

Exercício Resistido Modula Parâmetros de Estresse Oxidativo e Conteúdo de TNF- α no Coração de Camundongos com Obesidade Induzida por Dieta

Resistance Exercise Modulates Oxidative Stress Parameters and TNF- α Content in the Heart of Mice with Diet-Induced Obesity

Pauline Souza Eftting,¹ Stella M. S. Brescianini,¹ Helen R. Sorato,¹ Bruna Barros Fernandes,¹ Giulia dos S. Pedroso Fidelis,¹ Paulo Roberto L. da Silva,¹ Paulo César L. Silveira,^{1,4} Renata T. Nesi,¹ Rolando B. Ceddia,³ Ricardo A. Pinho^{1,2}

Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício (LAFIBE) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) - Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC),¹ Criciúma, SC – Brasil

Laboratório de Bioquímica do Exercício em Saúde (BioEx) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR),² Curitiba, PR – Brasil

Muscle Health Research Center, School of Kinesiology and Health Center - York University,³ Toronto, ON – Canadá

Laboratório de Fisiopatologia Experimental - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) - Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC),⁴ Criciúma, SC – Brasil

Resumo

Fundamento: A obesidade pode ser caracterizada por uma inflamação crônica de baixo grau e está associada à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, fatores que contribuem para doenças coronarianas e outras cardiomiopatias.

Objetivo: Verificar os efeitos do treinamento resistido sobre os parâmetros de estresse oxidativo e parâmetro inflamatório em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (DIO).

Métodos: 24 camundongos Swiss foram divididos em 4 grupos: dieta padrão (DP), DP + exercício resistido (DP+ER), obesidade induzida por DIO, DIO + ER. Os animais foram alimentados por 26 semanas com DP ou hiperlipídica realizando treinamento resistido nas 8 semanas finais do estudo. Para avaliar parâmetros clínicos foi realizado o teste de tolerância à insulina (TTI) e monitoramento do peso corporal. No tecido cardíaco foram avaliados parâmetros de estresse oxidativo e inflamação. Dados expressos por média e desvio padrão ($p < 0,05$).

Resultados: O grupo DIO teve um aumento significativo nos níveis espécies reativas e peroxidação lipídica com redução após o exercício. A superóxido dismutase e o sistema glutathione não demonstraram alterações importantes nos animais DIO, com elevação perante DP+ER. Somente a atividade da catalase reduziu tanto com influência da dieta como do exercício. Ocorreu um aumento do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) no grupo DIO, caracterizando um possível quadro inflamatório, com redução quando expostos ao treino resistido (DIO+ER).

Conclusão: A DIO ocasionou um desequilíbrio redox no tecido cardíaco, porém o ER foi capaz de modular estes parâmetros, bem como controlar o aumento do TNF- α . (Arq Bras Cardiol. 2019; 112(5):545-552)

Palavras-chave: Exercício; Estresse Oxidativo; Obesidade; Dieta Hiperlipídica; Camundongos.

Abstract

Background: Obesity can be characterized by low-grade chronic inflammation and is associated with an excess production of reactive oxygen species, factors that contribute to coronary heart disease and other cardiomyopathies.

Objective: To verify the effects of resistance exercise training on oxidative stress and inflammatory parameters on mice with obesity induced by a high-fat diet (HFD).

Methods: 24 Swiss mice were divided into 4 groups: standard diet (SD), SD + resistance exercise (SD + RE), diet-induced obesity, DIO + RE. The animals were fed SD or DIO for 26 weeks and performed resistance exercises in the last 8 weeks of the study. The insulin tolerance test (ITT) and body weight monitoring were performed to assess the clinical parameters. Oxidative stress and inflammation parameters were evaluated in the cardiac tissue. Data were expressed by mean and standard deviation ($p < 0.05$).

Results: The DIO group had a significant increase in reactive oxygen species levels and lipid peroxidation with reduction after exercise. Superoxide dismutase and the glutathione system showed no significant changes in DIO animals, with an increase in SD + RE. Only catalase activity decreased with both diet and exercise influence. There was an increase in tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in the DIO group, characterizing a possible inflammatory condition, with a decrease when exposed to resistance training (DIO+RE).

Conclusion: The DIO resulted in a redox imbalance in cardiac tissue, but the RE was able to modulate these parameters, as well as to control the increase in TNF- α levels. (Arq Bras Cardiol. 2019; 112(5):545-552)

Keywords: Exercise; Oxidative Stress; Obesity; Diet, High-Fat; Mice.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Pauline Souza Eftting •

Rua Alda Agliardi Colombo, 210. CEP 88816-735, Pedro Zanivan, Criciúma, SC – Brasil

E-mail: paulinese@gmail.com, paulinese@outlook.com

Artigo recebido em 29/05/2018, revisado em 20/08/2018, aceito em 02/10/2018

DOI: 10.5935/abc.20190072

Introdução

A Organização Mundial de Saúde¹ define a obesidade como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura que apresenta riscos à saúde. A mesma traz dados do Observatório Mundial da Saúde demonstrando uma prevalência mundial de obesidade de 39% em homens e mulheres acima de 18 anos (dados atualizados 2016). Nesse cenário, a obesidade também se apresenta como um fator de risco para doenças relacionadas ao estilo de vida, como doenças cardiovasculares e diabetes *mellitus* tipo II.² Pode ser caracterizada por uma inflamação crônica de baixo grau e está associada a níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias bem como a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio.^{3,4}

Estudos demonstram que a hiperglicemia e alterações da captação de glicose presentes no diabetes podem levar a um quadro de estresse oxidativo com consequente disfunção mitocondrial, bem como a um processo inflamatório com presença elevada de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α . Ambos os casos podem ser fatores desencadeantes para doenças coronarianas e outras cardiomiopatias⁵ (ver revisão de Adeghate e Singh).% Gamez-Mendez et al.,⁶ também demonstraram que 8 semanas de dieta hiperlipídica (DIO) levaram a um aumento do quadro de estresse oxidativo, o que gerou um desequilíbrio de substância vasoativas e consequente disfunção endotelial das artérias coronárias de ratos obesos.

Estudos apontam o exercício físico como importante aliado em diminuir os riscos relacionados à obesidade devido sua capacidade em reestabelecer o equilíbrio entre citocinas pró-anti-inflamatórias e regular o estado redox da célula.^{7,8} Segundo Boardman et al.,⁹ na obesidade, o exercício físico não é apenas uma importante abordagem terapêutica, mas é também crucial para melhorar a função cardíaca e prevenir a lesão isquêmica em animais obesos e/ou diabéticos.

Apesar da literatura apontar que a prática do exercício é importante para prevenir ou complementar o tratamento da obesidade,¹⁰ deve-se levar em conta às características do exercício praticado, como: intensidade, duração, frequência e tipo.

Com base no exposto, esse estudo teve por objetivo identificar se o exercício resistido (ER) altera parâmetros de estresse oxidativo e de inflamação ocasionado pela ingestão de uma DIO em um modelo experimental de obesidade.

Métodos

Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos (40 dias), pesando em média 35,45 g ($\pm 1,29$) fornecidos pelo Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC (Criciúma/SC – Brasil). Os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro 12/12h, a 22°C, em caixas coletivas (6 animais/caixa) e divididos randomicamente em quatro grupos (n = 6): dieta padrão (DP); obesidade induzida por DIO; DP + ER; DIO + ER. O procedimento de escolha aleatória se deu por alocar os animais nos respectivos grupos de forma arbitrária ou aleatória, sem haver avaliação de desempenho prévio ou utilizar qualquer outro indicador que permitisse a divisão dos grupos.

Dieta

Os animais foram alimentados *ad libitum* por 26 semanas com DP com baixo teor lipídico (DP: 27%, 23% e 50% das calorias provenientes de proteínas, gorduras e carboidratos, respectivamente – 3,3 kcal/g) ou com DIO (DIO: 15%, 59% e 26% das calorias provenientes de proteínas, gorduras e carboidratos, respectivamente – 5,3 kcal/g). A DP foi adquirida da Puro Trato Nutrição Animal (Puro Lab 22PB) Santo Augusto/RS – Brasil, e a DIO da PragSoluções Biociência, Jaú/SP – Brasil.

Exercício

O protocolo de adaptação ao exercício foi iniciado na 17ª semana de dieta e o protocolo de ER na 18ª. O treinamento resistido foi realizado em um aparato de escada de 1m com degraus de 2cm de distância e inclinação de 85º.¹¹ Os animais foram familiarizados com o exercício de subida nos degraus por 5 dias consecutivos, sem carga. O protocolo de treinamento, adaptado de Scheffer et al.,^{12,13} teve início 3 dias após o último treino de adaptação e foi realizado com intervalo de 48h entre as sessões, por 8 semanas, totalizando 28 treinos. O exercício foi realizado com progressão de intensidade acoplando um peso à cauda do animal (incremento de carga de 20% a 75% do peso corporal), e progressão de volume (5-10 séries por sessão) (Tabela 1), com intervalo de 2 min entre as séries na área de descanso (caixa fechada no topo dos degraus medindo 20x20x20 cm). Cada série foi realizada até que os animais completassem 5 repetições/escaladas (sem intervalo), ou não conseguissem mais subir as escadas mesmo após incentivo (estímulo manual na base da cauda).

Peso corporal e teste de tolerância à insulina (TTI)

O peso corporal individual foi mensurado no início do estudo e nas semanas 3, 6, 10, 14, 18, 22 e 26. Após 17 semanas de dieta foi realizado um TTI para confirmar um quadro de resistência à insulina. Após 6 horas de jejum,¹⁴ todos os animais receberam uma dose de 2 U/kg de insulina. A glicose sanguínea foi mensurada com um glicosímetro utilizando uma gota de sangue coletada de uma pequena incisão na ponta da cauda do animal. O mesmo protocolo foi realizado ao final do experimento, 48 horas após a última sessão de exercício.

Tabela 1 – protocolo de treinamento resistido

Semanas	Carga	Séries	Intervalo entre séries
1ª	20%	5	1 (2min)
2ª	20%	7	1 (2min)
3ª	50%	5	1 (2min)
4ª	50%	7	1 (2min)
5ª	50%	10	1 (2min)
6ª	50%	10	1 (2min)
7ª	75%	7	1 (2min)
8ª	75%	10	1 (2min)

Fonte: dados da pesquisa. Adaptado de Scheffer et al.¹²

Eutanásia

Após 24h do último teste de tolerância à insulina foi realizada a eutanásia por decapitação e o ventrículo esquerdo do coração foi cirurgicamente extraído, imediatamente congelado em nitrogênio líquido, e armazenado à -80°C para análises bioquímicas.

Análises bioquímicas

Para os ensaios bioquímicos descritos a seguir e teste de ELISA, todas as amostras foram homogeneizadas em tampão PBS (fosfato-salino) 50 mM, com adição de 10 μM de aprotinina. O homogeneizado foi centrifugado por 10min a 4°C e o sobrenadante foi estocado à -80°C . Os níveis de proteína foram determinados em todas as amostras utilizando o método Bradford.¹⁵

Oxidação de diclorodihidrofluorescína (DCFH)

Os níveis de espécies reativas foram mensurados com base na oxidação da sonda 2',7'-diclorodihidrofluorescína diacetato (DCFH-DA) em um composto fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF), como previamente descrito.¹⁶ Uma alíquota do lisado foi incubada com DCFH-DA 80 mM a 37°C durante 15 minutos. A produção de espécies reativas foi quantificada utilizando uma curva padrão de DCF e os dados foram expressos como nM DCF/mg de proteína.

Atividade de enzimas antioxidantes

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi estimada através da inibição da auto oxidação da adrenalina e lida espectrofotometricamente a 480 nm de acordo com o método descrito por McCord e Fridovich.¹⁷ A atividade da catalase (CAT) foi determinada com base na taxa de decomposição de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) gerada pela enzima presente na amostra usando uma solução H_2O_2 em 10mM em tampão fosfato de potássio, pH 7,0. A taxa máxima de decomposição H_2O_2 foi medida em 240 nm.¹⁸ Os valores foram expressos como unidades de SOD ou CAT por mg de proteína.

Níveis de glutatona total (GSH)

Os níveis de GSH foram pelo método de Hissin.¹⁹ As amostras foram incubadas em 0,6% de ácido sulfosalicílico seguido por uma reação de GSH presente na amostra com ácido 2-nitrobenzóico (5,5'-Dithiobis) (DTNB) produzindo um aducto de glutatona-TNB oxidado (GS-TNB). A cor resultante a partir da reação entre o DTNB e tióis contra a curva padrão de GSH foi determinado cineticamente a 412 nm depois por 10 min. Valores expressos em nmol/min/mg de proteína.

Liperoxidação

As concentrações de malondialdeído (MDA) nas amostras foram determinadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Agilent Technologies 1200 Series; Santa Clara, CA, EUA) de acordo com Grotto et al.,²⁰ utilizando uma derivação de ácido tiobarbitúrico (TBA). Uma curva padrão

foi preparada utilizando sal de tetrabutilamônio de MDA em concentrações que variam de 0,5 a 5 $\mu\text{mol/L}$. O MDA foi determinado à 532 nm e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ de MDA/miligrama de proteína.

Parâmetro inflamatório

A concentração do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foi avaliado por ensaio de imuno absorção enzimática (ELISA) de acordo com as recomendações do fabricante (ThermoFisher Scientific, cat.KMC3011). Resultados expressos em pg/mg de proteína.

Análise estatística

Inicialmente, os dados foram confrontados pelo teste de Grubbs para verificação de possíveis *outliers* seguido pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk, sendo que os mesmos atenderam às pressuposições para o uso de testes paramétricos. Foi então realizado o teste variância de duas vias (*two-way ANOVA*) seguido pelo teste *post-hoc* Bonferroni quando necessário. Para análise dos dados do TTI (Tabela 2) foi realizado o teste de variância de uma via (*one-way ANOVA*) de medida repetida seguido pelo *post-hoc* teste de Tukey quando necessário. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Foi utilizado o Graph Pad Prism versão 5 como pacote estatístico. Todos os dados foram expressos em média e desvio padrão, exceto pela figura 1A, expressa em média e erro padrão da média.

Resultados

Peso corporal e resistência à insulina

O ER teve um efeito benéfico impedindo que o grupo DIO+ER continuasse ganhando peso mesmo frente ao consumo da DIO, não caracterizando emagrecimento, mas sim uma manutenção do peso mesmo sem controle de ingesta (Figura 1A-C).

O TTI realizado pré-exercício demonstrou que os animais expostos à DIO apresentam um quadro de resistência à insulina ($p > 0,05$) (Tabela 2). Os resultados demonstraram que a DIO pode levar a um prejuízo da captação da glicose mesmo frente a um estímulo externo de insulina (2U/kg de peso). O ER ($p < 0,05$), mesmo frente ao consumo de DIO, foi capaz de retardar a progressão do quadro, mantendo melhor taxa de decaimento da glicose quando comparada ao grupo DIO sedentário ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa entre pré e pós exercício em nenhum grupo (Figura 1D).

Oxidação do DCFH

Os níveis de oxidação de DCFH foram mensurados como indicadores da produção de espécies reativas, especialmente peróxido de hidrogênio, e os resultados demonstraram que em animais não treinados, a DIO causou aumento dos níveis de DCF ($p < 0,001$) em comparação aos animais com DP. Por sua vez, nos animais alimentados com DIO e submetidos ao treinamento resistido (DIO+ER), foi observado uma diminuição significativa dos níveis de DCF em comparação com o grupo DIO ($p < 0,01$) (Figura 2A).

Tabela 2 – Teste de tolerância à insulina (TTI) – Curva de glicemia

		Tempo de coleta (Glicose mg/dL e variação em relação ao tempo 0 min)						
		0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
Pré-exercício	DP	154,3	139,2 (-15,0)	98,7 (-55,5)	77,5 (-76,8)	65,2 (-89,0)	56,7 (-97,5)	43,2 (-111,0)
	DP+ER	129,3	134,7 (+5,5)	57,7 (-71,5)	54,7 (-74,5)	46,7 (-82,5)	35,3 (-94,0)	25,5 (-103,8)
	DIO	191,0 [†]	186,0 (-5,0)	125,5 (-65,5)	118,0 (-73,0)	106,5 (-84,5) [†]	101,3 (-89,8) [†]	99,0 (-92,0) [†]
	DIO+ER	163,8 [†]	164,5 (+0,8)	128,0 (-35,8) [†]	115,2 (-48,5) [†]	107,3 (-56,5) [†]	100,8 (-63,0) [†]	99,5 (-64,3) [†]
Pós-exercício	DP	129,0	97,5 (-31,5)	71,0 (-58,0)	54,5 (-74,5)	59,0 (-70,0)	37,5 (-91,5)	27,0 (-102,0)
	DP+ER	122,3	102,0 (-20,3)	66,2 (-56,0)	53,5 (-68,8)	42,0 (-80,3) [*]	23,0 (-99,3)	15,8 (-106,5)
	DIO	150,8 [†]	120,7 (-30,0) [‡]	110,5 (-40,3) [†]	105,5 (-45,3) [†]	97,0 (-53,8) [†]	94,0 (-56,8) [†]	92,0 (-58,8) [†]
	DIO+ER	127,8 [†]	133,5 (+5,8)	93,7 (-34,0)	68,0 (-59,8) [‡]	64,3 (-63,5) ^{†*}	58,5 (-69,3) ^{†*}	46,5 (-81,3) ^{†*}

Fonte: dados da pesquisa. Pré-adoção/exercício (semana 17) e pós-exercício (semana 26). Após 6 horas de jejum foi mensurada da glicose sanguínea (dados da tabela) nos tempos 0 min (basal), seguida da aplicação intraperitoneal de insulina (2 U/kg) e mensurações nos tempos 5-30 min. ^{*}p < 0,05 versus respectivo não treinado; [†]p < 0,05 versus respectiva dieta padrão; [‡]p < 0,05 versus respectivo pré-exercício. DP: dieta padrão; ER: exercício resistido; DIO: dieta hiperlipídica.

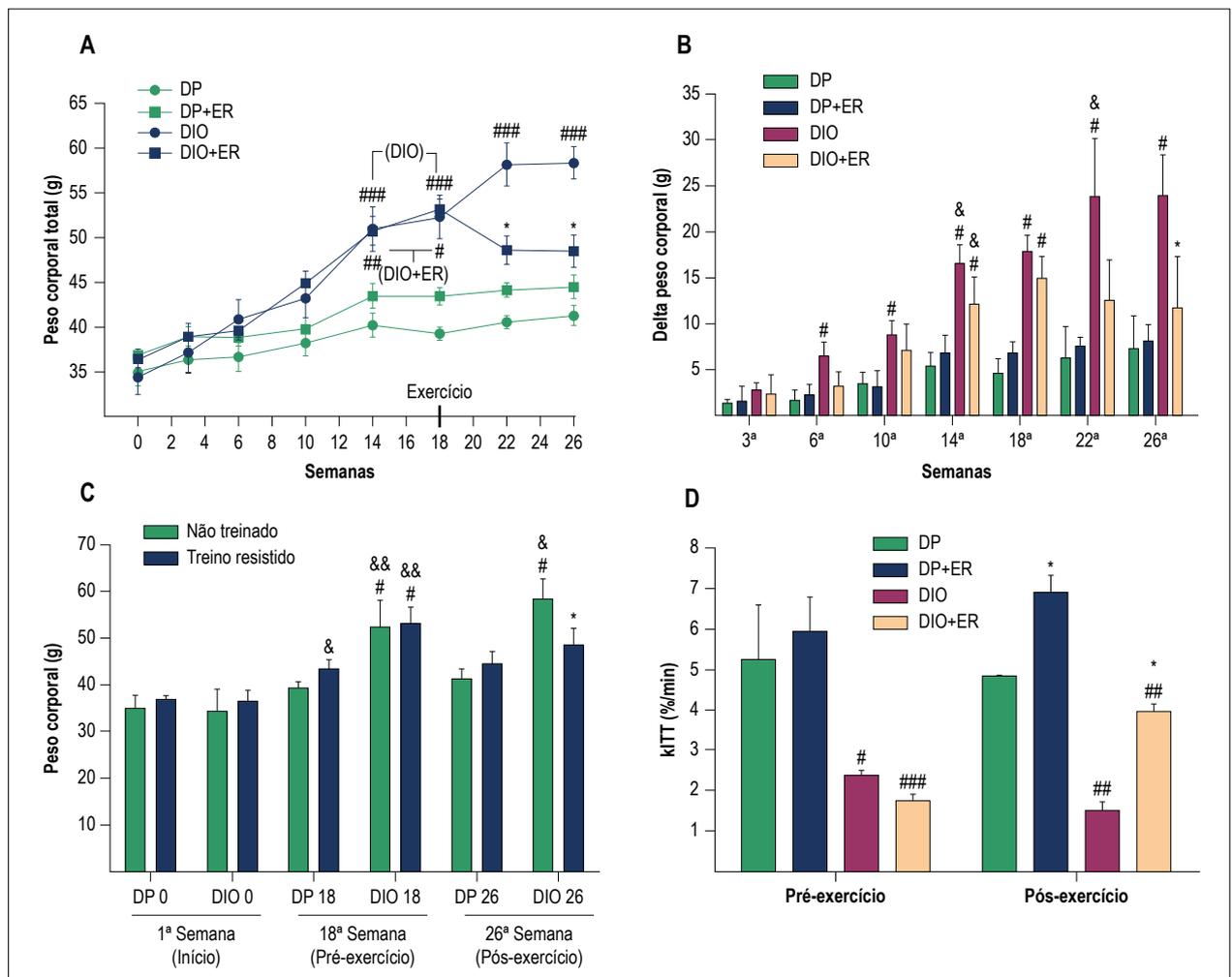


Figura 1 – A - Peso corporal total ao longo do estudo; B – delta (variação do peso corporal em relação ao início do estudo); C – comparação dos pesos entre 1ª semana (início), 18ª semana (pré-exercício) e 26ª semana (pós-exercício); D - Taxa de decaimento da glicose no teste de tolerância à insulina (kITT). Figura A, B e D - ^{*}p < 0,05 vs. respectivo não treinado do mesmo período, [#]p < 0,05, ^{##}p < 0,01 e ^{###}p < 0,001 vs. respectivo DP do mesmo período; ^{*}p < 0,05 vs. mesmo grupo da semana anterior. Figura C - ^{*}p < 0,001 vs. respectivo não treinado do mesmo período; [#]p < 0,01 e ^{##}p < 0,001 vs. respectivo DP do mesmo período; ^{*}p < 0,05, ^{##}p < 0,001 vs. mesmo grupo da semana anterior.

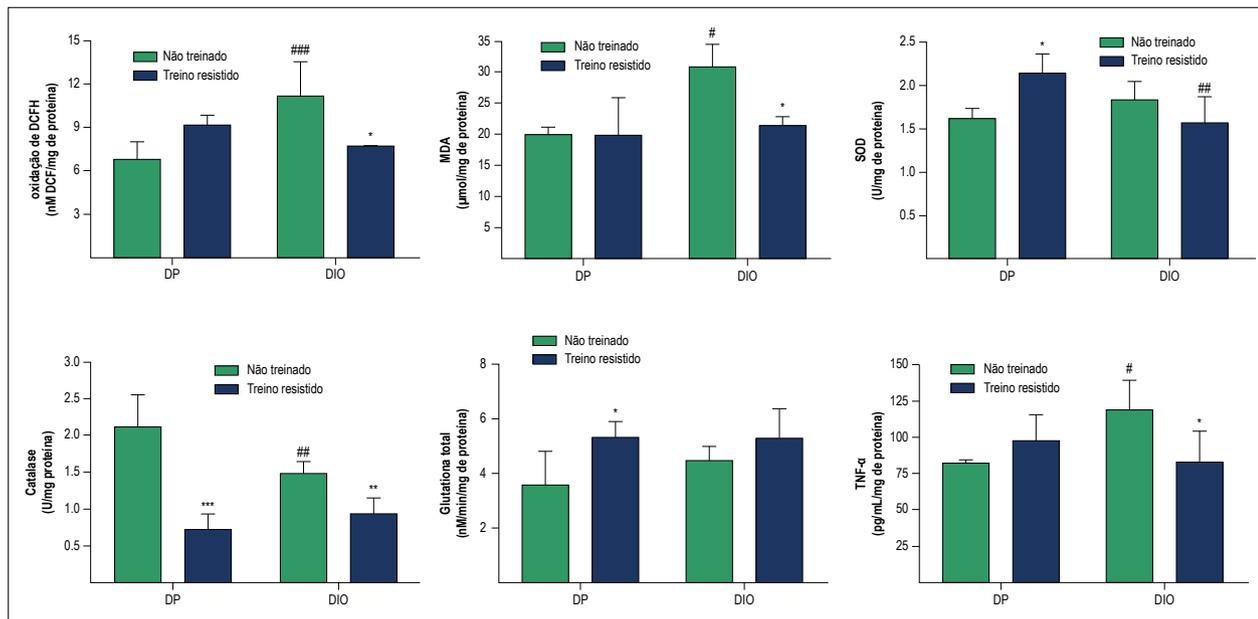


Figura 2 – Balanço redox e parâmetro inflamatório em tecido cardíaco de animais alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica e posteriormente submetidos ao treinamento resistido. A - Oxidação de DCFH; B - Conteúdo de MDA; C - Atividade da enzima SOD; D - Atividade da enzima CAT; E - Conteúdo de glutathiona total (reduzida e oxidada); F - níveis de TNF- α . * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. respectivo não treinado; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ vs. respectivo DP.

Lipoperoxidação

Como observado na figura 2B, os níveis de MDA sugerem uma elevação da lipoperoxidação nos animais DIO ($p < 0,05$), com reversão do quadro ($p < 0,05$) perante o treinamento resistido (DIO+ER).

Atividade da SOD

Os resultados observados na figura 2C mostram que a DIO não alterou a atividade da SOD, porém o treino resistido foi capaz de aumentar sua atividade no grupo DP+ER ($p < 0,05$), aumento esse, não observado, quando o exercício foi realizado no grupo obeso.

Atividade da CAT

Os resultados observados na figura 2D demonstram uma redução na atividade da CAT nos animais treinados (DP+ER, $p < 0,001$ e DP; DIO+ER, $p < 0,01$ vs. respectivo não treinado). Já os animais DIO, também apresentava uma diminuição da CAT ($p < 0,05$), porém somente quando comparado ao respectivo DP.

GSH

Os níveis totais de glutathiona não foram significativamente alterados em ambas as intervenções utilizadas no presente estudo (dietética e exercício) (Figura 2E).

Parâmetro inflamatório

Os níveis de TNF- α foram utilizados como indicador inflamatório no tecido cardíaco e os resultados observados na figura 2F revelam um aumento no conteúdo de TNF- α nos animais DIO ($p < 0,05$), sendo reduzida significativamente

($p < 0,05$) após a intervenção com exercício físico resistido (DIO+ER).

Discussão

Estudos têm demonstrado que o consumo de uma dieta rica em gordura, concomitante a um estilo de vida sedentário, pode desencadear diversos problemas de saúde^{21,22} com impacto significativo sobre o sistema cardiovascular. Nesse sentido, estudos experimentais têm sido utilizados para estudar os efeitos celulares provados por dieta rica em gordura.^{6,23,24} Os resultados de peso corporal e do TTI demonstraram que o modelo experimental adotado foi eficaz no aumento do peso e na instalação de um quadro de resistência à insulina sistêmica. O aumento do peso corpóreo tem sido relacionado com alterações inflamatórias e estresse oxidativo e ambas as alterações com a resistência à insulina em músculo esquelético,^{25,26} mas recentes estudos também têm demonstrado que as células cardíacas são também susceptíveis ao aumento de peso elevando mediadores inflamatórios e de estresse oxidativo.^{6,23,24,27,28} Nesse contexto, estudos prévios têm sugerido um importante papel do exercício físico, em particular, aeróbio ou de endurance, sobre as mudanças bioquímicas e moleculares que ocorrem no miocárdio decorrente de uma dieta rica em gordura.^{3,7} Contudo, esses efeitos são de maneira-dependente às características do exercício como duração, frequência, intensidade e tipo.

Resultados iniciais do nosso estudo demonstram que animais DIO apresentam níveis elevados de DCF, um indicador indireto da produção de peróxido de hidrogênio.²⁹ Esses dados são também observados por recente estudo publicado em 2017 por Zeng et al.,²³ Os autores revelaram uma elevada susceptibilidade do miocárdio ao estresse oxidativo com significativo aumento na oxidação de DCFH,

tanto *in vitro* quanto *in vivo*, mediado por dieta rica em gordura. Esses valores aumentados de DCF, observado nos animais DIO, foram significativamente reduzidos após o treinamento resistido, o que sugere um papel importante desse tipo de treinamento na regulação dos níveis de oxidantes celulares. Tal efeito pode estar associado ao fato do treinamento resistido exercer papel modulatório sobre enzimas antioxidantes endógenas. Essa observação é pautada em estudos prévios de nosso grupo em outros modelos experimentais inflamatórios que mostram importante papel do treinamento resistido sobre o sistema antioxidante enzimáticos em diferentes tecidos.^{30,31}

A SOD e a CAT são duas enzimas que atuam sinergicamente na formação (via dismutação do radical superóxido) e catálise do peróxido de hidrogênio, respectivamente. Os animais DIO não apresentaram mudanças na atividade da SOD, o que sugere que a produção aumentada de DCF pode estar associada a outros estímulos independente da SOD. Um dos fatores para isso é que apesar da oxidação de DCFH para DCF ser amplamente usado com indicador de produção de peróxido de hidrogênio, estudos têm observado que DCFH também pode ser oxidado por outras espécies reativas, em menor escala, como hidroxila, peroxila, óxido nítrico e peróxido nítrico.²⁹ Também cabe observar que a formação de peróxido de hidrogênio não é totalmente dependente da atividade da SOD. Em menor escala, eventos de auto oxidação de biomoléculas também contribuem para a formação de peróxido de hidrogênio.³² Essas condições limitariam a atividade da SOD, o que pode justificar os resultados encontrados.

Catalases são um grupo de enzimas que catalisam a decomposição do peróxido de hidrogênio para água e oxigênio. Nossos resultados mostram uma redução na atividade dessa enzima após o treinamento resistido no grupo exposto a DP. Como observado, a atividade da SOD foi aumentada nesse mesmo grupo, gerando, portanto, maiores níveis de peróxido de hidrogênio. Contudo, a redução na atividade da enzima sugere uma menor catálise do peróxido de hidrogênio, mas vale a ressalva que o peróxido de hidrogênio pode ser catalisado, sob essas condições, por outros sistemas de detoxificação celular como sistema glutatona e peroxinas,³³ o que poderia justificar nossos resultados já que o sistema glutatona apresentou aumento no grupo em questão (DP+ER). Ainda, observamos níveis reduzidos de CAT após o treinamento resistido no grupo DIO+ER e, portanto, considerando que a dieta aumenta significativamente a produção de oxidantes celulares como o peróxido de hidrogênio, uma atividade reduzida da CAT, poderia impactar nos possíveis danos oxidativos no miocárdio se o peróxido de hidrogênio não fosse catalisado por outros sistemas já mencionados (não investigado no presente estudo, mas que merece atenção em estudos futuros).

No sentido de observar os efeitos do ER sobre os danos oxidativos no miocárdio induzidos pelo modelo de DIO, nós avaliamos os níveis de MDA, um subproduto da lipoperoxidação, e observamos que animais DIO apresentam maiores danos em lipídeos em relação ao grupo com DP e que o ER foi capaz de reverter esses efeitos. Esses efeitos do modelo de DIO sobre os níveis de lipoperoxidação também foram observados em um estudo com camundongos BL6/C57 conduzido por Muthulakshmi and Saravanan (2013).³⁴

Os resultados positivos do ER estão, possivelmente, associados com a capacidade do exercício em promover uma modulação dos sistemas antioxidantes para além da atividade de enzimas antioxidantes primárias como SOD e CAT. Um dos mecanismos que pode ser mediado pelo ER é a translocação do *Fator Nuclear Eritroide 2 – tipo 2* (NRF2) para o núcleo e promover a expressão de diversas enzimas antioxidantes como NADH:quinone oxidoreductase 1 (NQO1 e Heme Oxigenase 1 (HO1)), que ajudam a detoxificar o sistema biológico e contribuir para a redução do estresse oxidativo.³⁵ Merry and Ristow (2016)³⁶ sugerem que o exercício pode estimular a translocação do NRF2 para regular funcionalmente a biogênese mitocondrial do músculo esquelético e a expressão de genes de defesa antioxidantes. Embora esses resultados sejam a partir de treinamento aeróbio e em músculo esquelético, acredita-se que tais efeitos possam também ocorrer via treinamento resistido, uma vez que o treinamento resistido ativa Proteína Quinase Ativada por Adenosina Monofosfato (AMPK)³⁷ que aumenta a fosforilação do NRF2 na célula e eleva o nível de NRF2 fosforilado no núcleo.³⁸

O aumento na produção de oxidantes no miocárdio pode ser mediado por uma possível resposta inflamatória induzida pela obesidade/DIO com secreção de diferentes mediadores. Nesse contexto, o TNF- α é um mediador sensível ao modelo DIO que apresenta uma vasta gama de ações pró-inflamatórias. Nossos resultados demonstraram um aumento significativo nos níveis de TNF- α em animais DIO com conseqüente redução após o treinamento resistido. Níveis aumentados de TNF- α no miocárdio induzidos pela DIO também foram observados em estudos prévios.^{3,28} Os efeitos do exercício podem estar relacionados ao fato do exercício aeróbio e resistido promoverem aumento na secreção de citocinas anti-inflamatórias e regular os níveis de TNF- α .^{30,31} Durante o exercício, os músculos liberam miocinas que estão envolvidas no crescimento, reparo e respostas anti-inflamatórias dos tecidos.³⁹ A IL-6 é a miocina primária liberada em resposta ao exercício e aumenta os níveis de IL-10 e diminui os níveis do TNF- α .⁴⁰ A IL-10 reduz a disfunção cardíaca pela diminuição da fibrose cardíaca.³⁹ Nesse cenário, a obesidade induzida por DIO diminui os níveis de proteína de IL-10, mas o treinamento físico aumenta significativamente os níveis de IL-10 nos tecidos cardíacos.³

Conforme dados de estudos prévios, considera-se o controle da secreção de TNF- α no miocárdio pelo ER um fator importante nos mecanismos de cardioproteção relacionados ao estresse oxidativo.

Conclusão

Nossos resultados demonstraram um importante efeito do ER sobre o controle/estabilização do peso corporal mesmo sem controle de ingestão. Também ficou demonstrado que existe uma alteração redox do tecido cardíaco frente a um modelo de obesidade, porém parece não ser mediado majoritariamente pela produção e controle antioxidante clássica de peróxido de hidrogênio, e sim por outras espécies reativas. Porém o ER foi capaz de reverter o dano em lipídeos e a produção de espécies reativas, mesmo com o consumo de DIO, bem como modular positivamente uma das principais citocinas responsáveis pela ativação do processo inflamatório.

Desta forma, o ER pode ser um grande aliado no processo de saúde referente à abordagem terapêutica da obesidade. Algumas limitações encontradas nestes estudos foram referentes a dados relacionados à quantificação da insulina sérica para melhor confirmar o quadro de resistência à insulina, e a avaliação de outras moléculas que podem alterar o balanço redox da célula. Estes testes não foram realizados por razões técnicas.

Finalmente, outros estudos devem ser conduzidos a fim de melhor esclarecer como o ER promove esses efeitos, em particular na regulação de espécies reativas como hidroxila, peroxila, óxido nítrico e peróxido nítrico, bem como outros parâmetros inflamatórios e anti-inflamatórios no tecido cardíaco.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Ceddia RB, Pinho RA; Obtenção de dados: Brescianini SMS, Fernandes BB, Fidelis GSP, da Silva PRL, Nesi RT; Análise e interpretação dos dados: Eftting PS, Brescianini SMS, Silveira PCL, Nesi RT, Pinho RA; Análise estatística: Eftting PS, Silveira PCL, Pinho RA; Obtenção

de financiamento: Pinho RA; Redação do manuscrito: Eftting PS, Pinho RA; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Ceddia RB, Pinho RA.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pelo CNPq e Capes.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Pauline Souza Eftting pela Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Extremo Sul Catarinense sob o número de protocolo 067/2014-2.

Referências

1. WHO - World Health Organization. Global Health Observatory (GHO) data. Overweight and obesity [Internet]. Copenhagen: WHO; 2018 [citado 30 jul. 2018]. Disponível em: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_obesity/obesity_adults/en/.
2. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci*. 2011;12(5):3117-32.
3. Kesharwani V, Chavali V, Hackfort BT, Tyagi SC, Mishra PK. Exercise ameliorates high fat diet induced cardiac dysfunction by increasing interleukin 10. *Front Physiol*. 2015 Apr 22;6:124.
4. Sakurai T, Izawa T, Kizaki T, Ogasawara J, Shirato K, Imaizumi K, et al. Exercise training decreases expression of inflammation-related adipokines through reduction of oxidative stress in rat white adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;379(2):605-9.
5. Adeghate E, Singh J. Structural changes in the myocardium during diabetes-induced cardiomyopathy. *Heart Fail Rev*. 2014;19(1):15-23.
6. Gamez-Mendez AM, Vargas-Robles H, Ríos A, Escalante B. Oxidative stress-dependent coronary endothelial dysfunction in obese mice. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138609.
7. Touati S, Montezano AC, Meziri F, Riva C, Touyz RM, Laurant P. Exercise training protects against atherosclerotic risk factors through vascular NADPH oxidase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase downregulation in obese rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2015;42(2):179-85.
8. Sharma NM, Rabeler B, Zheng H, Raichlin E, Patel KP. Exercise training attenuates upregulation of p47(phox) and p67(phox) in hearts of diabetic rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:5868913.
9. Boardman NT, Hafstad AD, Lund J, Rossvoll L, Aasum E. Exercise of obese mice induces cardioprotection and oxygen sparing in hearts exposed to high-fat load. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2017;313(5):H1054-62.
10. Di Meo S, Iossa S, Venditti P. Improvement of obesity-linked skeletal muscle insulin resistance by strength and endurance training. *J Endocrinol*. 2017;234(3):R159-81.
11. Hornberger TA Jr, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol*. 2004;29(1):16-31.
12. Scheffer DL, Silva LA, Tromm CB, da Rosa GL, Silveira PC, de Souza CT, et al. Impact of different resistance training protocols on muscular oxidative stress parameters. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2012;37(6):1239-46.
13. Vilela TC, Eftting PS, Dos Santos PG, Farias H, Paganini L, Rebelo SH, et al. Aerobic and strength training induce changes in oxidative stress parameters and elicit modifications of various cellular components in skeletal muscle of aged rats. *Exp Gerontol*. 2018 Jun;106:21-7.
14. Ayala JE, Samuel VT, Morton GJ, Obici S, Croniger CM, Shulman GI, et al. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Dis Model Mech*. 2010;3(9-10):525-34.
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.
16. Dong J, Sulik KK, Chen SY. The role of NOX enzymes in ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryos. *Toxicol Lett*. 2010;193(1):94-100.
17. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem*. 1969;244(22):6049-55.
18. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.
19. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976;74(1):214-26.
20. Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;43(2):619-24.
21. Barba I, Miró-Casas E, Torrecilla JL, Pladevall E, Tejedor S, Sebastián-Pérez R, et al. High-fat diet induces metabolic changes and reduces oxidative stress in female mouse hearts. *J Nutr Biochem*. 2017 Feb;40:187-93.

22. Carbone S, Mauro AC, Mezzaroma E, Kraskauskas D, Marchetti C, Buzzetti R, et al. A high-sugar and high-fat diet impairs cardiac systolic and diastolic function in mice. *Int J Cardiol.* 2015 Nov 1;198:66-9.
23. Zeng C, Zhong P, Zhao Y, Kanchana K, Zhang Y, Khan ZA, et al. Curcumin protects hearts from FFA-induced injury by activating Nrf2 and inactivating NF- κ B both in vitro and in vivo. *J Mol Cell Cardiol.* 2015 Feb;79:1-12.
24. Chen F, Chen D, Zhao X, Yang S, Li Z, Sanchis D, et al. Interleukin-6 deficiency facilitates myocardial dysfunction during high fat diet-induced obesity by promoting lipotoxicity and inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(12):3128-41.
25. Farias JM, Bom KF, Tromm CB, Luciano TF, Marques SO, Tuon T, et al. Effect of physical training on the adipose tissue of diet-induced obesity mice: interaction between reactive oxygen species and lipolysis. *Horm Metab Res.* 2013;45(3):190-6.
26. Pinho RA, Sepa-Kishi DM, Bikopoulos G, Wu M V., Uthayakumar A, Mohasses A, et al. High-fat diet induces skeletal muscle oxidative stress in a fiber type-dependent manner in rats. *Free Radic Biol Med.* 2017 Sep;110:381-9.
27. Pieri BL, Souza DR, Luciano TF, Marques SO, Pauli JR, Silva AS, et al. Effects of physical exercise on the P38MAPK/REDD1/14-3-3 pathways in the myocardium of diet-induced obesity rats. *Horm Metab Res.* 2014;46(9):621-7.
28. Farhangi MA, Nameni G, Hajiluan G, Mesgari-Abbasi M. Cardiac tissue oxidative stress and inflammation after vitamin D administrations in high fat-diet induced obese rats. *BMC Cardiovasc Disord.* 2017;17(1):161.
29. Chen X, Zhong Z, Xu Z, Chen L, Wang Y. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: forty years of application and controversy. *Free Radic Res.* 2010;44(6):587-604.
30. Tuon T, Souza PS, Santos MF, Pereira FT, Pedroso GS, Luciano TF, et al. Physical training regulates mitochondrial parameters and neuroinflammatory mechanisms in an experimental model of Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:261809.
31. Souza PS, Gonçalves ED, Pedroso GS, Farias HR, Junqueira SC, Marcon R, et al. Physical exercise attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting peripheral immune response and blood-brain barrier disruption. *Mol Neurobiol.* 2017;54(6):4723-37.
32. Yi Y, Wang L, Li G, Guo H. A review on research progress in the direct synthesis of hydrogen peroxide from hydrogen and oxygen: noble-metal catalytic method, fuel-cell method and plasma method. *Catal Sci Technol.* 2016;6(6):1593-1610.
33. Lennicke C, Rahn J, Lichtenfels R, Wessjohann LA, Seliger B. Hydrogen peroxide - production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Commun Signal.* 2015 Sep 14;13:39.
34. Muthalakshmi S, Saravanan R. Protective effects of azelaic acid against high-fat diet-induced oxidative stress in liver, kidney and heart of C57BL/6J mice. *Mol Cell Biochem.* 2013;377(1-2):23-33.
35. Done AJ, Traustadóttir T. Nrf2 mediates redox adaptations to exercise. *Redox Biol.* 2016 Dec;10:191-9.
36. Merry TL, Ristow M. Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (NFE2L2, Nrf2) mediates exercise-induced mitochondrial biogenesis and the anti-oxidant response in mice. *J Physiol.* 2016;594(18):5195-207.
37. Williamson D, Gallagher P, Harber M, Hollon C, Trappe S. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation: effects of age and acute exercise on human skeletal muscle. *J Physiol.* 2003;547(Pt 3):977-87.
38. Joo MS, Kim WD, Lee KY, Kim JH, Koo JH, Kim SG. AMPK facilitates nuclear accumulation of Nrf2 by phosphorylating at serine 550. *Mol Cell Biol.* 2016;36(14):1931-42.
39. Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol.* 2005;98(4):1154-62.
40. Benatti FB, Pedersen BK. Exercise as an anti-inflammatory therapy for rheumatic diseases-myokine regulation. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(2):86-97.

