

A expressão cardíaca de nitrotirosina em ratos Wistar, submetidos a dieta rica em gordura, a restrição calórica e ao exercício físico leve e intenso.

Giovanna Marques Resende¹, Marina de Sousa Aguiar², Glória Edeni Dias Pereira Amorim³, Ana Carla Borges Lacerda⁴, Cleverson Fernandes Rodrigues⁵

¹Graduanda do curso de Medicina, Universidade de Rio Verde, Aluno da Iniciação Científica- PIVIC.

²Graduanda do curso de Medicina, Universidade de Rio Verde

³Graduanda do curso de Medicina, Universidade de Rio Verde

⁴Graduanda do curso de Medicina, Universidade de Rio Verde

⁵ Orientador e professor da Faculdade de Medicina, Universidade de Rio Verde Email: cleversonfernandes@unirv.edu.br.

Reitor:

Prof. Dr. Alberto Barella Netto

Pró-Reitor de Pesquisa e Inovação:

Prof. Dr. Carlos César E. de Menezes

Editor Geral:

Prof. Dra. Andrea Sayuri Silveira Dias Terada

Editores de Seção:

Profa. Dra. Ana Paula Fontana

Prof. Dr. Hidelberto Matos Silva

Prof. Dr. Fábio Henrique Baia

Pra. Dra. Muriel Amaral Jacob

Prof. Dr. Matheus de Freitas Souza

Prof. Dr. Warley Augusto Pereira

Fomento:

Programa PIBIC/PIVIC UniRV/CNPq 2023-2024

Resumo: Introdução: Evidenciou-se presença de níveis elevados de nitrotirosina. (NT) desempenhou um papel crucial na determinação da lesão tecidual no coração. Sendo, a dieta rica em gordura (DRG), a atividade física e a restrição calórica (RC), variáveis ambientais que causaram adaptações distintas ao sistema cardiovascular. Objetivo: Avaliamos se o exercício físico de alta e baixa intensidade em condição de RC tem potencial lesivo ou protetor para o coração, comparado com outra variável extrema a alta ingestão de gordura. Material e métodos: Foram utilizados materiais biológicos remanescentes de um projeto previamente desenvolvido no departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto, em que noventa ratos Wistar foram aleatoriamente divididos em nove grupos, com exposição à exercício. Os dados de cada grupo foram avaliados pelo Graph Pad Prism 4.0. Resultados e Discussão: Descobrimos que ratos treinados fisicamente que receberam DRG por 90 min/dia diminuíram a densidade do tecido adiposo cardíaco, embora não tenham protegido o coração do dano oxidativo induzido pela gordura. Embora o treinamento físico tenha reduzido os níveis de colesterol promovidos pelo DRG, os níveis ainda eram mais elevados do que os dos animais que receberam uma dieta regular. Conclusão: Sugerimos que o aumento da ingestão de gordura promove alterações metabólicas e

inflamatórias que prejudicam os efeitos protetores do exercício físico contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Palavras-Chave: 1. Atividade Física; 2. Dieta hiperlipídica; 3 Doença Cardiovascular 4. Lesão tecidual.

Cardiac Expression of Nitrotyrosine in Wistar Rats Subjected to a High-Fat Diet, Caloric Restriction, and Low- and High-Intensity Physical Exercise

Abstract: Introduction: Elevated levels of nitrotyrosine (NT) were evidenced. NT played a crucial role in determining tissue damage in the heart. A high-fat diet (HFD), physical activity, and caloric restriction (CR) are environmental variables that caused distinct adaptations in the cardiovascular system. Objective: We evaluated whether high- and low-intensity physical exercise under CR conditions has harmful or protective potential for the heart, compared with another extreme variable, high fat intake. Materials and Methods: Biological materials were used from a previously developed project in the Department of Pathology at the Faculty of Medicine of the University of São Paulo (USP) in Ribeirão Preto, in which ninety Wistar rats were randomly divided into nine groups, with exposure to exercise. The data from each group were evaluated using GraphPad Prism 4.0. Results and Discussion: We found that physically trained rats that received HFD for 90 min/day reduced the density of cardiac adipose tissue, although they did not protect the heart from fat-induced oxidative damage. While physical training reduced cholesterol levels promoted by HFD, the levels were still higher than those of animals that received a regular diet. Conclusion: We suggest that increased fat intake promotes metabolic and inflammatory changes that impair the protective effects of physical exercise against the development of cardiovascular diseases

Keywords: 1. Physical Activity; 2. Hyperlipidic Diet; 3. Cardiovascular Disease; 4- Tissue Damage

Introdução

De acordo com Templeman (2021) “ As restrições alimentares assim como o jejum estão associados à maior expectativa de vida prolonga a duração de vida”. Embora, a diminuição da ingestão de energia seja geralmente considerada o fator crítico, segundo Madeo *et al.*(2021) é possível que o momento da ingestão de alimentos, e também a frequência da alimentação, sejam componentes-chave no prolongamento da vida.

Apesar do consenso geral referente aos perigos da alimentação e de um grande número de trabalhos relacionados com a ingestão de gordura, especialmente a gordura de origem animal, têm sido relacionada ao aumento da incidência de mortes. Dessa forma, a compreensão dos malefícios causados é agravada pela complexidade em controlar a real ingestão alimentar, bem como as interações dos compostos ingeridos fazem com que as mortes relacionadas aos hábitos alimentares possam variar de 10 a 70%, como evidenciado por Martínez *et al.* (2008).

Elucidando a ideia desta complexidade, os estudos de Wu *et al.* (2019) e Adams *et al.* (2018) “ Demonstraram que mesmo estudos que relacionam a ingestão de gordura com o ganho de peso e obesidade apresentam resultados inconsistentes”.

Conforme análise de Shuttler *et al.* (2019) os benefícios da atividade física são considerados convincentes para a prevenção de várias doenças. Entretanto, encontramos resultados controversos e inconclusivos referentes à sua intensidade e duração. Sendo que, alguns estudos relacionam os benefícios do exercício físico a uma intensidade vigorosa, outros moderada e outros a atividades recreacionais

O presente estudo tem como propósito avaliar os efeitos do exercício físico em diferentes durações e intensidades, associado a restrição calórica e um possível potencial lesivo ou protetor para o coração e em seguida, comparar estes resultados com o outro extremo nutricional, que é a alta ingestão de gordura, em animais submetidos ao mesmo protocolo de treinamento. .

Material e Métodos

Será utilizado material biológico (para análises inéditas, ainda não realizadas) de um projeto previamente desenvolvido na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), onde noventa ratos Wistar, machos, de aproximadamente 200g foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia, em condições de temperatura ambiente constante 24°C ±1°C em ciclo noite-dia 12:12-h, e umidade relativa do ar de 60-70%.

Alimentados com dieta padrão (até o início do experimento) e água de torneira. Os animais foram acomodados durante o período de adaptação (uma semana) em número de cinco por gaiola. Os animais foram divididos aleatoriamente em 9 grupos com 10 animais, sendo: G1 o grupo dieta padrão sedentário, G2 dieta padrão e 20 de natação (adaptado de Gobatto et al, 2001) e G3 dieta padrão e 90 minutos de natação. Os grupos G4, G5, G6 seguiram o mesmo protocolo dos grupos previamente descritos, tendo como variável única a substituição da dieta padrão por uma dieta rica em gordura, e os animais dos grupos G7, G8 e G9 também seguiram o mesmo protocolo de treinamento, tendo como variável a dieta de restrição calórica de 40%.

O treinamento físico dos animais consistiu de natação 5 vezes por semana durante 8 semanas. Os resultados serão submetidos à análise estatística utilizando o software Graph Pad Prism 4.0 (San Diego, Califórnia). Para verificar as comparações das variáveis obtidas entre os grupos será utilizada a Análise de Variância de Uma Via (ANOVA). Nas demais comparações será utilizado o pós-teste de Tukey's Multiple Comparison. A probabilidade de $p < 0.05$ será considerada estatisticamente significativa. Os animais foram mantidos segundo as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética (número do protocolo: 137/2010)..

Resultados e Discussão

Obtivemos resultados de que a dieta hiperlipídica (DH) danificou a aorta apesar dos benefícios do treinamento físico que durou 60 minutos, isto de forma histopatológica nas amostras dos ratos como demonstrada por Chen J et al.(2016). A análise revelou que os exercícios reduziram efetivamente o peso corporal que havia sido aumentado por uma DH (Tabela 1; $p < 0,05$).

Tabela 1 Peso corporal para cada grupo experimental.

Grupos	Peso (g)		Comparações		
	Dietas				
	DST	DH			
SED	210.7 ± 15.8	522.8 ± 25.5 [#]	# $p < 0.05$ vs STD/SED	* $p < 0.05$ vs DH/SED	& $p < 0.05$ vs DST/E60
Treinamento E60	190.5 ± 15.5	405.9 ± 18.6 ^{*,#,&}			

DST, dieta padrão; DH, dieta hiperlipídica; SED, sedentário; E60, exercício físico por 60 min. Os valores são apresentados como media DP. O teste ANOVA de dois fatores ((Bonferroni post hoc test) foi utilizado para todas as comparações. Fonte: autoria própria

Dessa forma, o treinamento físico não foi capaz de reduzir os níveis de nitrotirosina que haviam sido aumentados pela DH (Figura 1B; $p < 0,05$), analisado hispatologicamente a aorta do rato com biomarcador de dano (Figura 1A). Analisamos outras estruturas, para comparações que também não tiveram alterações nas atuais condições experimentais: espessura da aorta e seu conteúdo tecidual (Figura 1C-E; $p > 0,05$). Considerando que o colágeno fornece força mecânica à aorta de acordo com Tsamis *et al.*, (2013), descobrimos que a combinação do treinamento físico com uma DH reduziu o conteúdo aórtico dessas fibras [Figura 1F; $p < 0,05$ (primeira e segunda análises)]. Essa mudança, decrita por Li et al. (2014) pode estar relacionado à remodelação tecidual, os miofibroblastos foram enumerados.

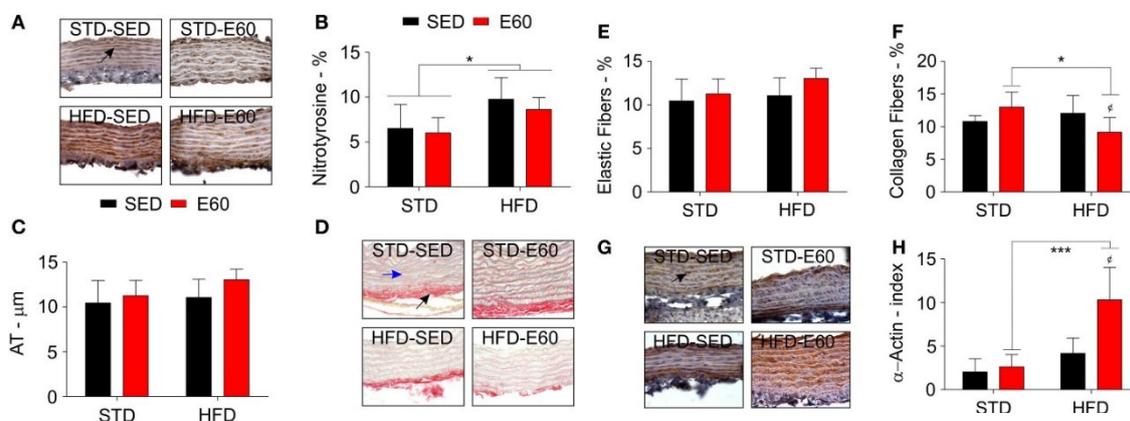


Figura 1 - Uma dieta rica em gordura (DH) danifica a aorta, além dos efeitos protetores do treinamento físico. (A) Imagens representativas ilustram reações com um anticorpo anti-nitrotirosina para cada grupo experimental em amostras de aorta. Uma seta preta mostra uma célula corada positivamente com aquele anticorpo anti-nitrotirosina. Ratos sedentários receberam ração regular [dieta padrão (STD)-SED]; ratos exercitados foram alimentados com ração normal (STD-E60); ratos sedentários receberam DH (HFD-SED); e, exercitados foram ratos alimentados com DH (HFD-E60). (B) A análise histopatológica determinou valores de nitrotirosina (%) por densidade óptica. (C) A análise microscópica determinou a espessura atrial (micrômetros) em cortes de aorta corados com hematoxilina e eosina. (D) Imagens representativas ilustram coloração vermelha picrosirius para cada grupo experimental em amostras de aorta. Uma seta preta mostra fibras de colágeno manchadas de vermelho. Uma seta azul mostra fibras elásticas manchadas de amarelo. (D, E) A análise histopatológica determinou a densidade das fibras elásticas (E) e colágenas (F). (G) Imagens representativas ilustram reações com um anticorpo anti- γ -actina para cada grupo experimental em amostras de aorta. Uma seta preta mostra uma célula corada positivamente com aquele anticorpo anti- γ -actina. (H) Uma análise microscópica determinou o número de células γ -actina positivas por área (milímetro; índice). Análise Estatística I: ϕ $p \in 0,05$ vs. HFD-SED. Análise Estatística II: $p < 0,05$ e $**p < 0,001$. Análise dos dados: teste ANOVA two-way (teste post hoc de Bonferroni). Os valores relacionados são a média + DP. Fonte: autoria própria.

Os ratos foram expostos diariamente a grandes quantidades de gordura na dieta, e toda área cardíaca foi analisada na tomografia computadorizada, como exposto, por Kanoski *et al.*, (2010). Essa região do coração dos ratos teve diminuição, com uma prática de treinamento de 20 a 90 min e que foram alimentados com uma dieta regular. A administração de DH aos ratos aumentou a área cardíaca e a densidade do tecido adiposo nos grupos sedentário e no grupo que exercitou por 20 minutos, entretanto o grupo que praticou exercício regular por 90 min reduziu ambos os parâmetros.

A combinação de exercício nos ratos por 90 minutos com ingestão de alimentação hipertrofiou ainda mais este ventrículo. Ambos os protocolos de treinamento físico reduziram a espessura do ventrículo esquerdo, mas aumentou a espessura do septo cardíaco em ratos que recebem uma dieta padrão. Coletivamente, nossos dados indicam que a dieta lipídica limitam os efeitos protetores do treinamento físico na aorta.

Conforme elucidado por Baker *et al.* (1999) "No sistema cardiovascular, as expressões celulares da nitrotirosina e da COX-2 têm sido intimamente relacionadas à inflamação". Descobrimos que o aumento da ingestão de ácidos graxos promoveu o aumento do número de células positivas para COX-2 no coração [Figuras 4A, B; $p < 0,05$ (segunda análise)], fato que foi pior no grupo que praticou exercício 90 min [Figura 4B; $p < 0,05$ (primeira análise)]. Deve-se considerar o fato de que o atual protocolo de treinamento físico não foi capaz de proteger adequadamente o coração dos efeitos prejudiciais da dieta gordurosa.

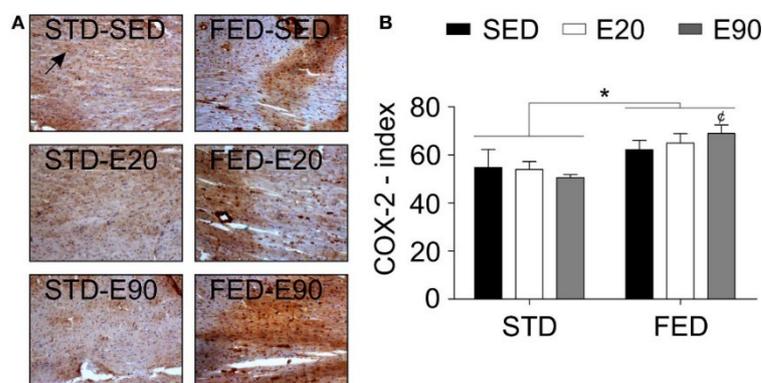


Figura 2- Uma dieta enriquecida com gordura promove inflamação no coração. (A) Imagens representativas ilustram reações com um anticorpo anticiclooxigenase-(COX-2) para cada grupo experimental em amostras de coração. Uma seta preta mostra uma célula corada positivamente com esse anticorpo anti-COX-2. Ratos sedentários receberam ração regular [dieta padrão (STD)-SED]; ratos exercitados foram alimentados com ração normal (STD-E60); ratos sedentários receberam DH (HFD-SED), e ratos exercitados foram alimentados com DH (HFD-E60). (B) O índice COX-2 foi determinado como o número de células positivas por área (milímetro quadrado). Análise Estatística II: * $p \leq 0,05$. Análise dos dados: teste ANOVA two-way (teste post hoc de Bonferroni). Os valores relatados são a média + DP. Fonte: autoria própria.

Inicialmente, planejamos revelar os benefícios potenciais do exercício aeróbico para a aorta e o coração, já que estudos anteriores indicaram que ele oferece proteção contra uma condição potencialmente fatal como elucidado por Demarzo *et al*(2008). Em primeiro lugar, observamos que o treinamento físico reduziu em cerca de 1,3 vezes o aumento de peso corporal causado pela dieta hiperlipídica (DH), embora essa dieta tenha mais que dobrado o peso dos animais. Cálculos simples de ganho de peso mostraram que esse acréscimo de gordura na dieta aumentou o peso corporal em aproximadamente 2,3 vezes tanto em ratos sedentários quanto nos que praticavam exercício.

Considerando que o teor de gordura total da dieta enriquecida (FED) era cerca de 3,6 vezes menor do que o de uma dieta hiperlipídica, e que 60 minutos de exercício não evitaram danos à aorta, buscamos ajustar o tempo de treino diário para um terço menos ou um terço mais, em ratos alimentados com FED. O exercício diário de 90 minutos restaurou aos níveis normais a área cardíaca e a densidade do tecido adiposo, ambos aumentados pela FED, apesar de as alterações na dieta terem engrossado o ventrículo esquerdo.

Embora as mudanças cardíacas induzidas pela FED não tenham sido totalmente neutralizadas pelo exercício, observamos que o treino reduziu os níveis séricos de colesterol e glicose, mas não alterou a concentração de triglicerídeos. Isso reforça a ideia de que o aumento da ingestão de gordura afeta a bioenergética mitocondrial, bloqueando a absorção de glicose pelo fígado e músculos esqueléticos, elevando os níveis séricos de glicose (49, 52).

Conclusão

Nossas descobertas parecem controversas em comparação com outros estudos, que destacam os efeitos protetores do exercício contra doenças cardiovasculares induzidas por dietas ricas em gordura como evidenciou. Em vez de utilizar exercícios aeróbicos moderados, como aplicamos com sucesso em modelos de ratos e camundongos para combater condições fatais, outros autores utilizaram exercícios intervalados de alta intensidade ou treinamento de resistência (Lund, 2015; Speretta,2016).

Dessa forma, sugerimos que o aumento na ingestão de gordura promove alterações metabólicas e inflamatórias que reduzem os efeitos protetores do exercício contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Isso ilustra que uma dieta saudável não pode ser substituída apenas pelo treino físico na proteção do sistema cardiovascular. As conclusões atuais exigem investigações mais aprofundadas.

Agradecimentos

Agradeço ao Programa de Iniciação Científica PIVIC que chancelou a execução do projeto, pelo pelos recursos disponibilizados e contribuições valiosas no processo da nossa formação científica.

Referências Bibliográficas

- ADAMS V, LINKE A. Impact of exercise training on cardiovascular disease and risk. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.** 2019 Apr 1;1865(4):728-734. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.08.019. Epub 2018 Aug 28. PMID: 30837069.
- DEMARZO MM; et al. . O exercício reduz a inflamação e a proliferação celular na carcinogênese do cólon de ratos. **Exercício Med Sci Sports** (2008) 40:618–21. doi:10.1249/MSS.0b013e318163274d
- LUND J, Hafstad AD, Boardman NT, Rossvoll L, Rolim NP, Ahmed MS, et al. O treinamento físico promove cardioproteção por meio de ação poupadora de oxigênio em camundongos alimentados com alto teor de gordura. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2015) 308:H823–9. doi:10.1152/ajpheart.00734.2014 17. Pimenta
- MADEO F. Caloric Restriction Mimetics against Age-Associated Disease: Targets, Mechanisms, and Therapeutic Potential. **Cell Metab.** 2019 Mar 5;29(3):592-610. doi: 10.1016/j.cmet.2019.01.018. PMID: 30840912.
- MARTÍNEZ, M. E. *et al.* Diet and cancer prevention: the roles of observation and experimentation. **Nat Rev Cancer.** 2008 Sep;8(9):694-703. doi: 10.1038/nrc2441. PMID: 19143054.
- SCHÜTTLER D. *et al.* Molecular Mechanisms of Cardiac Remodeling and Regeneration in Physical Exercise. **Cells.** 2019 Sep 23;8(10):1128. doi: 10.3390/cells8101128. PMID: 31547508; PMCID: PMC6829258.
- TEMPLEMAN, I. *et al.* A randomized controlled trial to isolate the effects of fasting and energy restriction on weight loss and metabolic health in lean adults. *Sci Transl Med.* 2021 Jun 16;13(598):eabd8034. doi: 10.1126/scitranslmed.abd8034. PMID: 34135111.
- SPERETTA GF, SILVA AA, VENDRAMINI RC, ZANESCO A, DELBIN MA, MENANI JV, et al. O treinamento resistido previne as alterações cardiovasculares causadas pela dieta rica em gordura. **Ciências da Vida** (2016) 146:154–62. doi:10.1016/j.lfs.2016.01.011
- WU, N.N. *et al.* Physical Exercise and Selective Autophagy: Benefit and Risk on Cardiovascular Health. **Cells.** 2019 Nov 14;8(11):1436. doi: 10.3390/cells8111436. PMID: 31739509; PMCID: PMC6912418.
- YU L; et al. Gordura dietética, saturação de ácidos graxos e bioenergética mitocondrial. **J Bioenerg Biomembra** (2014) 46:33–44. doi:10.1007/s10863-013-9530z.