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

UMA SESSÃO DE EXERCÍCIO AERÓBIO DE BAIXA INTENSIDADE ASSOCIADO AO CHOQUE TÉRMICO ALTERAM VARIÁVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO ENCÉFALO DE RATOS WISTAR OBESOS[1]

Fernanda Knopp Dos Santos[2], Analú Bender Dos Santos[3], Luana Weizenmann[4], Thiago Gomes Heck[5], Mirna Stela Ludwig[6], Pauline Brendler Goettems Fiorin[7].

[1] Projeto de Pesquisa realizado no Laboratório de Ensaios Biológicos durante a disciplina de Estágio Curricular do curso de Ciências Biológicas da UNIJUÍ.
[2] Acadêmica de Ciências Biológicas - Bacharelado da UNIJUÍ.
[3] Mestranda Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS) UNIJUÍ/UNICRUZ, Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF.
[4] Acadêmica de Fisioterapia da UNIJUÍ, Bolsista de Iniciação Científica PROBIC-FAPERGS, Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF.
[5] Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS), Professor do Departamento de Ciências da Vida - UNIJUI.
[6] Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS), Professora do Departamento de Ciências da Vida - UNIJUI.
[7] Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF, Professora do Departamento de Ciências da Vida - UNIJUI, Doutoranda em Ciências da Saúde - UFCSPA.

Introdução

O estresse oxidativo (EO) é decorrente do desequilíbrio de substâncias pró e antioxidantes presentes no organismo. Os principais agentes pró-oxidantes são as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), dentre os quais podemos indicar os Radicais Livres (RL), átomos que têm sua carga elétrica desemparelhada, ou seja, qualquer átomo que possui elétrons livres na sua órbita externa, gerando cargas que possuem reatividade (BARBOSA, 2010). O equilíbrio de compostos reativos dentro do organismo facilita a transferência de elétrons nas reações bioquímicas, no metabolismo respiratório, na geração de ATP, sinalização celular e nas reações imunológicas. Porém, o problema está na deficiência homeostática da produção desses radicais, que em excesso podem levar à uma condição pró-oxidante, que está associada ao desenvolvimento de inúmeras doenças.

Esse acúmulo de ERO, quando não atenuado pelos antioxidantes, pode causar danos às moléculas de DNA, aos carboidratos, proteínas, lipídios e outros componentes celulares. O sistema de defesa antioxidante tem como objetivo inibir ou minimizar os danos causados pela ação deletéria das ERO quando formadas em excesso (FERREIRA, A.L.A. MATSUBARA). No entanto, o desequilíbrio entre esta capacidade antioxidante e condições pró-oxidantes, resulta em EO no organismo. Estudos comprovam que o EO está fortemente relacionado a processos como envelhecimento, exposição à poluição, atividades físicas intensas, tipo de alimentação e doenças crônicas não transmissíveis como a obesidade, foco deste estudo (AUGUSTO, 2006).

Os mecanismos pelos quais a obesidade exerce efeitos prejudiciais à saúde estão relacionados à capacidade em induzir EO. O aumento nos níveis de ácidos graxos livres nos tecidos e na circulação também relaciona a obesidade à produção aumentada de ERO (PEREIRA, 2010). O consumo energético elevado leva ao aumento na produção dessas espécies na mitocôndria, por aumentar o

gradiente de prótons na membrana interna mitocondrial. Quando o gradiente excede o limiar, a transferência de elétrons da cadeia respiratória é bloqueada, levando a um escape de elétrons, formando radicais livres.

Além da produção de ERO na mitocôndria pelo alto consumo energético, esta produção também se dá naturalmente em nosso corpo, pelo aumento do consumo de O2, assim como pela ativação de vias metabólicas específicas durante ou após o exercício aeróbio agudo. O consumo elevado de O2 sobrecarrega o transporte de elétrons na matriz mitocondrial, fazendo com que parte do O2 não seja completamente reduzido à H2O, formando assim, os radicais livres. No entanto, o treinamento moderado regular é capaz de promover uma adaptação interna, aumentando mecanismos de defesa antioxidantes, o que reestabelece a homeostasia do organismo.

Similarmente ao efeito do exercício físico, a elevação da temperatura corporal também é capaz de aumentar a inibição de agentes pró-oxidantes, por meio da expressão de proteínas de choque térmico (HSP72) nos tecidos muscular esquelético, hepático e adiposo por até 24 horas após o aumento da temperatura (CHUNG et al., 2008; ASEA; FEBRAIO, 2007).

Destaca-se em especial o tecido encefálico, que possui baixa atividade da maioria das enzimas antioxidantes em comparação a outros órgãos, sendo assim, mais susceptível aos danos oxidativos, pois possui alta atividade metabólica e consumo de oxigênio. Desta forma este estudo tem por objetivo investigar o estado redox do tecido encefálico de animais obesos pelo consumo de dieta rica em ácidos graxos saturados, submetidos a uma sessão de exercício aeróbio de baixa intensidade associado a uma sessão de choque térmico.

Metodologia

Delineamento Experimental

Foram utilizados 50 ratos Wistar ao longo deste estudo. Inicialmente, 27 ratos foram submetidos ao consumo de ração hiperlipídica (Obesos; 22,8 MJ / kg, sendo 58,3 % de gorduras, 24,5% carboidratos e 17,2% de proteínas) e 23 ratos ao consumo de ração comercial padrão (Controles; Nuvilab CR-1; 16,6 MJ / kg, sendo 11,4% gorduras, 62,8% carboidratos e 25,8% proteínas), ambos durante 12 semanas de intervenção. Na 13ª semana todos os animais passaram por um período de adaptação à esteira por cinco dias consecutivos, aumentando progressivamente e diariamente o tempo 5-10min, e a velocidade da esteira de 5 a 8 m/min. Após a adaptação os animais foram divididos em oito grupos experimentais.

CONTROLES	OBESOS
C - Controle (sedentário);	O – Obeso (sedentário);
E - Exercício;	O+E – Obeso + Exercício;
HS - Choque Térmico (sedentário);	O+HS – Obeso + Choque Térmico (sedentário);
E+HS – Exercício + Choque Térmico.	O+E+HS – Obeso + Exercício + Choque Térmico.

Tabela 1: divisão dos grupos experimentais.

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

Após a divisão dos grupos experimentais, com 2 dias sem nenhuma manipulação (apenas mantidas as dietas experimentais) os animais dos grupos E, E+HS, O+E e O+E+HS realizaram uma única sessão de exercício aeróbio moderado, ~55% do VO2MAX, na velocidade de 16 m/minuto com a duração de 20 minutos em esteira rolante sem inclinação, em raias individuais, enquanto os grupos C, HS, O e O+HS permaneceram sedentários.

Após 36h da sessão de exercício, os grupos HS, E+HS, O+HS e O+E+HS passaram por uma sessão de choque térmico, enquanto os grupos C, E, O, e O+E permaneceram normotérmicos. Para sessão de choque térmico os animais foram anestesiados com xilazina 10 mg.kg-1 e cetamina 90 mg.kg-1 i.p. para supressão do controle da temperatura e indução da hipertermia. Estes animais foram colocados em um recipiente (banho) com água a 42°C, com a maior parte do corpo submerso (exceto cabeça e membros anteriores). A temperatura dos animais foi monitorada com termômetro retal durante todo o período em que eles estiverem no banho. Tão logo apresentaram temperatura central de 41°C permaneceram no banho, com monitoramento contínuo da temperatura central (41-41,5 °C) e do banho (41-42°C), durante quinze 15 minutos (BATHAIE et al., 2010; CHUNG et al., 2008).

Os animais dos grupos não submetidos ao choque térmico também foram anestesiados, porém mantidos com temperatura central entre 36,5-37,5 °C, monitorada com termômetro retal, em um recipiente com água (banho). Após 12 horas da sessão de choque térmico, todos os animais foram mortos por decapitação para a coleta de material biológico (encéfalo) para posterior análise.

Dosagem de Proteínas

A concentração de proteínas de cada amostra foi determinada por espectrofotometria a 595nm, usando albumina sérica bovina como padrão (pontos de 0,04-5,0 mg/mL). Os resultados obtidos serão expressos em mg de proteínas por ml de amostra (BRADFORD, 1976). Sendo esta utilizada para a normalização dos resultados de lipoperoxidação e atividade das enzimas SOD e CAT.

Lipoperoxidação e Atividade Enzimática

A determinação da lipoperoxidação foi realizada utilizando o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico à 535 nm (TBARS) (BUEGE & AUST, 1978). A atividade da Superóxido Dismutase (SOD) foi avaliada pelo método Marklund & Marklund (1974), a 420nm. A reação consiste na inibição da auto-oxidação do pirogalol pela atividade da enzima SOD. A atividade da Catalase (CAT) foi determinada através da decomposição do peróxido de hidrogênio a 240nm (AEBI, 1984). Os resultados serão expressos em USOD e pmol/mg de proteínas respectivamente.

Comitê de Ética

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais na UNIJUÍ (CEUA) (parecer substanciado n°001/2015).

Análise Estatística

Os dados foram expressos por Média +DP, sendo realizada ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Tukey. Foram considerados significativos $P<0,05$.

Resultados e Discussões

Os resultados mostram que o grupo Obeso apresentou aumento de lipoperoxidação (Figura 1A), em relação aos demais grupos (C, HS, E, E+HS, O+HS, O+E e O+E+HS). A atividade enzimática da SOD (Figura 1B) não foi alterada dentre os tratamentos, já a ação da CAT (Figura 1C) nos grupos E+HS e O+E apresentaram um aumento em relação com os outros grupos (C, HS, E, O, O+HS e O+E+HS). A razão USOD/UCAT (Figura 1D) apresentou diferença no grupo controle que realizou

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

exercício, em relação à CAT, evidenciando que um aumento da atividade da SOD poderia sobrecarregar a resposta da CAT, levando a um excesso de peróxido de hidrogênio (H2O2) no tecido.

Os animais submetidos somente à dieta hiperlipídica apresentaram efeitos da lipoperoxidação (Figura 1A), e sua associação com o E e HS não alteraram a ação antioxidante. Porém, no indivíduo saudável (controle), a terapia de E+HS aumentou a capacidade antioxidante, e o tratamento no obeso apenas com exercício também melhorou a condição de defesa antioxidante da Catalase nesse tecido (Figura 1C), indicando que a associação dessas terapias em um animal saudável pode potencializar sua capacidade antioxidante, tornando os tratamentos benéficos para o organismo. No entanto, sem efeitos sobre o encéfalo dos animais obesos, que, por aumentarem o dano oxidativo pelo consumo de dietas hiperlipídicas, devem buscar alternativas antioxidantes, evitando o estresse oxidativo encefálico.

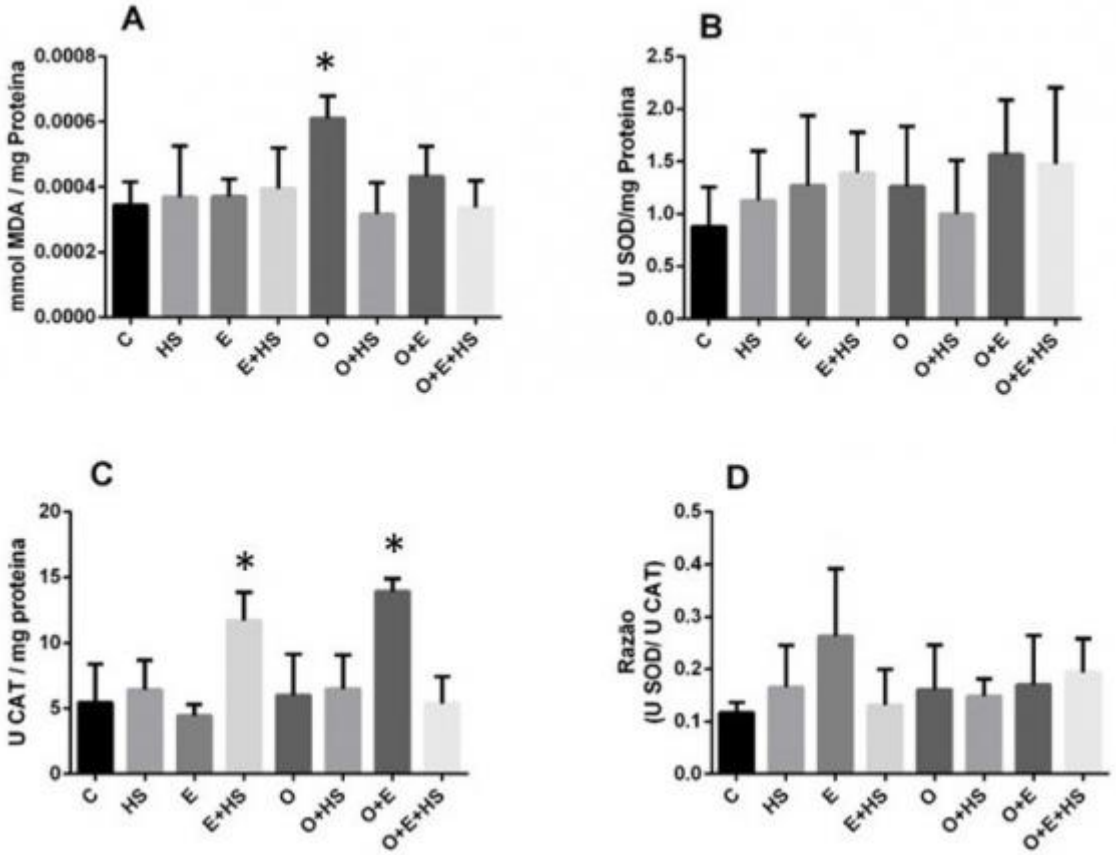

Figura1: Representação de parâmetros de estresse oxidativo em encéfalo de ratos Wistar obesos submetidos a uma sessão de exercício físico de baixa intensidade associado a uma sessão de choque térmico. Concentração de MDA (A); atividade enzimática da SOD (B) e CAT (C); e razão USOD/UCAT (D). Os dados foram expressos por Média +DP. (A) * P<0,05 vs C, HS, E, E+HS, O+HS, O+E e O+E+HS; (B) P=0,4009; (C) * P<0,01 vs os C, HS, E, O, O+HS e O+E+HS; e (D) P=0,1467 vc C, HS, E+HS, O, O+HS, O+E e O+E+HS.

Conclusões

De forma isolada a sessão de choque térmico em ratos saudáveis (E+HS) e uma sessão de exercício aeróbio de baixa intensidade em ratos obesos (O+E) aumentaram as concentrações de catalase, proporcionando um aumento na proteção das células do tecido encefálico destes grupos contra possíveis danos ocasionados pelo aumento na síntese de ERO.

Os animais do grupo Obeso (O) apresentaram uma maior concentração de MDA em relação aos demais grupos, demonstrando que o alto consumo de gorduras saturadas é prejudicial para o tecido encefálico. No entanto, uma única sessão de exercícios aeróbios de baixa intensidade e uma única sessão de choque térmico, em condições de obesidade, não desencadeiam uma resposta celular efetiva em todos os parâmetros analisados em relação ao estado redox do tecido encefálico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASEA, A. A. A., DE MAIO, A. A história por dentro: funções anti-inflamatória do HSF1 e das proteínas de choque térmico. In: Alexzander A. A. Asea and Antonio De Maio, Protein Reviews, Volume 1: Heat Shock Proteins: Potent mediators of inflammation and Immunity - Edited, v.1, cap.7, Ed. Springer. 2007.

ALABARSE, Paulo V. G., Estresse Oxidativo e Envelhecimento no Encéfalo de Ratos Machos e Reprodutores. Dissertação de Mestrado UFRGS, Porto Alegre, 2011.

AUGUSTO, Ohara. Radicais Livres, bons, maus e naturais. Oficina Textos, 2006.

BARBOSA, Kiriaque B. F. et al. Estresse Oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. Revista de Nutrição, 2010.

BATHAIE, S. Z. et al. The effect of hot-tub therapy on serum Hsp70 level and its benefit on diabetic rats: a preliminary report. Int J Hyperthermia, v.26, n.6, p.577-585, 2010.

BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Reproduction Research Laboratories, Department of Biochemistry, University of Georgia, Athens, Georgia 30602, 1976.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microssomal lipid peroxidation. Methods Enzymol., v.52, p.302-309, 1978.

GOETTEMS-FIORIN, Pauline B. RENDLER.Exposição Crônica a MP 2,5 Agrava Disfunção Metabólica Induzida por Dieta Hiperlípidica em Camundongos, 2014, Dissertação de Mestrado, UFCSPA, Porto Alegre.

CHUNG, J. et al. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. Proc Natl Acad Sci USA, v. 105, n.5, p. 1739-1944, 2008.

FERREIRA, A.L.A. MATSUBARA, L.S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, SP.

MARKLUND and MARKLUND, Gudrun, Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. Department of Chemistry, Section of Physiological Chemistry, University of Umei, 1974.

PEREIRA, S. S., Associação de Estresse Oxidativo e Obesidade Induzida por Dieta na Secreção de Adipocinas, Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, MG, 2010.

WEYDERT, J. C. and CULLEN, J. J. Measurement of Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase in Cultured Cells and Tissue, 2010.