

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

AUMENTO DA LIPOPEROXIDAÇÃO HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA E EXPOSTOS A POLUIÇÃO QUE REALIZARAM TREINAMENTO AERÓBIO EM DIFERENTES INTENSIDADES¹

Yohanna Hannah Donato², Analú Bender Dos Santos³, Aline Sfalcin Mai⁴, Iberê Machado Kostrycki⁵, Thiago Gomes Heck⁶, Mirna Stela Ludwig⁷.

¹ Pesquisa Institucional desenvolvida no Departamento de Ciências da Vida (DCVida), pertencente ao Grupo de Pesquisa em Fisiologia.

² Acadêmica do curso de Enfermagem – UNIJUÍ. Bolsista PIBIC/UNIJUÍ – DCVida. Grupo de Pesquisa em Fisiologia da Unijuí - GPeF. Email: yohannadonato260@gmail.com;

³ Educadora Física. Mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS) – UNIJUÍ/UNICRUZ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia da Unijuí – GPeF;

⁴ Educadora Física. Mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS) – UNIJUÍ/UNICRUZ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia da Unijuí - GPeF;

⁵ Educador Físico. Mestrando pelo Programa em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Bolsista de Mestrado da Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). Grupo de Pesquisa em Fisiologia da Unijuí - GPeF;

⁶ Professor do Departamento de Ciências da Vida (DCVida). Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS). Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia da Unijuí - GPeF;

⁷ Professora do Departamento de Ciências da Vida (DCVida). Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS). Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia da Unijuí - GPeF;

Introdução

Dados do Ministério da Saúde apontam que 48,5% da população brasileira está acima do peso, sendo a obesidade a forma mais comum de má-nutrição, contribuindo para o surgimento de diversas co-morbidades decorrentes do excesso de peso corporal, do padrão alimentar inadequado e do balanço energético positivo (Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, 2011). Desde que a obesidade passou a ser reconhecida como uma doença inflamatória, diversos estudos têm evidenciado a relação entre a doença e alterações metabólicas e endócrinas do tecido adiposo, demonstrando que indivíduos obesos apresentam diversos marcadores de inflamação como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e proteína C reativa (TANGVARASITTICHA, S. et al. 2015).

Além dos agravos causados pelo estilo de vida atual, o comprometimento da qualidade do ar também se constitui em um problema de saúde pública. Correntemente, pesquisas epidemiológicas e toxicológicas mostram que níveis de exposição atmosférica, mesmo quando menores que os recomendados pela OMS, têm apresentado efeitos na saúde humana (COTE et al., 2008). Neste contexto destaca-se a poluição atmosférica por material particulado (MP), o qual é composto por partículas que apresentam diâmetro menor que 2,5 μ m (MP_{2,5}), formadas principalmente a partir dos processos de combustão, incluindo fontes como veículos, usinas, incêndios, queimadas

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

agrícolas e processos industriais (U.S. EPA, 2011). Essas partículas tem a capacidade de invadir o trato respiratório e o sistema vascular (PEARSON et al., 2010) e deste modo, alcançar outros órgãos do corpo, entre eles o fígado. A instilação de MP_{2,5} em animais pode levar à alteração do tônus vasomotor, inflamação vascular e visceral, adiposidade, aterosclerose e resistência insulínica (XU et al., 2011).

A interação entre os poluentes e as células pulmonares podem ativar reflexos neurais no sistema nervoso autônomo e aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para a inflamação causada pela obesidade e constitui-se um fator de risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas como o diabetes mellitus tipo 2 (XU et al, 2011). Condições patológicas como a inflamação crônica gerada pela obesidade, em que a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) ultrapassa a capacidade do sistema de defesa antioxidante, podem acarretar o desenvolvimento de estresse oxidativo, modificando irreversivelmente macromoléculas biológicas como o DNA, proteínas e lipídios, alterando a homeostase celular e sistêmica (GOTTLIEB et al, 2010). Além disso tecidos metabólicos como o hepático podem acumular partículas de MP contribuindo para inflamação e estresse oxidativo (OBERDÖRSTER et al., 2002). Estudos também observaram que tal exposição em camundongos pré-diabéticos foi capaz de desenvolver esteatose hepática (TOMARU et al. 2007).

A prática de exercício físico também é um desafio ao organismo, pois causa aumento do consumo de oxigênio nas células, o que está diretamente relacionado à formação de ERO. Em indivíduos não treinados, os tecidos não são capazes de controlar tal demanda oxidativa, podendo ocorrer processo inflamatório associado. Comprova-se ainda que pessoas obesas necessitam de maior demanda de oxigênio em relação a indivíduos não obesos para a prática de exercício físico, portanto, estão mais suscetíveis aos danos promovidos pela exposição ao MP. Muito embora a prática regular de exercícios diminua o risco de morte, quando associado à poluição atmosférica pode apresentar-se prejudicial à saúde principalmente a indivíduos portadores de doenças cardiopulmonares e circulatórias (FERNANDES et al., 2009).

Por outro lado, em defesa a danos externos como os resíduos tóxicos, o organismo possui sistemas de defesas antioxidantes enzimáticas como as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (BARBOSA, et al, 2010), capazes de reestabelecer a homeostase do estado redox combatendo ao estresse oxidativo causado pelos fatores supracitados.

Neste contexto, o estudo apresentado tem por objetivo conhecer os efeitos da combinação de dieta hiperlipídica e instilação de poluente ambiental material particulado fino (MP_{2,5}) associada ao treinamento aeróbico moderado ou intenso sobre parâmetros de estresse oxidativo e capacidade antioxidante hepática em camundongos B6.

Metodologia

Local de realização: Laboratório de Ensaios Biológicos – Departamento de Ciências da Vida – Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ. Rua do Comércio no3000, Bairro Universitário, Ijuí/RS. Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIJUÍ (008/2013).

Animais: Foram utilizados 52 camundongos da linhagem B6129SF2/J (B6), mantidos em gaiolas semi-metabólicas provenientes do Biotério da UNIJUÍ, em ambiente com temperatura controlada

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar entre 50% e 60% e iluminação artificial com ciclos de 12 horas claro/escuro.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UNIJUÍ (NO0.11/2013).

Delineamento experimental: Neste projeto foram realizadas 3 principais intervenções: consumo de dieta hiperlipídica (representando o desenvolvimento de uma resistência insulínica), instilação de material particulado fino (MP2,5) (representando a exposição à poluição atmosférica) e natação em diferentes intensidades (representando o treinamento físico). As intervenções iniciaram após os 30 dias do nascimento dos animais e com duração de 12 semanas. Os animais foram divididos em 12 grupos: Controle (C, n=6), Treinamento moderado (T4%, n= 5), Treinamento intenso (T8%, n= 4), Poluído (P, n= 6), Treinamento moderado e MP2,5 (TP4%, n= 4), Treinamento intenso e MP2,5 (TP8%, n= 5), Dieta (D, n= 6), Dieta e treinamento moderado (DT4%, n= 3), Dieta e treinamento intenso (DT8%, n= 4), Dieta e MP2,5 (DP, n= 5), Dieta, treinamento moderado e MP2,5 (DTP4%, n= 3) e Dieta, treinamento intenso e MP2,5 (DTP8%, n= 2).

Intervenção Alimentar: A ração padrão é padronizada para animais de laboratório (Nuvilab CR-1) composta por 4% gordura e 3,9 kcal. A dieta hiperlipídica – composta por 60% de gordura – foi preparada com 40,4% de ração padrão, 37,4% de banha de porco, 13,7% de albumina, 7,4% de aminomix e 1,1% de farinha de osso e ostra, no nosso LEBio. Todos os grupos receberam água potável ad libitum.

Adaptação: Por 2 dias consecutivos foram submetidos a natação, sem adição de carga durante 10 minutos em tanque específico, para a adaptação ao meio líquido no qual realizaram o treinamento. Os animais não foram manipulados por 72 horas e depois iniciaram o protocolo de treinamento aeróbio moderado ou intenso.

Material Particulado: O processo de instilação intranasal (i.n) foi realizado diariamente, com micropipeta automática. O volume administrado foi de 10 μL de suspensão de material particulado fino (MP2,5) desprezando a suspensão na narina do animal, promovendo reflexo de apneia seguida de inspiração profunda, a qual impulsiona o líquido para os pulmões (GOETTEMMS-FIORIN, 2014). Os grupos não expostos receberam, diariamente, 10 μL de solução fisiológica NaCl 0,9%.

Protocolo de Exercício Físico: Os animais que realizaram treinamento físico moderado (TM) de natação (temperatura da água = $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) iniciaram o esforço com duração de 20 minutos na 1ª semana, sem adição de carga. Da 2ª a 5ª semana os animais receberam cargas acopladas à base de sua cauda, iniciando em 1% e atingindo 4% de carga equivalente ao seu peso corporal na 5ª semana. Ao atingir a carga de trabalho os animais tiveram um incremento de 10 minutos no volume de treinamento, até atingir 60 minutos na 9ª semana permanecendo com essa duração e intensidade de esforço até a 12ª semana. Este protocolo representa uma intensidade moderada de esforço (HECK, 2011) e tem suas cargas relativas inalteradas (em 4%). Os animais que realizaram treinamento físico intenso (TI) de natação (temperatura da água = $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) realizaram seu treinamento com as mesmas cargas e tempos de natação dos grupos TM até a 5ª semana. Porém continuaram a incrementar sua carga de trabalho, 1%/semana, até atingir 8% na 9ª semana de treinamento e permanecendo com essa duração (20 minutos) e intensidade de esforço (8%) até a 12ª semana. Este protocolo representa uma alta intensidade de esforço (HECK, 2011).

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

As cargas relativas mantiveram-se inalterada em 4% ou 8%, mas sua carga absoluta foi modificada em relação ao peso corporal do animal que estava em desenvolvimento. Os grupos sedentários C, P, D e DP foram mantidos durante o mesmo período de tempo (12 semanas) em um recipiente com 2 centímetros de água (temperatura da água = $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

Preparação dos tecidos: O tecido hepático foi dissecado e homogeneizado em tampão KPi com inibidores de protease para as análises de estresse oxidativo.

Dosagem de Proteína: A concentração de proteína do tecido foi determinada pelo método espectrofotométrico de Bradford, a 595 nanômetros, utilizando curva padrão de albumina (1mg/ml) (BRADFORD, 1976).

Lipoperoxidação (TBARS): A determinação da lipoperoxidação foi realizada utilizando o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BUEGE & AUST, 1978), como medida dos parâmetros de estresse oxidativo, por espectrofotometria em 535 nanômetros (ZANCHI et al., 2008).

Atividade enzimática: A atividade da Superóxido Dismutase (SOD) foi avaliada pelo método Marklund & Marklund (1974), a 420 nm. A atividade da Catalase (CAT) foi determinada através da decomposição do peróxido de hidrogênio, em 240nm de absorbância. Os resultados foram expressos em pmol/mg de proteínas (AEBI, 1984).

Análise estatística: Foi utilizado o programa Graph Pad 3.0. Os resultados foram expressos como médias $\pm$ DP e analisados por ANOVA de uma via, com teste post-hoc de TUKEY, considerando nível de significância estatística o limite de 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Este estudo revela que a intervenção com dieta hiperlipídica causou maior concentração de MDA no tecido hepático em relação aos animais que não receberam intervenção alimentar (Figura 1. A), indicando dano oxidativo hepático causado pela dieta hiperlipídica, provavelmente associado com o quadro inflamatório da obesidade. Nos grupos que foram tratados com a associação de dieta hiperlipídica com a instilação do poluente (MP2,5), foi verificada uma maior concentração de MDA em relação ao grupo que recebeu somente a intervenção com o poluente (Figura 1. A). Não foram observadas, entretanto, alterações na resposta enzimática antioxidante (Figura 1. B, C e D), apesar da adversidade do contexto (uso de dieta hiperlipídica e exposição a poluente). Neste sentido, considerando que a obesidade está associada à ocorrência de estresse oxidativo, com implicação no metabolismo do oxigênio e capacidade oxidativa dos ácidos graxos, a resposta inalterada das defesas antioxidantes pode representar maior risco de dano oxidativo no tecido hepático, na presente condição experimental (Figura 1. A). A instilação com poluente e/ou a realização de exercício físico moderado ou intenso não causou alteração/interferência no quadro quanto as variáveis analisadas neste estudo.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

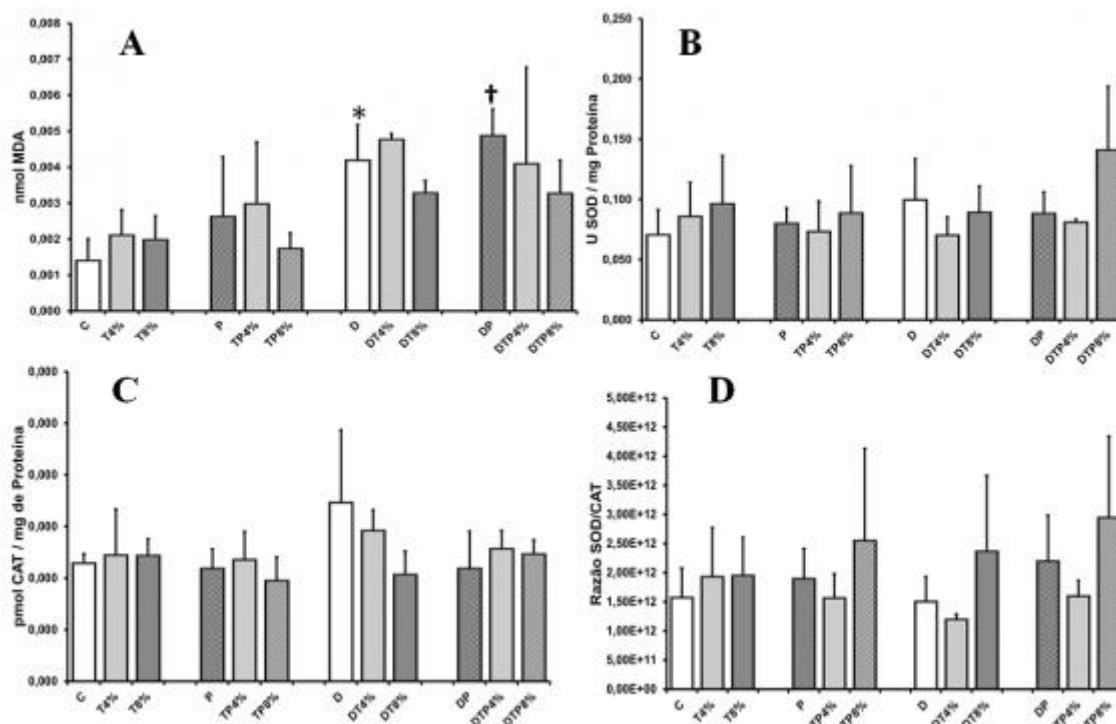


Figura 1. Avaliação de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em camundongos após 12 semanas de tratamento com DHL, instilação com MP 2,5 e realização de exercício físico moderado ou intenso. Concentrações de MDA (A), atividade enzimática da SOD (B) e CAT (C), razão SOD/CAT(D) no tecido hepático. Os valores foram expressos em média + DP. Análise estatística por Anova de uma via, seguida do teste post hoc de Tukey. (A) * $P < 0,005$ em comparação ao grupo C. † $P < 0,005$ em relação ao grupo C e P. (B) $P = 0,2851$. (C) $P = 0,0874$. (D) $P = 0,3440$.

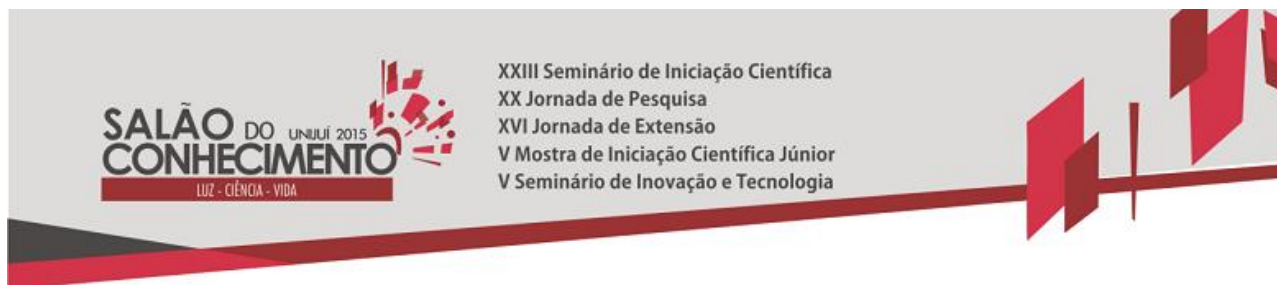
Conclusão

A intervenção alimentar com dieta hiperlipídica causou dano oxidativo no tecido hepático de camundongos, não havendo influência da instilação de material particulado. A resposta das defesas antioxidantes enzimáticas avaliadas não foi alterada pelas intervenções deste estudo. Os dados preliminares (número amostral ainda reduzido) dos grupos treinamento aeróbio moderado ou intenso indicam que o exercício físico regular pode prevenir o dano oxidativo hepático causado pelo consumo de dieta hiperlipídica.

Palavras-chave: DHL; Poluição atmosférica; Exercício físico intenso e moderado; Dano oxidativo hepático.

Referências Bibliográficas:

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, v.105, p.121. 1984.
BARBOSA, K. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Revista de Nutrição de Campinas*, 23(4):629-643, jul./ago., 2010.
BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v.72, p.248-54., 1976.



Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

COTE, I. et al. U.S. Air quality management: local, regional and global approaches. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*, v. 71, n. 1, p. 63-73, 2008.

DUBOWSKI, S. et al. Diabetes, Obesity, and Hypertension May Enhance Associations between Air Pollution and Markers of Systemic Inflammation. *Environmental Health Perspectives*, v.114, p.992-998, 2006.

GOTTLIEB, M. et al. Oxidative stress as an emergent cardiometabolic risk factor. *Scientia Medica (Porto Alegre)* 2010; volume 20, número 3, p. 243-249.

GOETTEMES-FIORIN, P. B. (2014). Exposição crônica à MP2,5 agrava disfunção metabólica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos.

HECK, T. G. (2011). HSP70 como Marcador de Intensidade de Exercício: Razão entre o Conteúdo Extracelular e Intracelular de HSP70 como um Sinal de Alerta Imunológico.

OBERDÖRSTER G, et al. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health*. 2002;65(20):1531–1543. p. 1001–1006, 2012.

PEARSON, J. et al. Association Between Fine Particulate Matter and Diabetes Prevalence in the U.S. *Diabetes Care*, v.33, p.2196–2201, 2010.

Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, 2011. Disponível em: <http://www.endocrino.org.br/numeros-da-obesidade-no-brasil>. Disponível em 29 de junho de 2015.

TANGVARASITTICHAJ, S. et al. Oxidative stress, insulin resistance dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2015 Apr 15;6(3):456-80. doi: 10.4239/wjd.v6.i3.456.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Particle Pollution (PM10) and (PM2.5). Disponível em: <http://www.airnow.gov/index.cfm?action=aqibasics.particle>. Acesso em 10 de Novembro de 2011.

XU, X. et al. Long-Term Exposure to Ambient Fine Particulate Pollution Induces Insulin Resistance and Mitochondrial Alteration in Adipose Tissue. *Toxicological Sciences*, 2011.

FERNANDES, J. et al. Air Pollution and its respiratory, cardiovascular and reproductive effects in the human health. *Revista de Medicina de Minas Gerais* 2010; 20(1): 92-101.