmas em situações de inflamações agudas (KUMRAL et al., 2014). O aumento sérico de IL-6 foi relatado em mulheres pós-menopausadas obesas comparado ao grupo com peso normal pareado por idade. Estudos prévios também correlacionaram, em mulheres na menopausa e idade mais avançada, o aumento de IL-6 sérica, TNF- α e IL-1 β , os quais correlacionados ao estresse oxidativo e inflamação subclínica (PAIK et al., 2015; KIM et al., 2012). Sabe-se que o aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias é um

mecanismo de ação que ocorre em muitas patologias que são relacionadas ao envelhecimento celular e, diferentes estudos clínicos já estabeleceram que há uma relação entre o aumento de TNF- α e IL-6 na corrente sanguínea, com o surgimento de patologias que ocorrem, em sua maioria, ao fim da fase fértil feminina (JILKA; HANGOC; GIRASOLE, 1992; SCHIEFFER et al., 2000). De acordo com Hong e colaboradores (2007), mesmo as mulheres saudáveis na pós-menopausa também apresentam níveis de TNF- α significativamente maiores do que as na pré-menopausa, sugerindo novamente que a deficiência de estrogênio resultaria no aumento de citocinas pró-inflamatórias.

A inflamação induz o estresse oxidativo e vice-versa, ocorrendo que, o estresse oxidativo e o aumento da adiposidade podem promover a pró-inflamação. O aumento do tecido adiposo promove uma inflamação subclínica, crônica e de baixo nível e que está correlacionada com câncer de mama, doenças cardíacas e risco de neurodegeneração (FERRUCCI e FABRI, 2018). Em modelos animais, Bhardwaj e colaboradores (2015) utilizaram camundongos C57BL/6J OVX tratados com dieta hiperlipídica (*high fat*), demonstrando um aumento da expressão de Cox-2, PGE2, TNF- α e IL-1 β no tecido adiposo mamário. A suplementação com estrogênio foi capaz de evitar o ganho de peso e a inflamação deste tecido. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que o *knockout* de RE- α em camundongos com a presença dos ovários e com uma dieta *High Fat* aumentaram o ganho de peso e resultaram em níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios, mimetizando os efeitos da OVX. Em consonância com o conceito de tecido adiposo como fonte de mediadores inflamatórios, nosso modelo mostrou que ocorreu o ganho de peso corporal induzido pela OVX, bem como o acúmulo de gordura retroperitoneal e o aumento das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6. Importante lembrar que os níveis de citocinas foram detectáveis em uma faixa de ng/mL, sendo considerados níveis baixos em condições inflamatórias mais agressivas, assim, concordando com o conceito de inflamação subclínica que trazemos em nosso trabalho. Mais relevante, a atenuação dos desequilíbrios oxidativos induzidos por OVX com NAC e LA foram benéficas na inflamação causada pela OVX.

Nossos dados sugerem que a NAC e LA melhoram o estresse oxidativo, o colesterol e os componentes inflamatórios associados à depleção de hormônios sexuais. Entretanto, é difícil estabelecer como o desequilíbrio oxidativo (demonstrado na disfunção do eixo GPx/GR/GSH e na depleção dos antioxidantes não enzimáticos), as alterações metabólicas dos lipídios e a inflamação *in vivo* se relacionam temporalmente no contexto da OVX. Entretanto, nosso estudo sugere

que os efeitos ocasionados pela OVX estão associados ao aumento do dano à biomoléculas, o que é provavelmente atribuído devido ao aumento da produção de espécies reativas, hipoteticamente geradas por mitocôndrias ou enzimas pró-oxidantes como a xantina oxidase (XO)/NADPH oxidase, ou pela diminuição de antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos; ou podemos considerar ambos mecanismos.

Nos tecidos que foram estudados (fígado, coração e rim), a depleção dos antioxidantes não enzimáticos causados pela OVX, como a GSH, foram suficientes para diminuir a enzima GPx e GR. Por outro lado, as atividades de SOD e CAT não foram alteradas. A suplementação de NAC e LA preveniram o comprometimento do sistema GPx/GR/GSH e foram capazes de impedir o esgotamento de antioxidantes totais não enzimáticos, atenuando o dano oxidativo induzido pela OVX.

Como a NAC e LA também restauraram o colesterol e diminuíram os níveis de citocinas inflamatórias, foi suposto que os ambientes pró-oxidantes induzidos pela OVX podem desempenhar um papel importante nas alterações metabólicas e na inflamação crônica e de baixo grau associada à depleção dos hormônios sexuais. Em conjunto com os resultados obtidos deste trabalho, bem como a comparação dos nossos achados com os dados da literatura, foi possível confirmar parte da nossa hipótese, pois conseguimos demonstrar que o estresse oxidativo juntamente com a perda hormonal ocasionada pela OVX colaborou com às alterações comumente observadas no período da menopausa e pós-menopausa e, a suplementação antioxidante de NAC e LA foi capaz de reverter, ao menos parcialmente, os danos ocasionados nesta fase, podendo ser uma estratégia para tratar alguns dos sintomas associados ao envelhecimento celular e declínio hormonal.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De modo geral, nossos dados sugerem que a NAC e LA foram capazes de prevenir os danos oxidativos, as alterações no perfil lipídico, e os marcadores pró-inflamatórios em modelo de OVX. Porém, ainda é difícil estabelecer como ocorre o desequilíbrio oxidativo ocasionado pela perda hormonal *in vivo*. Apesar deste fato, os dados deste trabalho sugerem o uso da suplementação com os antioxidantes NAC e LA como uma estratégia potencial para melhorar a saúde da mulher na menopausa, amenizando os danos celulares causados pelo envelhecimento e depleção dos hormônios sexuais femininos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.M.; ELSAMANOUDY, A.Z. Effects of 17-beta-estradiol and antioxidant administration on oxidative stress and insulin resistance in ovariectomized rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.89, n.7, p.497-504, 2011;

AGACAYAK et al. Oxidant/antioxidant status, paraoxonase activity, and lipid profile in plasma of ovariectomized rats under the influence of estrogen, estrogen combined with progesterone, and genistein. **Drug Design, Development and Therapy**, v.9, p.2975-2982, 2015;

AKMAN et al. Therapeutic effects of alpha lipoic acid and vitamin C on alveolar bone resorption after experimental periodontitis in rats: a biochemical, histochemical, and stereologic study. **Journal of Periodontology**, v. 84, n.5, p.666-674, 2013;

BABER, R. J.; PANAY, N.; FENTON, A. Recommendations on women's midlife health and menopause hormone therapy. **Climacteric**, v. 19, n. 2, p.109-150, 2016;

BABER, R. J.; WRIGHT, J. A brief history of the International Menopause Society. **Climacteric**, v. 20, n. 2, p.85-90, 2017;

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006;

BEHLING et al. Treatment of oxidative stress in brain of ovariectomized rats with omega-3 and lipoic acid. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.59, n.12, p.2547-2555, 2015;

BERLETT, S.; STADTMAN, E.R. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.33, p.20313-20316, 1997;

BHARDWAJ et al. Estrogen Protects against Obesity-Induced Mammary Gland Inflammation in Mice. **Cancer Prevention Research**, p.canpreves, 2015;

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999;

BRAND, D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. **Experimental Gerontology**, v. 45, n. 7-8, p.466-472, 2010;

BUTENANDT, A. Uber Progynon ein krystallisiertes weibliches Sexualhormon. **Naturwissenschaften**, v.17, n.45, p.879-879, 1929;

CARR, M.C. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.88, n.6, p.2404-2411, 2003;

CARREAU, S; VIENNE, C de; GALERAUD-DENIS, I. Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advances. **Advances in Medical Sciences**, v. 53, n. 2, p.139-144, 2008;

CHAKRABORTY, T.R.; GORE, A.C. Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function. **Experimental Biology and Medicine**, v.229, n.10, p.977-987, 2004;

CHANCE, B; SIES, H; A BOVERIS, Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p.527-605, 1979;

CHANG et al. Relationships of age, menopause and central obesity on cardiovascular disease risk factors in Chinese women. **International Journal of Obesity**, v.24, n.12, p.1699, 2000;

CLARK et al. Oral N-Acetyl-Cysteine Attenuates Loss of Dopaminergic Terminals in α -Synuclein Overexpressing Mice. **Plos One**, v. 5, n. 8, p.1-10, 23 ago. 2010;

CLARKSON, P.M.; THOMPSON, H.S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 72, n.2, p. 637S-46S, 2000;

CLAUZURE et al. Disruption of Interleukin-1 β Autocrine Signaling Rescues Complex I Activity and Improves ROS Levels in Immortalized Epithelial Cells with Impaired Cystic Fibrosis Transmembrane

Conductance Regulator (CFTR) Function. **Plos One**, v. 9, n. 6, p.1-17, 2014;

CONSENSO NACIONAL SOBRE MENOPAUSA. SOCIEDADE PORTUGUESA DE GINECOLOGIA. Disponível em: <http://www.spginecologia.pt/uploads/Consenso_Menopausa_2016.pdf> Acesso em: 14.07.2018;

CUI, J.; SHEN, Y.; LI, R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 3, p.197-209, 2013;

DALLE-DONNE et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica acta**, v.329, n.1-2, p.23-38, 2003;

DALLE-DONNE et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.10, n.2, p.389-406, 2006;

DAVINELLI et al. Influence of equol and resveratrol supplementation on health-related quality of life in menopausal women: A randomized, placebo-controlled study. **Maturitas**, v.96, p.77- 83, 2017;

DAVIS et al. Menopause. **Nature Reviews Disease Primers**, p.15004-15023, 2015;

DEROO, B. J. Estrogen receptors and human disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 3, p.561-570, 2006;

DIPLOCK et al. Functional food science and defence against reactive oxidative species. **British Journal of Nutrition**, v. 80, n. 1, p.77-112, 1998;

DOSA et al. Dose escalation study of intravenous and intra-arterial N-acetylcysteine for the prevention of oto- and nephrotoxicity of cisplatin with a contrast-induced nephropathy model in patients with renal insufficiency. **Fluids and Barriers of the CNS**, v.14, n.1, p.26, 2017;

DOWNEY, J M. Free Radicals and Their Involvement during Long-Term Myocardial Ischemia and Reperfusion. **Annual Review of Physiology**, v. 52, n. 1, p.487-504, 1990;

DOZIO et al. The natural antioxidant alpha-lipoic acid induces p27Kip1-dependent cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 641, n. 1, p.29-34, 2010;

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, p.421-431, 1990;

DRESCH et al. Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. **Analytical Biochemistry**, v.385, n.1, p.107-114, 2009;

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Archiver of Biochemistry and Biophysics**, n. 82, n.1, p. 70-77. 1959;

EVELSON et al. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.388, n.2, p.261-266, 2001;

FAYEZ, A.M.; ZAKARIA, S.; MOUSTAFA, D. Alpha lipoic acid exerts antioxidant effect via Nrf2/HO-1 pathway activation and suppresses hepatic stellate cells activation induced by methotrexate in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.105, p.428-433, 2018;

FENG et al. Quantitative proteomic profiling of muscle type-dependent and age-dependent protein carbonylation in rat skeletal muscle mitochondria. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v.63, n.11, p.1137-1152, 2008;

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 43.n 1, p.61-8, 1997;

FERRUCCI, L.; FABBRI, E. Inflammaging: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. **Nature Reviews Cardiology**, p.1, 2018;

FOXCROFT, L. **Hot Flushes, cold science: A History of the Modern Menopause**. Granta Books, 2011;

FRATANTONIO et al. Alpha-lipoic acid, but not di-hydrolipoic acid, activates Nrf2 response in primary human umbilical-vein endothelial cells and protects against TNF-alpha induced endothelium dysfunction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.655, p.18-25, 2018;

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **Journal of Experimental Biology**. v.201, 1998;

FRIED, S.K.; BUNKIN, D.A.; GREENBERG, A.S. Omental and Subcutaneous Adipose Tissues of Obese Subjects Release Interleukin-6: Depot Difference and Regulation by Glucocorticoid1. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 83, n. 3, p.847-850, 1998;

GALLIN et al. **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999;

GARDANNE, C.P.L. De La Menopause ou De L'âge Critique des Femmes. **Méquignon-Marvis**, 1821;

GLANTZOUNIS et al. Uric acid and oxidative stress. **Current Pharmaceutical Design**, v.11, n.32, p.4145-4151, 2005;

GU et al. Postmenopausal obesity promotes tumor angiogenesis and breast cancer progression in mice. **Cancer Biology Therapy**. v.11, n.10, p.910-917, 2011;

GUSTAFSSON, J. A. Novel Aspects of Estrogen Action. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 7, n. 1, p.8-9, 2000;

GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWELL, B. Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000: A Historical Look to the Future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, n. 1, p.136-147, 2006;

HA, B. J. Oxidative stress in ovariectomy menopause and role of chondroitin sulfate. **Archives of Pharmacal Research**, v.27, n.8, p.867-872, 2004;

HA et al. Alpha-Lipoic acid inhibits inflammatory bone resorption by suppressing prostaglandin E2 synthesis. **The Journal of Immunology**, v.176, n.1, p.111-117, 2006;

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Biology & Medicine**, v.8, n.1, p.125–126, 1995;

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., eds., **Free Radicals in Biology & Medicine**, p.187-267, 2007;

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Letters**, v. 486, n.1, p.10-13, 2000;

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. **Methods of Enzimology**, v. 186, n. 1, 1990;

HERMOSO et al. Melatonin protects female rats against steatosis and liver oxidative stress induced by oestrogen deficiency. **Life Sciences**, v.157, p.178-186, 2016;

HERMSDORFF, H.H.M.; MONTEIRO, J.B.R. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 6, p.803-811, 2004;

HERTIG, A.T. Allen and Doisy's 'An Ovarian Hormone'. **JAMA**, v. 250, n. 19, p.2684-2688, 1983;

HILLIER et al. Follicular oestrogen synthesis: the “two-cell, two-gonadotrophin” model revisited. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.100, n.1-2, p.51–54, 1994;

HOLMAY et al. N-Acetylcysteine boosts brain and blood glutathione in Gaucher and Parkinson diseases. **Clinical Neuropharmacol**, v.36, n.4, p.103, 2013;

HONG et al. Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. **Clinica Chimica Acta**. v. 340, p. 107-115, 2004;

HUSSAN et al. Curcumin Protects against Ovariectomy-Induced Bone Changes in Rat Model. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2012, 2012;

JYOTHI, N.; PASHA, S. Development and Validation of a New Rp-Hplc Method For Simultaneous Estimation of N-Acetylcysteine and L – Arginine in Combined Dosage form. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 30, n. 3, p.1371-1378, 2014;

KEMMERER et al. Comparison of human Nrf2 antibodies: A tale of two proteins. **Toxicology Letters**, v.238, n.2, p.83-89, 2015;

KIM et al. Effects of aging and menopause on serum interleukin-6 levels and peripheral blood mononuclear cell cytokine production in healthy nonobese women. **Age**, v.34, n.2, p.415-425, 2012;

KOLAGAL et al. Determination of oxidative stress markers and their importance in early diagnosis of uremia-related complications. **Indian Journal of Nephrology**, v.19, n.1, p.8, 2009;

KOLESNIKOVA et al. Antioxidant status in peri- and postmenopausal women. **Maturitas**, v.81, n. 1, p.83-87, 2015;

KOUFAKI, M. Therapeutic applications of lipoic acid: a patent review (2011 – 2014). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 24, n. 9, p.993-1005, 2014;

KREUZ, S.; FISCHLE, W. Oxidative stress signaling to chromatin in health and disease. **Epigenomics**, v. 8, n. 6, p.843-862, 2016;

LAU et al. The predicted molecular weight of Nrf2: it is what it is not. **Antioxidants & Redox Signalling**, v.18, n.1, p.91-93, 2013;

LEVINE et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, p.464-478, 1990;

LISSI et al. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. **Free Radical Biology and Medicine**, v.18, n.2, p.153-158, 1995;

LIZCANO, F.; GUZMÁN, G. Estrogen Deficiency and the Origin of Obesity during Menopause. **Biomed Research International**, v. 2014, p.1-11, 2014;

LOBO, R.A. Hormone-replacement therapy: current thinking. **Nature Reviews Endocrinology**, v.13, n.4, p.220, 2017;

LOWRY et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, n.1, p.265–275, 1951;

MA et al. The effects of different doses of estradiol (E2) on cerebral ischemia in an in vitro model of oxygen and glucose deprivation and reperfusion and in a rat model of middle carotid artery occlusion. **BMC Neurosciense**, v.14, n.1, p.118, 2013;

MANNERVIK, B. Measurement of glutathione reductase activity. **Current Protocols in Toxicology**, n.1, p.721-724, 1999;

MARÍ et al. Mitochondrial Glutathione, a Key Survival Antioxidant. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 11, p.2685-2700, 2009;

MINARINI et al. N-acetylcysteine in the treatment of psychiatric disorders: current status and future prospects. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v.13, n.3, p.279-292, 2017;

MIOUEL et al. Menopause: A review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 42, n. 3, p.289-306, 2006;

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v.247, n.10, p.3170-3175, 1972;

MORRONE et al. Curcumin Supplementation Decreases Intestinal Adiposity Accumulation, Serum Cholesterol Alterations, and Oxidative Stress in Ovariectomized Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2016, p.1-12, 2016;

NEUWELT et al. Therapeutic efficacy of aortic administration of N-acetylcysteine as a chemoprotectant against bone marrow toxicity after intracarotid administration of alkylators, with or without glutathione depletion in a rat model. **Cancer Research**, v.61, n.21, p.7868-7874, 2001;

NIKI, E.; NAKANO, M. Estrogens as antioxidants. **Methods Enzymol**, v.186, p.330-333, 1990;

ORRENIUS, S.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.47, p.143-183, 2007;

PACKER, L.; CADENAS, E. Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 48, n. 1, p.26-32, 2010;

PAIK et al. Circulating Lp-PLA (2) activity correlates with oxidative stress and cytokines in overweight/obese postmenopausal women not using hormone replacement therapy. **Age**, v.37, n.2, p.32, 2015;

PAPANAS, N.; ZIEGLER, D. Efficacy of alpha-lipoic acid in diabetic neuropathy. **Expert Opin Pharmacother**, v.15, n.18, p.2721-3731, 2014;

PFEILSCHIFTER et al. Changes in Proinflammatory Cytokine Activity after Menopause. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 1, p.90-119, 2002;

PHILLIPS et al. Relationship between serum sex hormones and coronary artery disease in postmenopausal women. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.17, n.4, p.695-701, 1997;

PIZZIMENTI et al. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. **Frontiers in Physiology**, v.4, p.242, 2013;

POLAT et al. The effect of alpha-lipoic acid in ovariectomy and inflammation-mediated osteoporosis on the skeletal status of rat bone. **European Journal of Pharmacology**, v.718, n.1-3, p.469-474, 2013;

PYNE, D.B. Regulation of Neutrophil Function During Exercise. **Sports Medicine**, v. 17, n. 4, p.245-258, 1994;

RADZKI et al. Lipoic acid stimulates bone formation in ovariectomized rats in a dose-dependent manner. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.94, n.9, p.947- 954, 2016;

RECZEK, C.R.; CHANDEL, N.S. ROS-dependent signal transduction. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 33, p.8-13, 2015.

REED, L.J. A trail of research from lipoic acid to alpha-keto acid dehydrogenase complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.42, p.38329-38336, 2001;

REGO et al. Neurosteroid biosynthesis: Enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, n. 3, p.259-301, 2009;

RODRIGUES et al. Effects of ovariectomy and resistance training on oxidative stress markers in the rat liver. **Clinics**, v.68, n.9, p.1247-1254, 2013;

ROVER, J.L.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado à métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2004;

SANDHYA, T.; MISHRA, K. Cytotoxic response of breast cancer cell lines, MCF 7 and T 47 D to triphala and its modification by antioxidants. **Cancer Letters**, v. 238, n. 2, p.304-313, 2006;

SANTEN et al. History of Aromatase: Saga of an Important Biological Mediator and Therapeutic Target. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 4, p.343-375, 2009;

SAVONENKO, A.V.; MARKOWSKA, A.L. The cognitive effects of ovariectomy and estrogen replacement are modulated by aging. **Neuroscience**, v.119, n.3, p.821-830, 2003;

SCHULLER et al. Effects of lipoic acid and n -3 long-chain polyunsaturated fatty acid on the liver ovariectomized rat model of menopause. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 2, p.263- 269, 2018;

SEIFRIED et al. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 9, p.567-579, 2007;

SHAY et al. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v.1790, n.10, p.1149- 1160, 2009;

SHI et al. Bone marrow ablation demonstrates that estrogen plays an important role in osteogenesis and bone turnover via an antioxidative mechanism. **Bone**, v.79, p.94-104, 2015;

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox biology**, v.4, p.180- 183, 2015;

SMITH et al. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**, v.11, n.9, p.1135-1146, 2004;

SULTANA et al. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. **Free Radical Biology and Medicine**, v.62, p.157-169, 2013;

THE NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY. The 2017 hormone therapy position statement of The North American Menopause Society. Menopause: **The Journal of The North American Menopause Society**, v.24, n.7, p.728-753, 2017;

TURRENS. J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of Physiology**, v.552, n.2, p.335-344, 2003;

UPPOOR et al. Oxidative Stress in Obese Postmenopausal Women: An Additive Burden for Atherosclerosis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**, v.9, n.12, p.OC03, 2015;

VALKO et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p.44-84, 2007;

WALLACE, D.C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging and cancer: a dawn for evolutionary medicine. **Annu. Rev. Genet.**, v.39, p.359-407, 2005;

WANG et al. The oncologic impact of hormone replacement therapy in premenopausal breast cancer survivors: A systematic review. **The Breast**, v.40, p.123-130, 2018;

WANG et al. Redox homeostasis: the linchpin in stem cell self-renewal and differentiation. **Cell Death & Disease**, v. 4, n. 3, p.1-10, 2013;

WENDEL A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, p.325-333, 1981;

WINK et al. A randomized placebo-controlled pilot study of N-acetylcysteine in youth with autism spectrum disorder. **Molecular Autism**, v. 7, n. 1, p.1-9, 2016;

YOO, J.; LIU, Y.; KIM, H. Hawthorn Fruit Extract Elevates Expression of Nrf2/HO-1 and Improves Lipid Profiles in Ovariectomized Rats. **Nutrients**, v. 8, n. 5, p.1-16, 2016;

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 1, p.139-162, 1994;

ZAFARULLAH et al. Molecular mechanisms of N -acetylcysteine actions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.60, p.6–20, 2003;

ZANOTTO-FILHO et al. Inflammatory landscape of human brain tumors reveals an NFkappaB dependent cytokine pathway associated with mesenchymal glioblastoma. **Cancer Letters**, v.390, p.176-187, 2017;

ZANOTTO-FILHO et al. Alkylating Agent-Induced NRF2 Blocks Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis via Control of Glutathione Pools and Protein Thiol Homeostasis. **Molecular Cancer Therapeutics**, p.molcanther, 2016;

ZHANG, W.J.; FREI, B. α -Lipoic acid inhibits TNF- α -induced NF κ -B activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. The **FASEB Journal**, v.15, n.13, p.2423–2432, 2001;

ZHU et al. Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver and may improve pathway-selective insulin resistance. **Diabetes**, v.62, n.2, p.424-434, 2013.

APÊNDICE A



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Antioxidantes como moduladores das alterações inflamatórias e oxidativas em modelo animal de menopausa", protocolada sob o CEUA nº 2231170317, sob a responsabilidade de **Alfeu Zanotto Filho** e equipe; *Marina Delgobo; Jonathan Paulo Agnes* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 05/09/2017.

We certify that the proposal "Antioxidants modulating the inflammatory and oxidative changes in animal model of menopause.", utilizing 160 Heterogenics rats (160 females), protocol number CEUA 2231170317, under the responsibility of **Alfeu Zanotto Filho** and team; *Marina Delgobo; Jonathan Paulo Agnes* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 09/05/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **05/2017** a **03/2019**

Área: **Farmacologia**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **90 a 150 dias**

N: **160**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **175 a 350 g**

Resumo: A menopausa é um evento que se inicia por volta dos 45 até 55 anos de idade em todas as mulheres, caracterizando-se pela falência ovariana e depleção paulatina de progesterona e estrogênio. Esse período está associado ao aumento no risco de doenças cardiovasculares, obesidade, câncer de mama e osteoporose entre outras doenças associadas ao envelhecimento. O estrogênio foi recentemente descrito como um relevante antioxidante endógeno (via ativação da expressão de enzimas antioxidantes) o que poderia explicar o quadro pró-oxidante e inflamatório observado em mulheres em menopausa. Uma vez que a inflamação e o estresse oxidativo vêm sendo associados com a depleção hormonal em menopausa, neste projeto achamos relevante abordar o contexto da suplementação com diferentes antioxidantes, com diferentes mecanismos de ação quelante de radicais livres, em modelo animal de menopausa. Nosso objetivo geral é avaliar os efeitos da administração de ácido Lipóico; N-acetilcisteína, Vitamina E e curcumina sob os parâmetros inflamatórios e oxidativos em ratas Wistar adultas, ovariectomizadas, através da dosagem dos níveis séricos das citocinas pró- (IL1?, TNF?) e anti- (IL-10) inflamatórias, por ELISA, e dos parâmetros oxidativos (TBARS, Carbonilação, atividades das enzimas superóxido dismutase, catalase, entre outras) em tecidos do sistema nervoso central, rins, fígado e coração. O objetivo primário é avaliar se as mudanças oxidativas e inflamatórias características da menopausa (verificadas em humanos e modelos animais) podem ser atenuadas pela suplementação com algum dos antioxidantes em teste. Isso nos permitirá traçar o uso do antioxidante correto no contexto da menopausa. Esperamos que os antioxidantes testados venham a produzir diferentes resultados em função dos seus diferentes mecanismos de ação molecular. A relevância deste estudo se dá em função dos altos impactos que a menopausa causa na saúde da mulher, em função das doenças associadas, e na facilidade translocacional que pode ser atingida em função da segurança farmacológica dos antioxidantes.

Local do experimento: Todos os experimentos serão realizados no Departamento de Farmacologia da UFSC (sala de cirurgia, laboratório 204 para tratamentos e coleta das amostras), e alguns procedimentos utilizarão equipamentos disponíveis nos LAMEB do Centro de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 11 de setembro de 2017



Universidade Federal
de Santa Catarina

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'R. Tonussi'.

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Castro'.

Maria Alcina Martins de Castro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina