

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

EXERCÍCIO, DIETA HIPERLIPÍDICA E INALAÇÃO DE MATERIAL PARTICULADO FINO: EFEITO SOBRE O DESEMPENHO FÍSICO E NÍVEIS DE eHSP72 EM CAMUNDONGOS¹

**Maicon Machado Sulzbacher², Iberê Machado Kostrycki³, Analú Bender Dos Santos⁴,
Guilherme Wildner⁵, Mirna Stela Ludwig⁶, Thiago Gomes Heck⁷.**

¹ Pesquisa institucional desenvolvida no Grupo de Pesquisa em Fisiologia, Departamento de Ciências da Vida - UNIJUI

² Acadêmico do curso de Enfermagem – UNIJUI, Bolsista PIBIC/CNPQ, Grupo de Pesquisa em Fisiologia – GPeF

³ Mestrando do PPG Ciências da Saúde - UFCSPA, Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI - GPeF

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

⁵ Acadêmica do curso de Ciências Biológicas – UNIJUI, Bolsista PROBIC/FAPERGS, Grupo de Pesquisa em Fisiologia – GPeF

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)

⁷ 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

Hábitos alimentares inadequados e um estilo de vida sedentário da população brasileira têm corroborado para o aumento da prevalência de obesidade e doenças correlacionadas, como o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Atualmente, estima-se que a população mundial com DM2 seja de 387 milhões e que alcance 471 milhões até 2035. O DM2 é uma doença caracterizada pelo quadro de hiperglicemia sustentada devido à resistência periférica à insulina e redução do número de células beta pancreáticas, responsáveis pela secreção deste hormônio (SODIEDADE BRASILEIRA DO DIABETES, 2016). Além disso, o quadro diabetogênico está associado à inflamação crônica de baixo grau, que pode ser observado pela alteração nos níveis plasmáticos de proteínas de choque térmico de 72kDa (eHSP72), biomarcador para estudo diagnóstico de situações de estresse no organismo (RODRIGUES-KRAUSE et al., 2012).

Outro problema de ordem global é a poluição atmosférica. No mundo, anualmente, 7 milhões de mortes são atribuídas à exposição ao poluente atmosférico Material Particulado de 2,5 μm (PM2,5) (WHO, 2013). Além disso, estudos mostram que a exposição prolongada a poluentes atmosféricos está associada a elevação do risco de desenvolvimento de DM2 (WANG et al., 2014). Estudos experimentais demonstram que a inalação de PM2,5 pode gerar desequilíbrio autonômico e estresse oxidativo em diferentes tecidos. A exposição aguda a partículas também altera níveis plasmáticos de eHSP72 em animais obesos, causando desequilíbrio entre a concentração de eHSP72 em relação aos níveis de proteínas de choque térmico com ação antiinflamatória (iHSP70), aumentando os níveis plasmáticos e diminuindo a mesma proteína no tecido pancreático, o que resulta em intolerância à glicose (GOETTEMS-FIORIN, 2016).

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

Em contrapartida, no combate de doenças crônicas e suas comorbidades, recomenda-se a prática regular de exercícios físicos moderados (EIJSSVOGELS TH; THOMPSON PD, 2015). Quando realizado de forma aguda, em ambientes com altos índices de poluição atmosférica, por indivíduos sedentários e sem planejamento, o exercício pode representar riscos ao organismo, podendo desencadear quadro inflamatório (THRALL et al., 2007) e de estresse oxidativo (HECK et al., 2014). Além disso, sabe-se que o exercício agudo e de alta intensidade ocasiona uma elevação 15% da eHSP72 (EC et al., 2015).

Estudos indicam que os níveis de eHSP72 podem ser considerados biomarcadores do quadro metabólico no DM2, no risco diante da exposição a poluição atmosférica por PM_{2,5} e também do nível de esforço físico realizado (HECK, 2011; LUDWIG et al., 2014), sendo um amplo marcador de estresse do organismo.

Assim, buscamos avaliar o efeito do exercício físico agudo nos níveis de eHSP72 em condições de risco à saúde: no DM2 e na exposição à poluição atmosférica por PM_{2,5}.

Metodologia

Foram utilizados 60 camundongos machos da linhagem B6129SF2 (B6) com 30 dias de idade, provenientes do Biotério da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ, mantidos sob condições padrão de biotério (ciclo claro/escuro de 12h, temperatura 22±2°C e livre acesso à comida e água). Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética da UNIJUÍ (CEUA 010/2013).

Os animais foram separados inicialmente em dois grupos, por 16 semanas: Dieta Padrão (DP, n=29) (Nuvilab CR-1, energia total metabolizada de 3,9 kcal/g de ração ingerida, sendo 11,4% gordura, 62,8% carboidrato, e 25,8% proteína) ou Dieta Hiperlipídica (HFD, n=31) (Ração preparada no laboratório, energia total metabolizada de 5,4 kcal/g de ração ingerida, sendo 58,3% gordura, 24,5% carboidratos e 17,2% proteínas.).

Foi verificada a glicemia de jejum (sangue coletado da parte distal da cauda, ~5µL) antes da introdução da dieta hiperlipídica (tempo= 0) e na 4^o, 8^o, 12^o e 16^o semana. Na 16^a semana, após jejum de 12 horas, foi realizado o Teste de Tolerância a Glicose (GTT; administração de solução de glicose 16% (m/v) em água destilada via intraperitoneal na dose de 1g/Kg) (glicosímetro Optium Xcedd Abbott).

Após o GTT, foi realizada adaptação ao exercício físico (dois dias de natação por 10min), em tanque de vidro (30x30x60cm), preenchidos com 20 cm de água a 30±1°C. Após a adaptação, os animais ficaram 24h sem nenhuma manipulação e foram separados randomicamente, quanto a realização de exercício e exposição ao PM_{2,5} (tabela 1):

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

Tabela 1 - Grupos experimentais:

Grupos	Dieta	Instilação	Exercício Físico
C (n=6)	DP	Solução Salina	Repouso
C+MOD (n=10)	DP	Solução Salina	20 min. de natação
PM (n=7)	DP	PM _{2,5}	Repouso
PM+MOD (n=6)	DP	PM _{2,5}	20 min. de natação
HFD (n=8)	HFD	Solução Salina	Repouso
HFD+MOD (n=9)	HFD	Solução Salina	20 min. de natação
HFD+PM (n=7)	HFD	PM _{2,5}	Repouso
HFD+PM+MOD (n=7)	HFD	PM _{2,5}	20 min. de natação

Os grupos PM, PM+MOD, HFD+PM e HFD+PM+MOD receberam PM_{2,5} por instilação intranasal, (50µg/10µL), uma única vez, antes da realização do exercício físico (ou repouso). Os demais grupos receberam o veículo da instilação (solução salina), configurando 8 grupos experimentais. Os grupos com a sigla MOD (MOD, PM+MOD, HFD+MOD, HFD+PM+MOD) desenvolveram exercício em intensidade moderada por meio de adição de 4% de sobrepeso na cauda por 20 min. Os demais grupos permaneceram em repouso na água rasa por 20 minutos. Após o exercício físico foram coletadas amostras de sangue (punção caudal, ~25µL) para mensuração da concentração de lactato sanguíneo (Accutrend® Lactate, Roche). Os animais foram mortos para coleta dos tecidos e sangue para a análise de eHSP72 por kit específico (EKS-715 Enzo Life Sciences).

Para análise estatística foi utilizado ANOVA de medidas repetidas de duas vias para as análises de GTT, glicemia de jejum e lactato sanguíneo. Para o tempo de exercício foi utilizado ANOVA uma via, seguido de Teste de Tukey-Kramer de múltiplas comparações. E eHSP72, ANOVA de uma via seguido de post-hoc de Tukey (GraphPad 3.0). Nível de significância fixado em 5% (p<0,05). Os resultados foram expressos como médias ± desvio padrão.

Resultados e Discussão

O resultado abaixo (Figura 1A e B) representa índices glicêmicos dos animais após 12 horas de jejum, e o GTT após 16 semanas de dieta hiperlipídica, demonstrando aumento de glicemia pelo grupo HFD a partir da 4ª semana, até o final do estudo.

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

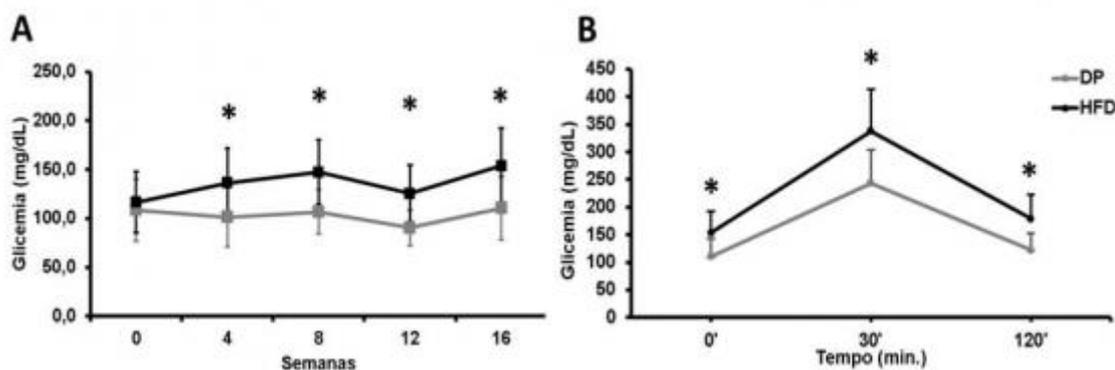


Figura 1. A) Glicemia de jejum de camundongos B6 ao longo de 16 semanas. *DP vs HFD 4^a, 8^a, 12^a e 16^a semana ($p < 0,0001$). B) GTT de camundongos B6 ao longo de 16 semanas. *DP vs HFD tempos 0, 30 e 120 min ($p < 0,0001$). Média \pm D.P. n=29-31.

Tendo em vista que uma dieta inadequada pode gerar intolerância à glicose e DM2, o modelo implementado em nosso estudo foi capaz de mimetizar um quadro de intolerância à glicose, já que os animais que receberam dieta hiperlipídica apresentaram hiperglicemia de jejum durante o período experimental a partir da 4^a semana de intervenção.

A intensidade do exercício físico realizado e a condição de repouso foram confirmadas através da mensuração do lactato sanguíneo (figura 2A). Observamos que os grupos HFD+MOD e HFD+PM+MOD não conseguiram concluir o tempo de exercício previsto (Figura 2A), demonstrando a redução no desempenho físico promovido pelo consumo de uma dieta hiperlipídica (BOUCHER et al., 2015).

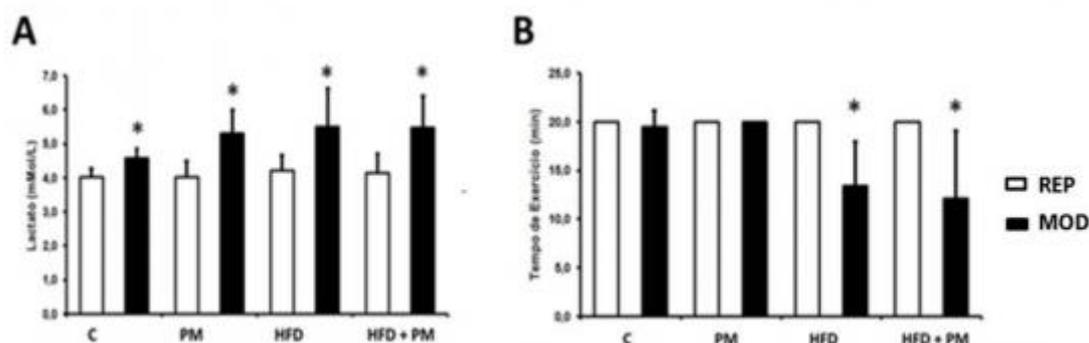


Figura 2. A) Lactato sanguíneo de Camundongos B6. *HFD vs HFD+MOD $p < 0,0065$; *HFD+PM vs HFD+PM+MOD $p < 0,0102$. B) Tempo de duração de Exercício Físico de Camundongos B6. *HFD+MOD vs C+MOD $p < 0,01$; *HFD+PM+MOD vs PM+MOD $p < 0,05$. Média \pm D.P. n=6-9. REP = animais que não realizaram exercício; MOD= animais que realizaram exercício moderado.

Em relação aos níveis de eHSP72, estes encontraram-se menores nos animais que praticaram exercício físico moderado e não foram expostos a uma dieta hiperlipídica (Figura 3).

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

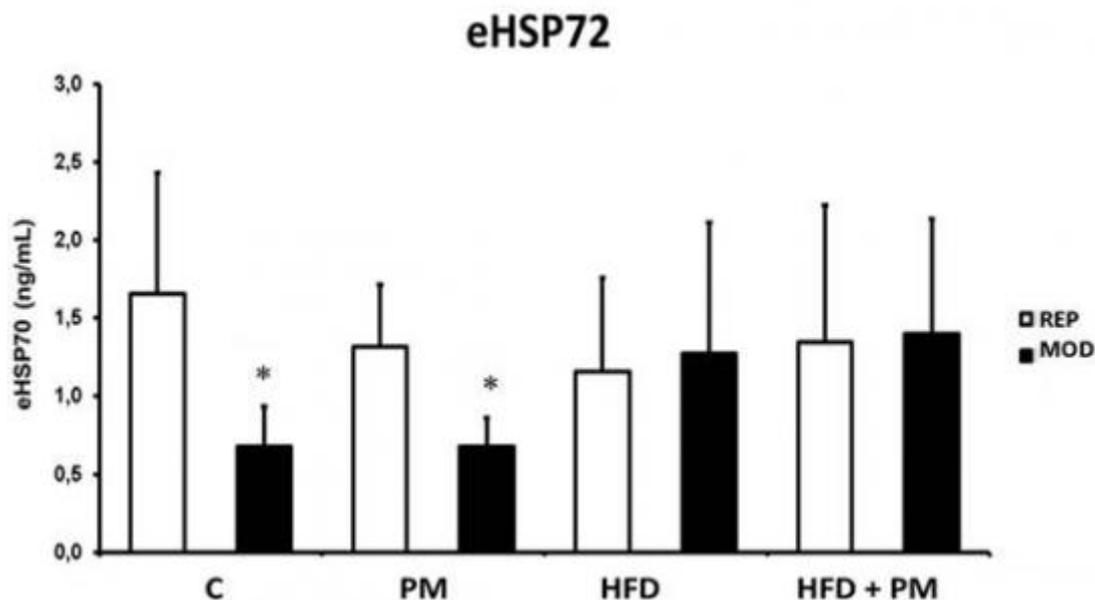


Figura 3. Concentração plasmática de eHSP72 (ng/mL de plasma), de camundongos após exercício físico moderado. REP = Animais em repouso na água rasa. MOD = Animais submetidos ao exercício agudo de intensidade moderada (4% peso acoplado à cauda, 20min, água 30±1°C). *C+MOD vs C+REP e PM+MOD vs PM+REP (P<0,05). n=4.

Conclusão

A dieta hiperlipídica foi capaz de induzir intolerância à glicose e diminuir a capacidade de conclusão do tempo de exercício físico previsto. Nos animais tratados com dieta hiperlipídica os níveis de eHSP72 não diminuíram como nos animais tratados com dieta convencional, mesmo expostos ao MP2,5. Portanto, o exercício de intensidade moderada pode diminuir os níveis de eHSP72, mas não em animais diabéticos. O material particulado não interferiu nos níveis de eHSP72.

Palavras chave: HSP70; Exercício Físico; Desempenho físico.

Referências:

- BOUCHER, F. et al. Childhood obesity affects postural control and aiming performance during an upper limb movement. *Gait and Posture*, v. 42, n. 2, p. 116–121, 2015.
- EC, L. et al. Extracellular and cellular Hsp72 differ as biomarkers in acute exercise/environmental stress and recovery. *Scand J Med Sci Sports*, 2015.
- EIJSSVOGELS TH; THOMPSON PD. Exercise is medicine: At any dose? *Jama*, v. 314, n. 18, p. 1915–1916, 2015.
- GOETTEMS-FIORIN, P. B. ET AL. Fine particulate matter potentiates type 2 diabetes development on high-fat diet-treated mice: stress response and extracellular to intracellular HSP70 ratio analysis. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2016.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

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

HECK, T. G. et al. Effects of Ambient Particles Inhalation on Lung Oxidative Stress Parameters in Exercising Rats. *Journal of Exercise Physiology*, v. 17, n. 3, p. 1–21, 2014.

LEE, B. J. et al. A comparison of two commercially available ELISA methods for the quantification of human plasma heat shock protein 70 during rest and exercise stress. *Cell Stress and Chaperones*, v. 20, n. 6, p. 917–926, 2015.

LUDWIG, M. et al. Processos químicos e biológicos associados a fisiopatologia do Diabetes Mellitus Contexto e Saúde. *Anais...2014*

MINISTÉRIO DA SAÚDE. cadernos de atenção básica no 36: Diabetes Mellitus. Brasília: [s.n.].

RODRIGUES-KRAUSE, J. et al. Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: Does fat matter? *Cell Stress and Chaperones*, v. 17, n. 3, p. 293–302, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DO DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira do Diabetes. 12. ed. Rio de Janeiro, 2016.

THRALL, G. et al. A systematic review of the effects of acute psychological stress and physical activity on haemorrhology, coagulation, fibrinolysis and platelet reactivity: Implications for the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Thrombosis Research*, v. 120, n. 6, p. 819–847, 2007.

WANG, B. et al. Effect of long-term exposure to air pollution on type 2 diabetes mellitus risk: a systemic review and meta-analysis of cohort studies. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, v. 171, n. 5, p. R173–82, 2014.

WHO, W. H. O.-; HENSCHER, S.; CHAN, G. Health risks of air pollution in Europe – HRAPIE project New emerging risks to health from air pollution – results from the survey of experts. Disponível em: <http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0017/234026/e96933.pdf?ua=1>. Acesso em: 28 jun. 2016.