



Alterações metabólicas e estresse oxidativo cardíaco em modelo animal submetido à dieta hipercalórica restrita no tempo de ingestão sob programa de natação.

Barbanera, P.O.; Queiroz, P.M.; Kaga A.K.; Gazoli M.B.; Carmo, N.O.L.; Fernandes, A.A.H.

Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil

Resumo

O estilo de vida contemporâneo, que restringe o tempo gasto com alimentação e inatividade física são fatores relevantes a serem considerados, devido às alterações cardiovasculares. Para prevenir ou até mesmo para amenizar tais efeitos, a recomendação frequente tem sido a prática de exercícios físicos como medida de interação terapêutica na medicina preventiva e reabilitação. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do exercício físico em ratos submetidos a dietas restritivas e hipercalóricas, através de parâmetros metabólicos além do estresse oxidativo no tecido cardíaco. Foram utilizados 32 ratos Wistar, machos, com 45 dias de idade. Os animais foram inicialmente divididos em dois grupos: C (n=16) considerado controle, receberam ração e água ad libitum; RS (n=16) receberam ração em tempo restrito e solução de sacarose 30% ad libitum. Os animais de RS receberam a mesma quantidade de ração ingerida por C, oferecida num tempo restrito de 2 horas diárias, durante o período de 30 dias. Após este período, os grupos (C e RS) foram subdivididos (n=8) em TR que receberam o mesmo tratamento que C e os animais deste grupo foram considerados exercitados e RS-TR receberam o mesmo tratamento que RS e foram considerados exercitados. Os grupos C e RS foram mantidos na fase de treinamento. A natação foi utilizada como ergômetro, com intensidade de treinamento moderada, durante 8 semanas. O delineamento estatístico foi inteiramente ao acaso com 32 tratamentos e 8 repetições, com nível de significância de 5% de probabilidade. Se revelou elevada atividade enzimática da β -hidroxil-CoA-desidrogenase em RS. Estes animais também promoveram o estresse oxidativo no tecido cardíaco. Animais de RS-TR melhorou as alterações metabólicas e atenuou o estresse oxidativo. Desta forma, pode-se concluir que o protocolo de natação foi eficiente em controlar os efeitos deletérios impostos pela dieta inadequada do miocárdio.

Palavras chave: Miocárdio; Estresse oxidativo; Exercício Físico; Modelo Animal.

Abstract

The contemporary lifestyle, which restricts the time spent with food and physical inactivity are relevant factors to be considered due to cardiovascular changes. To prevent or even mitigate such effects, the frequent recommendation has been the practice of physical exercises as a measure of therapeutic interaction in preventive medicine and rehabilitation. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effects of physical exercise in rats submitted to restrictive and hypercaloric diets, through metabolic parameters besides oxidative stress in cardiac tissue. Thirty-two male Wistar mice, 45 days old, were used. The animals were initially divided into two groups: C (n = 16) considered control, fed ration and water ad libitum; RS (n = 16) received restricted time ration and 30% sucrose solution ad libitum. RS animals received the same amount of feed ingested by C, offered in a restricted time of 2 hours daily, during the

period of 30 days. After this period, groups (C and RS) were subdivided (n = 8) into TR that received the same treatment as C and the animals in this group were considered exercised and RS-TR received the same treatment as RS and were considered exercised. Groups C and RS were maintained in the training phase. Swimming was used as an ergometer with moderate training intensity for 8 weeks. The statistical design was completely randomized with 32 treatments and 8 replicates, with significance level of 5% probability. It has been shown high enzymatic activity of β -hydroxyl-CoA dehydrogenase in RS. These animals also promoted oxidative stress in cardiac tissue. RS-TR animals improved metabolic changes and attenuated oxidative stress. In this way, it can be concluded that the swimming protocol was efficient in controlling the deleterious effects imposed by the inadequate diet of the myocardium.

Keywords: Myocardium; Oxidative Stress; Physical Exercise; Animal model.

Introdução

A ingestão de dietas inadequadas, hipercalóricas, enriquecidas com carboidratos refinados, associadas ao sedentarismo e baixo nível de condicionamento físico, compõem importantes fatores de risco na etiologia de várias condições patológicas. Além disso, os efeitos da inadequada ingestão alimentar e redução de refeições diárias, ou seja, dietas pouco fracionadas podem induzir modificações no metabolismo energético e estresse oxidativo no tecido cardíaco (Diniz et al., 2004).

A prevalência da falta de exercício físico tem aumentado na população adulta nas últimas décadas, assim mudanças no estilo de vida são de especial interesse porque a inatividade física predis põe o indivíduo a eventos cardiovasculares indesejáveis, com maior índice de infarto do miocárdio (Carvalho et al., 2016).

O exercício físico regular tem sido adotado como estratégia para reduzir os efeitos deletérios impostos pela elevada ingestão de calorias (Accioly et al., 2016). A base desta estratégia evidencia-se em amenizar os efeitos deletérios no miocárdio através do aumento da eficiência de vias metabólicas ativas para a obtenção de ATP, além de aumentar os processos oxidativos diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Dolinsky et al., 2012).

Considerando a prevalência dos distúrbios metabólicos associadas à inatividade física e ingestão alimentar inadequada, os objetivos do presente estudo são evidenciar os efeitos da atividade física sobre o metabolismo energético cardíaco e estresse oxidativo em modelo animal submetido à dieta padrão restritiva no tempo de ingestão e com ingestão excessiva de sacarose.

Método

Os procedimentos experimentais foram aprovados e protocolados, sob número 421, pela Comissão de Ética e Experimentação Animal do Instituto de Biociências (IB) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, “Campus de Botucatu”, que adota os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram utilizados 32 ratos, Wistar, machos, com 45 dias de idade e alojados em gaiolas de polietileno, mantidos em ambiente com temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) umidade relativa ($50\pm 5\%$) e fotoperíodo (ciclos de 12:12 horas claro/escuro) controlados.

Os animais foram inicialmente divididos em dois grupos: C (n=16) considerado controle, receberam ração e água ad libitum; RS (n=16) receberam ração em tempo restrito e solução de sacarose 30% ad libitum. Os animais de RS receberam a mesma quantidade de ração ingerida por C, oferecida num tempo restrito de 2 horas diárias, durante o período de 30 dias. Após este período, os grupos (C e RS) foram subdivididos (n=8) em TR que receberam o mesmo tratamento que C e os animais deste grupo foram considerados exercitados e RS-TR receberam o mesmo tratamento que RS e foram considerados exercitados. Os grupos C e RS foram mantidos na fase de treinamento. A natação foi utilizada como ergômetro, com intensidade de treinamento moderada, durante 8 semanas.

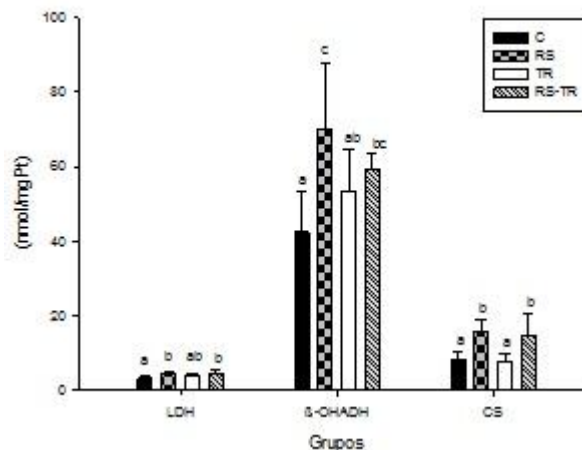
Para obter a atividade física em intensidade considerada moderada, utilizou-se do modelo logístico para determinar o limiar anaeróbico (Lan) em teste progressivo de natação. A intensidade do exercício físico é considerada moderada quando se atinge o Lan.

Após o período experimental, os animais foram eutanaziados e coletado amostra (200mg) de tecido cardíaco para a determinação da atividade da β -hidroxiacil desidrogenase (Bass et al., 1969); atividade da citrato sintase (Bass et al., 1969); atividade da lactato desidrogenase (Santos et al. 2014); a concentração de hidroperóxido de lipídio (Santos et al., 2014); atividade de glutathione peroxidase (GSH-Px) Nakamura et al. (1974); a atividade de superóxido dismutase (SOD) Crouch et al. (1981 e atividade da catalase (CAT).

Resultados e Discussão

A Figura 1 ilustra a atividade enzimática do metabolismo energético do tecido cardíaco.

Figura 1: Resultados médios e desvios padrão obtidos para a citrato sintase (nmol/mgPt), β -hidroxi-acil-CoA desidrogenase (nmol/mgPt) e lactato desidrogenase (nmol/mgPt), para os diferentes grupos experimentais



Média \pm Desvio Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$).

A atividade enzimática da lactato desidrogenase aumentou no miocárdio dos animais pertencentes ao grupo RS e RS-TR, comparativamente aos animais do grupo C. Enquanto animais treinados (TR) não demonstraram qualquer alteração significativa na atividade desta enzima ($p > 0.05$). Esta alteração na homeostase energética cardíaca observada em RS sugere a associação à proteína reguladora da proteína Sirtuína 1 (SIRT 1), a qual está expressa na restrição alimentar (Radak et al., 2013). A SIRT 1 aumenta a concentração de adenosina monofosfato quinase (AMPK), a qual modula o estado energético celular e inibe a expressão do complexo enzimático ácido graxo sintetase, e conseqüentemente a síntese de ácidos graxos. Nestas condições, ocorre diminuição da atividade da acetil coenzima-A carboxilase, reduzindo a formação de malonil-coenzima A, a qual inibe a carnitina acil transferase e, conseqüentemente favorece a oxidação de ácidos graxos (Chambers et al., 2011).

Contudo, estudos experimentais tenham demonstrado que o treinamento físico aumenta a capacidade oxidativa, o que pode ser indicado pela elevada atividade da citrato sintase (Dolinsky et al., 2012), no presente estudo não houve aumento significativo nesta enzima no miocárdio de ratos treinados (TR), mas esteve elevada nos grupo RS e RS-TR, sugerindo que o aumento da atividade da citrato sintase pode ser decorrente da ação combinada entre o comportamento alimentar inadequado e atividade física imposta a estes animais (RS-TR).

O grupo RS apresentou atividade da β -hidroxiacil-CoA desidrogenase elevada em relação aos grupos C e TR, os quais não diferiram entre si ($p > 0.05$). Embora a atividade da lactato desidrogenase estivesse aumentada nos animais RS e RS-TR, sugere-se o favorecimento do metabolismo anaeróbico, no qual o miocárdio passaria produzir lactato, a elevada atividade tanto da β -hidroxiacil-CoA-desidrogenase como da citrato sintase indica que também ocorreu oxidação de ácidos graxos no coração destes animais (RS, RS-TR).

Considerando que o metabolismo cardíaco é essencialmente aeróbico com elevada capacidade de oxidar lactato, a atividade da lactato desidrogenase, enzima associada ao metabolismo anaeróbico celular

(Granlund et al. 2011), ao permanecer inalterada nos grupos C e TR demonstra que o protocolo experimental desenvolvido no presente estudo possibilitou o treinamento aeróbico adequado.

No presente estudo pode-se observar que os efeitos da natação através da atividade enzimática da β -hidroxiacil-CoA-desidrogenase nos grupos TR e RS-TR, pois apresentaram tendência em normalizar, quando comparado ao grupo C. Assim, pode-se sugerir que o treinamento físico controlou a oxidação excessiva de ácidos graxos no miocárdio dos animais pertencentes ao grupo RS.

A Tabela 1 ilustra o efeito do estresse oxidativo no tecido cardíaco.

Tabela 1: Resultados médios obtidos para as concentrações teciduais cardíacas de hidroperóxido de lipídio (HP), atividade sérica da superóxido dismutase (SOD), catalase e da glutatona peroxidase (GSH-Px) para os diferentes grupos experimentais.

| | GRUPOS | | | |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | C | RS | TR | RS-TR |
| HP nmol/g | 238,69±16,66b | 303,38±22,04c | 205,63±18,43a | 261,40±26,40b |
| SOD nmol/mgPt | 7,62±1,13a | 16,43±1,26c | 7,32±0,95a | 9,42±0,97b |
| Catalase μ mol/g | 96,09±17,72a | 108,76±19,72a | 108,66±28,66a | 97,43±33,32a |
| GSH-Px nmol/mg | 46,43±5,70b | 27,78±5,72a | 59,82±8,59c | 41,75±8,67b |

Média \pm Desvio Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$).

Evidências mostram que os lipídios acumulados no tecido cardíaco pode ser alvo das espécies reativas de oxigênio (EROS) durante o processo de lipoperoxidação e formação de hidroperóxido de lipídio (HP), o qual tem sido considerado importante biomarcador do estresse oxidativo (Santos et al., 2014). Pode-se verificar que os níveis de HP em animais treinados (TR) encontram-se diminuídos em comparação aos animais pertencentes aos grupos C=RS-TR<RS. A natação para o grupo RS-TR não promoveu significância para este parâmetro em relação ao grupo C ($p > 0.05$).

Considerando que a fosforilação oxidativa, associada ao transporte mitocondrial de elétrons constitui importante fonte de EROs, os quais podem induzir a lipoperoxidação, a melhora na produção de HP pelos animais exercitados pode ser em decorrência de maior controle na oxidação de ácidos graxos e, portanto menor a probabilidade de produzir EROs na cadeia transportadora de elétrons.

Além disso, pode-se postular que a alta oxidação de ácidos graxos demonstrada por estes animais (RS) pode ter contribuído para elevar a produção de EROs. As moléculas de acetil-CoA, produto final da β -oxidação, são oxidadas no ciclo do ácido cítrico e a sua entrada nesta via depende da atividade da citrato sintase. A oxidação elevada de acetil-CoA gera excesso de equivalentes redutores (NADH e FADH), as quais liberam elétrons na cadeia respiratória, o que provoca rapidamente saturação dos complexos enzimáticos e bloqueio no fluxo de elétrons na cadeia respiratória. Desta forma, eventualmente uma pequena fração de elétrons pode escapar dos complexos enzimáticos I e III e reduzir parcialmente o oxigênio molecular, produzindo ânions superóxidos, que posteriormente convertem-se em

peróxidos de hidrogênio (Leverde 2007, Tsutsui et al., 2011).

Para a remoção das EROs as células dependem de sistemas antioxidantes enzimáticos endógenos, representados pela superóxido dismutase, que constitui a primeira linha de defesa contra a ação de ERO e catalisa a conversão de O_2^- em H_2O_2 , o qual é reduzido a H_2O pela glutatona peroxidase e catalase (Tsutsui et al., 2011).

A superóxido dismutase (SOD) esteve elevada nos grupos RS e RS-TR, sendo os sedentários que apresentaram maior atividade para esta enzima. Evidencia-se que o exercício físico não diferiu estatisticamente a atividade da SOD no miocárdio entre os grupos C e TR ($p > 0.05$). A SOD foi elevada no grupo RS, embora não suficiente para impedir a elevação na concentração de HP.

Os grupos experimentais deste estudo não apresentaram diferenças significantes para a atividade da catalase no tecido cardíaco ($p > 0.05$), enquanto a atividade da enzima glutatona peroxidase (GSH-Px) foi significativamente maior para o grupo TR e menor para o grupo RS em relação aos demais grupos deste estudo. Através da atividade enzimática da CAT e GSH-Px sugere que o radical superóxido foi dismutado em peróxido de hidrogênio, o qual não foi suficientemente reduzido em água e assim, apresentou importante papel na peroxidação lipídica e elevação na concentração de HP no miocárdio dos animais do grupo RS. Enquanto TR e RS-TR a atividade da SOD normalizou e reduziu, respectivamente. E a atividade da GSH-Px esteve elevada nos animais exercitados, quando comparada a RS ($p < 0.05$). Estes resultados sugerem menor produção de H_2O_2 e simultaneamente maior conversão destes peróxidos de hidrogênio em H_2O , indicando estabilização no processo de lipoperoxidação, como pode ser verificado pelos valores obtidos para HP nestes animais. Resultados concordantes mostraram o efeito benéfico do exercício de treinamento aeróbico diário, aumentando as defesas antioxidantes endógenas e a resistência do miocárdio à lipoperoxidação e, portanto maior proteção do tecido cardíaco contra o estresse oxidativo (Viera et al., 2013).

Como esperado, encontra-se relevante a ação do sistema de defesa antioxidante como adaptações fisiológicas positivas durante o exercício físico de intensidade moderada.

Conclusões

Diante dos resultados obtidos conclui-se que a dieta padrão restrita no tempo de ingestão e solução de sacarose induziu alterações metabólicas, além de estresse oxidativo, no tecido cardíaco.

O exercício físico atenuou os efeitos deletérios impostos pela dieta hipercalórica, normalizando o metabolismo energético. Os efeitos benéficos observados pela prática da natação estiveram associados à ação protetora das defesas antioxidantes contra o estresse oxidativo no tecido cardíaco.

Referências

Accioly MF, Padulla SAT, Carmo EM, Camargo Filho JCS, Brandão AC, Souza DRS. (2016) Efeito do treinamento físico aeróbico e do uso de estatinas sobre o perfil lipídico de



animais com dislipidemia. *R. bras. Ci. e Mov*;24(1): 108-117.

- Bass A, Brdicka PE, Eyer P, Pette D. (1969) Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eu J Biochem.* (10):198-206.
- Carvalho EMG & Rabelo JN. (2016). Identificação, prevenção e tratamento dos fatores de riscos associados à síndrome metabólica em pacientes atendidos no programa integrado de atividade física, esporte e lazer para todos os servidores da ufv campus florestal: estudo piloto–piafel-ep. *Synthesis| Revistal Digital fapam*, 1(1), 355-66.
- Chambers K.T., Leone T.C, Sambandam N et al. (2011) Chronic inhibition of pyruvate dehydrogenase in heart triggers an adaptive metabolic response. *J. Biol Chem.* (286):55-62.
- Crouch RK, Gandy SC, Kisey G. (1981) The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes*; 30: 235-41.
- Diniz Y.S., Cicogna A, Padovani C et al. (2004). Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: metabolic shifting and cardiac health. *Nutrition.* 2004; (20): 230–4.
- Dolinsky VW, Jones KE, Sidhu RS et al. (2012) Improvements in skeletal muscle strength and cardiac function induced by resveratrol during exercise training contribute to enhanced exercise performance in rats. *J Physiol.* (590):2783-99.
- Gibson, J.J. (1979). *The ecological approach to visual perception*. Boston: Houghton Mifflin.
- Granlund A, Waem MJ, Gustavsson BE. (2011) The influence of the PRKAG3 mutation on glucogen, enzyme activities and fiber types in different skeletal muscles of exercise trained pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica.* (53):210-25.
- Leverde X.M. (2007) Mitochondrial function and substrate availability. *Crit Care Med.* (35): 454-60.
- Nakamura W, Hojoda S, Hayashi K. (1974) Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta*; 358: 251-61
- Radak Z, Zhao Z, Koltai E et al. (2013) Oxygen consumption and usage during physical exercise: The balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxidants e Redox Signaling.* (18): 1208-1246.
- Santos KC, Braga CP, Barbanera PO, Seiva FRF, Fernandes Junior A, Fernandes AAH. (2014) . Cardiac metabolism and Oxidative Stress Biomarkers in Diabetic Rat Treated with Resveratrol. *Plos One*, v. 9, p. 1.
- Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. (2011) Oxidative stress and heart failure American Journal of Physiology. *Heart and Circulatory Physiology*; (301):2181-2190.
- Viera RC, Silva CMS, Araujo MB, Garcia A, Voltarelli VA, Ries AD, Voltarelli FA. (2013) Aerobic swimming training increases the activity of antioxidant enzymes and the glycogen content in the skeletal muscle of rats. *Rev. Bras Med Esporte* 19: 204-8.

Agradecimentos

CAPES

Nota dos autores

Ana Angélica H Fernandes é docente no Departamento de Química e Bioquímica da Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

Pedro O. Barbanera; Nagilla O. L. Carmo são alunos do programa de doutorado em Fisiopatologia em Clínica Médica da Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

Mariana B. Gazoli é aluna de graduação do curso de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

Anderson K. Kaga é mestre pelo programa de Farmacologia e Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

Contato

Pedro O. Barbanera

E-mail: pedro.barbanera@gmail.com