



**PATRÍCIA APARECIDA MONTEIRO**

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DO ESTRESSE  
OXIDATIVO NOS TECIDOS ADIPOSOS EM MODELO  
ANIMAL DE HIPERALIMENTAÇÃO NEONATAL**

**LAVRAS – MG**

**2019**

**PATRÍCIA APARECIDA MONTEIRO**

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO NOS  
TECIDOS ADIPOSOS EM MODELO ANIMAL DE  
HIPERALIMENTAÇÃO NEONATAL**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Universidade Federal  
de Lavras, como parte das exigências  
do Curso de Nutrição, para obtenção do título  
de Bacharel.

Orientadora

Prof.<sup>a</sup> Dra. Isabela Coelho de Castro

**LAVRAS – MG**

**2019**

**PATRÍCIA APARECIDA MONTEIRO**

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO NOS TECIDOS  
ADIPOSOS EM MODELO ANIMAL DE HIPERALIMENTAÇÃO NEONATAL**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Universidade Federal  
de Lavras, como parte das exigências  
do Curso de Nutrição, para obtenção do título  
de Bacharel.

Aprovado em 17 de Junho de 2019.

Dr.<sup>a</sup> Isabela Coelho de Castro – UFLA  
Me. Geraldo de Sousa Cândido – UFLA  
B<sup>ela</sup>. Tatiana Teixeira Silva - UFLA

Orientadora

Prof.<sup>a</sup> Dra. Isabela Coelho de Castro

**LAVRAS – MG**

**2019**

## RESUMO

A obesidade é uma doença crônica que vem crescendo expressivamente ao longo dos anos, sua origem é multifatorial e está relacionada a fatores ambientais e genéticos. O acúmulo excessivo de gordura existente na obesidade resulta em uma condição inflamatória responsável pelo desenvolvimento de diversos processos patológicos, como: dislipidemia, hipertensão, hiperinsulinemia, diabetes e aumento do estresse oxidativo. Como o período neonatal possui grande vulnerabilidade por ser influenciado diretamente por fatores ambientais, como a nutrição, o presente trabalho teve como objetivo avaliar marcadores de estresse oxidativo em amostras de tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM) em ratos *Wistar* submetidos ao modelo de hiperalimentação neonatal. O projeto foi aprovado pelo CEUA/UFLA (nº 019/2015). Realizou-se o cruzamento de 12 fêmeas e 4 machos ratos *Wistar* e após o nascimento efetuou-se o controle das ninhadas, formando grupo Hiperalimentado (H) (n=9) com três filhotes na ninhada e grupo controle (C) (n=19) com 8-12 filhotes na ninhada. O desmame ocorreu após 21 dias do nascimento, foram utilizados apenas os ratos machos e os mesmos foram acompanhados até os 100 dias de vida, com o consumo de água e ração ad libitum, quando ocorreu a eutanásia por exsanguinação para a coleta e armazenamentos dos tecidos adiposos para a realização de ensaios futuros. Foram realizadas dosagens da concentração de hidroperóxidos, que são metabólitos primários da peroxidação lipídica e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que são os produtos secundários da peroxidação de lipídeos reativos ao ácido tiobarbitúrico, sendo que o principal é o malondialdeído (MDA). Também foram dosadas as atividades das enzimas pertencentes ao sistema de defesa antioxidante, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no TAB e TAM. Os resultados mostraram que o modelo de hiperalimentação neonatal não foi eficaz em alterar a produção de MDA (C,  $5.422 \pm 0.2996$  e H,  $5.410 \pm 0.3442$  nmol MDA/g de PTN) e hidroperóxidos (C,  $15.31 \pm 2.538$  e H,  $15.31 \pm 2.254$  nmol/mg de PTN), bem como a atividade das enzimas SOD (C,  $0,4112 \pm 0,02670$  e H,  $0,4120 \pm 0,02938$  U/mg de PTN) e CAT (C,  $0.7360 \pm 0.05148$  e H,  $0.7058 \pm 0.07487$   $\Delta$ E/min/mg de PTN) no TAB. Entretanto, no TAM, o H apresentou redução de hidroperóxidos (C,  $37.12 \pm 4.564$  e H,  $20.48 \pm 3.914$  nmol/mg de PTN) e na atividade da SOD (C,  $0.4921 \pm 0.01558$  e H,  $0.4421 \pm 0.01532$  U/mg de PTN). A dosagem de MDA (C,  $9.330 \pm 0.2664$  e H,  $10.15 \pm 0.5127$  nmol MDA/g de PTN) e a atividade da CAT (C,  $1.481 \pm 0.1346$  e H,  $1.498 \pm 0.1072$   $\Delta$ E/min/mg de PTN) não apresentaram alterações significativas entre os grupos no TAM. O presente estudo não confirmou a presença de estresse oxidativo no TAB, porém a diminuição da enzima SOD no TAM indica um possível prejuízo no sistema de defesa antioxidante em tal tecido ou pode indicar também a presença de um via alternativa para neutralizar as espécies reativas.

**Palavras-chave:** sobrepeso, peroxidação de lipídeos, radicais livres

## ABSTRACT

Obesity is a chronic disease that has been growing significantly over the years, its origin is multifactorial and related to environmental and genetic factors. The excessive fat accumulation in obesity results in an inflammatory condition responsible for the development of several pathological processes, such as: dyslipidemia, hypertension, hyperinsulinemia, diabetes and increased oxidative stress. As the neonatal period is highly vulnerable, because it is directly influenced by environmental factors such as nutrition, the present study aimed to evaluate oxidative stress markers in white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT) in *Wistar* rats submitted to the model of neonatal hyperalimentation. The project was approved by the CEUA/UFLA (n° 019/2015). The crossbreeding of 12 female and 4 male *Wistar* rats was realized and after birth the control of the litters was realized, forming overfeed groups (H) (n=9) with three pups, and control groups (C) (n=19) with 8-12 pups in the litter. Weaning occurred after 21 days of birth, only male rats were used and they were followed up to the 101 days of life, with water and feed intake *ad libitum*, when euthanasia occurred by exsanguination for the collection and storage of adipose tissues for future analyzes. The concentration of hydroperoxides, which are primary products of lipid peroxidation and the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), which are secondary products of lipid peroxidation, being the main the malondialdehyde (MDA), were analyzed. The activity of the enzymes belonging to the antioxidant defense system were also evaluated, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in WAT and BAT. The results showed that the neonatal hyperalimentation model was not effective in altering the production of MDA (C,  $5.422 \pm 0.2996$  e H,  $5.410 \pm 0.3442$  nmol MDA/g de PTN) and hydroperoxides (C,  $15.31 \pm 2.538$  e H,  $15.31 \pm 2.254$  nmol/mg de PTN), as well as the activity of the enzyme SOD (C,  $0,4112 \pm 0,02670$  e H,  $0,4120 \pm 0,02938$  U/mg de PTN) and CAT (C,  $0.7360 \pm 0.05148$  e H,  $0.7058 \pm 0.07487$   $\Delta$ E/min/mg de PTN) in WAT. However, in BAT, the group H presented reduction of hydroperoxides (C,  $37.12 \pm 4.564$  e H,  $20.48 \pm 3.914$  nmol/mg de PTN) and in SOD activity (C,  $0.4921 \pm 0.01558$  e H,  $0.4421 \pm 0.01532$  U/mg de PTN). The MDA level (C,  $9.330 \pm 0.2664$  e H,  $10.15 \pm 0.5127$  nmol MDA/g de PTN) and CAT activity (C,  $1.481 \pm 0.1346$  e H,  $1.498 \pm 0.1072$   $\Delta$ E/min/mg de PTN) did not show significant changes between the groups in the BAT. The present study did not confirm the presence of oxidative stress in the WAT, but the decrease of the SOD enzyme in the BAT indicates a possible loss in the antioxidant defense system in such tissue or may also indicate the presence of an alternative way to neutralize the reactive species.

**Keywords:** overweight, lipid peroxidation, free radicals.

## 1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica causada pelo acúmulo de gordura no tecido adiposo, o que traz diversos prejuízos ao organismo do portador. De acordo com levantamento realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a prevalência da obesidade mundial praticamente triplicou entre os anos de 1975 e 2016, sendo que em 2016 cerca de 1,9 bilhões de adultos possuíam excesso de peso e, entre esses, 650 milhões eram obesos (OMS, 2017). Um estudo realizado por Andrade et al. (2015) com a população urbana brasileira, mostrou que o excesso de peso estava prevalente em metade (52,3%) da população urbana estudada, independentemente do sexo.

A obesidade tem origem multifatorial, sendo relacionada com fatores ambientais e genéticos. Comportamentos alimentares inadequados, baixa atividade física e outros fatores ambientais associados à susceptibilidade genética do indivíduo podem levar a um balanço energético positivo, isto é, a quantidade de calorias ingeridas excede o seu gasto, ocorrendo então o armazenamento do excedente calórico na forma de gordura pelo tecido adiposo (TA) (ANDRADE et al., 2015; BRAY et al., 2017).

Nos mamíferos há dois tipos de tecido adiposo: o tecido adiposo marrom (TAM) e o tecido adiposo branco (TAB). Em indivíduos adultos o TAM está presente em pequenas quantidades, localizadas próximo ao pescoço e ao tórax e possui expressiva atividade metabólica, tendo como principal função a termogênese, definida como a produção de calor vital para a manutenção da temperatura corporal, sendo descrita pela primeira vez por Smith (1961). Já o TAB possui ampla distribuição, pode ser subcutâneo ou visceral e é o principal responsável pela reserva de energia corporal, exercendo papel fundamental no controle do peso e na homeostase energética por possuir adipócitos aptos em armazenar lipídios e liberar os ácidos graxos, para serem utilizados como fonte energética pelo fígado, além de sintetizarem uma série de citocinas e hormônios (ENERBÄCK, 2010; SANTOS e TORRENT, 2010; PEURICHARD et al., 2017).

Os danos causados pela obesidade ocorrem devido a hipertrofia e hiperplasia das células de gordura do TA. Como citado, os adipócitos produzem e secretam variados produtos que causam alterações inflamatórias e metabólicas no organismo, gerando a condição inflamatória encontrada na obesidade, contribuindo para geração de outros processos patológicos, como dislipidemia, hipertensão, hiperinsulinemia, diabetes e aumento do estresse oxidativo (KACSO et al., 2012; MARTINS et al., 2014; SAMSON et al., 2014).

O estresse oxidativo surge quando existe um desequilíbrio entre a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) e o sistema de defesa antioxidante (SDA), sistema este que reage com espécies reativas e impede a ocorrência de danos aos tecidos. As EROs e ERNs são moléculas geradas naturalmente em diversos mecanismos do corpo, são essenciais à vida já que participam de uma gama de reações cruciais para o adequado funcionamento do organismo. Entretanto, são substâncias extremamente reativas e se não neutralizadas adequadamente podem danificar importantes moléculas, como lipídios, proteínas, carboidratos e DNA, ocasionando diversos prejuízos aos tecidos afetados. No estresse oxidativo, o desequilíbrio gerado pode ser por elevação na formação dessas espécies ou pela redução das substâncias ou sistemas antioxidantes (FERREIRA et al., 2011).

Diversos modelos animais para o estudo da obesidade são procurados, sendo que a escolha por induzir a obesidade em modelos animais através de dietas hipercalóricas, se mostra como um método eficaz para o entendimento do que ocorre na população humana. Outro modelo estudado é o de hiperalimentação neonatal, a qual consiste em aumentar o provimento de energia para os animais em fase de amamentação por redução das ninhadas, diminuindo assim a competição e deixando mais alimento disponível. O resultado da hiperalimentação é que o ganho de peso desses animais é cerca de 30% maior em relação ao grupo controle. Apesar de apresentar resultados relevantes ao acúmulo de peso, a literatura atual é carente em relação às considerações sobre o estresse oxidativo no modelo de hiperalimentação (ROSINI et al., 2012; HABBOUT et al., 2013).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo analisar se o modelo experimental de hiperalimentação neonatal em ratos *Wistar* modula a produção de marcadores de estresse oxidativo nos tecidos adiposos.

## 2 METODOLOGIA

O presente estudo analisou amostras de tecido adiposo branco (TAB) e de tecido adiposo marrom (TAM) coletadas em um experimento realizado anteriormente pelo grupo de pesquisa no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição (DNU) na Universidade Federal de Lavras (UFLA). Todos os experimentos foram realizados em conformidade com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras, MG, Brasil (CEUA nº protocolo: 019/2015).

### 2.1 Animais e desenho experimental

Na etapa inicial do experimento foram utilizados ratos machos e fêmeas *Wistar* com aproximadamente 90 dias de vida e peso médio de 250g para o período de acasalamento, onde as fêmeas foram mantidas com ratos machos na proporção de 3:1. Após o período de 14 dias para o acasalamento e iniciada a gestação, as fêmeas foram individualizadas. Ao nascimento da ninhada, esta foi reduzida a três filhotes por ninhada nos grupos chamados de Hiperalimentação Neonatal (H) e mantida entre oito a doze filhotes nos grupos Controle (C). O desmame ocorreu quando os filhotes completaram 21 dias de vida e então estes foram separados de acordo com o grupo previamente especificado, conforme metodologia descrita em Habbout et al. (2013).

Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , em ciclo claro-escuro de 12 horas com ração padrão NUVILAB CR1<sup>®</sup> (Sorgob, São Paulo, SP, Brasil) e água *ad libitum* durante todo o curso experimental.

Decorridos 100 dias do experimento, os animais receberam anestesia através dos fármacos Cloridrato de Xilazina (20 mg/kg massa corporal) e Cloridrato de Cetamina (60 mg/kg de massa corporal) e foram ortotansados por hipovolemia com a coleta de sangue por punção cardíaca, com a separação do plasma para os testes bioquímicos, e coleta e armazenamento à  $-20^{\circ}\text{C}$  dos tecidos adiposos periepídidimário, retroperitoneal e marrom.

## **2.2 Preparo das amostras para análises de estresse oxidativo**

### **2.2.1 Tecido adiposo branco (TAB)**

Para as análises do TAB foram utilizadas amostras coletadas dos tecidos periepídídímico e retroperitoneal. Inicialmente foram pesados aproximadamente 300 mg de TAB, que foi mantido em gelo durante todo o experimento em tubo tipo *ependorff* com capacidade para 2 mL. Em seguida acrescentou-se 1 mL de PBS – 10mM (do inglês Phosphate Buffered Saline, traduzido para tampão fosfato-salino). Esta mistura foi triturada no homogeneizador Ultra Stirrer® por aproximadamente 1 minuto e posteriormente colocada em centrífuga a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido e fracionado em tubos tipo *ependorff* com a quantidade necessária para cada teste que iria ser realizado. Os tubos devidamente identificados foram armazenados e mantidos em freezer -20°C até a realização das análises.

### **2.2.2 Tecido adiposo marrom (TAM)**

Para as análises do TAM foram pesados aproximadamente 100 mg de tecido, mantido em gelo durante todo o experimento em tubo tipo *ependorff*. Acrescentou-se 600 µL de PBS. Esta mistura foi triturada no homogeneizador Ultra Stirrer® por aproximadamente 1 minuto e posteriormente colocada em centrífuga a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido e fracionado em tubos tipo *ependorff* com a quantidade necessária para cada teste que iria ser realizado. Os tubos devidamente identificados foram armazenados e mantidos em freezer -20°C até a realização das análises.

## **2.3 Teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e Dosagem da concentração de hidroperóxidos pela oxidação ferrosa do Xilenol Orange**

O teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) seguiu de acordo com o protocolo de execução proposto por Buege e Aust (1978), com as modificações necessárias para a realização do mesmo. Para o preparo de 100 mL da solução TBARS utilizou-se 15 g de ácido tricloroacético (TCA), 0,375 g de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 6,25 mL de HCl 0,25 N; o volume de 100 mL foi completado com água deionizada. A solução de malondialdeído (MDA), para os padrões, foi preparada a partir de 4,167 µL ( $\cong 4,2$ ) de MDA e

1 mL de etanol, completou-se com água deionizada até o volume final de 50 mL; o tubo com a solução foi envolto em papel alumínio e mantido sob refrigeração. Adicionou-se 0,5 mL da solução TBARS nos tubos contendo as amostras, os padrões e o branco, estes foram cobertos com papel alumínio e colocados em banho-maria fervente por 15 minutos, com posterior resfriamento em água corrente fria. Na capela, foram adicionados 0,75 mL de butanol em todos os tubos, tampando-os imediatamente e homogeneizando-os cautelosamente no agitador de tubos. Os tubos foram centrifugados em centrífuga de mesa (SpinLab® SL-5GR), em 6000 rpm durante 10 minutos. Em seguida foram transferidos para microplaca de 96 poços, 200 µL por poço do sobrenadante das misturas em duplicata e a leitura realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm. Os dados obtidos foram comparados com a curva padrão de MDA e normalizados pela quantificação proteica das mesmas amostras. Os dados finais foram expressos em nmol/g de proteína.

A dosagem da concentração de hidroperóxidos foi realizada conforme a metodologia sugerida por Banerjee et al. (2002). Para a dosagem de hidroperóxidos são requeridas quatro diferentes soluções: solução A (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 250Mm), a solução B, denominada também por FOX (composta por xilenol Orange 100 µM, sulfato ferroso amoniacal 250 µM e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 25 mM), a solução C (composta por hidroxitoluenobutilado (BHT) a 4 mM e metanol a 90% v/v) e a solução de trifenilfosfina (TPP) – PM 262,29 (composta por 100 mL de metanol e 0,262g de TPP). No momento da realização do ensaio, foi preparado o Reagente FOX-2, obtido a partir da diluição de um volume da solução B em nove volumes da solução C, conforme os cálculos da quantidade a ser utilizada. Dois ensaios foram realizados, sendo que em apenas um foi adicionado o TPP, resultando em um ensaio com TPP e outro sem TPP. A leitura foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 550 nm.

Para os cálculos, o valor médio das absorbâncias foi dividido por 430000 (coeficiente de extinção dos hidroperóxidos) e o resultado dividido por 0,000000001 (coeficiente de extinção do cromóforo azul-arroxeadado). Finalmente, subtraíram-se os valores encontrados no ensaio sem TPP pelos resultados do ensaio com TPP. O TPP reage com hidroperóxidos, exceto com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, logo, quando se subtrai os valores com TPP dos valores sem o TPP, exclui-se os peróxidos de hidrogênio e se obtém o correspondente aos demais hidroperóxidos. Os resultados obtidos foram normalizados pela quantificação proteica das amostras correspondentes. Os dados finais foram expressos em nmol/mg de proteína.

## 2.4 Avaliação das enzimas antioxidantes

### 2.4.1 Superóxido dismutase (SOD)

A determinação da concentração da superóxido dismutase (SOD) baseou-se no método proposto por Dieterich et al. (2000). O método utilizado é baseado na capacidade da SOD em consumir o radical superóxido ( $O_2^-$ ), reduzindo a razão de auto-oxidação do pirogalol (1,2,3- trihidroxibenzeno).

Em microplaca de 96 poços foram pipetados 30 $\mu$ L de amostra, 99 $\mu$ L de tampão fosfato (50mM), 6 $\mu$ L de MTT (brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium) e 15 $\mu$ L de pirogalol (100 $\mu$ M). Para o branco, a amostra e o pirogalol foram substituídos por tampão fosfato e para o padrão, a amostra foi substituída pelo tampão fosfato. A reação foi interrompida após 5 minutos de incubação a 37°C pela adição de 150 $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 550nm. O cálculo realizado considerou a absorbância do padrão como uma unidade de SOD. O resultado foi expresso em U/mg de proteína.

### 2.4.2 Catalase (CAT)

O teste de atividade da catalase (CAT) *in vitro* seguiu conforme o protocolo de execução sugerido por Aebi (1984), com as modificações necessárias para a realização do mesmo. O método baseia-se na observação da diminuição da absorbância em 240 nm devido à decomposição do  $H_2O_2$  realizada pela catalase.

Para a realização do teste, foram necessários os seguintes reagentes: peróxido de hidrogênio (0,3 mol/L) e tampão fosfato (50mM; pH: 7,0), que foi preparado com a mistura da solução A (constituída de 6,81 g de  $K_2HPO_4$  e 1000 mL de água deionizada) com a solução B (composta por 8,90 g de  $Na_2HPO_4$  e 1000 mL de água deionizada), na proporção de 1:1,5 (v/v). Em cubeta de quartzo foi adicionado 1000  $\mu$ L do tampão fosfato, 25  $\mu$ L da amostra diluída (1:5) e 25  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio, sendo realizada leitura a cada 15 segundos, com o total de 60 segundos, em espectrofotômetro no comprimento de onda de 240 nm. O cálculo foi realizado baseado na diferença de leitura do tempo inicial pelo tempo final, dividido pelo volume da amostra (mL) e multiplicado pelo fator de diluição. Os valores encontrados foram normalizados pela quantificação proteica e o resultado final expresso em  $\Delta E/\text{min}/\text{mg}$  de proteína.

## 2.5 Quantificação Proteica

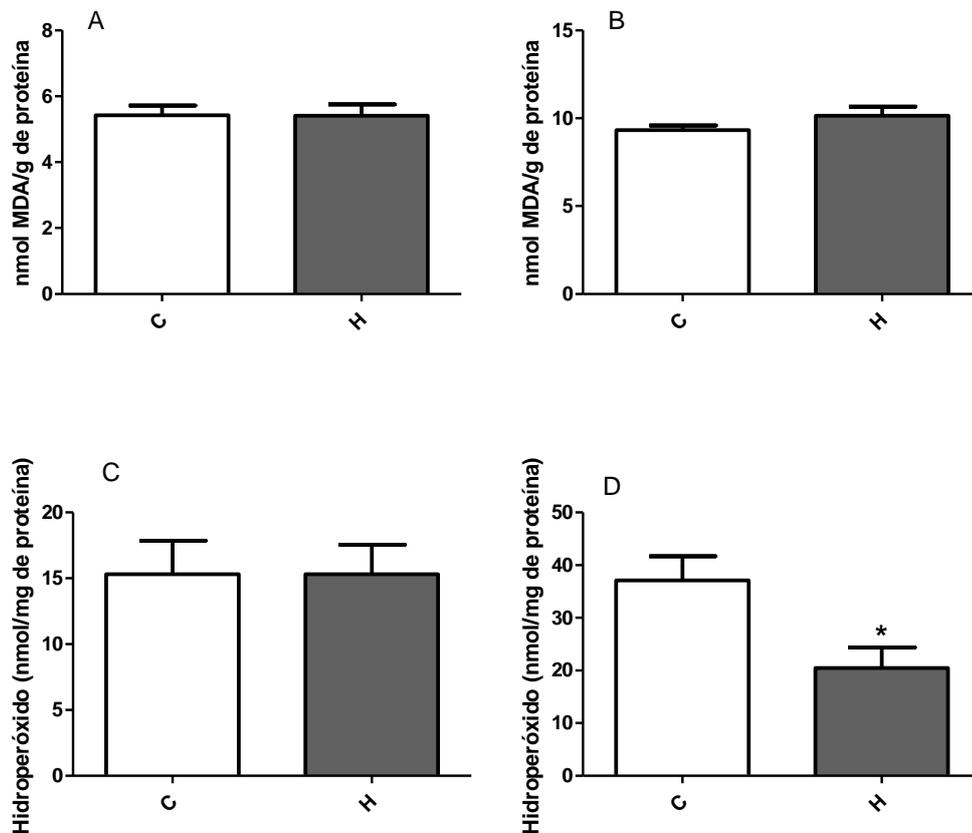
A quantificação proteica foi executada seguindo a metodologia proposta por Bradford (1976), que se baseia na ligação da proteína ao corante Coomassie Blue G-250, o que resulta em coloração azulada detectável por espectrofotômetro. Para o preparo da solução de Bradford foi utilizado 100 mg de azul Coomassie G-250, 50 mL de etanol 95%, 100 mL de ácido fosfórico 85% e água miliQ16 qsp 1000 mL). A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 630 nm. O cálculo da concentração baseou-se na curva padrão de proteína conhecida (albumina sérica bovina) e o valor obtido foi multiplicado pelo fator de diluição das amostras, para obter a concentração de proteína em mg/mL e normalização das outras análises.

## 2.6 Análise Estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prisma® 5.00. Os resultados foram reportados como valores médios com erro padrão da média (EPM). Inicialmente os valores foram submetidos ao teste de Grubbs para a detecção de valores *outliers*. Para a determinação da normalidade das amostras os valores foram submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnov e D'Agostino e Pearson. Utilizou-se o teste t de Student, quando os dados seguiam distribuição normal e o teste Mann-Whitney, quando os dados não seguiam uma distribuição Gaussiana. O critério de significância estatística foi com valores de  $p < 0,05$ .

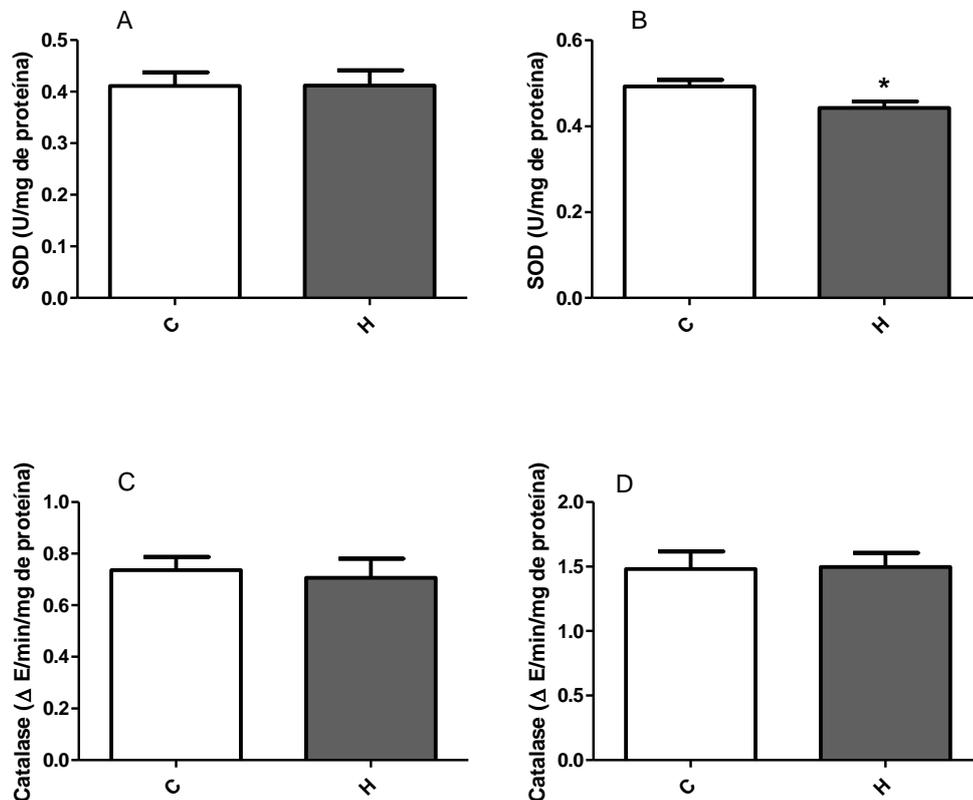
### 3 RESULTADOS

As análises foram realizadas em amostras de tecido adiposo branco e tecido adiposo marrom (TAB e TAM, respectivamente). Os animais foram divididos em dois grupos: Controle (n=19) e Hiperalimentado (n=9). Em relação aos marcadores de estresse oxidativo analisados, não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos experimentais nos testes de TBARS do TAB (C,  $5.422 \pm 0.2996$  e H,  $5.410 \pm 0.3442$ ) e do TAM (C,  $9.330 \pm 0.2664$  e H,  $10.15 \pm 0.5127$ ) (Figura 1A e 1B, respectivamente), todos os resultados foram expressos em nmol MDA/g de proteína. A análise referente à concentração de Hidroperóxidos não mostrou diferença relevante no TAB (Figura 1C) (C,  $15.31 \pm 2.538$  e H,  $15.31 \pm 2.254$ ), porém o grupo H ( $20.48 \pm 3.914$ ) mostra menor produção de hidroperóxido que o grupo C ( $37.12 \pm 4.564$ ) (p<0,05) no TAM (Figura 1D), os resultados estão expressos em nmol/mg de proteína.



**Figura 1:** Teste da dosagem de TBARS normalizado pela concentração proteica (nmolMDA/mg PTN)do tecido adiposo branco (A) e tecido adiposo marrom (B). Avaliação da dosagem de hidroperóxidos normalizada pela concentração proteica (nmol/mg PTN) do tecido adiposo branco (C) e tecido adiposo marrom (D) (p<0,05).

As análises referentes à concentração tecidual da enzima Superóxido dismutase (SOD) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais no TAB (C,  $0,4112 \pm 0,02670$  e H,  $0,4120 \pm 0,02938$ ), entretanto sua atividade estava reduzida no modelo de hiperalimentação ( $0,4421 \pm 0,01532$ ) comparado com o controle ( $0,4921 \pm 0,01558$ ) no TAM ( $p < 0,05$ ), os resultados estão expressos em U/mg de proteína (Figura 2A e 2B, respectivamente). Não foram constatadas alterações relevantes na dosagem de Catalase entre os grupos comparados, tanto no TAB (C,  $0,7360 \pm 0,05148$  e H,  $0,7058 \pm 0,07487$ ), quanto no TAM (C,  $1,481 \pm 0,1346$  e H,  $1,498 \pm 0,1072$ ), os valores estão expressos em  $\Delta E/\text{min}/\text{mg}$  de proteína (Figura 2C e 2D, respectivamente).



**FIGURA 2:** Dosagem da concentração de SOD normalizada pela concentração proteica tecidual (U/mg PTN) do tecido adiposo branco (A) e do tecido adiposo marrom (B). Avaliação da concentração de Catalase normalizada pela concentração proteica tecidual ( $\Delta E/\text{min}/\text{mg}$  PTN) do tecido adiposo branco (C) e do tecido adiposo marrom (D) ( $p < 0,05$ ).

## 4 DISCUSSÃO

A obesidade é uma doença crônica responsável pelo desenvolvimento de vários processos patológicos no organismo e estes contribuem para o aparecimento de diversas patologias, como problemas cardiovasculares, dislipidemia, hipertensão, diabetes, entre outros. Devido ao aumento no tamanho e número das células do tecido adiposo há uma elevação na secreção de diversos fatores pró-inflamatórios, levando à inflamação sistêmica e às disfunções metabólicas encontradas na obesidade (AZEVEDO e BRITO, 2012). Segundo Navarro et al. (2015), na obesidade observa-se uma inflamação sistêmica e perturbações metabólicas, incluindo: aumento da glicemia, assim como dos triacilgliceróis, da leptina, das citocinas circulantes e a redução de adiponectina.

Como mencionado anteriormente, nos mamíferos há a presença de dois tecidos adiposos, o branco e o marrom, e apesar das células dos dois tecidos serem as únicas células do organismo que são adaptadas a armazenar e liberar lipídeos sem que haja comprometimento estrutural e funcional, muitas são as diferenças encontradas entre os dois tecidos (SANTOS e TORRENT, 2010).

O tecido adiposo branco é o maior reservatório energético do organismo e está distribuído de forma generalizada no corpo. Muitas funções são atribuídas ao TAB, sendo a principal o armazenamento energético, porém também possui funções imunitária e endócrina, sendo responsável pela produção e liberação de uma gama de substâncias que atuam em respostas imunológicas, no controle do apetite, da glicemia, da pressão arterial, entre outros (SANTOS e TORRENT, 2010; PEURICHARD et al., 2017).

Já o tecido adiposo marrom está presente em pequenas quantidades em indivíduos adultos, localizado próximo ao pescoço e ao tórax. Sua principal função é a produção de calor, possível pela presença da proteína conhecida como termogenina ou proteína desacopladora 1 (UCP-1). No interior do adipócito marrom os lipídeos estão armazenados em várias partículas lipídicas de diversos tamanhos. Outra característica dessas células é a presença de numerosas mitocôndrias, que são as principais encarregadas da oxidação de lipídeos e da produção de calor (PINTO, 2014; HALPERN et al., 2014).

Os achados recentes apontam a existência de um tecido intermediário, o tecido adiposo bege, que apresenta algumas características tanto de células adiposas brancas, quanto de adipócitos marrons. Fatores como a exposição ao frio e o exercício físico, estimulam o processo de escurecimento do tecido adiposo bege, tornando suas características semelhantes ao do TAM. Muitos estudos a respeito do tema têm como objetivo determinar se o TAM

encontrado nos adultos é de fato o mesmo que está presente na infância ou se apenas o begeh está presente nessa população (LIDELL et al., 2013; HALPERN et al., 2014; BONFANTE et al., 2015).

A indução da obesidade em modelos animais, através de dietas hipercalóricas é um método eficaz para reproduzir e facilitar o entendimento do que ocorre na presença do excesso de peso, na população humana; entretanto quando esses animais cessam o consumo da dieta hipercalórica, o peso corporal normalmente retorna aos valores considerados normais, o que pode não ocorrer nos seres humanos. O modelo animal de hiperalimentação neonatal induz ao maior ganho de peso por aumentar o provimento de energia com a redução da ninhada, diminuindo a competição dos animais pela amamentação, deixando assim mais alimento disponível (ROSINI et al., 2012; HABBOUT et al., 2013).

Em seu estudo, Ferreira Júnior et al. (2019) demonstraram que o modelo de hiperalimentação neonatal resultou em alterações morfológicas, moleculares e funcionais do músculo cardíaco de ratos machos *Wistar*, além de ser evidenciado a dislipidemia, aumento considerável da adiposidade dos animais, na pressão sistólica e diastólica, bem como da resistência à insulina.

O período neonatal possui grande vulnerabilidade por ser influenciado diretamente por fatores ambientais, como a nutrição, e alguns estudos mostram que as alterações metabólicas iniciadas nesta fase, como o aumento da adiposidade e o desenvolvimento dos componentes da síndrome metabólica podem ser mantidas na fase adulta (PLAGEMANN et al., 1999; HABBOUT et al., 2013).

A produção de radicais livres é um processo fisiológico e ininterrupto do corpo. A sua geração em níveis adequados possibilita entre outros mecanismos, a síntese de ATP (energia) e a atuação correta dos mecanismos de defesa em momentos de infecção, porém o estado inflamatório encontrado na obesidade está relacionado a um aumento na produção de radicais livres e espécies reativas, sendo que sua produção exacerbada é responsável por danos oxidativos às estruturas biológicas. Quando a produção dessas moléculas é maior que a capacidade de ação dos sistemas antioxidantes, possibilita-se a oxidação de lipídeos, proteínas e DNA, podendo ocasionar lesão celular e tecidual (BARBOSA et al., 2010; FRANÇA et al., 2013). A oxidação dessas biomoléculas resulta na liberação de metabólitos específicos, que podem ser identificados e quantificados, auxiliando no entendimento e nos estudos a respeito do tema.

Os métodos para a detecção da peroxidação lipídica sucedem prioritariamente a avaliação de forma indireta, ou seja, através da dosagem dos produtos decorrentes da

oxidação. A aferição direta das EROs é impossibilitada pela alta velocidade de suas reações e pelas suas concentrações extremamente baixas. Os marcadores da peroxidação lipídica podem ser produtos primários ou secundários da oxidação (FRANÇA et al., 2013).

O método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) é baseado no fato de que alguns produtos resultantes da peroxidação lipídica são reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBA), assim, quando o TBA é adicionado às amostras biológicas é possível constatar a presença dessas substâncias. O malondialdeído (MDA) é o produto secundário mais abundante da peroxidação lipídica e por ser reativo ao ácido tiobarbitúrico é considerado um importante indicador de peroxidação lipídica e conseqüentemente do estresse oxidativo. Já a dosagem da concentração tecidual dos hidroperóxidos é utilizada como parâmetro para análise do estresse oxidativo, pelo fato de constituírem produtos primários da peroxidação lipídica. (RODRIGUES, 2007; BARBOSA et al., 2010; FRANÇA et al., 2013).

No presente trabalho o modelo de hiperalimentação neonatal não gerou alterações significativas quanto ao teor de MDA nos dois tecidos analisados. O modelo citado não provocou alterações relevantes na concentração de hidroperóxidos no TAB, porém foi capaz de causar uma redução significativa no teor de hidroperóxidos no TAM.

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é o processo de oxidação de membranas lipídicas, ocasionado pela ação de espécies reativas. As duplas ligações presentes nos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) das membranas das células e das organelas conferem maior instabilidade nas ligações e por esse motivo, tais estruturas são facilmente oxidadas. As espécies reativas sequestram um átomo de hidrogênio dos AGPI, dando início a uma cadeia de reações oxidativas, que se não interrompida, pode levar a danos irreversíveis à célula (BARBOSA et al., 2010).

Existem vários mecanismos que podem contribuir para o aparecimento do estresse oxidativo nos indivíduos com excesso de peso, incluindo: aumento do esforço do músculo cardíaco, o que causa elevação do consumo de oxigênio e conseqüente aumento da respiração mitocondrial, ocasionando maior produção de espécies reativas; hiperglicemia encontrada na obesidade promove a glicação de proteínas e com isso há maior produção dessas espécies; injúria celular causada pela pressão exercida aos tecidos pelo excesso de gordura aumentando a produção de citocinas e adipocinas pró-inflamatórias e das espécies reativas de oxigênio (VINCENT e TAYLOR, 2006; FRANÇA et al., 2013).

Os fatores citados apoiam a expectativa de encontrar um aumento dos marcadores do estresse oxidativo em modelos de sobrepeso e obesidade, porém os métodos empregados para a avaliação da concentração de MDA e de hidroperóxidos, apesar de simples e reprodutíveis,

são inespecíficos e podem sofrer interferências de diversas substâncias, tal fato pode justificar os resultados obtidos no presente trabalho (MOORE E ROBERTS, 1998; LIMA E ABDALLA, 2001).

Outra forma de avaliar a presença de estresse oxidativo é através da determinação da atividade das enzimas constituintes do sistema de defesa antioxidante (SDA). Tanto a enzima superóxido dismutase, quanto a enzima catalase (CAT), pertencem ao SDA e atuam para impedir e/ou diminuir os danos causados pela ação danosa das espécies reativas. A SOD age como catalisadora da reação de conversão do radical superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), constituindo a primeira linha de defesa contra o  $O_2^-$ . A catalase é responsável por impedir o acúmulo de  $H_2O_2$ , já que catalisa sua reação de decomposição transformando-o em  $H_2O$  (BARBOSA et al., 2010; JASCOLKA, 2010).

No presente estudo, a atividade da enzima SOD não foi afetada pelo modelo de hiperalimentação no tecido adiposo branco, porém houve uma diminuição considerável da sua atividade induzida pelo modelo utilizado, no TAM. A hiperalimentação neonatal não causou variações significativas na atividade da enzima CAT nos dois tecidos analisados.

A redução da atividade da SOD pode ocasionar um acúmulo do radical superóxido, o que propicia sua reação com o óxido nítrico (NO) para formar o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que é extremamente reativo, indicando então, um prejuízo do sistema de defesa antioxidante (RODRIGUES, 2007; PEDROZA, 2015). Entretanto, o SDA é composto por diversos mecanismos com outras enzimas atuantes, como a Glutathiona peroxidase e a Glutathiona redutase, além de vias não enzimáticas que atuam na neutralização das espécies reativas, dessa forma a sua redução pode indicar também o uso de alguma via alternativa para a neutralização do radical superóxido e, portanto a sua redução por não utilização. A análise das demais enzimas pertencentes ao SDA não foram realizadas no presente trabalho, o que impossibilita o melhor entendimento dos resultados obtidos.

Os estudos realizados na área mostram resultados variados a respeito do tema. Em uma pesquisa realizada por Farhangi et al. (2017) com ratos *Wistar*, a administração de uma dieta hiperlipídica por 16 semanas foi capaz de induzir um aumento significativo no ganho de peso dos animais hiperalimentados e na atividade da enzima CAT no TAB. Entretanto, a atividade da enzima SOD e o teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico não diferiu entre os grupos analisados.

Em contrapartida, Boyer et al. (2016) encontraram um aumento significativo na produção do radical superóxido e no acúmulo de produtos da peroxidação lipídica, no tecido adiposo de camundongos diabéticos e obesos, além de um aumento expressivo da enzima

SOD do tecido adiposo epididimal, contudo não foram encontradas diferenças relevantes entre os grupos na atividade da enzima CAT.

Em outro estudo, a administração de dieta hiperlipídica por 20 dias a camundongos C75Bl/6 J, ocasionou em maior peso do tecido adiposo branco epididimal e do tecido adiposo marrom interescapular. No mesmo trabalho foi evidenciado um aumento de quase o dobro da geração de EROs, com conseqüente adaptação das enzimas SOD e CAT que apresentaram suas atividades aumentadas, afim de reduzir os danos causados pelo excesso de EROs (ALCALÁ et al., 2017).

Pedroza (2015), utilizando ratos *Wistar*, com objetivo de avaliar a capacidade da superalimentação no período pós-natal em desenvolver o estresse oxidativo no córtex renal, encontrou níveis aumentados de MDA, redução da atividade da CAT e como o exposto trabalho, níveis reduzidos da enzima superóxido dismutase dos animais submetidos à experimentação.

Verificou-se através das pesquisas realizadas sobre o tema que, os resultados que a literatura apresenta são diversos e variam de acordo com o modelo animal utilizado, o tipo de dieta fornecida, o tempo de realização dos experimentos e o tipo de tecido avaliado.

As divergências observadas entre os resultados do TAB e do TAM no presente trabalho podem ser justificadas pelas diferenças em relação às suas características estruturais e funcionais, como já citado anteriormente. A literatura atual é carente em relação às ponderações dos mecanismos envolvidos no estresse oxidativo no modelo de hiperalimentação neonatal nos tecidos adiposos. Portanto, são necessários mais estudos sobre a atuação e a produção das diversas substâncias produzidas pelos tecidos adiposos e sua relação com o estresse oxidativo.

## **5 CONCLUSÃO**

Em conclusão, através do modelo de obesidade induzida pela hiperalimentação neonatal, não foi possível confirmar a presença de estresse oxidativo nos tecidos avaliados. Entretanto, houve redução de um marcador do sistema antioxidante no tecido adiposo marrom, mesmo com a diminuição de um parâmetro do estresse oxidativo no mesmo tecido. Os resultados obtidos mostram a dificuldade e a complexidade do estudo sobre os marcadores do estresse oxidativo e das enzimas atuantes do sistema de defesa antioxidante, fundamentando a necessidade de mais estudos na área.

## 6 REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. In: **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- ALCALÁ, M. et al. Increased inflammation, oxidative stress and mitochondrial respiration in brown adipose tissue from obese mice. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.
- ANDRADE, R. G.; CHAVES, O. C.; COSTAS, D. A. S. Excesso de peso em homens e mulheres residentes em área urbana: fatores individuais e contexto socioeconômico. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 31, p. 1-11, 2015.
- AZEVEDO, F. R.; BRITO, B. C. Influência das variáveis nutricionais e da obesidade sobre a saúde e o metabolismo. **Revista da Associação Médica Brasileira (English Edition)**, v. 58, n. 6, p. 714-723, 2012.
- BANERJEE, D. et al. Determination of absolute hydrogen peroxide concentration by spectrophotometric method. **Current Science**, v. 83, n. 10, p. 1193-1194, 2002.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BONFANTE, I. L. P. et al. Novos achados relacionados ao tecido adiposo: uma revisão de literatura sobre o browning e irisina. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 22, n. 2, p. 9-15, 2015.
- BOYER, F. et al. Enhanced oxidative stress in adipose tissue from diabetic mice, possible contribution of glycated albumin. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 473, n. 1, p. 154-160, 2016.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytica biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRAY, G. A.; KIM, K. K.; WILDING, J. P. H. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. **Obesity Reviews**, v. 18, n. 7, p. 715-723, 2017.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. In: **Methods in enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.
- DIETERICH, S. et al. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, v. 101, n. 1, p. 33-39, 2000.
- ENERBÄCK, S. Human brown adipose tissue. **Cell metabolism**, v. 11, n. 4, p. 248-252, 2010.

FARHANGI, M.A. et al. Adipose tissue inflammation and oxidative stress: the ameliorative effects of vitamin D. **Inflammation**, v. 40, n. 5, p. 1688-1697, 2017.

FERREIRA JÚNIOR, M. D. et al. Postnatal early overfeeding induces cardiovascular dysfunction by oxidative stress in adult male Wistar rats. **Life sciences**, v. 226, p. 173-184, 2019.

FERREIRA, A. L. A. et al. Síndrome metabólica: atualização de critérios diagnósticos e impacto do estresse oxidativo na patogênese. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 9, n. 1, p. 54-61, fev. 2011.

FRANÇA, B. K. et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE jornal português de gastroenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199-206, 2013.

HABBOUT, A. et al. Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short-and long-term pathophysiological consequences. **The Journal of nutrition**, v. 143, n. 5, p. 553-562, 2013.

HALPERN, B.; MANCINI, M. C.; HALPERN, A. Brown adipose tissue: what have we learned since its recent identification in human adults. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 9, p. 889-899, 2014.

JASCOLKA, T. L. Efeitos do Quefir no Perfil Lipídico, Estresse Oxidativo e Aterosclerose de Camundongos Deficientes em Apolipoproteína E. p. 1-102, 2010.

KACSO, I. et al. Low plasma adiponectin levels predict increased urinary albumin/creatinine ratio in type 2 diabetes patients. **International urology and nephrology**, v. 44, n. 4, p. 1151-1157, 2012.

LIDELL, M. E. et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. **Nature medicine**, v. 19, n. 5, p. 631, 2013.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

MARTINS, L. M. et al. Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 4, p. 677-692, 2014.

MOORE, K.; ROBERTS, L. J. Measurement of lipid peroxidation. **Free radical research**, v. 28, n. 6, p. 659-671, 1998.

NAVARRO, M. E. L. et al. Inflamação renal, alterações metabólicas e oxidativas após 6 semanas de dieta de cafeteria em ratos. **Brazilian Journal of Nephrology**, p. 9-14, 2015.

PEDROZA, A. A. S. Avaliação dos efeitos da supernutrição no período pós-natal sobre os níveis de estresse oxidativo no córtex renal de ratos jovens. p. 1-29,2015.

PEURICHARD, D. et al. Simple mechanical cues could explain adipose tissue morphology. **Journal of Theoretical Biology**, v. 429, p. 61-81, jun. 2017.

PINTO, W. D. J. A função endócrina do tecido adiposo. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 16, n. 3, p. 111-120, 2014.

PLAGEMANN, A. et al. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. **Brain research**, v. 836, n. 1-2, p. 146-155, 1999.

RODRIGUES, N. R. D. Medidas de indicadores de estresse oxidativo e de remodelamento cardíaco em camundongos expostos à poluição atmosférica ambiental durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, p. 1-60, 2007.

ROSINI, T. C.; DA SILVA, A. S. R.; DE MORAES, C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 383-387, 2012.

SAMSON, S L.; GARBER, A. J. Metabolic syndrome. **Endocrinology and Metabolism Clinics**, v. 43, n. 1, p. 1-23, 2014.

SANTOS, L.C.; TORRENT, I. F. O tecido adiposo e a produção de adipocinas. **SynThesis Revista Digital FAPAM**, Pará de Minas, v. 2, n. 2, p. 110-119, nov. 2010.

SMITH, R. E. Thermogenic activity of the hibernating gland in the cold-acclimated rat. **Physiologist**, v. 4, p. 113, 1961.

TRAYHURN, P. Origins and early development of the concept that brown adipose tissue thermogenesis is linked to energy balance and obesity. **Biochimie**, v. 134, p. 62-70, 2017.

VELICKOVIC, K. D. et al. Effects of long-term sucrose overfeeding on rat brown adipose tissue: a structural and immune histochemical study. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 9, p.1-9, 2018.

VINCENT, H. K.; TAYLOR, A. G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. **International journal of obesity**, v. 30, n. 3, p. 400-418, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Obesity and overweight fact sheet, 2017.