

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

A EXPOSIÇÃO AO MATERIAL PARTICULADO FINO (MP_{2,5}) ALTERA O EQUILÍBRIO REDOX DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA SUBMETIDOS AO TREINAMENTO FÍSICO INTENSO¹

Lílian Corrêa Costa Beber², Jéssyca Bandeira Corrêa³, Aline Sfalcin Mai⁴, Analú Bender Dos Santos⁵, Thiago Gomes Heck⁶, Mirna Stela Ludwig⁷.

¹ Trabalho de pesquisa realizado pelo Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF/Unijuí).

² Acadêmica do curso de Ciências Biológicas da Unijuí, bolsista de Iniciação Científica (PIBIC/Unijuí) e integrante do GPeF – liliantutty@hotmail.com.

³ Mestranda pelo Programa de Pós Graduação em Atenção Integral à Saúde e integrante do GPeF - je.correa@yahoo.com.br.

⁴ Mestranda pelo Programa de Pós Graduação em Atenção Integral à Saúde e integrante do GPeF - esfalcin@yahoo.com.br.

⁵ Mestranda pelo Programa de Pós Graduação em Atenção Integral à Saúde e integrante do GPeF - analu.bender@gmail.com.

⁶ Docente do Departamento de Ciências da Vida (DCVida/Unijuí) e coordenador do GPeF - gomesheck@yahoo.com.

⁷ Docente do Departamento de Ciências da Vida (DCVida/Unijuí) e coordenador do GPeF - ludwig@unijui.edu.br.

Introdução

A obesidade é hoje um dos maiores problemas de saúde no mundo, principalmente devido à inatividade física e aos maus hábitos alimentares. A obesidade é uma doença crônica caracterizada pela deposição excessiva de tecido adiposo e é acompanhada de uma série de complicações cardiopulmonares e metabólicas. Estas complicações estão relacionadas ao aumento da secreção de ácidos graxos livres, adipocinas inflamatórias e prostaglandinas pelo tecido adiposo, as quais contribuem para a regulação do apetite, sensibilidade à insulina, pressão arterial e metabolismo lipídico (GUYTON; HALL, 2011).

O indivíduo obeso também se torna mais suscetível aos fatores exógenos indutores de dano, como a poluição atmosférica. Um dos poluentes mais nocivos é o material particulado fino (MP_{2,5}) que, devido ao seu diâmetro reduzido, apresenta maior absorção pelo organismo em relação aos demais poluentes. A inalação do MP_{2,5} pode danificar tecidos cardiopulmonares, atingir a circulação sanguínea e prejudicar a homeostase (RAJAGOPALAN; BROOK, 2012).

No sentido de reduzir as complicações e a mortalidade advindas da obesidade, a prática de exercício físico regular e um acompanhamento nutricional adequado têm se mostrado eficazes. O exercício físico realizado de forma crônica promove uma melhora na qualidade de vida do indivíduo, uma vez que aumenta o gasto energético e reduz a adiposidade (GUYTON; HALL, 2011), além de regular a síntese e a remoção de compostos oxidantes, impedindo o dano por estresse oxidativo (EO). Entende-se por EO o desequilíbrio entre fatores pró-oxidantes e as defesas antioxidantes do organismo. Outro benefício associado ao exercício físico crônico está relacionado à melhora na sensibilidade à insulina e na captação de glicose por vias independentes da insulina (ROPELLE, 2011).

Considerando que a obesidade torna o indivíduo mais suscetível aos danos ocasionados pela poluição e que o exercício físico quando realizado cronicamente pode melhorar a qualidade de vida

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

de indivíduos obesos, este trabalho pretende avaliar possíveis alterações no equilíbrio redox em animais obesos, induzidos por dieta hiperlipídica (DHL), expostos ao MP2,5 e que realizaram de treinamento físico de diferentes intensidades.

Metodologia

Animais: foram utilizados 96 camundongos machos B6129SF2/J com 30 dias de idade, no período pós desmame. Os animais foram mantidos durante todo o período experimental no Biotério da UNIJUÍ em caixas semimetabólicas, com temperatura ambiente controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa de 50-60% e ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os animais receberam água a vontade (ad libitum).

Delineamento experimental: os animais foram divididos em 12 grupos (n=6): Controle (C), Treinamento Moderado (MOD), Treinamento Intenso (INT), Poluído (P), Treinamento Moderado+Poluição (P-MOD), Treinamento Intenso+Poluição (P-INT), Dieta hiperlipídica (D), Dieta hiperlipídica+Treinamento Moderado (D-MOD), Dieta hiperlipídica+Treinamento Intenso (D-INT), Dieta hiperlipídica+Poluído (DP), Dieta hiperlipídica+Treinamento Moderado+Poluição (DP-MOD) e Dieta hiperlipídica+Treinamento Intenso+Poluição (DP-INT).

Os animais pertencentes aos grupos C, MOD, INT, P, P-MOD e P-INT receberam ração padrão para animais de laboratório (Nuvilab CR-1®), com energia metabolizável total de 16,6 MJ/kg. Os animais dos grupos D, D-MOD, D-INT, DP, DP-MOD e DP-INT receberam dieta hiperlipídica à base de banha de porco, com energia metabolizável total de 22,8 MJ/kg.

No mesmo período, os animais receberam diariamente instilação intranasal de 10 μL de solução fisiológica (C, MOD, INT, D, D-MOD e D-INT) ou 10 μL de suspensão de material particulado fino (MP2,5) (5 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) (P, P-MOD, P-INT, DP, DP-MOD e DP-INT). A exposição dos animais à poluição foi realizada através de instilação intranasal por micropipeta automática, através do reflexo de apneia (MEDEIROS et al, 2004).

O MP2,5 foi obtido com coletor gravimétrico com filtro de policarbonato, propriedade da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na cidade de São Paulo. Destes filtros foi coletado o MP2,5 concentrado por meio de sonificação ao longo de sete etapas de 50 minutos, com 30 minutos de pausa entre elas. Após a obtenção das partículas foi preparada uma suspensão estoque contendo 10mg de partículas em 1,0mL de solução fisiológica. A partir dessa suspensão foram preparadas diluições seriadas até a obtenção da concentração desejada (5 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$).

Os animais MOD, INT, D-MOD, D-INT, P-MOD, P-INT, DP-MOD e DP-INT realizaram natação (água a $30^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$), numa profundidade de 20 cm. Eles foram adaptados à água por 10 minutos durante dois dias, sem carga acoplada à cauda. Na 1^a, 2^a, 3^a, 4^a e 5^a semanas os animais realizaram cinco sessões de natação semanais com duração de 20 minutos cada, com cargas acopladas na base da cauda nos valores de 0%, 1%, 2%, 3% e 4% respectivamente. A partir da 6^a semana os grupos que realizaram treinamento moderado (MOD, D-MOD, P-MOD e DP-MOD) permaneceram com a carga de 4% e aumentaram o tempo de treinamento em 10 minutos semanais, até atingir 60 minutos na 9^a semana e permanecer com esta mesma carga e tempo de natação até a 12^a semana de treinamento. Já os grupos que realizaram treinamento de alta intensidade (INT, D-INT, P-INT, DP-INT) permaneceram com o tempo de 20 minutos de natação e aumentaram a carga em 1% até atingir 8% na 9^a semana e permanecer com esta mesma carga e tempo de natação até a 12^a semana

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

de treinamento. Os grupos C, P, D e DP foram mantidos na água ($30^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$) numa profundidade de 2 cm, por 20 min e em repouso durante as 12 semanas.

Coleta e preparação dos tecidos: ao término do período experimental de 12 semanas os animais foram mortos por decapitação e tiveram o pulmão e coração coletados. Os tecidos foram rapidamente congelados, armazenados à temperatura -20°C e homogeneizados em tampão fosfato de potássio (KPi, pH 7,4) contendo inibidor de protease (PMSF).

Análises bioquímicas: a lipoperoxidação foi avaliada conforme o método de TBARS, a 535 nm (BUEGE; AUST, 1978), a atividade da superóxido dismutase (SOD) a partir da inibição da autoxidação do pirogalol, a 420nm (MARKLUND; MARKLUND, 1974) e a atividade da catalase (CAT) a partir da decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a 240 nm (AEBI,1984). A dosagem de proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976), a 595 nm.

Análise Estatística: os grupos foram comparados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste post-hoc de Tukey. Para nível de significância estatística foi considerado $P < 0,05$.

Este trabalho faz parte de um projeto aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UNIJUÍ (CEUA 011/13).

Resultados e discussão

Ao fim do delineamento experimental foram encontradas importantes diferenças nos tecidos cardiopulmonares. O tecido pulmonar foi responsivo às intervenções, de modo que os animais P-INT apresentaram maior lipoperoxidação em relação aos INT, aos P-MOD e aos DP-INT (Figura 1-A). Os grupos não apresentaram diferenças na atividade da SOD (Figura 1-B), CAT (Figura 1-C) e nem na razão entre elas (Figura 1-D). Estes resultados mostram um dano causado pelo poluente, mesmo sendo utilizado em baixa concentração, que se encontra entre a faixa boa e moderada. Ainda, de que a associação entre exercício físico de alta intensidade e poluição é capaz de aumentar o dano oxidativo lipídico no pulmão.

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

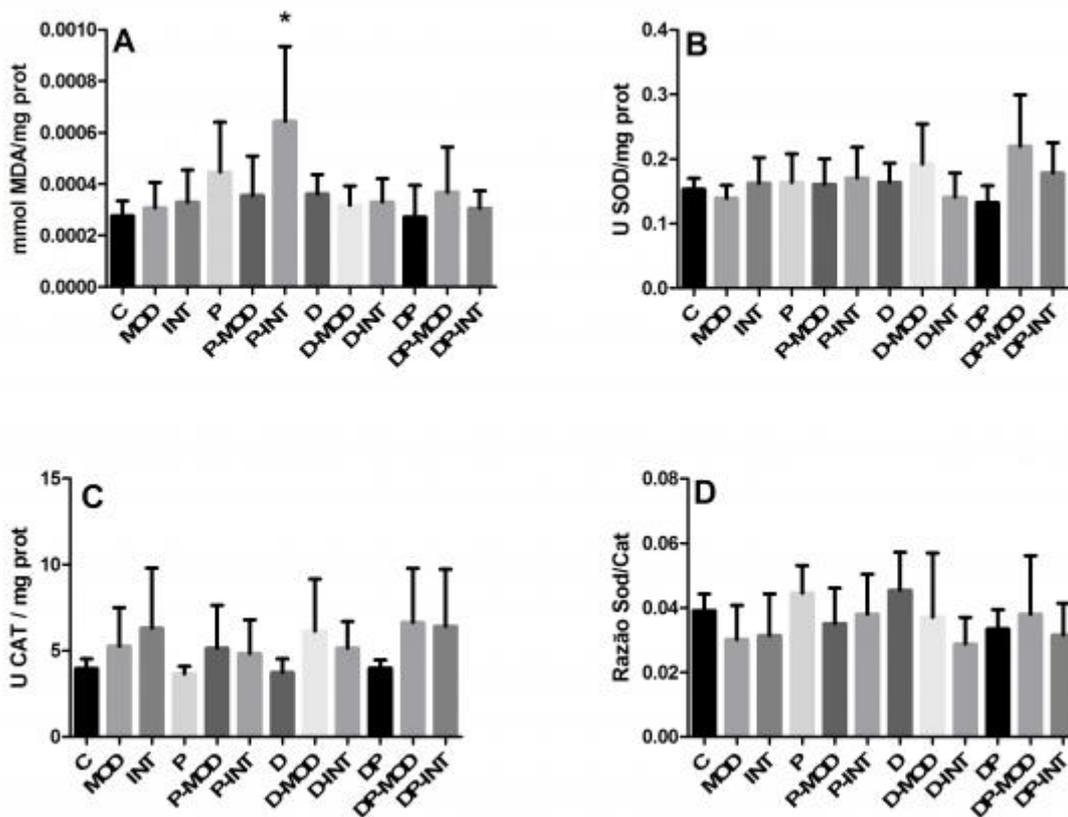


Figura 1: Avaliação de variáveis de estresse oxidativo no pulmão de camundongos machos após 12 semanas de dieta hiperlipídica, exposição ao MP2,5 e treinamento físico de diferentes intensidades. Concentrações de MDA (A); atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) (B) e da catalase (CAT) (C); razão entre atividade das enzimas SOD e CAT (SOD/CAT) (D). Os valores estão expressos em média \pm desvio-padrão. ANOVA de uma via, seguido do teste post hoc de Tukey. A)* $P < 0,01$ vs INT, P-MOD, DP-INT. B) $P = 0,0677$. C) $P = 0,2112$. D) $P = 0,2769$.

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

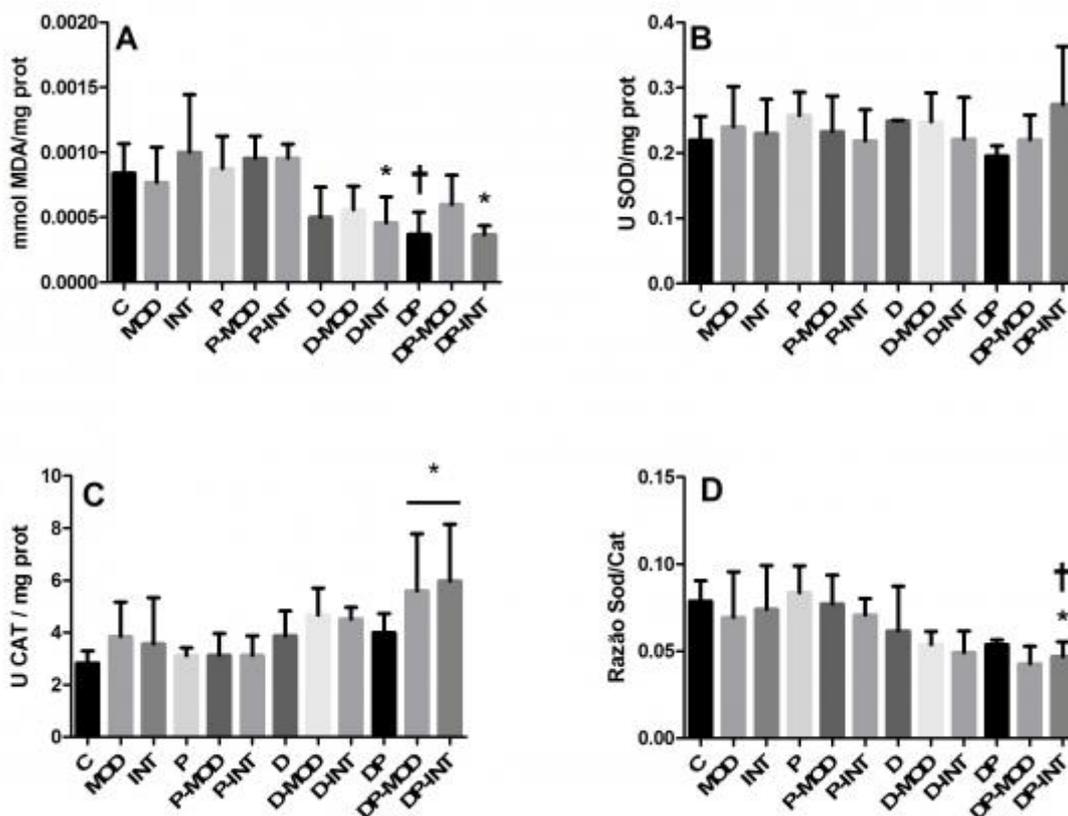


Figura 2: Avaliação de variáveis de estresse oxidativo no coração de camundongos B6129SF2/J machos após 12 semanas de dieta hiperlipídica, exposição ao MP2,5 e treinamento físico de diferentes intensidades. Concentrações de MDA (A); atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) (B) e da catalase (CAT) (C); razão entre atividade das enzimas SOD e CAT (SOD/CAT) (D). Os valores estão expressos em média \pm desvio-padrão. ANOVA de uma via, seguido do teste post hoc de Tukey. A) * $P < 0,01$ vs INT † $P < 0,01$ vs P. B) $P = 0,6134$. C) * $P < 0,01$ vs P-MOD e P-INT. D) * $P < 0,01$ vs C., † $P < 0,01$ vs P.

Em relação ao tecido cardíaco, os animais D-INT e DP-INT apresentaram menor lipoperoxidação que os INT. Os animais do grupo DP apresentaram menor dano oxidativo quando comparados ao P. (Figura 2-A). Estes resultados apontam para possíveis efeitos da DHL sobre o metabolismo oxidativo destes animais. A enzima SOD não foi responsiva às intervenções (Figura 2-B). A CAT, por sua vez, apresentou-se alterada pelas intervenções. Os grupos DP-MOD e DP-INT apresentaram maior atividade enzimática da CAT em relação aos animais P-MOD e P-INT (Figura 2-C). Quando avaliadas a razão entre as duas enzimas antioxidantes, o grupo D-INT apresentou menor razão comparado ao C e ao P (Figura 2-D), o que aponta para um desequilíbrio entre as duas enzimas antioxidantes (SOD e CAT) advindo da associação entre DHL e exercício físico intenso.

Os resultados apontam para o efeito deletério do treinamento físico de diferentes intensidades quando o organismo é exposto a poluentes atmosféricos. O MP2,5 devido a sua grande superfície de contato e ao diâmetro reduzido, além da sua composição rica em metais de transição, pode

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

facilmente desencadear perfis toxicológicos no trato cardiorrespiratório (LU et al., 2015). Além disso, os metais presentes em sua constituição podem participar de reações de Fenton e induzir a produção de espécies reativas.

A realização de exercício físico intenso induz o aumento da ventilação pulmonar. Consequentemente, há maior inalação de poluentes, maior EO e inflamação. No estudo de Arbex et al. (2012), foi observado aumento de 3,3 vezes nos casos de asma em crianças que praticavam esportes em comunidades com elevada concentração de ozônio, quando comparada as crianças da mesma comunidade que não realizavam exercícios. O próprio relatório da Cetesb que, hoje chama atenção para a elevada concentração de MP2,5 e a qualidade ruim do ar de São Paulo, destaca que uma das medidas de prevenção para a população em geral é reduzir o esforço físico pesado ao ar livre.

Analisando a lipoperoxidação dos grupos e a atividade das enzimas antioxidantes, a obesidade (induzida pela DHL) parece não ter piorado o quadro de estresse oxidativo observado nestes tecidos. No entanto, estes valores se devem ao menor tempo que estes animais (D-INT, D-MOD, DP-MOD e DP-INT) conseguiram nadar em relação aos demais. Os resultados encontrados neste estudo concordam com os descritos no trabalho de Kostrychi (2016), segundo o qual os animais que receberam dieta padrão para animais de laboratório conseguiram realizar os 20 minutos de exercício moderado, enquanto aqueles que receberam DHL tiveram menor desempenho, sofrendo de fadiga precoce em relação aos demais.

Conclusão

Os resultados apontam para os danos cardiopulmonares causados pela poluição durante a realização de exercício intenso em locais onde a qualidade do ar não é adequada.

Palavras-chave: obesidade; poluição atmosférica; treinamento físico de diferentes intensidades; estresse oxidativo.

Referências bibliográficas

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, v. 105, p. 121-126, 1984.
- ARBEX, M. A. et al. A poluição do ar e o sistema respiratório. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 38, n. 5, 2012.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, p. 248-254, 1976.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, v. 52, p. 302-310, 1978.
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Qualidade do ar. Disponível em: http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/Ar/php/mapa_qualidade_rmosp.php. Acesso em: 16 de junho de 2016.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. H. *Tratado de fisiologia médica*. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- KOSTRYCHI, I. M. Exercício físico agudo de intensidade moderada gera resposta anti-inflamatória em camundongos expostos ao material particulado fino. 2016. 94 f. Dissertação (Mestrado em

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, 2016. (não publicada).

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, v. 47, p. 469-474, 1974.

MEDEIROS, N. et al. Acute pulmonary and hematological effects of two types of particles surrogates are influenced by their elemental composition. *Environmental Research*, v. 95, n. 1, p. 62–70, 2004.

LU, S. et al. Comparison of cellular toxicity caused by ambient ultrafine particles and engineered metal oxide nanoparticles. *Particle and fibre toxicology*, v. 12, n. 5, p. 1-12, 2015.

RAJAGOPALN, S.; BROOK, R. D. Air pollution and type 2 diabetes: mechanistic insights. *Diabetes*, v. 12, n. 61, p. 3037-3045, 2012.

ROPELLE, E. R. Efeitos do exercício físico na obesidade e diabetes. In: CINTRA, D. E. et al. *Obesidade e diabetes: fisiopatologia e sinalização celular*. São Paulo: Sarvier, 2011.