

O envolvimento do estrogênio no estresse oxidativo induzido pela ligadura parcial da veia porta em ratas Wistar

SIMONE IAHNIG JACQUES¹
ELIZÂNGELA SCHEMITT²
FRANCIELLI LICKS³
RENATA HARTMANN⁴
CAMILA MARQUES⁵
MARIA ISABEL MORGAN MARTINS⁶
NORMA POSSA MARRONI⁷

RESUMO

A Hipertensão Portal (HP) é uma complicação secundária à cirrose que tem como característica um aumento do fluxo sanguíneo e/ou resistência vascular no sistema porta, causando o surgimento de uma circulação colateral hiperdinâmica. O estrogênio é uma molécula antioxidante com diferentes ações fisiológicas. O objetivo foi verificar a ação antioxidante do estrogênio endógeno em modelo experimental de ligadura parcial da veia porta (LPVP) comparando ratas intactas com ratas castradas. Foram utilizadas 20 ratas Wistar, divididas em 4 grupos: SO, I+LPVP, C e C+LPVP. Avaliou-se a lipoperoxidação, a atividade das enzimas antioxidantes, o tamanho dos

¹ Acadêmica do Curso de Biologia/ULBRA-Canoas - Bolsista PROICT/ULBRA

² Acadêmica do Curso de Biologia/ULBRA-Gravataí – Bolsista BIC/FAPERGS

³ Acadêmica do Curso de Biomedicina /ULBRA – Bolsista PROICT/ULBRA

⁴ Aluna de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA

⁵ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/UFRGS

⁶ Professora do Curso de Biologia/ULBRA

⁷ Professora – Orientadora do Curso de Biologia/ULBRA e do PPG Genética e Toxicologia Aplicada e Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA (nmarroni@terra.com.br)

cornos uterinos e histologia. Nos resultados obtidos encontramos uma maior proteção nos animais intactos quanto ao estresse oxidativo quando comparado aos animais castrados. Sugerimos que o estrogênio, por apresentar radicais hidrofênicos em sua molécula, desempenha um papel protetor nas ratas intactas, agindo como antioxidante, neste modelo experimental.

Palavras-chave: hipertensão portal, estresse oxidativo, antioxidante, castração, estrogênio.

ABSTRACT

Portal Hypertension (PH) is a complication secondary to cirrhosis that is characterized by an increased blood flow and / or vascular resistance in the portal system, causing the appearance of a collateral circulation hyperdynamic. Estrogen is an antioxidant molecule with various physiological actions. The objective was to assess the antioxidant activity of endogenous estrogen in an experimental model of partial portal vein ligation (PPVL) compared with intact rats castrated rats. We used 20 Wistar rats were divided into four groups: SO, I + LPVP C and C + PPVL. We evaluated the lipid peroxidation, the antioxidant enzyme activities, the size of uterine horns and histology. Their results have found greater protection in intact animals to oxidative stress as compared to castrated animals. We suggest that estrogen, by presenting hidrofênicos radicals in its molecule, plays a protective role in intact rats, thus acting as an antioxidant in this experimental model.

Key words: portal hypertension, oxidative stress, antioxidant, castration, estrogen

INTRODUÇÃO

A hipertensão portal (HP) é uma complicação da cirrose caracterizada pela dilatação dos vasos mesentéricos com aumento da pressão venosa portal e desenvolvimento da circulação colateral que desvia o sangue do sistema porta para a circulação sistêmica, contornando o fígado e levando à formação de varizes gastroesofágicas e dilatação dos vasos da submucosa gástrica, situação esta que caracteriza a Gastropatia da Hipertensão Portal (GHP) (MCCORMACK et al., 1985; BOSCH et al., 2008).

A HP ocorre por uma obstrução do fluxo sanguíneo nos vasos, provocada por diferentes doenças que ocorrem em localizações anatômicas pré, intra ou pós-hepáticas, respectivamente, a

trombose portal, a cirrose e a síndrome de Budd-Chiari (CAMERON et al., 1983, CICHOZ-LACH et al., 2008).

A tentativa de descomprimir o sistema portal faz com que a comunicação entre a circulação portal e a sistêmica torne os vasos dilatados e tortuosos, sendo que um dos locais mais comuns é na submucosa do estômago e esôfago. Pode haver anastomose entre os vasos periesplênicos (componentes do sistema portal) e as veias gástricas curtas que drenam para a veia cava superior, constituindo a principal fonte para as varizes do plexo submucoso do estômago e para a GHP (MARTINELLI, 2004).

A GHP se caracteriza por apresentar alterações vasculares predominantemente na submucosa incluindo pontos vermelhos gástricos ou “petéquias

gástricas”, nítida ectasia vascular e ausência de processo inflamatório (MCCORMACK et al., 1985; PRIMIGNANI et al., 2000).

As alterações no fluxo sanguíneo geram a liberação de substâncias vasoativas produzidas pelo endotélio como vasodilatadores (prostaciclina e óxido nítrico) e vasoconstritores (endotelina e prostanóides) que agem de forma parácrina na musculatura lisa (MARTINELLI, 2004).

O modelo em ratos para a indução da hipertensão portal foi descrito por Sikuler et al. (1985), em que é realizada uma ligadura parcial da veia porta (LPVP), o que leva a um aumento do fluxo venoso portal, sem comprometer as funções hepáticas, pois é um modelo pré-hepático. Este modelo possibilita avaliar diferentes estágios da HP, a interação entre fluxo e resistência do sistema portal, a relação entre o desenvolvimento do estado hiperdinâmico circulatório, a elevação do fluxo venoso portal, bem como, avaliar ações de diferentes fármacos que alterem o grau da pressão portal (PP) (SIKULER; GROSZMANN, 1985).

As alterações hemodinâmicas envolvidas na HP levam ao aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO) na mucosa gástrica, que desencadeiam o estresse oxidativo (EO) (MOREIRA et al., 2004). Tanto as alterações hemodinâmicas como o EO atingem de modo diferente homens e mulheres, como descrito em diferentes estudos e pesquisas randomizadas que indicam que a incidência de doenças coronarianas é menor em mulheres na pré-menopausa quando comparadas com homens na mesma faixa etária, e têm apontado para um aumento das doenças cardiovasculares na menopausa (SALEH et al., 2000). Segundo Borrás et al. (2003), a mitocôndria é responsável pelas diferenças de longevidade entre os gêneros, concluindo que a produção oxidante da mitocôndria de machos é

maior que das fêmeas. Em outro estudo, Borrás et al. (2010), constataram que estes efeitos são pela ação do estrogênio (E2) que auto-regula a expressão de genes nucleares de enzimas antioxidantes e agem diretamente nas mitocôndrias, contribuindo para o efeito protetor em fêmeas.

Os receptores estrogênicos têm sido detectados nas células do músculo liso, artérias coronárias e células endoteliais, causam uma imediata vasodilatação por aumentar a formação e liberação do óxido nítrico (NO) e prostaciclina nas células endoteliais (ZHU; CONNEY, 1998; LEVIN, 2002a). Nas células, o E2 pode inibir a apoptose das células endoteliais e promove a atividade angiogênica *in vitro* (GRUBER et al., 2002). Assim os estrogênios são considerados agentes vasoprotetores (ZHU; CONNEY, 1998; LEVIN, 2002b), bem como, eles agem em diferentes mecanismos intracelulares devido a sua atividade como antioxidante, por apresentar grupamento hidrofênolico em sua molécula, o que lhes confere ação como “scavenger” de radicais livres (RL), diminuindo a formação das espécies reativas de oxigênio (ERO) (NIKI; NAKANO, 1990).

Em um estudo piloto realizado entre grupos de machos e fêmeas submetidos ao modelo experimental de LPVP, a LPO apresentou um aumento significativo no grupo dos machos enquanto que no grupo das fêmeas os resultados foram semelhantes ao grupo controle. Ou seja, a LPVP, nos machos, leva à hipertensão portal e aumento da LPO, enquanto que as fêmeas estavam protegidas do dano induzido pela LPVP neste tempo de indução, já estabelecido para os machos.

Tendo em vista que a HP leva ao desenvolvimento de uma circulação hiperdinâmica e ao estresse oxidativo, o objetivo deste estudo foi verificar a ação do E2 no estômago de ratas Wistar que foram submetidas à castração e à ligadura parcial de veia porta (LPVP).

MATERIAL E MÉTODOS

Animals

Vinte ratas Wistar, pesando 250g foram utilizadas. Elas foram obtidas a partir Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Porto Alegre, RS, foram mantidos no Biotério da Universidade Luterana do Brasil em caixas de plástico medindo 47x34x18cm forrada com lascas de madeira (maravalha), em ciclo claro/escuro de 12 horas (7:00-07:00), a uma temperatura de 22 ± 4 ° C. Os ratos foram alimentados com 16g/animal/dia na ração (Purina-Nutripal, Porto Alegre, RS, Brasil) e tinha água ad libitum.

Este experimento cumpriu as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, sob o protocolo 55-2010.

Delineamento Experimental

As ratas foram divididas em 4 grupos (n=5): SO – “sham-operated”, foram submetidas à simulação das cirurgias de castração e Ligadura parcial da Veia Porta LPVP; I+LPVP – intactas (I) onde foi simulada a castração e submetidas a cirurgia de LPVP; C – castradas, submetidas a castração e a simulação da LPVP e C+LPVP – foram submetidas às cirurgias de castração e da LPVP.

Castração

Os procedimentos de castração (grupo C e C+LPVP) e de simulação (grupo SO e I+LPVP) foram realizados no primeiro dia do experimento. As ratas foram anestesiadas com Cetamina (cloreto de cetamina -Parke-Davis, São Paulo) na dose de

100 mg/Kg e Xilazina (cloreto de xilazina - LAB) 50 mg/Kg intraperitonealmente e a cirurgia de castração foi realizada bilateralmente conforme o modelo de BAKER et al. (1979).

Indução da Hipertensão Portal

Após sete dias da castração ou simulação, os animais foram anestesiados, conforme descrito anteriormente, e foram realizadas a LPVP, através de uma incisão no abdômen, as alças intestinas foram expostas e umedecidas e a veia porta era isolada e parcialmente ocluída. Após era verificada se não ocorria trombose (SIKULER et al., 1985).

O grupo SO e C foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém a veia não era parcialmente ocluída.

Medida da Pressão Portal

A pressão Portal foi avaliada em mmHg em um polígrafo 2006 (Letica Scientific Instruments, Barcelona, Barcelona, Spain) por canulação da veia mesentérica.

Morte dos Animais

Os animais foram mortos após o registro da pressão portal por exsanguinação sob anestesia profunda. O estômago foi retirado e pesado, um pequeno fragmento foi separado e emergido em formol tamponado para posterior análise histológica e o restante do tecido foi congelado a -80°C para posteriores avaliações bioquímicas.

O corno uterino das ratas foi retirado e imediatamente pesado (peso úmido), logo após foram

colocados em estufa por 24 horas para posterior aferição do peso seco.

Homogeneizados de Estômago

O estômago foi rapidamente retirado e homogeneizado durante 30 segundos em Ultra-Turrax, na presença de KCl 1,15% (5 mL por g de tecido) e de fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100 mM em isopropanol (10 μ L por mL de KCl adicionado). Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada (Sorvall Super T21 – Condensed Operating Kendro Laboratory Products – USA – SN 9900069) e o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a -80°C para as dosagens posteriores (LLESUY et al, 1985).

Proteína

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores, que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1mg/mL (LOWRY, 1951), realizada a leitura em espectrofotômetro a 625nm. Os valores foram usados para calcular valores de TBARS (substâncias tiobarbitúrico ácido-reativa) e enzimas antioxidantes.

Lipoperoxidação do Estômago

A técnica usada para avaliar a lipoperoxidação (LPO) é a das substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). O ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da LPO, entre eles o malondialdeído e outros aldeídos. O ensaio foi realizado e a

absorbância foi determinada espectrofotometricamente a 535nm (BUEGE; AUST, 1978).

Atividade das Enzimas Antioxidantes

A análise da enzima superóxido dismutase (SOD) é baseada na inibição da reação com do radical superóxido com a adrenalina, valores foram expressos em U/mg prot. (MISRA; FRIDOVICH, 1972). A atividade da catalase (CAT) é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, valores expressos em p mol/mg prot. (BOVERIS; CHANCE, 1973; WEBSTER; NUNN, 1988). A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH, na presença de GSH e GR na reação de redução acoplada à reação da GPx (WENDEL, 1981), os valores são expressos em mmoles/min/mg prot (FLOHE; GUNZLER, 1984).

Histologia

Para avaliação histológica, parte do estômago foi preservado em formol a 10% por 24 horas, incluídos em parafina e cortado em 3 seções mM com um micrótomo. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (100x).

Análise estatística

Todos os dados são apresentados como médias \pm erro padrão da média (EM). A significância estatística foi calculada usando GraphPad InStat versão 3.0 para Windows XP2000. Nós utilizamos a análise da variância (ANOVA) e Student-Newman-Keuls para análise múltipla, adotando nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Na Figura 1 observamos que os cornos uterinos dos grupos C e C+LPVP, apresentavam um peso significativamente menor ($p < 0.05$) que os grupos SO e I+LPVP, tanto para o peso úmido como para o peso seco. Na figura 2 observamos a nítida diferença entre os cornos uterinos, onde A representa o animal intacto e em B os animais castrados que mostra redução do tamanho dos cornos uterinos

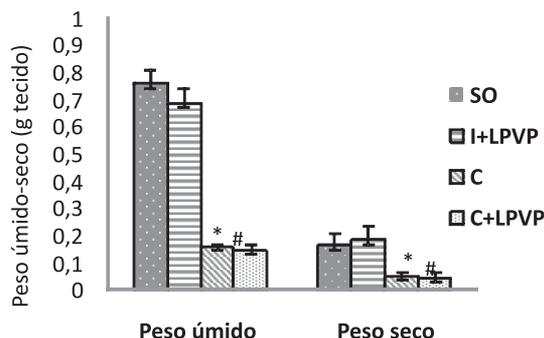


Figura 1. Peso úmido e peso seco dos cornos uterinos das ratas submetidas à cirurgia de castração e ratas intactas.

Média \pm erro padrão da média (n=5).

Diferença significativa ($p < 0.05$) C+LPVP e C comparando com SO e I+LPVP tanto para peso úmido dos cornos uterinos quanto para peso seco.

SO – grupo sham; I+LPVP – intactas com ligadura parcial da veia porta; C – castradas; C+LPVP – castradas com ligadura parcial da veia porta

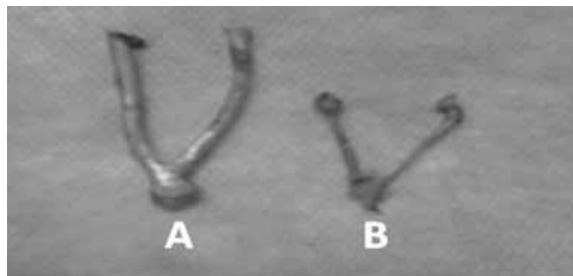


Figura 2. Fotografia de um corno uterino de uma rata intacta (A) – padrão encontrado nos grupos SO e I+LPVP e de uma rata castrada (B) – padrão verificado nos grupos C e C+LPVP.

Na Figura 3, analisamos os resultados da PP nos diferentes grupos experimentais onde foi encontrado um aumento significativo no grupo C+LPVP em relação aos demais ($p < 0.05$).

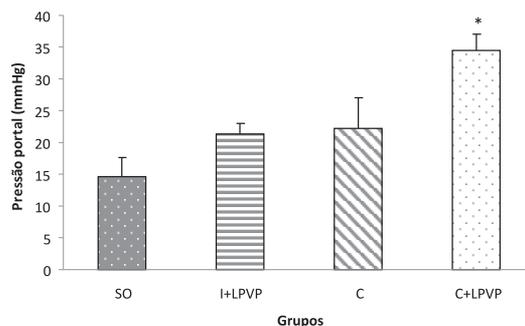


Figura 3. Valores médios da pressão portal (mmHg) entre os diferentes grupos .

Média \pm erro padrão da média (n=5).

* Apresenta diferença significativa para $p < 0.05$ C+LPVP comparando aos demais grupos.

SO – grupo sham; I+LPVP – intactas com ligadura parcial da veia porta; C – castradas; C+LPVP – castradas com ligadura parcial da veia porta

Quanto aos valores de LPO obtidos através da técnica de TBARS em homogeneizado de estômago, podemos verificar um aumento significativo ($p < 0.05$) da LPO nos grupos C e C+LPVP em relação aos grupos SO e I+LPVP (Figura 4), evidenciando que a castração gerou um aumento da lipoperoxidação, e que o fato dos grupos SO e I+LPVP, manterem o ovário e, portanto com estrogênio circulante não teve diferença significativa da LPO nestes dois grupos.

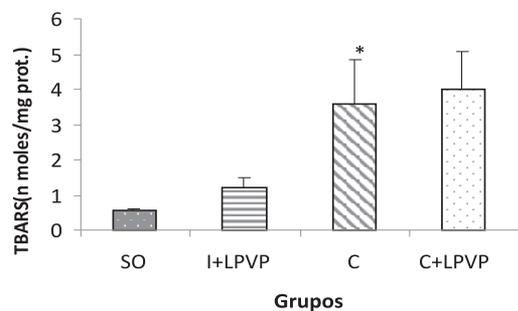


Figura 4. Valores médios de TBARS nos diferentes grupos estudados.

Média \pm erro padrão da média (n=5).

*Apresenta diferença significativa ($p < 0.05$) no grupo C+LPVP e C comparando aos demais grupos.

SO – grupo *sham*; I+LPVP – intactas com ligadura parcial da veia porta; C – castradas; C+LPVP – castradas com ligadura parcial da veia porta

A atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx foram avaliadas em homogeneizado de estômago. Os dados encontram-se na Tabela 1.

Quanto à atividade da enzima SOD foi observado que o grupo C apresentou um aumento significativo da sua atividade em relação aos grupos SO e I+LPVP, e que o grupo C+LPVP apresentou um aumento significativo da atividade da SOD em relação a todos os grupos. A atividade da enzima catalase mostrou o mesmo padrão de resultados encontrados na enzima SOD. Quando analisada a atividade da GPx, verificou-se um aumento significativo do grupo C em relação aos demais grupos.

Tabela 1. Valores da atividade das enzimas SOD, CAT e GPx.

	SO	I+LPVP	C	C+LPVP
SOD _(USOD/mg prot)	26,33 \pm 5	24,17 \pm 1,6	80,73 \pm 8,5*	112,64 \pm 9,8#
CAT _(pmoles/mg de prot)	0,14 \pm 0,02	0,16 \pm 0,01	0,24 \pm 0,005*	0,35 \pm 0,06#
GPx _(nmoles/min/mg prot)	0,67 \pm 0,28	0,51 \pm 0,18	2,9 \pm 0,05*	0,57 \pm 0,02

* Aumento significativo ($p < 0.05$) da enzima SOD e CAT nos grupos C e C+LPVP em relação aos demais grupos.

* Aumento significativo ($p < 0.05$) da GPx em relação aos demais grupos.

Média \pm erro padrão da média (n=5). SO – grupo *sham*; I+LPVP – intactas com ligadura parcial da veia porta; C – castradas; C+LPVP – castradas com ligadura parcial da veia porta

Foi observado na análise histológica em tecido de estômago que os animais dos grupos I+LPVP e C+LPVP apresentaram edema, congestão e proliferação de vasos (Figura 5 C/D), em contraste com os animais dos grupos SO e C que não sofreram LPVP (Figura 5 A/B).

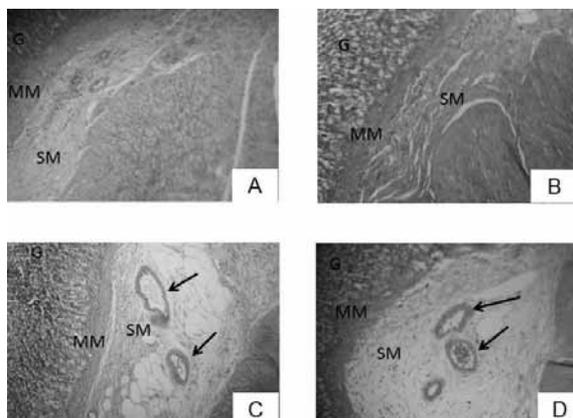


Figura 5. Micrografia de tecido gástrico de uma rata do grupo SO (A), rata do grupo C (castrada) (B), rata do grupo I+LPVP (C) e rata do grupo C+LPVP (D).

G: tecido glandular, MM: *muscularis mucosae*, SM: submucosa.

Coloração de Hematoxilina e Eosina. Aumento de 100x.

Edema, congestão e proliferação de vasos são verificados nas imagens C e D.

DISCUSSÃO

Neste trabalho queremos verificar se ratas intactas podem ser protegidas dos danos induzidos pela LPVP neste tempo experimental já estabelecido por outros autores em grupos de machos.

A castração (ovariectomia) é um procedimento cirúrgico de retirada dos ovários, a fim de induzir a “menopausa” (ausência de estrogênio). Em estudo anterior realizado com ratas Wistar (MORGAN-MARTINS, 2003), comprovou-se que após sete dias da castração, os animais não apresentavam níveis séricos de estrogênios detectáveis.

A fim de comprovar a eficácia da castração, foi comparado o peso úmido e seco dos cornos uterinos dos animais de todos os grupos. Na Figura 1 e 2, evidencia que a retirada do E2 circulante é

responsável pela redução do tamanho e do peso dos cornos uterinos, logo o estrogênio é responsável manutenção da integridade do órgão, como fica evidenciado nos resultados.

A ovariectomia diminui o peso dos cornos uterinos e dos níveis de estrogênio circulante, comprovando a eficácia da cirurgia de castração (TORREZAN et al., 2008).

O trabalho de Borecki et al. (2009) demonstra que o estrogênio apresenta uma proteção sobre a mucosa gástrica e outros estudos mostram que a participação do estrogênio no sistema cardiovascular confere maior proteção as mulheres em idade reprodutiva que homens nesta mesma faixa etária, isso se deve a sua atividade per se, ou seja sua ação como hormônio e por sua atividade como antioxidante (DANTAS; CARVALHO, 2000; MORGAN-MARTINS, 2003; FERNANDES et al., 2004; BOREKCI et al., 2009).

No décimo segundo dia do início do experimento foi aferida a Pressão Portal (PP), em trabalhos anteriores com machos, realizados pelo nosso grupo e por outros pesquisadores, mostra que em machos a PP aumenta significativamente nos animais com LPVP (SIKULER et al., 1985; YOKOYAMA et al., 2001; MOREIRA et al., 2004; WEN et al., 2009). Porém este estudo com fêmeas mostrou um perfil diferente em relação à PP, verificou-se um aumento significativo apenas no grupo C+LPVP. Embora o grupo I+LPVP também tenha sido ligado, ele não apresentou aumento da PP (Figura 3), sugerindo que a presença do estrogênio, neste grupo, possa estar contribuindo para este resultado. Em diferentes trabalhos o E2 interfere na função endotelial modulando a geração do NO, assim contribuindo para a vasodilatação, por aumentar a formação e liberação do NO nas células endoteliais do vaso (MONCADA et al., 1991; HAYASHI et al., 1992;

ZHU, CONNEY, 1998; LEVIN, 2002b). O NO é liberado por fatores como o fluxo sanguíneo aumentado, o que gera um estresse de cisalhamento e o aumento da pressão do sangue sobre o vaso, como é visto neste modelo desenvolvido por Sikuler et al. (1985).

Uma vez que este modelo é pré-hepático não foram avaliadas as enzimas de integridade hepáticas tais como AST, ALT e FA, porque em trabalhos anteriores foi observado que estes parâmetros não são alterados (SIKULER et al., 1985; MOREIRA et al., 2004; BOSCH et al., 2008).

A LPO, é um marcador de dano à membrana celular, foi avaliada pela técnica de TBARS. Foi verificado um aumento significativo da LPO nos grupos C e C+LPVP (Figura 4), o que nos sugere que a retirada do E2, através da castração, aumentou significativamente a LPO no estômago das ratas e que, quando além da castração, foi realizado a LPVP, este dano aumentava significativamente ($p < 0.05$) o que não foi verificado no grupo I+LPVP possivelmente pela presença do E2.

Existem vários estudos que associam a privação de estrogênio ao EO e que sua presença evita o dano oxidativo, possivelmente devido ao seu potencial antioxidante (NIKI; NAKANO, 1990; BEDNAREK-TUPIKOWSKA et al., 2001; BORRAS et al., 2003; KUMTEPE et al., 2009), pois o E2 possui radicais hidrofênicos. O grupamento hidrofênico do estrogênio doa o hidrogênio para uma molécula instável, tornando-se um radical menos lesivo; o anel da molécula do estrogênio se reorganiza e se estabiliza, retirando do meio um radical livre (MORGAN-MARTINS, 2003).

Ao ser avaliada a atividade antioxidante através das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx), foi observado

que nos grupos SO e I+LPVP, não houve diferença significativa entre as enzimas antioxidantes avaliadas. Isso sugere que neste modelo experimental, em que no grupo das ratas que mantém os ovários, ou seja, apresenta estrogênio circulante, este lhes confere proteção, mesmo quando o grupo I+LPVP passa pela LPVP, não ocorre aumento da LPO, por isso não há alteração na atividade das enzimas antioxidantes. Este fato não se repete nos grupos C e C+LPVP como é descrito abaixo.

Em relação à atividade da enzima SOD, nos animais submetidos a castração foi observado que no grupo C houve um aumento significativo da SOD em relação aos grupos SO e I+LPVP (Tabela 1), e no grupo C+LPVP apresentou aumento significativo em relação a todos os grupos, sugerindo que este aumento possa ter ocorrido para compensar a ausência do E2 circulante e que embora a SOD tenha aumentado sua atividade nos grupos castrados não foi eficaz em reduzir a LPO (Figura 4), que se apresenta aumentada nestes grupos em relação ao SO e I+LPVP.

Römer et al.(1997) relataram em seu estudo que vários metabólitos do estrogênio inibem a produção do ânion radical superóxido *in vitro*, bem como influenciam no ciclo redox do ferro, levando a uma menor formação de radicais livres. Da mesma forma no trabalho Borrás et al. (2003) foi verificado que mitocôndrias de fêmeas apresentam maior expressão das enzimas antioxidantes que machos. Em nosso trabalho nos animais do grupo I+LPVP foi observado que o estrogênio conferiu proteção, pois não observamos aumento da LPO neste grupo, explicando os valores de SOD encontrados.

Quanto à atividade da enzima CAT nos grupos C e C+LPVP, foi encontrado um aumento da atividade da CAT nos grupos C e C+LPVP (Tabela 1) em relação aos demais grupos, refletindo o aumento

da LPO (Figura 4) e nos animais ligados (C+LPVP) o aumento da PP. Assim, mesmo que a CAT tenha aumentado sua atividade nestes grupos não foi suficiente para reduzir o dano oxidativo causado pela castração e pela ligadura, o que nos leva a sugerir que a castração retirou do meio o E2 que confere proteção como visto nos grupos SO e I+LPVP.

Outros autores relatam que a castração aumenta a LPO pelo aumento da produção de peróxido de hidrogênio (STREHLOW et al., 2003) corroborando nossos resultados, e ainda estudos como de Ozgonul et al. (2003), em que fêmeas Sprague-Dawley castradas têm um aumento da atividade da enzima CAT em fígado e a reposição estrogênica reverte esse efeito, retornando aos valores dos animais controles.

Hernández et al. (2000) evidenciaram em seu estudo que a castração ocasionou uma diminuição dos grupos tióis (-SH) e da capacidade antioxidante total no plasma, assim como um aumento dos lipoperóxidos no plasma, refletindo um desequilíbrio a favor dos processos oxidativos. Vários antioxidantes agem como defesas enzimáticas e não enzimáticas, e que apresentam os grupos tióis para exercerem seus efeitos como antioxidantes, são elas: GPx, GST e GSH, assim estas enzimas podem ter sua atividade comprometida pela ausência deste grupamento.

Em nosso modelo experimental, assim como de Hernández et al. (2000), a castração desencadeou um aumento significativo da LPO (Figura 4). Podemos sugerir que a castração pode ter reduzido os grupamentos tióis, como verificado com a diminuição significativa da enzima GPx no grupo C+LPVP, favorecendo o dano, que foi verificado pelo aumento da LPO neste grupo em relação aos demais. Já no grupo C apresentou um aumento significativo da GPx em relação aos demais grupos, na tentativa de compensar a falta do estrogênio

circulante. Podemos sugerir então que a castração seguida da LPVP leva ao estresse oxidativo.

Evidenciamos que a castração, desencadeou um desequilíbrio a favor dos processos oxidativos e que mesmo tendo um aumento das enzimas antioxidantes nos grupos C e C+LPVP, este não foi suficiente para reduzir a LPO e restabelecer o estado redox.

Os achados histológicos evidenciam a vasodilatação na submucosa gástrica característicos de animais submetidos à LPVP (MCCORMACK et al., 1985; MARTINELLI, 2004; MOREIRA et al., 2004). Ao analisarmos as microscopias dos diferentes grupos experimentais, notamos que nos grupos SO e C (Figura 5. A/B), não foi encontrado vasodilatação enquanto que nos animais I+LPVP e C+LPVP (Figura 5. C/D) ocorre vasodilatação, característico deste modelo e que leva a gastropatia da HP. Foi observado que o embora o grupo I+LPVP não apresente alteração da PP e da LPO, a histologia já mostra os danos decorrentes da ligadura.

CONCLUSÃO

Sugerimos que o E2, por apresentar radicais hidrofenoílicos em sua molécula, agindo como “scavenger” de radicais livres, protegeu as ratas intactas das alterações hemodinâmicas e da LPO, neste tempo experimental, ao comparar ratas Wistar castradas com intactas no modelo de LPVP.

REFERÊNCIAS

BAKER, H. J.; LINDSEY, J. R.; WEISBROTH, S. H. **The Laboratory Rat**: Biology and Disease

- Book Description. Alabama: Academic Press, 1979.
- BEDNAREK-TUPIKOWSKA, G. et al. Serum lipid peroxide levels and erythrocyte glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity in premenopausal and postmenopausal women. **Gynecol Endocrinol**, v. 15, p. 298-303, 2001.
- BOREKCI, B. et al. Role of alpha-2 adrenergic receptors in anti-ulcer effect mechanism of estrogen and luteinising hormone on rats. **Gynecol Endocrinol**, v. 25, p. 264-268, 2009.
- BORRAS, C. et al. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. **Free Radic Biol Med**, v. 34, p. 546-552, 2003.
- BORRAS C. et al. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. **Biochim Biophys Acta**, v. 1802, n. 1, p. 205-511, 2010.
- BOSCH, J. et al. The management of portal hypertension: rational basis, available treatments and future options. **J Hepatol**, v. 48, Suppl 1, p. S68-92, 2008.
- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The Mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochem. J.** n.134, p.707-716, 1973.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-310, 1978.
- CAMERON, J. L. et al. The Budd-Chiari syndrome. Treatment by mesenteric-systemic venous shunts. **Ann Surg**, v. 198, p. 335-346, 1983.
- CICHOZ-LACH, H. et al. Pathophysiology of portal hypertension. **J Physiol Pharmacol**, v. 59, Suppl 2, p. 231-238, 2008.
- DANTAS, A. P. V.; CARVALHO, M. H. C. Efecto protector de los estrogénos em el sistema cardiovascular. **Antioxidantes y calidad de vida**, v. 7, p. 6-11, 2000.
- FERNANDES, C. E.; BARACAT, E. C.; LIMA, G. R. (Eds.). **Climateric: a handbook**. São Paulo: Ponto, 2004.
- FLOHE, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 114-121, 1984.
- GRUBER, C. J. et al. Production and actions of estrogens. **N Engl J Med**, v. 346, p. 340-352, 2002.
- HAYASHI, T. et al. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, p. 11259-11263, 1992.
- HERNANDEZ, I. et al. 17beta-estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 279, p. R1599-1605, 2000.
- KUMTEPE, Y. et al. Effect of acute and chronic administration of progesterone, estrogen, FSH and LH on oxidant and antioxidant parameters in rat gastric tissue. **Chem Biol Interact**, v. 182, p. 1-6, 2009.
- LEVIN, E. R. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. **Steroids**, v. 67, p. 471-475, 2002a.

- LEVIN, E. R. Estrogen receptor-beta and the cardiovascular system. **Trends Endocrinol Metab**, v. 13, p. 184-185, 2002b.
- LLESUY, S. F. et al. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. **Tumori**, v. 71, p. 241-249, 1985.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MARTINELLI, A.L.C. Hipertensão Portal. **Simpósio SEMIOLOGIA**. Medicina, Ribeirão Preto, n.37, p.253-261, jul.-dez., 2004
- MCCORMACK, T. T. et al. Gastric lesions in portal hypertension: inflammatory gastritis or congestive gastropathy? **Gut**, v. 26, p. 1226-1232, 1985.
- MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, p. 3170-3175, 1972.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, p. 109-142, 1991.
- MOREIRA, A. J. et al. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. **Biochem Pharmacol**, v. 68, p. 1939-1946, 2004.
- MORGAN-MARTINS, M. I. **Replacement estrogen decreases oxidative damage, increase the activity of antioxidant enzymes and improves cardiac function in rats**. 2003. (Tese) - Doctorate, Federal University of Rio Grande do Sul, 2003.
- NIKI, E.; NAKANO, M. Estrogens as antioxidants. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 330-333, 1990.
- OZGONUL, M. et al. The effects of estrogen and raloxifene treatment on antioxidant enzymes in brain and liver of ovariectomized female rats. **Endocr Res**, v. 29, p. 183-189, 2003.
- PRIMIGNANI, M. et al. Natural history of portal hypertensive gastropathy in patients with liver cirrhosis. The New Italian Endoscopic Club for the study and treatment of esophageal varices (NIEC). **Gastroenterology**, v. 119, p. 181-187, 2000.
- SALEH, T. M.; CONNELL, B. J.; SALEH, M. C. Acute injection of 17beta-estradiol enhances cardiovascular reflexes and autonomic tone in ovariectomized female rats. **Auton Neurosci**, v. 84, p. 78-88, 2000.
- SIKULER, E.; GROSZMANN, R. J. Hemodynamic studies in a parabiotic model of portal hypertension. **Experientia**, v. 41, p. 1323-1324, 1985.
- SIKULER, E.; KRAVETZ, D.; GROSZMANN, R. J. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. **Am J Physiol**, v. 248, p. G618-G625, 1985.
- STREHLOW, K. et al. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. **Circ Res**, v. 93, p. 170-177, 2003.
- TORREZAN, R. et al. Treatment with isoflavones replaces estradiol effect on the tissue fat accumulation from ovariectomized rats. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, p. 1489-1496, 2008.
- WEBSTER, N. R.; NUNN, J. F. Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. **Br J Anaesth**, v. 60, p. 98-108, 1988.

WEN, Z. et al. Stability of a rat model of prehepatic portal hypertension caused by partial ligation of the portal vein. **World J Gastroenterol**, v. 15, p. 4049-4054, 2009.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 325-333, 1981.

YOKOYAMA, Y. et al. Hepatic neovascular-

ization after partial portal vein ligation: novel mechanism of chronic regulation of blood flow. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 280, p. G21-31, 2001.

ZHU, B. T.; CONNEY, A. H. Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 1-27, 1998.