

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

A EXPOSIÇÃO AO RESIDUAL OIL FLY-ASH ALTERA O EQUILÍBRIO REDOX CARDÍACO DE CAMUNDONGOS¹

Lílian Corrêa Costa Beber², Analú Bender Dos Santos³, Yohanna Hanna Donato⁴, Maicon Machado Sulzbacher⁵, Thiago Gomes Heck⁶.

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 - analu.bender@gmail.com.

⁴ Acadêmica do curso de Enfermagem da Unijuí, bolsista Iniciação Científica (PIBIC/Unijuí) e integrante do GPeF – yohannadonato260@gmail.com.

⁵ Acadêmico do curso de Enfermagem da Unijuí, bolsista Iniciação Científica (PIBIC/CNPQ) e integrante do GPeF – maiconsulzbacher@hotmail.com.

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

Introdução

A obesidade é uma doença crônica com crescente abrangência na população mundial (PAULI et al., 2011). Trata-se da expansão excessiva do tecido adiposo, que além de ser um aumento de depósito energético, ainda secreta adipocinas inflamatórias que atuam na regulação do apetite, sensibilidade à insulina, pressão arterial e metabolismo de lipídeos (URTADO et al., 2008, GUYTON; HALL, 2011).

Na condição de obesidade há um aumento na secreção destas adipocinas culminando num quadro inflamatório de baixo grau e de estresse oxidativo (EO). O EO ocorre em condições nas quais os fatores antioxidantes do organismo são incapazes de neutralizar os pró-oxidantes, de origem endógena ou exógena. Com isso, a obesidade pode comprometer os tecidos cardiopulmonares (PRADO et al., 2009) e culminar no desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas (URTADO et al., 2008).

As consequências da obesidade podem ainda ser agravadas pela exposição à poluição atmosférica, reconhecidamente indutora de EO. Dentre os poluentes atmosféricos, destaca-se o Residual Oil Fly-Ash (ROFA) decorrente da queima de combustíveis fósseis e rico em metais pesados (GHIO et al., 2002). O ROFA é considerado um tipo de material particulado que, por apresentar diâmetro reduzido, pode ser facilmente absorvido e afetar o trato respiratório através do EO e de processos inflamatórios (GHIO et al., 2002).

Uma das medidas recomendadas para reduzir as complicações da obesidade é o exercício físico (JI, 2002). A realização crônica de exercício físico reduz a suscetibilidade dos tecidos aos danos causados pelos fatores pró-oxidantes. Outros benefícios residem na elevação do gasto calórico e redução da adiposidade promovida pelo exercício. Isso se deve a capacidade térmica do exercício (durante e após a realização) e ao aumento da taxa metabólica basal do indivíduo mediante o aumento da massa magra e, conseqüentemente, ao aumento na quantidade energética necessária para mantê-la (GUYTON; HALL, 2011).

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

No entanto, nada se sabe sobre a ação do exercício físico moderado sobre indivíduos já suscetíveis, pela obesidade decorrente do elevado consumo de dieta hiperlipídica (DHL) e pela exposição ao ROFA. O presente trabalho visa avaliar possíveis alterações no equilíbrio redox em animais submetidos à associação entre essas três intervenções, DHL, ROFA e treinamento físico moderado.

Metodologia

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UNIJUÍ (NO 0.11/2013).

Animais: Foram utilizados 65 camundongos fêmeas B6129SF2/J com três meses de idade. 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 inicialmente divididos em quatro grupos: Controle (C), Rofa (R), Dieta (D) e Dieta+Rofa (DR). Os animais pertencentes aos grupos C e R receberam ração padrão para animais de laboratório (Nuvilab CR-1), obtidas comercialmente de Nuvital Nutrientes SA., com energia metabolizável total de 16.6 MJ/kg, sendo 11.4 % de gordura, 62.8% de carboidratos e 25.8% de proteínas e consistindo de proteína bruta, matéria mineral e fibrosa. Os animais dos grupos D e DR receberam dieta hiperlipídica à base de banha de porco, com energia metabolizável total de 22,8 MJ/kg, sendo de 58,3% de gorduras, 24,5% de carboidratos e 17,2% de proteínas (WINZELL; AHREN, 2004).

No mesmo período, os animais receberam diariamente instilação intranasal de 10 μL de solução fisiológica (C e D) ou 10 μL de ROFA (dose de 20 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$) (R e DR). O ROFA foi obtido através de partículas retiradas de um precipitador eletrostático instalado em uma das chaminés de uma fábrica de aço de grandes dimensões localizado na cidade de São Paulo. Sua constituição é Fe 1058,9 + 2,37 $\mu\text{g g}^{-1}$; Rb 719,7 + 1,0 $\mu\text{g g}^{-1}$; Zn 491,9 + 3,1 $\mu\text{g g}^{-1}$; As 154,4 + 0,8 $\mu\text{g g}^{-1}$; Cr 107,7 + 1,4 $\mu\text{g g}^{-1}$; V 35 + 4 $\mu\text{g g}^{-1}$; Ce 16,3 + 0,3 $\mu\text{g g}^{-1}$; La 10,3 + 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$; Co 9,9 + 0,25 $\mu\text{g g}^{-1}$; Mn 3,8 + 24 $\mu\text{g g}^{-1}$; Sb 2,2 + 0,9 $\mu\text{g g}^{-1}$; Br 1,5 + 19 $\mu\text{g g}^{-1}$ (média + desvio padrão), sendo que as partículas apresentam diâmetro aerodinâmico médio de $1,2 + 2,24 \mu\text{m}$. O poluente foi administrado por meio de instilação intranasal com utilização de micropipeta automática, utilizando-se do reflexo de apneia (MEDEIROS et al, 2004).

Na 13ª semana, os grupos C, R, D e DR foram subdivididos em oito grupos: Controle (C), Treinado (T), Rofa (R), Treinado-Rofa (TR), Dieta (D), Dieta-Treinado (DT), Dieta-Rofa (DR) e Dieta-Treinado-Rofa (DTR). Os animais pertencentes aos grupos T, DT, TR e DTR foram adaptados à natação ao longo de 10 minutos, sem adição de carga, por três dias, na água a 30°C , numa profundidade de 20 cm. Nas seis semanas subsequentes eles realizaram treinamento de intensidade moderada, iniciando na primeira semana com 4% de carga e 20 min de treinamento. Na segunda semana foi acrescido 1% de carga e manteve-se o tempo. Nas quatro semanas subsequentes a duração do exercício foi aumentada em 10 minutos a cada semana, alcançando 60 minutos na sexta semana e mantendo a carga de 5%. Os animais não treinados (C, D, R, DR) foram submetidos ao mesmo manuseio, permanecendo no tanque com água a 30°C na profundidade de 2 cm.

Durante essas seis semanas a instilação de ROFA e o consumo de DHL foram mantidos, totalizando 19 semanas com estas intervenções e apenas seis de exercício moderado.

Ao fim destas 19 semanas, os animais foram mortos por decapitação e os tecidos (pulmão e coração) coletados. Eles foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer a -20°C .

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

Posteriormente, foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (KPi, pH 7,4) contendo inibidor de protease (PMSF) para realização das análises bioquímicas.

Análises bioquímicas: A lipoperoxidação, que compreende o dano oxidativo lipídico, foi avaliada conforme o método de TBARS, a 535 nm (BUEGE; AUST, 1978). As enzimas antioxidantes também foram avaliadas, sendo que a atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada a partir da inibição da autooxidação do pirogalol a 420nm (MARKLUND; MARKLUND, 1974) e a atividade da catalase (CAT) a partir da decomposição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 240 nm (AEBI, 1984). Todas estas análises tiveram a dosagem de proteínas como padrão, a qual foi avaliada segundo o método espectrofotométrico de Bradford (1976) a 595 nm.

Estatística: A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido pelo teste post-hoc de Tukey. Para nível de significância estatística foi considerado $P < 0,05$.

Resultados e discussão

Após o período experimental de 19 semanas foram observadas importantes alterações nos tecidos cardiopulmonares promovidas pelas intervenções, DHL, ROFA e treinamento aeróbio moderado.

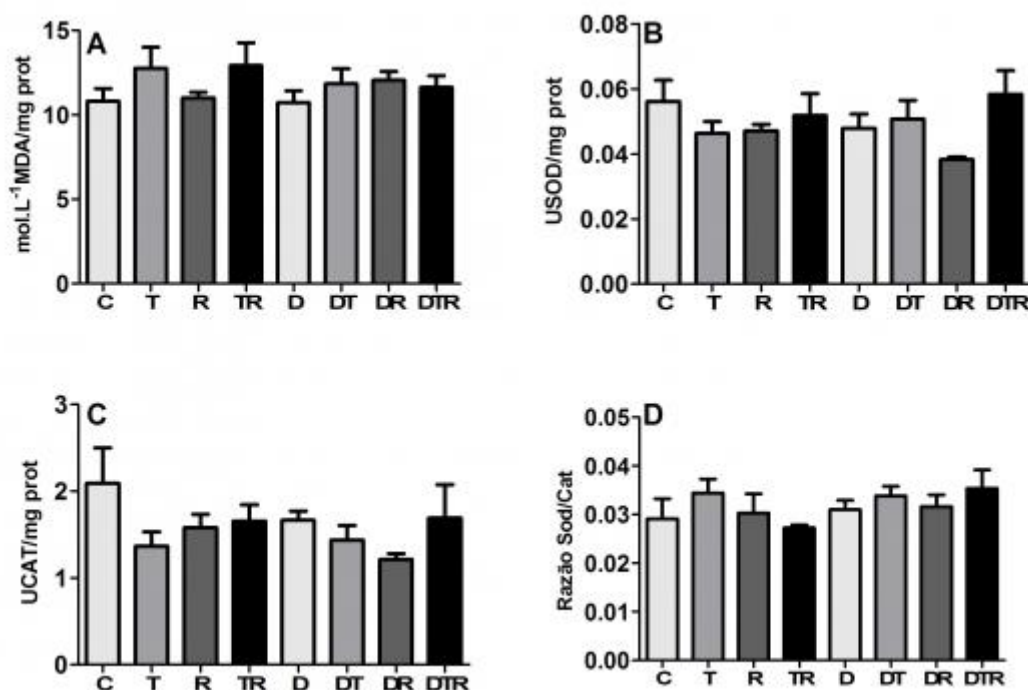


Figura 1: Avaliação de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo tecidual do pulmão em camundongos após 19 semanas de dieta hiperlipídica e exposição ao ROFA, acompanhadas a partir da 13ª semana, de treinamento físico moderado. Concentrações de MDA (A), atividade enzimática das enzimas SOD (B) e CAT (C), razão SOD/CAT (D). Os valores foram expressos em média + DP, relativo ao grupo Controle. Análise estatística por Anova de uma via, seguida do teste post hoc de Tukey. A) $P=0,4351$. B) $P=0,3540$. C) $P=0,3599$. D) $P=0,6699$.

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

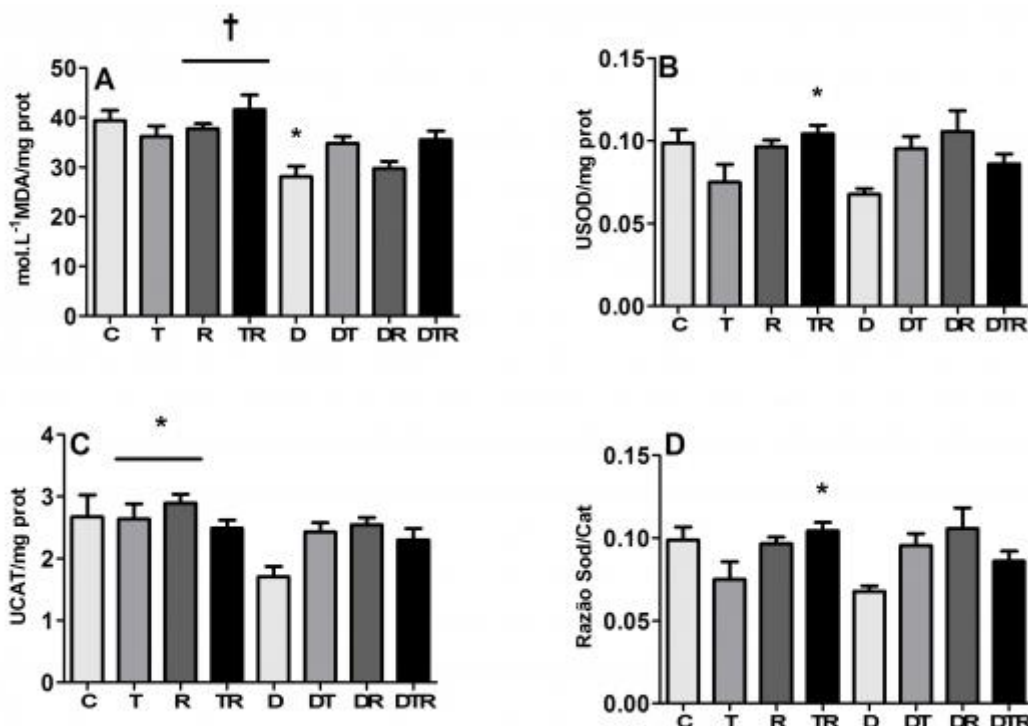


Figura 2: Avaliação de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo tecidual do coração em camundongos após 19 semanas de dieta hiperlipídica e exposição ao ROFA, acompanhadas a partir da 13ª semana, de treinamento físico moderado. Concentrações de MDA (A), atividade enzimática das enzimas SOD (B) e CAT (C), razão SOD/CAT (D). Os valores foram expressos em média + DP, relativo ao grupo Controle. Análise estatística por Anova de uma via, seguida do teste post hoc de Tukey. A) *P<0,01 vs C. † P<0,01 vs D. B) *P<0,01 vs D. C) *P<0,01 vs D. D) *P<0,05 vs D.

O tecido pulmonar não se mostrou responsivo as intervenções, pois não apresentou diferenças na lipoperoxidação entre os grupos (Figura 1-A), tampouco na atividade das enzimas antioxidantes SOD (Figura 1-B), CAT (Figura 1-C) e na razão entre elas (Figura 1-D). O tecido cardíaco, por sua vez, foi responsivo ao ROFA, a DHL e ao treinamento. A dieta (D) reduziu a lipoperoxidação (Figura 2-A) e a atividade das enzimas antioxidantes SOD (Figura 2-B) e CAT (Figura 2-C) no tecido cardíaco, o que pode ter ocorrido devido à redução da taxa metabólica basal pela obesidade em períodos experimentais longos (19 semanas). A obesidade, aqui induzida pela DHL, leva inicialmente ao aumento da taxa metabólica basal em decorrência do aumento da musculatura para suportar mais peso. Porém, em um tempo experimental maior, leva a redução da taxa metabólica basal e da eficiência dos tecidos ativos (FRANCISCHI et al., 2012). A instilação do ROFA (R) isolada e somada ao treinamento moderado (TR) levaram a uma maior lipoperoxidação em comparação aos animais que receberam apenas a DHL (D) (Figura 2-A). Este resultado aponta para os possíveis danos de realizar atividades físicas ao ar livre em locais cuja qualidade do ar não é adequada, mesmo que ainda não seja considerada ‘alerta’ por órgãos reguladores da saúde pública e ambiental (MMA, 2015).

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

Os maiores valores de lipoperoxidação encontrados nos animais que receberam ROFA (R e TR) (Figura 2-A) apontam para o seu potencial na indução do estresse oxidativo, em decorrência da sua composição rica em metais pesados, incluindo ferro, vanádio e níquel, os quais, de acordo com Ghio et al. (2002), podem estar induzindo a formação de espécies reativas através das reações de Fenton.

O treinamento moderado (T) isolado levou a um aumento da atividade da CAT no tecido cardíaco em relação ao grupo que recebeu apenas DHL (D) (Figura 2-C), apontando para o seu potencial na redução e/ou reversão das complicações decorrentes da obesidade, neste estudo induzida pela DHL. Isto se dá pela adaptação do indivíduo ao dano oxidativo, através da indução da superprodução de espécies oxidantes e a estimulação dos mecanismos celulares antioxidantes (BALDISSERA; CRUZAT, 2014).

O ROFA isolado (R), por sua vez, mesmo tendo levado a uma maior lipoperoxidação, resultou numa maior atividade da CAT quando comparado aos animais obesos (D) (Figura 2-C), mostrando que, na dose avaliada, mesmo sendo prejudicial, quando não acompanhado de outro fator de risco ou predisposição, o organismo consegue se defender dos danos oxidativos decorrentes deste poluente, através do aumento das enzimas antioxidantes.

A associação entre treinamento moderado e ROFA levou a uma atividade maior da SOD em relação àqueles que receberam apenas DHL (Figura 2-B). No entanto, quando analisada as duas enzimas antioxidantes (SOD/CAT) simultaneamente, o treinamento moderado somado à instilação diária de ROFA levou a uma maior razão entre estas duas enzimas quando comparados ao grupo que recebeu apenas DHL (Figura 2-D). Deste modo, considerando que a ação de uma enzima é complementar a outra, este desequilíbrio leva a uma superprodução de H₂O₂ (GARCEZ et al., 2004). Essa superprodução está levando, como fica evidente nos níveis de MDA observados, a um quadro de estresse oxidativo.

Conclusão

Ao fim deste trabalho, destaca-se a instilação do ROFA como indutora do estresse oxidativo. Também se aponta para o benefício do treinamento moderado para a saúde, uma vez que levou a um aumento nas enzimas antioxidantes (CAT). Assim, em conjunto, os dados indicam que a exposição a poluentes altera o equilíbrio redox cardíaco, reforçando a necessidade das recomendações de realização de exercício físico em locais com condições de ar adequadas.

Palavras-chave: obesidade; poluição atmosférica; treinamento moderado; estresse oxidativo.

Referências bibliográficas

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, v. 105, p. 121-126, 1984.
- BALDISSERA, F. G.; CRUZAT, V. F. Estresse oxidativo, qualidade de vida e exercício: uma abordagem nutricional. In: WINKELMANN, E. R.; BERLEZI, E. M. *Atenção Integral à Saúde*. Ijuí: Ed. Unijuí, 2014.
- 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.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, v. 52, p. 302-310, 1978.

FRANCISCHI, R. P. et al. Exercício, comportamento alimentar e obesidade: revisão dos efeitos sobre a composição corporal e parâmetros metabólicos. *Revista Paulista de Educação Física*, v. 15, n. 2, p. 117-140, 2012.

GARCEZ, M. et al. Radicais livres e espécies reativas. In: SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. Canoas: Ed. ULBRA, 2004.

GUYTON, A. C.; HALL, J. H. Tratado de fisiologia médica. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

GHIO, A. J. et al. Biologic effects of oil fly ash. *Environmental Health Perspectives*, v. 110, n. SUPPL. 1, p. 89-94, 2002.

JI, L. L. Exercise-induced modulation of antioxidant defense. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 959, p. 82-92, 2002.

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 particle surrogates are influenced by their elemental composition. *Environmental Research*, v. 95, p. 62-70, 2004.

MMA. Padrões de qualidade do ar. 2015. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/cidades-sustentaveis/qualidade-do-ar/padroes-de-qualidade-do-ar>. Acesso em: setembro de 2015.

PAULI, J. R. et al. Impacto do estilo de vida na prevalência de obesidade e diabetes. In: CINTRA, D. E. et al. Obesidade e diabetes: fisiopatologia e sinalização celular. São Paulo: Sarvier, 2011.

PRADO, W. L. et al. Obesidade e Adipocinas Inflamatórias: Implicações Práticas para a Prescrição de Exercício. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 15, p. 378-383, 2009.

URTADO, C. B. Alterações neuroendócrinas e exercício físico na obesidade. *Anuário da Produção Acadêmica Docente*, v. 12, n. 2, p. 247-266, 2008.

WINZELL, M. S.; AHREN, B. The High-Fat Diet-Fed Mouse: A Model for Studying Mechanisms and Treatment of Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes. *Diabetes*, v. 9, p. 237-215, 2004.