



Efeitos da administração de eritropoietina na dislipidemia e na hipertrofia ventricular esquerda de camundongos hiperlipidêmicos

Bruno Barbosa Rosa^{1*}; Gerusa Dias Siqueira Vilela Terra²; José Antônio Dias Garcia³; Cassiano Meurssi Neiva⁴

¹ Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Curso de Educação Física da UNIFENAS – Alfenas, MG, Brasil.

² Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Curso de Educação Física e Nutrição da UNIFENAS – Alfenas, MG, Brasil.

³ Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Curso de Medicina da UNIFENAS – Alfenas, MG, Brasil.

⁴ Universidade Estadual Paulista - UNESP - Faculdade de Ciências de Bauru - Laboratório de Metabolismo e Fisiologia do Esforço - MEF

RESUMO

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da eritropoietina (EPO) no perfil lipídico e na hipertrofia ventricular esquerda (HVE) de camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica. Foram utilizados vinte e quatro camundongos LDLr^{-/-}, machos, 3 meses de idade, equinumericamente divididos em 3 grupos: Grupo S, alimentados com dieta padrão; Grupo HL, alimentados com dieta hiperlipídica (20% de gordura total e 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido fólico); Grupo HL+EPO, alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com EPO na dose semanal de 200UI/kg via subcutânea. Após 75 dias de experimento foram avaliadas a desenvoltura da HVE e as concentrações séricas de glicose, triglicérides (TG), colesterol total (CT) e de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), de muita baixa densidade (VLDL), e de alta densidade (HDL) além da razão entre a massa ventricular esquerda e a massa total do animal: massa ventricular (mg)/ massa do animal(g). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Experimental da Universidade sob o número 13A/2010. Ao final do período experimental, os camundongos do grupo HL apresentaram desenvolvimento de HVE com aumento nas concentrações séricas de CT, LDL, VLDL, TG e glicose e redução do HDL, quando comparados com parâmetros dos camundongos do grupo S. O uso da EPO pelo grupo HL+EPO aumentou significativamente ($p<0,05$) as concentrações séricas do HDL, quando comparados com o grupo HL, e preveniu a HVE. Além disso, reduziu as concentrações de CT, LDL e glicose ($p<0,05$). Entretanto, a EPO não foi eficiente em impedir a hipertrigliceridemia e tão pouco foi capaz de reduzir as concentrações de VLDL induzidas pela dieta HL. Em conclusão, a EPO apresentou alguns efeitos cardioprotetores, prevenindo a HVE bem como corrigindo algumas das variáveis bioquímicas induzidas pela dieta HL. Estes efeitos podem estar em parte, relacionados ao aumento das concentrações plasmáticas de HDL.

Palavras-chave: Dislipidemia. Hipertrofia Ventricular Esquerda. Eritropoietina. Camundongos LDLr^{-/-}.

Autor correspondente: Bruno Barbosa Rosa, Curso de Educação Física da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS – Alfenas, MG, Brasil. E-mail: brunobarbosa1991@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011), as doenças cardiovasculares (DCV) lideram as causas de morte no mundo. Dentre essas doenças, a hipertrofia ventricular esquerda (HVE) constitui um indicador de grande relevância no risco de morbidade e mortalidade.

Um dos principais fatores determinantes para o desenvolvimento das DCV é a dislipidemia, caracterizada por alterações no metabolismo das gorduras, repercutindo sobre as concentrações das lipoproteínas e seus diferentes componentes presentes na circulação sanguínea, bem como o colesterol total (CT) e os triglicérides (TG) (Fagherazzi *et al.*, 2008). No entanto, existem outros fatores que permitem o desenvolvimento das DCV, tais como a hipertensão arterial (HA), a obesidade, o *diabetes mellitus* (DM) e a aterosclerose (Carvalho *et al.*, 2007).

Estudos recentes mostram que camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica por 15 dias apresentam aterosclerose, aumento de 4,7 e 1,2 vezes nas concentrações plasmáticas de CT e TG respectivamente em relação aos camundongos LDLr^{-/-} com dieta padrão (Krieger *et al.*, 2006). Nos estudos de Garcia *et al.* (2008), os autores demonstraram ainda que estes camundongos LDLr^{-/-} quando alimentados com dieta hiperlipídica por 15 dias apresentavam aumento de 30% no diâmetro dos cardiomiócitos, quando comparados aos camundongos alimentados com dieta padrão, além do aumento do colágeno intersticial e perivascular, fato importante que indica presença de hipertrofia cardíaca nestes camundongos.

A Eritropoietina (EPO) é uma glicoproteína endócrina de origem renal que, na medula óssea, estimula a divisão e a diferenciação dos progenitores de eritrócitos.

Na forma sintética, para uso farmacológico, além de seu efeito terapêutico no tratamento de pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) e algumas formas de anemia e câncer (SBN, 2000), a EPO é considerada como elemento dopante na prática esportiva, uma vez que, por elevar o número de eritrócitos na corrente sanguínea,

contribui de forma desleal para o aumento rápido da capacidade aeróbia do atleta a valores supra fisiológicos (Dias, 2011). Além disso, como efeitos colaterais de alto risco, pode induzir a hipertrofia ventricular concêntrica em seus usuários, de forma semelhante ao que pode ocorrer em alguns casos de manipulação genética da sua síntese (Hamamori *et al.*, 1994).

A EPO, produzida por tecnologia de DNA recombinante, é idêntica e tem os mesmos efeitos biológicos da eritropoietina endógena (Hamamori *et al.*, 1994).

Contudo, para alguns autores (Bommer *et al.*, 1988; Bommer *et al.*, 1991; Kaufman *et al.*, 1998; Zachee, 1995) a questão dos efeitos de risco cardíaco para o uso da EPO, parece contraditória ou duvidosa, uma vez que alguns efeitos cardioprotetores foram observados após o uso subcutâneo frequente e de baixas dosagens da EPO, além ainda de afirmarem que sua reposição sistemática e a consequente correção da anemia levam à redução da necessidade de transfusão sanguínea, da morbidade, da mortalidade e à melhora da qualidade de vida em portadores de IRC.

Assim, tendo em vista o baixo número de estudos sobre o assunto, o objetivo do presente foi avaliar os efeitos da EPO no perfil lipídico e na HVE de camundongos LDLr-/- alimentados com dieta hiperlipídica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento do Protocolo Experimental, Animais e Grupos.

O estudo em modelo animal empregou 24 camundongos machos, homocigotos para a ausência do gene do receptor de LDL (LDLr-/-) gerados no *background* C57BL6, com 3 meses de idade, pesando em média 23 ± 3g, divididos em 3 grupos equinumeros, conforme apresentados na Tabela 1. Os animais foram obtidos do Jackson Laboratories (EUA) e criados no biotério da Pós-graduação da Universidade.

TABELA 1 - Grupos experimentais e seus respectivos protocolos.

GRUPO	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	DENOMINAÇÃO
1	Camundongos LDLr-/- que receberam ração padrão para roedores (Nuvital®) e foram submetidos à aplicação de solução salina.	S
2	Camundongos LDLr-/- que receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura total e 1,25% de colesterol, 0,5 % ácido cólico e foram submetidos à aplicação de solução salina.	HL
3	Camundongos LDLr-/- que receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5 % ácido cólico e foram submetidos à aplicação de Eritropoietina (Eritropoietina 4000UI®, adquirida do laboratório farmacêutico Biosintética).	HL+EPO

Os animais foram mantidos em racks ventilados (Alesco®) com controle de temperatura, umidade e ciclo

claro/escuro de 12 horas. A água e a ração foram ofertadas *ad libitum* e trocadas, medidas e pesadas diariamente. O registro do ganho médio de peso (g) dos animais foi efetuado semanalmente. Já as médias de ingestão alimentar (g) e hídrica (mL) foram registradas diariamente e apresentados como valores médios individuais para cada grupo.

O protocolo experimental teve a duração de 75 dias. A EPO foi administrada apenas nos animais do grupo 3 (HL+EPO), uma vez por semana, durante 11 semanas, totalizando os 75 dias, em doses de 200UI/Kg via subcutânea.

Eutanásia e Coleta de Material Biológico.

Ao final do período experimental e após 12 horas de jejum, os camundongos foram pesados (g) e anestesiados por via intraperitoneal utilizando-se Xilazina e Ketamina (Bayer® e Parke-Davis®, respectivamente) na concentração de 6 - 40 mg/Kg, respectivamente. O sangue foi coletado via retro-orbital, utilizando tubos heparinizados, e encaminhado para análises posteriores sendo os animais eutanasiados por esse procedimento. Em seguida os animais foram toracotomizados e o coração foi removido e pesado a fresco (mg) para calcular a proporção massa cardíaca. Os átrios e a parede livre do ventrículo direito foram extraídos permanecendo somente o ventrículo esquerdo, que foi pesado a fresco para cálculo da proporção da massa ventricular esquerda (massa VE/massa total do animal). Todo o procedimento foi executado de acordo com protocolado já validado na literatura (Garcia *et al.*, 2008)

Análises Morfológicas e Morfométricas

Os cortes histológicos para o ventrículo esquerdo foram divididos em 2 grupos, para análise morfológica e qualitativa de colágeno por meio de luz polarizada conforme procedimento já conhecido (Junqueira *et al.*, 1979). Para quantificação da área de colágeno no tecido cardíaco e para medida do diâmetro dos cardiomiócitos, foram seguidos critérios padrões (Armstrong *et al.*, 1998). Também foram mensuradas a área de deposição de colágeno e a deposição de placas de atheroma na parede da artéria aorta nos animais dos 3 grupos.

Análises Bioquímicas

As determinações das concentrações séricas de CT, suas frações, TG e glicose foram realizadas por métodos espectrofotométricos. Foram empregados sistemas colorimétricos e enzimáticos, cujos procedimentos técnicos utilizados seguiram os protocolos descritos nos kits comercialmente disponíveis (Trinder, 1969; Warnick *et al.*, 2001).

Os valores das concentrações da fração VLDL do colesterol foram obtidos pela divisão dos valores das concentrações de TG por 5 e os valores da fração LDL do colesterol, foram calculados pela subtração dos valores das frações de HDL e VLDL dos valores das concentrações de CT de acordo com a literatura (Friedewald *et al.*, 1972). Ambas foram apresentadas em mg/dL.

Análises Estatísticas

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Análise de variância de um caminho (One-way ANOVA) complementada pelo teste de Tukey (quando necessário) foram empregados para comparar as médias entre diferentes grupos. As diferenças foram consideradas significativas para o valor de $p < 0,05$. Todo tratamento estatístico foi performedo através do uso do programa de *software* para PC para cálculos estatísticos *Graphpad Instat*, versão 3.05 para sistema operacional *Windows®* (*Graphpad Instat®*, San Diego, CA).

Aspectos Éticos

Todos os procedimentos utilizados foram corretamente executados e seguiram os Princípios Éticos para Estudos com Animais estabelecidos pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA) sendo o estudo integralmente aprovado pelo Comitê de Ética Experimental da Universidade sob o número 13A/2010.

RESULTADOS

Peso e Ingestão Alimentar e Hídrica

A tabela 2 apresenta os valores médios semanais individuais para o ganho de peso (g), ingestão hídrica (mL) e ingestão sólida (g - ração normal ou hiperlipídica) para os animais de cada grupo.

TABELA 2 – Comparação do valores individuais semanais médios de ganho de peso, e diários médios de ingestão de água e ingestão de ração pelos animais de cada grupo.

Grupos	Ganho Peso (g)	Ingestão de Água (mL)	Ingestão de Sólidos (g)
S	4.70 ± 0.10 ^A	6.13 ± 0.08	5.80 ± 0.40
HL	5.80 ± 0.04 ^B	6.23 ± 0.08	6.00 ± 0.30
HL+EPO	5.65 ± 0.07 ^B	6.08 ± 0.10	5.92 ± 0.30

Valores expressos em média ± EPM. Letras: A = diferença significativa em relação aos valores de B. Dados não pareados e $p < 0,05$.

Nela, é possível observar que todos os animais ganharam peso durante todo o experimento e consumiram alimentos sólidos e água suficientes para fornecer a energia e a hidratação necessárias para a manutenção do metabolismo e suas atividades diárias. Contudo, ao contrário do que reportam alguns autores em estudos anteriores (Garcia *et al.*, 2008; Kriger *et al.*, 2006), no presente estudo a ingestão de alimentos sólidos não foi maior nos grupos alimentados com ração hiperlipídica em comparação ao grupo S, o mesmo acontecendo com a ingestão hídrica.

Contudo, é possível notar que os animais dos grupos HL e HL+EPO, apresentaram um maior e significativo ganho de peso semanal quando comparados aos animais do grupo S, os quais foram alimentados com ração padrão para roedores.

Esse ganho de peso adicional provavelmente está atribuído ao maior teor calórico da dieta hiperlipídica, visto

que a ingestão alimentar média dos animais de cada grupo não apresentou diferenças.

Esse fato demonstra que a ração hiperlipídica bem como o tratamento com EPO, parecem não ter interferido no padrão alimentar quantitativo dos camundongos LDLr-/- empregados no presente estudo.

Bioquímica Sérica

A análise das concentrações séricas de lipídios e glicose mostra que o grupo HL+EPO, apresentou bom controle sobre as concentrações de CT, LDL, HDL e glicose, com menores valores para CT, LDL e glicose e maiores para as concentrações de HDL quando comparados ao grupo HL. O tratamento com EPO parece ter exercido um efeito protetor sobre a dislipidemia uma vez que os animais do grupo HL+EPO apresentaram valores característicos de dislipidemia moderada ao passo que os animais do grupo HL apresentaram valores de dislipidemia severa. Já os resultados de VLDL e TG não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Tais resultados são apresentados na tabela 3.

TABELA 3 - Comparação das concentrações séricas de lipídios e glicose entre os animais de cada grupo.

Grupos	CT (mg/dL)	LDL (mg/dL)	VLDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)	TG (mg/dL)	Glicemia (mg/dL)
S	263 ± 8 ^A	159 ± 10 ^A	36 ± 2 ^A	68 ± 3 ^A	173 ± 9 ^A	58 ± 9 ^A
HL	869 ± 15 ^B	814 ± 29 ^B	54 ± 4 ^B	20 ± 1 ^B	271 ± 22 ^B	190 ± 10 ^B
HL+EPO	682 ± 16 ^C	593 ± 13 ^C	46 ± 4 ^{AB}	39 ± 3 ^C	219 ± 19 ^{AB}	150 ± 7 ^C

Valores expressos em média ± EPM. Letras: A = diferença significativa em relação aos valores de B e C; B = diferença significativa em relação aos valores de C. Dados não pareados e $p < 0,05$.

Parâmetros Morfológicos e Morfométricos do Ventrículo Esquerdo

Os resultados apresentados na tabela 4 foram obtidos com a análise da razão massa VE/massa total do animal, com intuito de evidenciar a presença de hipertrofia ventricular esquerda. Eles mostram que, o grupo HL+EPO não apresentou diferença significativa em relação ao grupo S, mas apenas quando comparado ao grupo HL, o que indica que o grupo HL+EPO não desenvolveu a hipertrofia ventricular esquerda causada pela ração hiperlipídica.

TABELA 4 – Comparação da razão entre a massa VE/massa total do animal entre os animais de cada grupo.

Grupos	Razão massa VE(mg)/massa total do animal (g) – valores absolutos
S	3,6 ± 0,1 ^A
HL	4,4 ± 0,1 ^B
HL+EPO	3,3 ± 0,1 ^A

Valores expressos em média ± EPM. Letras: A = diferença significativa em relação aos valores de B. Dados não pareados e $p < 0,05$.

Já os resultados relativos à área de deposição de colágeno na artéria aorta são apresentados na tabela 5. Nela é possível perceber que a deposição de colágeno no animais do grupo S foi maior que nos demais grupos. Nos grupos HL e HL+EPO, houve redução significativa de colágeno quando comparados ao grupo S, porém não houve diferença significativa quando comparados entre si.

TABELA 5 - Comparação das áreas de depósito de colágeno na artéria aorta entre os animais de cada grupo.

Grupos	Área de depósito de colágeno na aorta (em micrometros ²)
S	133376,54 ± 6903,7 ^A
HL	103253,54 ± 5301,2 ^B
HL+EPO	97753,44 ± 4332 ^B

Valores expressos em média ± EPM. Letras: A = diferença significativa em relação aos valores de B. Dados não pareados e p<0,05.

Os resultados relativos às análises e quantificações das alterações nos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos animais são apresentadas na figura 1.

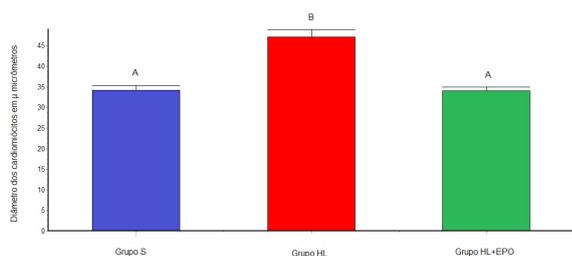


FIGURA 1 – Gráfico comparativo dos volumes dos cardiomiócitos entre os diferentes grupos.

Valores expressos em média ± EPM. Letras: A = diferença significativa em relação aos valores de B. Dados não pareados e p<0,05.

Quando quantificado o volume dos cardiomiócitos, percebe-se que nos animais do grupo S não houve HVE. É possível notar ainda que, quando se compara o grupo HL+EPO com o grupo S, não se encontra diferença significativa, mostrando que o grupo tratado com EPO também não desenvolveu a HVE, corroborando os achados relativos a massa ventricular.

Ainda na figura 1, é possível observar no grupo HL um aumento na dimensão dos cardiomiócitos, revelando o desenvolvimento de HVE para esse grupo e novamente corroborando os achados apresentados na tabela 3.

Finalmente, os resultados relativos à dimensão (circunferência) das placas de ateroma nos animais de cada grupo são apresentados na figura 2. É possível perceber que, no grupo S não houve a formação de placas de aterosclerose na parede da artéria aorta. Já nos grupos HL e HL+EPO, houve a formação das placas. Contudo ainda, quando comparadas entre si, percebe-se valores significativamente maiores da área das placa do grupo HL em relação ao grupo HL+EPO.

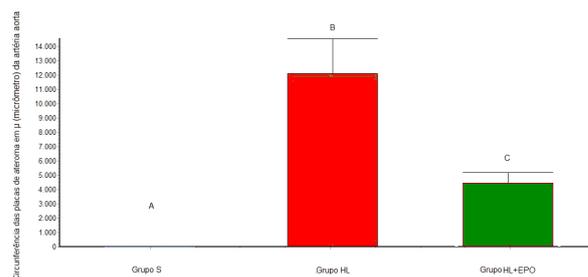


FIGURA 2 – Gráfico comparativo da dimensão (circunferência em micrômetros) das placas de ateroma na artéria aorta dos animais dos diferentes grupos.

Valores expressos em média ± EPM. Letras: A = diferença significativa em relação aos valores de B e C; B = diferença significativa em relação aos valores de C; Dados não pareados e p<0,05.

DISCUSSÃO

Conforme já apregoado por outros autores (Weisbroth *et al.*, 1977), investigando o uso de drogas e dietas específicas, é necessário dar atenção especial para o estado nutricional dos animais experimentais, visto que as variações no consumo de sólidos e líquidos da dieta podem causar alterações nas respostas biológicas dos animais.

De acordo com estudos anteriores (Chorilli *et al.*, 2007) camundongos devem consumir quantidades diárias médias de ração e água superior a 4 g e 6 mL, respectivamente, para manter um estado nutricional adequado e prevenir a desnutrição e desidratação.

No presente estudo, os animais apresentaram valores de ingestão hídrica e de sólidos alimentares condizentes com o apontado por Chorilli *et al.* (2007) e ainda, todos os animais estudados aqui obtiveram ganho de peso durante todo o experimento. Isso demonstra que a dieta hiperlipídica e tampouco o tratamento com EPO não foram capazes de interferir no padrão dietético dos animais, minimizando a possibilidade de considerarmos diferenças nos volumes dietéticos diários como provável fator de influência nos resultados encontrados.

Todavia, o maior ganho de peso apresentado pelos animais dos grupos HL e HL+EPO em comparação aos do grupo S, pode ser atribuído ao mais elevado teor calórico das dietas hiperlipídicas, uma vez que, como reportado acima, não houve diferença no consumo alimentar diário entre os animais dos diferentes grupos.

Já por outro lado, as concentrações plasmáticas de TG, CT e suas frações foram elevadas nos animais do grupo HL quando comparadas aos dos outros dois grupos. Estes resultados efetivamente demonstraram o potencial dislipidêmico da dieta hiperlipídica isoladamente (grupo HL) em camundongos LDLr^{-/-} alterando drasticamente as concentrações de lipídios plasmáticos.

Isso demonstra que camundongos LDLr^{-/-}, os quais são tradicionalmente empregados em estudos com doenças cardiovasculares também podem ser usados como

um modelo para investigar os efeitos de drogas sobre as dislipidemias e alterações metabólicas, pois ao contrário de outros modelos animais, as concentrações de lipídios plasmáticos permanecem elevadas nestes animais quando submetidos a dietas hiperlipídicas.

Estudos em camundongos LDLr^{-/-} demonstram que estes animais desenvolvem hipercolesterolemia moderada quando alimentados com uma dieta padrão e lesões ateroscleróticas quando recebem dietas hiperlipídicas (Garcia *et al.*, 2008; Krieger *et al.*, 2006). No presente estudo, os resultados corroboram tais achados uma vez que os animais do grupo HL apresentaram indicadores de lesão aterosclerótica, além HVE maiores do que o grupo HL+EPO, bem como maior ganho peso do que os animais recebendo uma dieta padrão de roedores.

Os resultados nos revelam assim também que, o uso da EPO (HL+EPO) diminui a magnitude dos efeitos dislipidêmicos da dieta hiperlipídica, demonstrando um efeito protetor da EPO, sobre variáveis bioquímicas plasmáticas. Esses efeitos podem estar relacionados à ação protetora da HDL que se encontrou significativamente mais alta nos animais do grupo HL+EPO quando comparada aos animais do grupo HL.

No entanto, a dislipidemia genética dos camundongos empregados no presente estudo associada à dieta hiperlipídica, mesmo nos animais tratados com EPO e concentrações mais elevadas de HDL, ainda assim foram capazes de causar alterações nos parâmetros morfológicos e morfométricos da aorta e dos cardiomiócitos dos animais.

Contudo, o comprometimento dos tecidos cardíaco e vascular na aorta (HVE; razão da massa VE/ massa total do animal; deposição de colágeno no VE; deposição de colágeno na aorta; dimensão das placas de ateroma na aorta) foi mais marcado nos animais do grupo HL o que provavelmente ocorreu devido a redução drástica nas concentrações séricas de HDL associados com um aumento também drástico das concentrações CT, TG e VLDL, quando comparado aos demais grupos.

Sabemos que atualmente, diferentes estratégias terapêuticas são usadas para aumentar as concentrações de HDL ou para melhorar a sua função em uma tentativa de controlar dislipidemias e reduzir os riscos cardiovasculares (Ragbir & Farmer, 2010).

No presente estudo os animais dos grupos S e HL+EPO apresentaram concentrações séricas de HDL maiores em comparação com os do grupo HL. De acordo com Duffy & Rader (2009) a HDL age como um fator protetor contra doenças cardiovasculares, promovendo o transporte reverso de LDL colesterol exercendo assim uma ação antiinflamatória e antioxidante.

Os maiores valores de HDL, observados nos animais HL+EPO quando comparados ao grupo HL, provavelmente foram determinantes para o desenvolvimento de dislipidemias apenas moderada nos animais tratados com EPO, enquanto o grupo HL apresentou baixas concentrações de HDL e altas de TG e CT, LDL e VLDL caracterizando a dislipidemia severa. Segundo Brodeur *et al.* (2008) além

de sua ação cardiovascular o HDL parece inibir outros aspectos degenerativos induzidos pela LDL, com efeitos benéficos sobre o organismo dos animais.

Para Garcia & Incerpi (2008) outro aspecto importante está associado as dislipidemias. Os autores apontam que em animais dislipidêmicos uma paralela diminuição de hemoglobina (Hb) na corrente sanguínea induz o organismo a realização de mecanismos compensatórios que atuam diretamente no desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda e desenvolvimento de cardiopatias. Ainda, segundo os mesmos autores, o uso EPO pode induzir o organismo a algumas adaptações, como aumento da taxa de hemácias e Hb, consequentemente, tornando o organismo mais eficiente na oxigenação tecidual.

Clausell & Weber (2010), demonstraram que pacientes com insuficiência cardíaca (IC) e anemia, com baixas concentrações de EPO e baixos índices de ferritina, sintomas como redução da capacidade de realizar exercícios físicos, risco aumentado para admissões hospitalares, além de maior mortalidade estão significativamente aumentados e associados a mecanismos cardiovasculares compensatórios. Entre esses mecanismos a redistribuição do fluxo sanguíneo da região subendocárdica para a região subpericárdica do ventrículo pode gerar uma redução do fluxo coronariano. Nesse caso, segundo os autores, a diminuição de Hb agrava a hipóxia periférica, aumenta o retorno venoso e o trabalho cardíaco o que induz à HVE concêntrica.

No presente estudo, o tratamento com EPO mostrou efeito benéfico sobre as concentrações plasmáticas de lipídios e na estrutura cardíaca, prevenindo a HVE dos camundongos LDLr^{-/-}, os quais apresentam aumentada susceptibilidade ao desenvolvimento e complicações causadas pela dislipidemia instalada, uma vez que são geneticamente modificados para ausência do gene do receptor da fração LDL do colesterol.

Uma provável explicação para este resultado pode ser entendida de acordo com o mecanismo descrito por Clausell & Weber (2010). De acordo com mecanograma proposto pelos autores, alguns fatores hematológicos como a hemodiluição e a dislipidemia, provocam diversas alterações no organismo. Entre as quais, a indução ao aumento da liberação de citocinas inflamatórias na corrente sanguínea promovendo ação agressiva ao tecido endotelial, aumentando na mesma proporção a quantidade de transportadores de metal divalente 1 (DMT1) e consequentemente levando a redução da quantidade de ferro fazendo com que reste menor quantidade de ferro para a eritropoiese. De acordo com os autores, isso resulta na redução da massa eritrocitária.

Além disso, para Sandhu *et al.* (2010), as dislipidemias predis põem ao surgimento e desenvolvimento da anemia, pois nos quadros dislipidêmicos há um aumento da secreção de bilirrubinas, e assim maior quantidade de Hb é quebrada e o ferro liberado é transportado pela ferritina para o fígado onde é armazenado. Além disso, nesse processo, aumentam-se proporcionalmente as

concentrações de ferro na corrente sanguínea, havendo maior liberação de radicais livres no sangue, que possuem efeitos lesivos ao tecido endotelial, contribuindo para a formação de placas de ateroma.

Bento *et al.* (2003) consideram que é a EPO ao entrar em contato com a medula óssea dos ossos longos provoca o estímulo para o aumento da produção de hemácias, levando a hemoconcentração. Dessa forma, os autores apontam que, com o aumento da viscosidade sanguínea, o organismo reduz a produção e liberação de citocinas inflamatórias, graças à redução da quantidade de DMT1. Com essa redução no transportador, diminui-se também a quantidade de ferro liberada pelos macrófagos restando maior quantidade para a eritropoiese, e assim, aumento da massa eritrocitária (Bento *et al.*, 2003; Sandhu *et al.*, 2010).

Além disso, os autores consideram também que o aumento da taxa de novos eritrócitos circulantes produzidos pela medula óssea ocorre cerca de dois dias após o aumento das concentrações de EPO no plasma (Bento *et al.*, 2003).

Ainda, concomitantemente a este fato, de acordo com Katz *et al.* (2004), a hemoconcentração é responsável pela secreção de inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA), já a curto prazo.

Isso nos permite entender que a EPO pode promover conjuntamente um aumento na massa eritrocitária e concentração de Hb na corrente sanguínea com uma vasodilatação reflexa causada pela elevação dos iECA, melhorando assim a oxigenação tecidual, diminuindo a ocorrência de apoptose das principais células alvo, como o músculo cardíaco, o encéfalo e as células endoteliais. Além disso, com o aumento da concentração de Hb na circulação e o aumento da pré-carga, haverá ativação do mecanismo de compensação vascular gerando angiogênese ou neovascularização, melhorando o fornecimento de O₂ tecidual, como previamente descrito por (Katz *et al.* 2004).

Já segundo Hamamori (1994), a EPO atua favorecendo o metabolismo lipídico, aumentando as concentrações séricas de HDL e diminuindo as de LDL e CT, devido à redução da secreção de mediadores inflamatórios, podendo isso, ser considerado como um efeito cardioprotetor.

Esses efeitos conjuntamente associados, provavelmente ocorridos nos animais HL+EPO, podem ajudar-nos a compreender os efeitos cardioprotetores verificados no presente estudo para os animais tratados com EPO.

Outro possível mecanismo envolvido e que pode nos ajudar a entender o efeito cardioprotetor da EPO no presente estudo foi considerado por Vilarinho & Petruccio-Junior (2012). Em estudo experimental onde foram analisadas a atividade de proteínas intracelulares e a expressão de seus genes, os autores avaliaram o uso da EPO na função sistólica em corações de suínos neonatais submetidos a isquemia e reperfusão. Os autores

concluíram que o uso da EPO, 24 horas antes e também 3 minutos antes da submissão a isquemia de 45 minutos seguida de reperfusão, protegeu a função sistólica do ventrículo esquerdo por promover diminuição da expressão de proteínas pró-apoptóticas.

De acordo com os autores, esse efeito foi atribuído a um aumento da taxa de fosforilação da Akt (uma importante via de sinalização citoplasmática a qual que está envolvida com mecanismos de sobrevivência celular, inibindo processos apoptóticos).

Assim, se considerarmos que a EPO foi capaz de impedir lesões no miocárdio de animais submetidos a isquemia experimental aguda por inibir a expressão de proteínas pró-apoptóticas as quais ocorrem em condições de isquemia tecidual, como demonstrado no estudo de Vilarinho e Petruccio-Junior (2012), no presente estudo tais efeitos podem também ser considerados para que possamos compreender os mecanismos cardioprotetores ocorridos nos animais do grupo HL+EPO, os quais, apresentaram desenvolvimento das placas de ateroma na artéria aorta porém sem apresentarem o desenvolvimento de HVE.

Além disso, é importante considerar que o uso subcutâneo da EPO, conforme apresentado por Bommer *et al.* (1991) pode ter sido determinante para tais resultados.

Frente ao exposto, o presente estudo nos permite concluir que as alterações dislipidêmicas foram significativamente mais acentuadas nos camundongos LDLr^{-/-} apenas submetidos a dieta hiperlipídica. Em contraste, o uso da EPO resultou no controle sobre as concentrações de CT, LDL, HDL e glicose com diminuição dos valores para CT, LDL e glicose e elevação simultânea das concentrações séricas de HDL encontradas no grupo de HL+EPO quando comparados ao grupo HL, demonstrando assim um efeito cardioprotetor da EPO.

Já em relação às alterações morfológicas observadas no coração, a EPO novamente demonstrou efeito cardioprotetor sobre o coração ao evitar o desenvolvimento da HVE no grupo HL+EPO, a qual ocorreu no grupo HL. Nesse caso, os efeitos da EPO que explicam tais resultados podem ser entendidos de forma indireta, através da manutenção de concentrações adequadas de HDL auxiliando no controle da dislipidemia, mas também e de forma direta, onde a EPO parece ter impedido a isquemia bem como como reações inflamatórias na parede ventricular dos animais do grupo HL+EPO.

Os mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos em tais resultados ainda necessitam de maiores esclarecimentos, sendo que para tanto, os autores do presente estudo sugerem novas investigações.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro.

ABSTRACT

Effects of administration of the erythropoietin in dyslipidemia and left ventricular hypertrophy of hyperlipidemic mice

The main purpose of this work was to evaluate the effects of erythropoietin (EPO) on the lipid profile and in left ventricular hypertrophy (LVH) in mice LDLr^{-/-}, fed a high fat diet. Were used twenty-four mice LDLr^{-/-}, male, 3 months old, proportionally divided in 3 groups: S Group, fed with standard diet; HL Group, fed with high fat diet (20% fat total and 1.25% cholesterol, 0.5% cholic acid); HL + EPO Group, fed with high-fat diet and treated with EPO on weekly dose of 200UI/kg, subcutaneously. After 75 days of experiment the development of LVH, serum concentrations of glucose, triglycerides (TG), total cholesterol (TC), and low, very low and high density lipoprotein (LDL, VLDL and HDL, respectively) in addition to the left ventricular mass ratio and the total mass of the animal (ventricular mass(mg)/total animal mass(g)) were evaluated. The experimental protocol was approved by the University Ethics Committee of the Experimental Studies under the number 13A/2010. At the end of the trial period, the mice of the HL presented development of LVH with increase in serum concentrations of CT, LDL, VLDL, TG and glucose and a decreased of HDL concentrations, when compared with parameters of mice of the Group S. The use of EPO by HL+EPO group increased serum concentrations of HDL, compared with the HL group (p<0,05) and prevented LVH. In addition, reduced the serum concentrations of TC, LDL, and glucose (p<0,05). However, EPO was not efficient in preventing the hypertriglyceridemia and still, wasn't able to reduce VLDL concentrations induced by the diet HL. In conclusion, the EPO presented some cardio protective effects, preventing the HVE as well as correcting some of the biochemical variables diet HL-induced. These effects may be, in part, related to increased plasma concentrations of HDL.

Keywords: Dislipidemy. Left Ventricular Hypertrophy. Erythropoietin. Mice LDLr^{-/-}.

REFERÊNCIAS

- Armstrong AT, Binkley PF, Baker PB, Myerowitz PD, Leier CV. Quantitative investigation of cardiomyocyte hypertrophy and myocardial fibrosis over 6 years after cardiac transplantation. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:704-10.
- Bento RMA, Damasceno LMP, Aquino-Neto FR. Eritropoietina humana recombinante no esporte: uma revisão. *Rev Bras Med Esporte* 2003;9:181-90.
- Bommer J, *et al*. Efficacy comparison of intravenous and subcutaneous recombinant human erythropoietin administration in hemodialysis patients. *Contrib Nephrol*. 1991; 88:136-43.
- Bommer J, *et al*. Subcutaneous erythropoietin (letter). *Lancet* 1988;2:406.
- Brodeur MR, Brissette L, Falstraull L, Moreau R. HDL3 reduces the association and modulates the metabolism of oxidized LDL by osteoblastic cells: a protection against cell death. *J Cell Biochem*. 2008;105:1374–85
- Carvalho DF, Paiva AA, Melo ASO. Perfil lipídico e estado nutricional do adolescente. *Rev Bras Epidemiol*. 2007;10(4):491-8.
- Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN. Animais de laboratório: o camundongo. *Rev Cienc Farm Básica Apl*. 2007;28:11–23
- Clausell N, Weber CS. Patogênese da anemia em pacientes com insuficiência cardíaca: contribuição de mecanismos inflamatórios, peculiaridades do metabolismo do ferro e ação da eritropoietina. In: 30ª Semana Científica do Hospital das Clínicas de Porto Alegre; 2010; Porto Alegre: Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Dias RG. Genética, performance física humana e doping genético: o senso comum versus a realidade científica. *Rev Bras Med Esporte* [Internet] 2011 [cited 2013 Sep 22]; 17(1):62-70. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-86922011000100012>.
- Duffy D, Rader DJ. Update on strategies to increase HDL quantity and function. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6:455–63
- Fagherazzi S, Dias RL, Bortolon F. Impacto do exercício físico isolado e combinado com dieta sobre os níveis séricos de HDL, LDL, colesterol total e triglicerídeos. *Rev Bras Med Esporte* 2008;14(4):381-6
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparatory ultracentrifugation. *Clin Chem*. 1972;18:499-502.
- Garcia JA, Santos L, Moura AL, Ricardo KF, Wanschel AC, Shishido SM, Spadari-Bralfish RC, de Souza HP, Krieger MH. S-Nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) prevents myocardial alterations in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice by antiinflammatory action. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008;51:78–85.
- Garcia JAD, Incerpi EK. Factors and Mechanisms Involved in Left Ventricular Hypertrophy and the Anti-Hypertrophic Role of Nitric Oxide. *Arq Bras Cardiol*. 2008; 90(6):443-50.
- Graphpad Instat* [computer program]. Version 3.05 for Microsoft Windows®. San Diego, CA: GraphPad® Software, Inc; © 1990-2003
- Hamamori Y, Samal B, Tian J, Kedes L. Persistent erythropoiesis by myoblast transfer of erythropoietin cDNA. *Hum Gene Ther*. 1994;5(11):1349-56.

Junqueira LC, Bignolas G, Bretani RR. Picosirius red staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;11:447-55.

Katz SD, Macini D, Androne AS, Hryniewicz K. Treatment of anemia in patients with chronic heart failure. *J Card Fail*. 2004;10(Suppl 1):S13-6.

Kaufman JS, *et al*. Subcutaneous compared with intravenous epoetin in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med*. 1998;339:578-83.

Krieger MH, Santos KFR, Shishido SM, Wanschel ACBA, Estrela HFG, Santos L, Oliveira MG, Franchini KG, Spadari-Bratfisch RC, Laurindo FRM. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide* 2006;14:12-20.

Ragbir S, Farmer JA. Dysfunctional high-density lipoprotein and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2010;12:343-48.

Sandhu A, Soman S, Hudson M, Besarab A. Managing anemia in patients with chronic heart failure: What do we know? *Vasc Health Risk Manag*. 2010;6:237-52.

Sociedade Brasileira de Nefrologia. Diretrizes para a condução da anemia na insuficiência renal crônica. *J Bras Nefrol*. 2000;22(supl 5):1-48.

Trinder R. Determination of glucose in blood using glucose with alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem*. 1969;6:27-27.

Image Tool [computer program]. Version, 3.0 for Microsoft *Windows*®. San Antonio, TX: UTHSCSA Image Tool® *Software*, The University of Texas Health Science Center; © 1996-2002

Vilarinho KAS, Petruccio-Junior O. A eritropoietina protege a função sistólica de corações neonatais submetidos a isquemia e reperfusão regional. [Tese]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas; 2012.

Warnick GR, Nauck M, Rifai N. Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol: from ultracentrifugation to homogeneous assays. *Clin Chem*. 2001;47: 1579-96.

Weisbroth SH, Paganelli RG, Salvia M. Evaluation of a disposable system during shipment of laboratory rats and mice. *Lab Anim Sci*. 1977; 27:186-94.

World Health Organizations. The 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2011. WHO Media Centre, Fact sheet N°310 [Internet] 2011[cited 2013 Sep 22]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>

Zachee P. Controversies in selection of epoetin dosages. *Drugs* 1995;49:536.

Recebido em 21 de junho de 2013

Aceito em 25 de novembro de 2013