

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

EFEITOS DA COMBINAÇÃO DE EXERCÍCIO, POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA E DIETA HIPERLIPÍDICAS NO ESTRESSE OXIDATIVO NO TECIDO ADIPOSEO DE CAMUNDONGOS¹

Marlon Turcato², Jéssyca Bandeira Corrêa³, Analú Bender Dos Santos⁴, Mirna Stela Ludwig⁵, Thiago Gomes Heck⁶.

¹ Projeto de pesquisa realizado no Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPEF) UNIJUI

² Acadêmico do curso de Nutrição - UNIJUI, Bolsista PROBIC/FAPERGS, Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPEF

³ Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Mestranda Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS) UNIJUI/UNICRUZ

⁴ Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF, Mestranda Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS) UNIJUI/UNICRUZ

⁵ Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS), Departamento de Ciências da Vida (DCVida), Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI)

⁶ Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS), Departamento de Ciências da Vida (DCVida), Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI)

INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo (EO) é resultado do desequilíbrio entre espécies antioxidantes e pró-oxidantes em favor da geração excessiva dessas últimas. Esse desequilíbrio ocorre quando a produção de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ERO) excede a capacidade antioxidante natural do organismo (HALLIWELL B, 2007). Dessa forma, o EO pode ocorrer após a exposição a agentes pró-oxidantes, como poluentes do ar (DELFINO; STAIMER; VAZIRI, 2011) e dieta hiperlipídica (MATSUZAWA-NAGATA et al., 2008). Também é possível relacionar o estresse oxidativo com a intensidade do exercício, uma vez que intensidades moderadas não parecem induzir danos oxidativos ao organismo, diferente do que ocorre com exercício de alta intensidade (ALESSIO, 1993).

Estudos mostram que a inalação de material particulado (MP) pode causar diversos agravos para saúde, tanto em curto quanto longo prazo. Dependendo do seu diâmetro, o MP pode se depositar nos alvéolos pulmonares e atingir a corrente sanguínea. A exposição à poluição atmosférica ao MP leva ao estresse oxidativo em diferentes órgãos, tornando-se um agente agravante para o surgimento de inúmeras doenças (KÜNZLI et al., 2005).

Além da exposição à poluição, o exercício físico também leva a formação de ERO, o que requer cuidados de modo a evitar que se estabeleça um quadro de EO em função da intensidade de esforço. O EO pode ser responsável por aumentar a incidência de diversas lesões, alterar o sistema imunológico e reduzir o desempenho, ocasionando diversas doenças, incluindo cardiovasculares (FANHAN; FERREIRA, 2006).

Alguns estudos demonstram que uma carga isolada de trabalho exaustivo na musculatura esquelética leva ao aumento de lipoperoxidação e com isso um aumento na atividade de enzimas antioxidantes como Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT). Nesse sentido, o treinamento

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

de intensidade moderada pode aumentar tanto a capacidade de resistência aeróbia quanto as defesas antioxidantes, limitando assim o dano tecidual causado por ERO (SCHNEIDER, 2004).

A obesidade e outras doenças metabólicas estão relacionadas ao consumo calórico aumentado e ao sedentarismo, e vem se tornando cada vez mais comum entre a população mundial, devido as hábitos alimentares. Neste sentido, dietas hiperlipídicas têm sido utilizadas com sucesso para a reprodução de modelos experimentais de obesidade e síndrome plurimetabólicas. Ratos submetidos à dieta hiperlipídica palatável mostram, a partir de três semanas, um aumento na quantidade dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal (FO, 2001). Estudos mostram que na obesidade, ocorre um desbalanço oxidativo em prol do aumento da produção de pró-oxidantes pelo organismo, denominado estresse oxidativo (DE OLIVEIRA; SCHOFFEN, 2010)

O objetivo deste trabalho é verificar se a dieta hiperlipídica, o exercício físico em diferentes intensidades e a poluição, modificam o estado redox no tecido adiposo e no músculo gastrocnêmio de camundongos.

METODOLOGIA

Animais: foram utilizados 96 camundongos B6129SF2/J (B6) adultos com 21 dias, machos, provenientes do biotério da UNIJUÍ e mantidos em gaiolas semi-metabólicas, sob ciclo claro/escuro de 12h, com controle da temperatura ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ar (50 a 60%), sendo alimentados com ração padronizada para animais de laboratório (Nuvilab CR-1) 22% de proteína e recebendo água potável ad libitum.

Delineamento experimental: inicialmente os 96 animais (camundongos) foram divididos em 2 grupos experimentais: Controle (Não diabético) e Diabetes (Diabetes tipo II induzida por dieta hiperlipídica) por 12 semanas. Simultaneamente ao tratamento com as diferentes dietas, os animais foram subdivididos em grupos de acordo com a exposição à poluição (Exposto ou não ao material particulado por 12 semanas) e também submetidos durante as 12 semanas a três diferentes 3 situações (Repouso, Treinamento físico moderado e Treinamento físico intenso). Esses grupos foram então subdivididos nos seguintes grupos (n=3-6): Controle (C), Treinamento Moderado (T4%), Treinamento Intenso (T8%), Poluído (P), Treinamento Moderado e Poluição (TP4%), Treinamento Intenso e poluição (TP8%), Dieta hiperlipídica (D), Dieta hiperlipídica e Treinamento Moderado (DT4%), Dieta hiperlipídica e Treinamento Intenso (DT8%), Dieta hiperlipídica e Poluído (DP), Dieta hiperlipídica, Treinamento Moderado e Poluição (DTP4%) e Dieta hiperlipídica, Treinamento Intenso e Poluição (DTP8%).

Durante o experimento nós tivemos grupos animais alimentados com ração padrão para animais de laboratório (Nuvilab CR-1®) (C, T4%, T8%, P, TP4% e TP8%) e grupos que receberam dieta hiperlipídica (D, DP, DT4%, DTP4%, DT8% e DTP8%) com 60% de gordura, constituída de ração padronizada para animais de laboratório (Nuvilab CR-1) com 22% de proteína, 40% de banha de porco, 37% de albumina, 14% aminomix (vitaminas e minerais 8%) e 1% de farinha de osso e ostra, por 12 semanas. A ração normal foi moída e adicionada na forma de pó aos demais componentes, sendo armazenada em refrigerador ($2-8^{\circ}\text{C}$).

Nos grupos que receberam a poluição (P, TP4%, TP8%, DP, DTP4% e DTP8%) foram administrados via intranasal 10 μL da suspensão de Material Particulado Fino (MP2,5) (5 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$). Os grupos não expostos (C, T4%, T8%, D, DT4% e DT8%) receberam, nos mesmos dias, 10 μL de solução de salina 0,9%.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

Os animais que realizaram treinamento físico (TP4%, DTP4%, T4%, DT4%) (temperatura da água = 30°C+1°C), iniciaram o esforço com duração de 20 minutos na 1ª semana, com carga equivalente a 2% do peso corporal adicionada à cauda de cada animal. Na 2ª semana realizaram o treinamento com carga de 4%. Ao tempo de exercício, foram acrescidos 10 minutos a cada semana subsequente, atingindo 60 minutos de natação com uma carga de 4% acoplada a base de sua cauda na 6ª semana de treinamento 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%), mas sua carga absoluta modificada em relação ao peso corporal do animal que está em desenvolvimento. Os grupos sedentários (C, D, DP, P) foram mantidos durante o mesmo período de tempo (12 semanas) em um recipiente com 4 centímetros de água (temperatura da água = 30°C+1°C).

Material particulado: o poluente utilizado foi o material particulado fino, definido pela EPA (United States Environmental Protection Agency) por partículas finas com diâmetro aerodinâmico menor que 2,5 micrômetros. Este poluente é contido em filtro de policarbonato, através de um coletador gravimétrico instalado no terraço da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo na cidade de São Paulo, Brasil. Após a exposição à poluição (24 horas) o filtro foi retirado e a coleta das partículas aderidas no mesmo foram obtidas através do processo de sonicação em banho de ultrassom, realizado em 7 sessões de 50 minutos/cada, em meio aquoso. As partículas foram ressuspensas em solução fisiológica NaCl 0,9%, na dose de 500µg/mL. A partir dessa suspensão foram preparadas diluições seriadas até a obtenção da concentração desejada (5 µg/10 µL).

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 com auxílio de freeze-clamp (em nitrogênio líquido), armazenados à temperatura -20°C e homogeneizados em tampão fosfato de potássio (KPi, pH 7,4) contendo inibidor de protease (PMSF).

Peroxidação lipídica: foi avaliada conforme o método de TBARS, a 535 nm (BUEGE; AUST, 1978).

Atividade das enzimas antioxidantes: a atividade da Superóxido Dismutase (SOD) foi avaliada pelo método Marklund & Marklund (1974), a 420 nm. A reação consiste na inibição da auto-oxidação do pirogalol pela atividade da enzima SOD. A atividade da CAT foi determinada pela decomposição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), mensurada a 240 nm durante 2 min (AEBI, 1984). Os resultados foram expressos em UCAT por miligrama de proteína (WEYDERT; CULLEN, 2010).

Dosagem de proteína: a concentração de proteína dos tecidos foi determinada pelo método espectrofotométrico de Bradford, a 595nm, utilizando curva padrão de albumina (1mg/ml) (BRADFORD, 1976).

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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Grupos experimentais	TBARS (nmol.mg ⁻¹ prot)	SOD (USOD.mg ⁻¹ prot)	CAT (UCAT.mg ⁻¹ prot)
C	0,0035 ± 0,0010	0,35 ± 0,19	18,22 ± 7,98
T4%	0,0073 ± 0,0056	1,13 ± 0,46	32,71 ± 8,65
T8%	0,0035 ± 0,0014	0,83 ± 0,36	23,13 ± 8,27
P	0,0035 ± 0,0016	0,70 ± 0,71	23,32 ± 3,95
TP4%	0,0075 ± 0,0075	0,94 ± 0,58	27,91 ± 1,83
TP8%	0,0049 ± 0,0047	1,40 ± 1,35	23,26 ± 8,21
D	0,0015 ± 0,0010	2,87 ± 3,71	43,80 ± 23,87
DT4%	0,0013 ± 0,0008	2,22 ± 1,34	40,24 ± 16,79
DT8%	0,0013 ± 0,0007	4,78 ± 4,29	50,23 ± 15,62
DP	0,0042 ± 0,0060	3,82 ± 3,78	44,97 ± 9,78
DTP4%	0,0080 ± 0,0075	27,64 ± 28,61	98,02 ± 77,26
DTP8%	0,0048 ± 0,0001	0,95 ± 0,74	22,12 ± 8,95

TABELA 1. Resultados de estresse oxidativo no tecido adiposo de camundongos.

Grupos experimentais	TBARS (nmol.mg ⁻¹ prot)	SOD (USOD.mg ⁻¹ prot)	CAT (UCAT.mg ⁻¹ prot)
C	0,0035 ± 0,0010	0,35 ± 0,19	18,22 ± 7,98
T4%	0,0073 ± 0,0056	1,13 ± 0,46	32,71 ± 8,65
T8%	0,0035 ± 0,0014	0,83 ± 0,36	23,13 ± 8,27
P	0,0035 ± 0,0016	0,70 ± 0,71	23,32 ± 3,95
TP4%	0,0075 ± 0,0075	0,94 ± 0,58	27,91 ± 1,83
TP8%	0,0049 ± 0,0047	1,40 ± 1,35	23,26 ± 8,21
D	0,0015 ± 0,0010	2,87 ± 3,71	43,80 ± 23,87
DT4%	0,0013 ± 0,0008	2,22 ± 1,34	40,24 ± 16,79
DT8%	0,0013 ± 0,0007	4,78 ± 4,29	50,23 ± 15,62
DP	0,0042 ± 0,0060	3,82 ± 3,78	44,97 ± 9,78
DTP4%	0,0080 ± 0,0075	27,64 ± 28,61	98,02 ± 77,26
DTP8%	0,0048 ± 0,0001	0,95 ± 0,74	22,12 ± 8,95

TABELA 2. Resultados de estresse oxidativo no tecido do músculo gastrocnêmio

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

Nenhuma das intervenções foi capaz de modificar o estado redox nos tecidos adiposo (Tabela 1). Resultados da literatura mostram que a exposição ao (MP) (KUNZLI et al.; HU,2012), dieta hiperlipídica (MATSUZAWA-NAGATA et al., 2008) e o exercício físico (FANHAN; FERREIRA, 2006), são potenciais causadores de dano oxidativo em outros tecidos.

Em nosso estudo, não foram observadas diferenças entre os grupos, possivelmente, por que os animais foram mortos 48h após a última intervenção, o que faz com que não tenhamos conseguido observar no músculo gastrocnêmio e no tecido adiposo um efeito crônico em camundongos. Talvez se esses tecidos fossem analisados imediatamente após a última sessão de exercício poderia ter se percebido alguma modificação nas variáveis de estresse oxidativo. Em nosso estudo, o número de animais por grupo (n=3-6) também é um fator limitante.

CONCLUSÃO

Os dados preliminares indicam que a combinação exercício, poluição atmosférica e dieta hiperlipídicas não causaram alterações oxidativas no tecido muscular e no tecido adiposo.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymology*, Orlando, v. 105, p. 121-126, 1984.
- ALESSIO, Helaine M. Exercise-induced oxidative stress. *Medicine and science in sports and exercise*, v. 25, n. 2, p. 218–224, 1993.
- 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.
- DE OLIVEIRA, Monique Cristine; SCHOFFEN, J. P F. Oxidative stress action in cellular aging. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 53, n. 6, p. 1333–1342, 2010.
- DELFINO, Ralph J; STAIMER, Norbert; VAZIRI, Nosratola D. Air pollution and circulating biomarkers of oxidative stress. *Air Qual Atmos Health.*, v. 4, n. 1, p. 37–52, 2011.
- FO, Duarte. Adaptações metabólicas a dois tipos de treinamento moderado de natação, contínuo e intermitente, em ratos machos adultos alimentados com dieta normocalórica e hipercalórica. 2001.
- HALLIWELL B, Gutteridge J M C. Free radicals in biology and medicine. [S.l.: s.n.], 2007.
- KÜNZLI, Nino et al. Ambient air pollution and atherosclerosis in Los Angeles. *Environmental Health Perspectives*, v. 113, n. 2, p. 201–206, 2005.
- 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.
- MATSUZAWA-NAGATA, Naoto et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 57, n. 8, p. 1071–1077, 2008.
- WEYDERT, C.J.; CULLEN, J. J. Measurement of Superoxide dismutase, Catalase, and Glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols*, v. 5, n. 1, p. 51-66, 2010.