

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-NUPEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE UMA DIETA RICA
EM CARBOIDRATOS REFINADOS E À HIPERÓXIA
SOBRE O DESEQUILÍBRIO REDOX E A INFLAMAÇÃO
EM CAMUNDONGOS**

Nícia Pedreira Soares

Ouro Preto, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - NUPEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE UMA DIETA RICA EM
CARBOIDRATOS REFINADOS E À HIPERÓXIA SOBRE O
DESEQUILÍBRIO REDOX E A INFLAMAÇÃO EM
CAMUNDONGOS**

Prof. Dr. Frank Silva Bezerra

Orientador

Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva

Co-orientador

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós- Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

Ouro Preto, MG, 2015

S676e

Soares, Nícia Pedreira.

Efeitos da associação entre uma dieta rica em carboidratos refinados e à hiperóxia sobre o desequilíbrio redox e a inflamação em camundongos [manuscrito] / Nícia Pedreira Soares. - 2015.

65f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Frank Silva Bezerra.

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Departamento de Ciências Biológicas. Núcleo de Pesquisas Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Carboidratos na nutrição humana. 2. Carboidratos refinados. 3. Inflamação. I. Bezerra, Frank Silva. II. Silva, Marcelo Eustáquio. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 641.13

Catálogo: www.sisbin.ufop.br

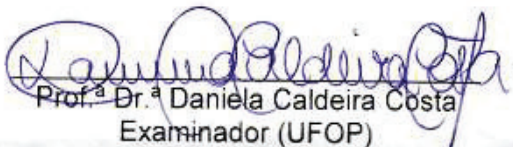


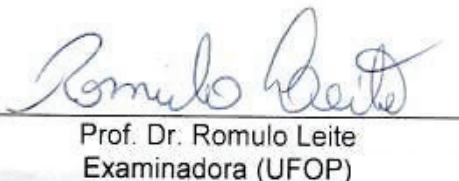
Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

“Efeitos da associação entre uma dieta rica em carboidratos refinados e à hiperóxia sobre o desequilíbrio redox e a inflamação em camundongos”.

Aos dezessete dias do mês de dezembro de 2015, às 10:00h, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna Nícia Pedreira Soares. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:


Prof.^a Dr.^a Daniela Caldeira Costa
Examinador (UFOP)


Prof. Dr. Romulo Leite
Examinadora (UFOP)


Prof. Dr. Frank Silva Bezerra
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: 17/12/2015



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/cbiol

Este Trabalho foi realizado no **Laboratório de Bioquímica Metabólica** e no **Laboratório de Nutrição Experimental** do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), sob auxílio concedido pela Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais presentes em minha vida:

Minha mãe, pelo incentivo e amor;

Meu pai, pelos ensinamentos e exemplos;

Meu grande amor, Jorge, por estar ao meu lado nos melhores e
piores momentos de minha vida;

Meu Filho Yuri, meu maior presente!

Meus amigos pela companhia, amizade, dedicação e fidelidade.

AMO MUITO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

A UFOP por me proporcionar um aperfeiçoamento de qualidade e gratuito.

Ao meu orientador Dr. Frank Silva Bezerra pela oportunidade em me aceitar para ser meu orientador, demonstrando confiança. Obrigada ainda pelos seus ensinamentos, por acreditar e confiar na minha capacidade por ser exemplo de profissional e, sobretudo pela paciência em todos os momentos ao longo desses dois anos.

Agradeço as amigas Keila Karine Duarte Campos por dedicar seu tempo para me ensinar desde as mais básicas as mais complexas técnicas necessárias para realização do meu mestrado. E a Karina Braga Pena por sua parceria em realizar praticamente todos os experimentos e a ajuda prestada. A vocês duas agradeço ainda por participaram diretamente deste trabalho e me ajudarem em todos os momentos, pela amizade, conversas, conselhos, desabafos e é claro pelas hospedagens!

Agradeço aos demais alunos e ex alunos do Laboratório de Fisiopatologia Experimental (LAFEx) Mônica Campos Andrade, Camila de Oliveira Ramos, Natália Pereira da Silva Araújo, Clarissa Rodrigues Nardeli, Pâmela Félix da Silva, Lucas Antunes Araujo, Dafne Fernandes Machado e Thais Lourenço pela ajuda prestada em diversos experimentos e eutanásias. Assim como também ao Fernando Rodrigues de Lima pelas horas dedicadas em fazer dietas entre outros procedimentos.

A doutoranda Ana Carla Bandeira Balthar Bandeira pelos ensinamentos.

A amiga Larissa Lélis Teixeira Reis pelos estudos compartilhados assim como pela amizade, conversas, desabafos, conselhos e companheirismo do dia a dia.

Ao professor Dr. Marcelo Eustáquio da Silva pelo fornecimento dos camundongos e reagentes necessário para a realização de várias etapas do projeto desse mestrado.

Ao professor Dr. André Talvani e ao doutorando Guilherme de Paula Costa pelo auxílio na realização dos Ensaio imunoenzimáticos.

A todos os colegas e professores do programa pós-graduação em ciências biológicas pelo convívio e aprendizado.

Ao Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC), ao Professor Dr. Roney Luiz de Carvalho Nicolato e aos técnicos administrativos Adão José da Rocha e Gustavo Silveira Breguez pela realização das análises hematológicas.

Ao Laboratório de nutrição experimental (LBNEX) e laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM) e seus respectivos técnicos administrativos Jair pastor mota e Renata Rebeca Pereira pela disponibilidade de ajudar sempre que necessário.

Agradeço, também, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e a Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) pelo apoio financeiro.

Ninguém vence sozinho...

OBRIGADA A TODOS!

RESUMO

A obesidade é uma doença multifatorial que sofre influências genéticas, sociais e ambientais. O consumo de dietas ricas em carboidratos refinados tem sido associado a diferentes condições patológicas. Essa doença leva a hipóxia e, conseqüentemente, aumenta a produção de citocinas pro-inflamatórias resultando em um processo inflamatório generalizado. A suplementação de oxigênio pode ser utilizada no tratamento da hipóxia tecidual, no entanto, a exposição excessiva por longos períodos leva à lesão pulmonar aguda hiperóxica e, conseqüentemente, a liberação de citocinas pró-inflamatórias. O estudo analisou os efeitos da dieta rica em carboidratos refinados sobre o desequilíbrio redox e a inflamação em animais expostos à hiperóxia. Vinte e quatro (24) camundongos da linhagem BALB/c (machos, adultos, 5-7 semanas de idade) foram divididos em dois grupos: o primeiro grupo (G1) recebeu uma dieta padrão e o segundo grupo (G2) recebeu uma dieta rica em carboidratos refinados – 10% de açúcar, 45% de dieta padrão, 45% de leite condensado. A massa corporal dos animais e a ingestão alimentar foram mensuradas semanalmente durante 12 semanas. Após o tratamento dietético, G1 foi randomicamente dividido em grupo Controle (GC) e Grupo Hiperóxia (GH), e G2 foi randomicamente dividido em Grupo Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados (GDC) e Grupo Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados + Hiperóxia (GDCH). GH e GDCH foram expostos a 100% de oxigênio por 24h e GC e GDC foram apenas expostos ao ar ambiente por 24h. Após as exposições, os animais foram eutanasiados e amostras de sangue, lavado broncoalveolar (LBA), tecido adiposo e pulmões foram coletados para futuras análises. Houve um ganho de massa e adiposidade corporal, bem como o aumento da área dos adipócitos no GDC quando comparado ao GC. No LBA, houve um aumento do número de leucócitos totais no GDCH quando comparado ao GC e uma diminuição do número de leucócitos totais no sangue do GDCH quando comparado ao GC. O GH apresentou maiores níveis da citocina IFN- γ no tecido adiposo, quando comparado aos demais grupos e maiores níveis de IL-10 e TNF- α comparado ao GC e GDCH. A atividade da SOD e CAT no parênquima pulmonar diminuiu no grupo GDCH quando comparado ao GC. A dosagem de TBARS revelou um aumento progressivo da peroxidação lipídica nos grupos GH, GDC e GDCH em comparação ao GC, assim como um aumento de GDC comparado ao GH e do GDCH comparado ao GH e GDC. Uma dieta rica em carboidratos refinados associada à hiperóxia promoveu inflamação e desequilíbrio redox em camundongos adultos.

Palavras chaves: obesidade, hiperóxia, inflamação, desequilíbrio redox, camundongos BALB/c.

ABSTRACT

Obesity is a multifactorial disease with genetic, social and environmental influences. The consumption of diets rich in refined carbohydrates has been associated with this pathological condition. This disease leads to hypoxia and, consequently, increases production of pro-inflammatory cytokines resulting in a generalized inflammatory process. The oxygen supplementation can be used for the treatment of tissue hypoxia, however, excessive exposure for long periods leads to hyperoxia acute lung injury and, consequently, the release of pro-inflammatory cytokines. This study analyzed the effects of high-refined carbohydrate-containing diet on the redox imbalance and inflammation in mice exposed to hyperoxia. Twenty-four BALB/c mice (males, adults, 5-7 weeks old) were divided into two groups: the first group (G1) received a standard diet and the second (G2) received a diet rich in refined carbohydrates - composed of 10% of sugar, 45% of standard diet and 45% of sweet condensed milk. The animal body weight and food intake were measured weekly for twelve weeks. After dietary treatment, G1 was randomly divided in Control Group (CG) and Hyperoxia Group (HG), and G2 was randomly divided in Refined Carbohydrate Diet Group (RCDG) and Refined Carbohydrate Diet + Hyperoxia Group (RCDHG). HG and RCDHG were exposed to 100% oxygen for 24 hours and CG and RCDG were just exposed to ambient air for 24 hours. After the exposures, the animals were euthanatized and blood, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) adipose tissue and lungs were collected for analyses. There was a weight gain and body adiposity as well as an increase of the area of adipocytes in GDC when compared to CG. In the BALF, there was an increase in the number of total leukocytes no GDCH when compared to GC and a decrease of the number of total leukocytes in the blood of GDCH when compared to GC. The GH showed higher levels of IFN- γ in adipose tissue when compared to other groups and higher levels of IL-10 and TNF- α compared to GC and GDCH. SOD and CAT activity were decreased in GDCH group when compared to GC in pulmonary parenchyma. The TBARS assay showed a progressive increase of lipid peroxidation in GH, GDC and GDCH when compared to GC, as well as an increase of GDC when compared to GH and GDCH when compared to GH and GDC. A refined carbohydrate diet associated with hyperoxia promoted inflammation and redox imbalance in adult mice.

Key words: obesity, hyperoxia, inflammation, redox imbalance, BALB/c mice.

Lista de quadros

Quadro 1. Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	16
Quadro 2. Composição nutricional e análise quantitativa de sacarose da dieta controle e da dieta rica em carboidratos refinados	24
Quadro 3. Reagentes utilizados para mensurar a atividade da Superóxido dismutase (SOD)	31

Lista de tabelas

Tabela 1. Contagem total e diferencial de células do Lavado Broncoalveolar nos grupos experimentais	40
Tabela 2. Contagem total e diferencial de Leucócitos no sangue dos grupos experimentais	41
Tabela 3. Hemograma dos grupos experimentais	41
Tabela 4. Análises bioquímicas do plasma sanguíneo nos grupos experimentais	42
Tabela 5. Marcadores inflamatórios no tecido adiposo epididimal	43
Tabela 6. Avaliações estereológicas do parênquima pulmonar dos grupos experimentais	43
Tabela 7. Avaliações do estresse e dano causados pela oxidação no parênquima pulmonar dos grupos experimentais	45

Lista de figuras

Figura 1. Mecanismo da obesidade associado à inflamação	10
Figura 2. Partes constituintes do pulmão.....	12
Figura 3. Principais enzimas antioxidantes.	18
Figura 4. Vias de produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.	20
Figura 5. Esquema representativo da exposição ao oxigênio	26
Figura 6. Análise histológica de seções do tecido adiposo epididimal corados com HE (10x).....	38
Figura 7. Fotomicrografias de cortes de pulmão corado com H&E (40x). Influxo celular no parênquima pulmonar	44

Lista de gráficos

Gráfico 1. Ganho de massa corporal no decorrer de 12 semanas	35
Gráfico 2. Massa corporal em gramas (g) dos animais experimentais.	36
Gráfico 3. Consumo alimentar e calórico acumulado nos grupos experimentais.....	36
Gráfico 4. Adiposidade corporal (A) e área dos adipócitos (B) nos grupos experimentais.	37
Gráfico 5. Níveis séricos de glicose (A) e colesterol (B).....	39

Lista de abreviaturas e símbolos

AGL- Ácidos graxos livres
ALP- Fosfatase alcalina
ALT- Alanina aminotransferase
AP- Proteína ativadora
AST- Aspartato aminotransferase
ATP- Trifosfato de adenosina
BHT – 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metilfenol
CC- Circunferência da cintura
CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais
ChREBP - Elemento responsivo ao carboidrato
Cm- Centímetro
CO₂ – Dióxido de carbono
CSF- Fator estimulador de colônias
CSF-1-Fator estimulador de colônias
DCV- Doenças cardiovasculares
DEXA- Dual Energy X-Ray Absorptiometry
DM- Diabetes mellitus
DMSO- Dimetilsulfóxido
DNA- Ácido desoxirribonucléico
DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazina
DTNB – Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EROs - Espécies reativas de oxigênio
Fe- Ferro
FiO₂- Fração inspiratória de oxigênio
GC- Grupo Controle
GH- Grupo Hiperóxia
GDC- Grupo Dieta com Alto Teor de Carboidratos Refinados
GDCH- Grupo Dieta com Alto Teor de Carboidratos Refinados e Hiperóxia
GPx - Glutaciona peroxidase
GRd – Glutaciona redutase
GSH – Glutaciona reduzida
GSSG – Glutaciona oxidada
H₂O- Água
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄- Ácido sulfúrico
HCl – Ácido clorídrico
HE – Hematoxilina e eosina
IA: Índice de adiposidade

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- Interferon
IL- Interleucina
IMC- Índice de Massa Corpórea
JNK- Jun N-terminalquinase
KH₂PO₄ – Fosfato de potássio monobásico
L- litro
LABNEX- Laboratório de Nutrição Experimental
LAPAC- Laboratório Piloto de Análises Clínicas
LBA- Lavado broncoalveolar
MCP1-Proteína quimiotática de monócitos
Mg- Miligramas
min- Minuto
MTT- Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difenilterazoli
N₂-Nitrogênio
Na₂HPO₄ – Fosfato de sódio
NaCl – Cloreto de sódio
NADPH- Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina.
NFκB- Fator nuclear kappa B
NO^{*} – Óxido nítrico
NRC- National Research Council
O₂- Oxigênio
O₂⁻-Ânion superóxido
OH - Radical hidroxila
OH^{*} – Radical hidroxila
OMS- Organização Mundial de Saúde (OMS)
ONOO⁻ - Ânion peroxinitrito
PaO₂- Pressão parcial de oxigênio
PBS – Tampão fosfato-salino
PCR- Proteína C Reativa
POF- Pesquisa de Orçamentos Familiares
RCQ- Razão cintura e quadril
RO•- Radicais alcoxil
ROO•- Radicais peroxil
SaO₂- Saturação de oxigênio
SARA- Síndrome da angústia respiratória aguda
SBPT- Sociedade brasileira de pneumologia e fisiologia
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SNC- Sistema nervoso central
SOD- Superóxido dismutase
SRI-1 Substato1 do receptor de insulina
SSA- Ácido de sulfosalicílico

TAB- Tecido adiposo branco
TAE- Tecido adiposo epididimal
TAM- Tecido adiposo mesentérico
TAP- Tecido adiposo periuterino
TAR- Tecido adiposo retroperitonal
TBA - Ácido tiobarbitúrico
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA – Ácido tricloroacético
TGF β - Fator de transformação de crescimento
TNB- 5-tio-2-ácido nitrobenzóico
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
TNF- β - Fator de necrose tumoral beta
TOTG- Teste oral de tolerância à glicose
TRL- Toll-like
UFOP- Universidade Federal de Ouro Preto
UV- Ultravioleta
Vva - Densidade de volume de alvéolo
Vvsa- Densidade de volume do septo alveolar
 γ - Gama

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Obesidade.....	4
2.1.1 Prevalência	4
2.1.2 Medidas de adiposidade	5
2.1.3 Tecido adiposo	5
2.1.4 Obesidade e citocinas	6
2.1.5 Mecanismos que relacionam a obesidade à inflamação e resistência à insulina.....	8
2.2 Hiperóxia	10
2.2.1 Sistema respiratório.....	10
2.2.2 O oxigênio e seu transporte.....	12
2.2.3 A oxigenoterapia e a lesão pulmonar induzida pela hiperóxia.....	13
2.3 Desequilíbrio Redox	15
2.3.1 Radicais livres, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	15
2.3.2 Defesas antioxidantes.....	16
2.3.3 Hiperóxia, espécies reativas e dano celular.....	18
2.3.4 Estresse oxidativo na obesidade.....	21
3.0 OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo Geral.....	22
3.2 Objetivos específicos	22
4. METODOLOGIA.....	23
4.1 Desenho experimental.....	23
4.1.1 Animais	23
4.1.2 Composição das Dietas	24
4.1.3 Ingestão alimentar e controle de massa corporal	24
4.2 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG).....	25
4.3 Exposição ao oxigênio	25
4.4 Eutanásia.....	26

4.5 Coleta do Sangue	26
4.5.1 Esfregaço sanguíneo.....	26
4.5.2 Contagem diferencial de leucócitos do sangue	27
4.5.3 Hemograma	27
4.5.4 Análises bioquímicas do plasma sanguíneo	27
4.6 Coleta do Lavado Broncoalveolar (LBA).....	27
4.6.1 Contagem total e diferencial de leucócitos do LBA	28
4.7 Pulmões.....	28
4.7.1 Homogeneizado pulmonar	28
4.7.2 Processamento do tecido	28
4.7.3 Análises morfométricas: Estereologia do pulmão.....	29
4.8 Tecido adiposo	29
4.8.1 Índice de Adiposidade Corporal (IAC).....	29
4.8.2 Ensaio imunoenzimático do TAE	29
4.8.3 Análises histológicas e morfométricas do TAE	30
4.9 Análises do estresse oxidativo	31
4.9.1 Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	31
4.9.2. Proteínas totais	32
4.9.3 Atividade da catalase.....	33
4.10 Análise do dano causado pela oxidação lipídica	34
4.10.1 Dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	34
4.11. Análise estatística	34
5. RESULTADOS	35
5.1 Ingestão alimentar e ganho de massa corporal	35
5.2 Índice de adiposidade corporal e área dos adipócitos.....	37
5.3 Metabolismo de glicose e colesterol.....	38
5.4 Contagem total e diferencial de células no LBA	39
5.5 Contagem total e diferencial de células do sangue	40
5.6 Hemograma e análises bioquímicas do sangue.....	41
5.7 Ensaio imunoenzimático do Tecido Adiposo Epididimal	42

5.8 Avaliações estereológicas do parênquima pulmonar dos grupos experimentais	43
5.9 Análise histopatológica.....	43
5.10 Análises do Estresse e dano causado pela oxidação	44
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÕES	52
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
9. ANEXOS	66

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a obesidade é uma doença de etiologia multifatorial com influências genéticas, sociais e ambientais. De maneira geral, pode ser considerada como um desequilíbrio positivo a favor da quantidade de energia ingerida em comparação com a energia gasta ou como um acúmulo excessivo de gordura corporal em extensão tal, que acarreta prejuízos à saúde dos indivíduos (WHO, 2000).

Segundo a WHO (2010), a prevalência da obesidade aumentou rapidamente nas últimas décadas, podendo ser considerada uma epidemia mundial. No ano de 2005, 54,7 % dos homens e 62,3 % das mulheres na faixa etária de 30 a 100 anos, apresentavam-se com sobrepeso ou obesidade e em 2014, mais de 1,9 bilhões de adultos com no mínimo 18 anos, estavam acima do peso. Destes, mais de 600 milhões eram obesos. Em Porcentagem, esses valores correspondem 39% de sobrepeso e 13% de obesidade. Em relação às condições socioeconômicas e sexo, estudos mostraram que em famílias com menor renda e pessoas do sexo feminino são observadas uma maior prevalência da obesidade (Stunkard, 2000; Mokhtar *et al.*, 2001).

Desta forma essa doença se encontra em uma situação preocupante, uma vez que está fortemente relacionada a alterações metabólicas como dislipidemias, hipertensão arterial, intolerância à glicose, diabetes, arteriosclerose, insuficiência cardíaca e diversos tipos de cânceres (Bray *et al.*, 2009; Marinou *et al.*, 2010; Rotella e Dicembrini, 2015). Ela também é responsável por diversas conseqüências econômicas, já que aumenta o risco de desenvolvimento de outras doenças que diminuem a qualidade e expectativa de vida (Salve, 2006).

A obesidade em humanos pode ser diagnosticada através de várias formas como, por exemplo, o índice de massa corpórea (IMC) que é calculado dividindo a massa corporal (em quilograma) pela estatura ao quadrado (em metros), como mostra a seguinte fórmula: $IMC = \frac{\text{Peso}}{(\text{altura})^2}$ (WHO, 1998). Se o resultado dessa equação for entre 30 a 34,9; 35 a 39,9 ou ≥ 40 o indivíduo será classificado com obesidade grau I, II ou III respectivamente (James *et al.*, 2001). Entretanto, o IMC desconsidera a composição da massa corporal, desta forma um atleta com massa muscular elevada, pode ser considerado obeso. Neste contexto esse

parâmetro não deve ser considerado uma medida isolada para o diagnóstico de obesidade e deve ser complementado com outros métodos como a medida de pregas cutâneas, densitometria, bioimpedância, imagem por ressonância magnética e espectroscopia (Barrios *et al.*, 2011).

Em modelos experimentais de camundongos, a obesidade pode ser calculada pelo índice de adiposidade (IA) que é obtido pela soma do tecido adiposo periuterino (TAP) ou tecido adiposo epididimal (TAE), tecido adiposo retroperitoneal (TAR) e tecido adiposo mesentérico (TAM) dividido pela massa corporal vezes cem, conforme mostra a fórmula a seguir:

$$IA = (TAP \text{ ou } TAE + TAR + TAM) / \text{massa corporal} \times 100 \text{ (Oliveira } et al., 2013).$$

Segundo Harold (2000), o modelo de obesidade experimental que mais se assemelha a obesidade humana está condicionado a alimentos palatáveis com alto teor de carboidratos refinados e lipídeos (Harrold *et al.*, 2000), sendo esses macronutrientes, responsáveis em parte pela inflamação sistêmica crônica de baixa intensidade encontrada nos quadros de obesidade (Bourlier e Bouloumie, 2009). Os carboidratos acionam enzimas lipogênicas devido à ativação da proteína de ligação ao elemento responsivo ao carboidrato (ChREBP) favorecendo o desenvolvimento da obesidade (Benhamed, Poupeau e Postic, 2013). Na obesidade, os adipócitos liberam ácidos graxos livres (AGL) que ativam as vias de sinalização inflamatórias. Os AGL, ao se ligarem a receptores para macrófagos na membrana celular, ativam um complexo de enzimas quinases que codificam as proteínas envolvidas na resposta inflamatória como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), essas, por sua vez, ativam adipócitos induzindo a lipólise, liberando mais ácidos graxos e vários genes inflamatórios (Arkan *et al.*, 2005; Hajer, Van Haeften e Visseren, 2008; Karalis *et al.*, 2009). O TNF- α aciona a via de proteínas quinases ativadas por mitógenos responsável pela transcrição de genes inflamatórios (Bastos *et al.*, 2009) e pode ainda estimular a infiltração e o acúmulo de macrófagos nos adipócitos como consequência do processo inflamatório na obesidade (Tateya *et al.*, 2010). Além desses mecanismos descritos, a obesidade leva um aumento do tamanho (hipertrofia), assim como do número (hiperplasia) dos adipócitos o que acarreta em uma hipoperfusão e hipóxia tecidual (Leite e Sarni, 2003; Hosogai *et al.*, 2007). Esse processo levará a uma diminuição na produção de adiponectina e aumento de citocinas pró-inflamatórias caracterizando a inflamação (Wajchenberg *et al.*, 2009; Tateya *et al.*, 2010).

Comumente na prática clínica, pacientes obesos com comorbidades como insuficiência respiratória e cardíaca (Wong e Marwick, 2007; Rotella e Dicembrini, 2015) são submetidos à suplementação de oxigênio (Branson e Johannigman, 2013). Entretanto, deve-se seguir um criterioso método para avaliar a necessidade, tempo e quantidade de administração dessa manobra terapêutica, uma vez que o oxigênio em altas concentrações (hiperóxia) pode levar a lesão pulmonar hiperóxica aguda e ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS) e como consequência um processo inflamatório e o desequilíbrio redox (Valença, S. *et al.*, 2007; Nagato *et al.*, 2012).

A obesidade e hiperóxia são conhecidas levarem um aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) (Chang, H.-P. *et al.*, 2011; Bonomini, Rodella e Rezzani, 2015). As EROs podem ser de origem exógena ou endógena sendo esta última formada normalmente no nosso organismo como resultado do metabolismo celular (Halliwell e Gutteridge, 2006; Bindoli e Rigobello, 2013). Desse modo, em baixas a moderadas concentrações, funcionam em processos celulares fisiológicos e possuem um papel benéfico nos organismos aeróbios, participando da regulação da sinalização celular e da expressão gênica, determinantes de mecanismos apoptóticos. Entretanto, em concentrações elevadas, causam danos aos componentes celulares, tais como lipídios, proteínas e o ácido desoxirribonucléico (DNA) (Bindoli e Rigobello, 2013). Para contrabalancear essas espécies reativas, as células possuem um sistema de defesa antioxidante que podem ser de origem enzimática e não enzimática. As enzimas envolvidas na proteção antioxidante primária do organismo humano constituem uma proteção intrínseca e incluem principalmente a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx) (Halliwell e Gutteridge, 2006; Cantin e Richter, 2012; Bindoli e Rigobello, 2013).

Atualmente, o oxigênio medicinal é rotineiramente prescrito na prática clínica sem uma avaliação cuidadosa dos seus potenciais efeitos colaterais. Por se tratar de uma substância com finalidades terapêuticas, deve-se estabelecer uma atenção especial para a utilização do oxigênio em altas concentrações, pois a hiperóxia induz, no tecido pulmonar, danos oxidativos à matriz extracelular, às células epiteliais e endoteliais, além de induzir a inflamação pulmonar (Valença, S. *et al.*, 2007; Nagato *et al.*, 2009; Nagato *et al.*, 2012), e em pacientes obesos que já apresentam uma inflamação crônica de baixa intensidade (Chang, H.-P. *et al.*, 2011) e aumento de EROs (Bonomini, Rodella e Rezzani, 2015), esse quadro pode ser agravado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Obesidade

2.1.1 Prevalência

Sobrepeso e obesidade são definidos como o acúmulo excessivo de gordura que pode ser prejudicial à saúde e são resultantes do desequilíbrio energético, no qual a ingestão de energia é maior do que a gasta pelo organismo (Hajer, Van Haefen e Visseren, 2008; Marinou *et al.*, 2010). A obesidade tem origem multicausal, relacionada a fatores genéticos e ambientais e estudos epidemiológicos mostraram que a incidência e prevalência dessa doença estão fortemente correlacionadas com o aumento no consumo de alimentos calóricos (Zou e Shao, 2008).

A obesidade é considerada nos últimos tempos um dos maiores problemas de saúde pública mundial. O seu agravamento é devido a sua associação com diversas comorbidades como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares (DCV), distúrbios músculo-esqueléticos e alguns tipos de câncer como do endométrio, mama e colo (Bray *et al.*, 2009; Marinou *et al.*, 2010). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a obesidade em todo o mundo mais do que duplicou desde 1980. Em 2005 aproximadamente 1,6 bilhões de adultos maiores de 18 anos tinham sobrepeso e mais de 400 milhões eram obesos (WHO, 2000; Bray *et al.*, 2009). Em 2014, mais de 1,9 bilhões de adultos com no mínimo 18 anos, estavam acima do peso. Destes, mais de 600 milhões eram obesos. Em Porcentagem, esses valores correspondem 39% de sobrepeso e 13% de obesidade. Nos dias atuais, a maior parte da população mundial vive em países onde o excesso de peso e obesidade matam mais pessoas do que o baixo peso (WHO, 2015).

No Brasil, segundo a WHO (2015) em 2008, 52,8% da população sendo 53,5% dos homens e 52,0% das mulheres apresentavam-se com sobrepeso e 19,5% (16,5% do sexo masculino e 22,1% do sexo feminino) apresentavam-se obesos (WHO, 2015).

Os resultados de antropometria e estado nutricional da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) realizada em parceria com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2008-2009, também observou um considerável aumento de massa corporal desde 1974. Segundo esse estudo, o excesso de peso nas mulheres cresceu de

28,7% em 1974-75 para 48% em 2008-09 e entre os homens, de 18,5% para 50,1%. Já a obesidade aumentou mais que o dobro entre as mulheres, de 8% para 16,9% e mais de quatro vezes entre os homens, de 2,8% para 12,4%. Esse quadro de sobrepeso foi observado em todas as regiões brasileiras. Sendo mais perceptível na Região Nordeste para as mulheres: de 19,5% para 46% e no Sul para os homens: de 23% para 56,8% (IBGE, 2010).

2.1.2 Medidas de adiposidade

Vários métodos que quantificam a massa adiposa total ou estimam através do padrão de distribuição de gordura corporal podem ser usados para o diagnóstico de sobrepeso ou obesidade. Podendo ser diretos: Dual Energy X-Ray Absorptiometry (DEXA), ressonância magnética ou tomografia computadorizada; ou indiretos: antropometria e pregas cutâneas. Os métodos diretos são mais caros e pouco viáveis e, por esse motivo, na prática clínica e em estudos de base populacional normalmente são utilizados os indiretos (Abeso, 2009).

2.1.3 Tecido adiposo

O tecido adiposo é um tecido heterogêneo e pode ser dividido, por dois citotipos funcionalmente distintos, em tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom, sendo o TAB composto por diversos tipos celulares, tais como, adipócitos e pré-adipócitos, células endoteliais, macrófagos, células do estroma vascular e fibroblastos (Bastos *et al.*, 2009; Prado *et al.*, 2009). O TAB proporciona uma capacidade ilimitada de armazenar triglicerídeos, sendo vital para a sobrevivência de vários seres vivos e seus principais depósitos estão localizados na região subcutânea e ao redor das vísceras (Prado *et al.*, 2009).

Durante a refeição com o aumento de lipídeos e glicose e como consequência a liberação de insulina, há um estímulo para a formação e armazenamento de triglicerídeos no fígado e no TAB. De forma inversa, a queda de insulina durante o jejum estimula a lipólise e glicogenólise pela ativação do sistema nervoso simpático e elevação de glucagon, epinefrina e glicocorticóides. Desta forma, o corpo garante um suprimento adequado de glicose para o cérebro e órgãos vitais (Hajer, Van Haefte e Visseren, 2008).

Durante muitos anos o tecido adiposo foi considerado um tecido com função apenas de isolamento térmico, amortecimento do corpo e armazenamento de energia (Hajer, Van

Haeften e Visseren, 2008). Entretanto, em 1994 com a descoberta do gene *ob*, e a clonagem de seu produto genético, a leptina, pelo grupo de Friedman, da Rockefeller University, o tecido adiposo passou a ser reconhecido pelo seu papel endócrino (Zhang *et al.*, 1994; Hauner, 2004; Karalis *et al.*, 2009). A leptina é uma proteína que possui 167 aminoácidos e peso molecular de 16 kd produzida e secretada quase que exclusivamente pelos adipócitos do tecido adiposo branco e em menor parte pelo tecido adiposo marrom. Ela circula no plasma de forma livre ou ligada a proteínas e age no sistema nervoso central (SNC) tendo como função promover a saciedade, incrementar o metabolismo energético, além de afetar eixos hipotalâmico-hipofisários e regular mecanismos neuroendócrinos. Como consequência promove uma diminuição da ingestão alimentar e o aumento do gasto energético, além de regular a função neuroendócrina e incrementar o metabolismo de glicose e de gorduras (Kershaw e Flier, 2004). Estudos demonstraram que camundongos do gene (*ob/ob*) que são geneticamente obesos não possuem o gene para a expressão da leptina e, por isso, desenvolvem hiperfagia e acúmulo progressivo de gordura corporal. (Kershaw e Flier, 2004). Entretanto, em humanos observa-se que as concentrações circulantes dessa adipocina estão exacerbadas, demonstrando que a obesidade leva a resistência a leptina. O mecanismo no qual essa resistência se desenvolve ainda é desconhecido, mas acreditam ser resultantes de defeitos de sinalização da leptina ou do transporte através da barreira hematoencefálica (Kershaw e Flier, 2004; Dâmaso *et al.*, 2006; Karalis *et al.*, 2009).

2.1.4 Obesidade e citocinas

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares hidrossolúveis que regulam o crescimento, a ativação das células imunes e que medeiam às respostas inflamatórias bem como imunológicas normais e patológicas (Prado *et al.*, 2009). As citocinas são produzidas por diversas células no local da lesão e por células do sistema imunológico como monócitos e macrófagos através da ativação de proteinoquinases ativadas por mitógenos. Podem ainda ser produzidas e secretadas por adipócitos, sendo denominadas adipocinas e os seus níveis séricos refletem-se na quantidade de tecido adiposo. A ação ocorre tanto *in loco* (ação autócrina ou parácrina) como sistemicamente (ação endócrina). A critério de classificação são divididas nas seguintes categorias: interferons (IFN), interleucinas (IL), fator de necrose tumoral alfa e beta (TNF- α e TNF- β), fator de transformação de crescimento (TGF β) e fator estimulador de colônias (CSF) (Karalis *et al.*, 2009). Dessas, várias estão

relacionadas com a obesidade como, por exemplo, a leptina, o TNF- α , as Interleucinas 6, 8, 10 e 18 (IL-6, IL-8, IL-10, IL-18) e a adiponectina (Hajer, Van Haeften e Visseren, 2008).

O TNF- α é uma citocina que foi isolada pela primeira vez em 1975 por Carswell e colaboradores (Carswell *et al.*, 1975) e está presente na resposta imunológica mediada por células. É sintetizado por macrófagos infiltrados no tecido adiposo de animais e humanos obesos. Desta forma, encontra-se elevado na obesidade (Khan, 2008). O TNF- α tem efeitos distintos sobre o tecido adiposo, incluindo a indução de resistência à insulina, produção de leptina, estimulação da lipólise, supressão de lipogênese e comprometimento da diferenciação de pré-adipócitos *in vitro*. Esses efeitos contribuem para a diminuição do tamanho e número dos adipócitos limitando o aumento da massa de gordura. Prins *et al* (1997) mencionaram que para tentar controlar a adiposidade o TNF- α induz a apoptose dos pré-adipócitos humanos o que agrava a inflamação existente (Prins *et al.*, 1997).

A IL-6 é uma citocina produzida pelo tecido adiposo, fibroblastos, monócitos e células endoteliais em resposta ao trauma, queimadura, dano tecidual e inflamação e está relacionada a vários processos como resposta imune, reprodução, metabolismo ósseo e envelhecimento (Khan, 2008). A IL-6, o TNF α e a leptina promovem o aumento da Proteína C Reativa (PCR), uma proteína de fase aguda produzida principalmente no fígado. A IL-6 é a citocina que estimula a síntese e secreção da PCR pelos hepatócitos, portanto, o aumento da adiposidade promove a elevação dos níveis de IL-6 e, conseqüentemente, o aumento da PCR (Bahceci *et al.*, 2007). Um estudo realizado por Lieb et al (2009) demonstraram que filhos não-obesos de pais com obesidade apresentavam níveis de PCR alterados, desta forma, o estado pro-inflamatório da obesidade não é só consequência como também um precursor do processo inflamatório (Lieb *et al.*, 2009).

A IL-8 é uma citocina pro-inflamatória produzida principalmente pelos macrófagos e monócitos desempenhando papel fundamental na modulação da resposta inflamatória. Pode ainda ser secretada por adipócitos humanos e está correlacionada positivamente com a obesidade. Tem como uma de suas funções promover a adesão dos monócitos ao endotélio vascular, sendo, portanto um fator de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Strackowski *et al.*, 2002).

A IL-18 é uma citocina pró inflamatória, que promove a produção de vários mediadores pró-inflamatórios e desempenha um papel no câncer e várias doenças infecciosas.

Essa interleucina foi inicialmente identificada como sendo da classe do Interferon Gama (IFN- γ) e é produzida por diversas células incluindo macrófagos, células dendríticas, células epiteliais intestinais, fibroblastos sinoviais, queratinócitos, células de Kupffer, micróglias e osteoblastos. Assim como outras citocinas pro-inflamatórias existe uma diminuição dos níveis de IL-18 com a redução da massa corporal (Esposito *et al.*, 2003; Khan, 2008).

A IL-10 é uma citocina que possui papel regulatório e anti-inflamatório, secretada por adipócitos, macrófagos, células T auxiliares do tipo 2 (TH2) e mastócitos. Essa citocina é importante uma vez que inibe outras citocinas envolvidas no processo inflamatório como, por exemplo, as Interleucinas 1, 2, 3 e 12, Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e Interferon gama (IFN- γ). Para que a IL-10 exerça sua função é necessário que ela interaja com seus receptores específicos (IL-10R1 e IL-10R2). Após sua ligação ao receptor ocorre a ativação das vias de tirosina quinase (JAK 1 e JAK 2) e, como consequência, a indução dos fatores de transcrição STAT 1, 3 e 5 (Khan, 2008). Acredita-se que a presença dessa citocina na obesidade tem como função limitar o estado inflamatório causado pela adiposidade, uma vez que possui o papel de regular a produção de citocinas pro-inflamatórias produzidas por macrófagos e linfócitos (Esposito *et al.*, 2003).

A adiponectina, ou proteína complementar relacionada com adipócito (Acrp 30) é uma citocina homóloga ao TNF- α em relação a sua estrutura, entretanto com propriedades anti-inflamatórias, anti-aterogênicas e anorexígena. A sua resposta anti-inflamatória parece ser mediada pelas concentrações de outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, a proteína C reativa (PCR) e o TNF- α . A adiponectina é o fator mais abundante produzido exclusivamente pelo tecido adiposo, apresentando-se mais elevado em pessoas do sexo feminino e ao contrario da maioria das adipocinas encontra-se em baixos níveis plasmáticos em pessoas obesas e diminui com o ganho de massa corporal (Arita *et al.*, 1999; Prado *et al.*, 2009).

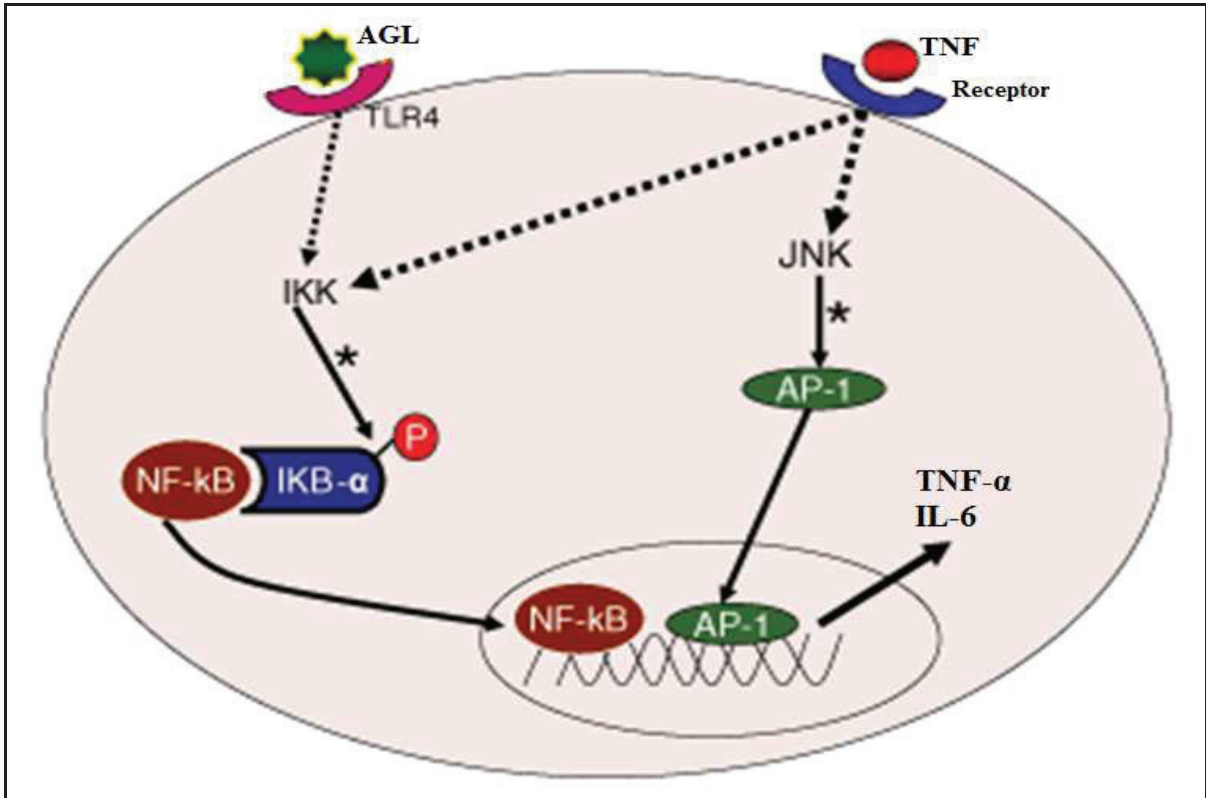
2.1.5 Mecanismos que relacionam a obesidade à inflamação e resistência à insulina

Desde os anos 1950, estudos epidemiológicos mostraram uma associação da obesidade com a inflamação, entretanto os mecanismos subjacentes a esse processo permaneceu desconhecidos por várias décadas (Karalis *et al.*, 2009). Ainda não está esclarecido se a inflamação é causa ou consequência da obesidade (Prado *et al.*, 2009). Um dos mecanismos no qual a obesidade pode levar a inflamação é descrito a seguir: na obesidade há um aumento

do tamanho (hipertrofia), assim como do número (hiperplasia) dos adipócitos e, como consequência, uma hipoperfusão que acarreta em um processo de hipóxia (Leite e Sarni, 2003; Hosogai *et al.*, 2007). Esta por sua vez, levará a uma diminuição na produção de adiponectina e aumento de citocinas pró-inflamatórias como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) que tem como função promover a infiltração de monócitos. Esses, na presença do fator estimulador de colônias 1 (CSF-1) serão posteriormente diferenciados em macrófagos. Os macrófagos vão então segregar várias citocinas pró-inflamatórias provocando um estado crônico de inflamação de baixa intensidade (Wajchenberg *et al.*, 2009; Tateya *et al.*, 2010).

A hipóxia provocada pela obesidade causa ainda um desequilíbrio de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, a ativação de Jun N-terminal quinases (JNK). Uma vez ativado, o JNK fosforila em serina o subdomínio do receptor de insulina (IRS-1) fazendo com que não haja a fosforilação em tirosina desse receptor provocando o desenvolvimento de resistência à insulina (Karalis *et al.*, 2009).

Os ácidos graxos livres (AGL) também podem ativar as vias de sinalização inflamatórias. Na obesidade, os adipócitos liberam mais AGL que podem se ligar a receptores para macrófagos como o receptor Toll-like 4 (TLR-4) e induzir a ativação de um complexo de enzimas quinases que irão fosforilar a I κ B-alfa, uma proteína reguladora que inibe o fator nuclear kappa-B (NF κ B), através do complexo I κ B- α /NF κ B. Uma vez fosforilada, a I κ B- α se desprende do NF κ B e o mesmo é translocado do citosol para o núcleo onde promove a ativação de genes que codificam proteínas envolvidas na resposta inflamatória. Quanto maior a adiposidade, maiores são os níveis de NF κ B, e conseqüentemente, um aumento de citocinas inflamatórias como o TNF- α e IL-6. Por sua vez, o TNF- α ativa adipócitos humanos o que induz a lipólise, liberando AGL, o que aumenta ainda mais a expressão de vários genes inflamatórios (Arkan *et al.*, 2005; Hajer, Van Haeften e Visseren, 2008; Karalis *et al.*, 2009). O TNF- α também ativa a via de proteínas quinases ativadas por mitógenos, como a Jun N-terminal kinase (JNK) que fosforila a proteína ativadora 1 (AP-1) responsável por ativar a transcrição de genes inflamatórios (Bastos *et al.*, 2009) (Figura 1). O TNF- α pode ainda estimular o MCP-1 a promover infiltração e acumulação de macrófagos e, conseqüentemente, o processo inflamatório na obesidade (Tateya *et al.*, 2010).



Fonte: adaptado de Bastos et al. (2009).

Figura 1. Mecanismo da obesidade associado à inflamação.

AGL: ácidos graxos livres; AP-1: proteína ativadora 1; IL-6: Interleucina 6; NFκB: fator nuclear kappa-B; IKK: complexo de enzimas quinases; IκB-α: inibidor do kappa-B alfa; JNK: Jun N-terminal kinase; TNF: fator de necrose tumoral.

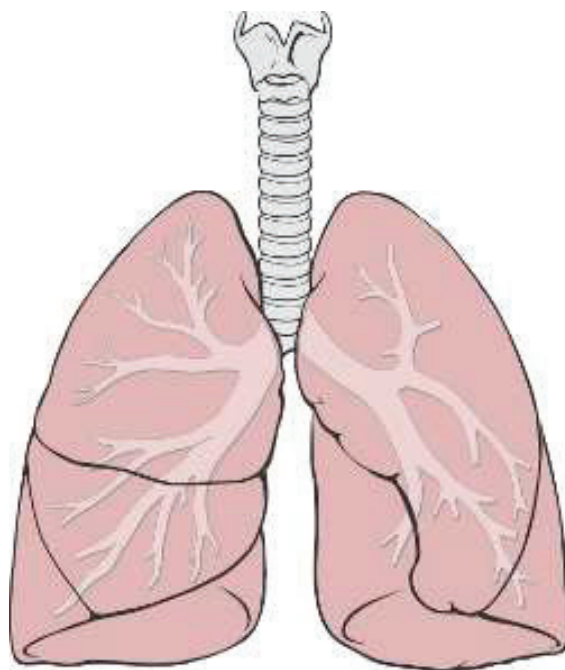
2.2 Hiperóxia

2.2.1 Sistema respiratório

O sistema respiratório é o sistema responsável pelas trocas gasosas do organismo com o ar atmosférico, assegurando permanente concentração de oxigênio no sangue, necessária para as reações metabólicas assim como, pela eliminação do gás carbônico que resultam dessas reações (Moore e Dalley, 2007; Tortora, 2007). Esse sistema é constituído pela porção de condução, formada pelo nariz, faringe, laringe, traquéia e brônquios os quais são responsáveis por levar o ar inspirado até a porção respiratória, representada pelos pulmões, local aonde ocorrem às trocas gasosas. Os músculos que formam a cavidade torácica e as pleuras, membranas que protegem os pulmões, também fazem parte desse sistema (Moore e Dalley, 2007; Tortora, 2007). Os pulmões são órgãos vitais da respiração e são responsáveis

pelas trocas de gases (hematose), encontram-se no interior do tórax, estendem-se do diafragma até um pouco acima das clavículas e estão justapostos às costelas. Em pessoas saudáveis, são macios, leves, elásticos e esponjosos (Moore e Dalley, 2007; Tortora, 2007). O pulmão direito é o mais espesso, mais largo e mais curto do que o esquerdo. Ele possui três lobos que são separados por uma fissura horizontal que separa o lobo superior do lobo médio e uma oblíqua que separa lobo inferior dos lobos médio e superior. Já o pulmão esquerdo só possui dois lobos, o superior e inferior que são separados por uma fissura denominada de fissura oblíqua (Figura 2) (Moore e Dalley, 2007; Tortora, 2007).

Os pulmões de uma pessoa adulta pesam aproximadamente 700 gramas e possuem 25 centímetros de altura. Possuem uma forma piramidal apresentando um ápice, uma base, três margens e três faces. O Ápice do Pulmão está voltado cranialmente e tem forma levemente arredondada. Apresenta um sulco percorrido pela artéria subclávia, denominado sulco da artéria subclávia. No corpo, o ápice do pulmão atinge o nível da articulação esternoclavicular. A base do pulmão está sobre o músculo diafragma e apresenta uma forma côncava. Devido à presença do fígado a concavidade da base do pulmão direito é mais profunda que a do esquerdo. As margens dos pulmões são denominadas posterior, anterior e inferior. A margem posterior é romba e projeta-se na superfície posterior da cavidade torácica. A margem anterior é delgada e estende-se à face ventral do coração. No pulmão esquerdo, essa margem apresenta uma incisura produzida pelo coração, à incisura cardíaca. A margem inferior apresenta duas porções uma delgada que se projeta no recesso costofrênico, e outra que é mais arredondada e projeta-se no mediastino. As faces dos pulmões são denominadas costal, diafragmática e mediastínica. A face costal ou lateral é uma face relativamente lisa e convexa, voltada para a superfície interna da cavidade torácica. A face diafragmática ou inferior é côncava e repousa sobre a cúpula diafragmática. Já a face mediastínica ou medial, possui uma região côncava onde se acomoda o coração. Dorsalmente, encontra-se a região denominada hilo ou raiz do pulmão (Figura 2) (Moore e Dalley, 2007; Tortora, 2007).



Fonte: Nature (2010).

Figura 2. Partes constituintes do pulmão.

2.2.2 O oxigênio e seu transporte

Basicamente, a atmosfera terrestre é constituída de uma mistura gasosa de 79,03% de dióxido de carbono (CO_2); 20,93% de oxigênio (O_2) e 0,04% de nitrogênio (N_2). A pressão parcial de cada gás constituinte é proporcional à quantidade desse gás na mistura e ao seu número de moléculas, assim, quanto mais moléculas, maior será a sua pressão parcial (Ac. e Je., 2002; Guyton e Hall, 2002; Aires, 2012).

O oxigênio, representado pelo símbolo O, é um calcogênio da família VI a da tabela periódica. Possui número atômico 8 e massa atômica 15,9994 g/mol. Na sua forma molecular (O_2) é um gás incolor, inodoro, pouco solúvel em água e está presente na natureza sob a forma de três isótopos estáveis: o oxigênio 16 (99,75%); o oxigênio 17 (0,37%) e o oxigênio 18 (0,20%). Na presença, de substâncias catalisadoras ou ao receber calor, o O_2 reage com grande parte dos elementos químicos originando diversos compostos (Cook e Lauer, 1968). O transporte de oxigênio do ar para as mitocôndrias celulares ocorre através de vários passos. O sistema deve ser eficiente em termos energéticos (evitando trabalho desnecessário cardiorrespiratório), e permitir o transporte de oxigênio em toda a matriz do tecido extravascular. Ao nível dos tecidos, as células devem extrair oxigênio do ambiente

extracelular e usá-lo em processos metabólicos celulares. A maior parte do O₂ é transportada nas hemácias, combinados à hemoglobina e apenas a menor parte permanece no plasma (Treacher e Leach, 1998). Os níveis mais elevados do que a pressão parcial de oxigênio fisiológico nos pulmões ou outros tecidos do corpo é denominado hiperóxia (Birben *et al.*, 2012).

2.2.3 A oxigenoterapia e a lesão pulmonar induzida pela hiperóxia

O oxigênio suplementar vem sendo utilizado desde a sua descoberta feita por Priestley e Lavoisier em 1775. A oxigenoterapia pode ser definida como a oferta de oxigênio acima da porcentagem presente no ar ambiente, aproximadamente 21%, e é indicada para muitos pacientes com hipoxemia a fim de evitar os efeitos prejudiciais da hipóxia ao organismo. O principal objeto da oxigenoterapia é manter a pressão parcial de oxigênio (PaO₂) no sangue arterial em valores normais ou próximos dos normais, assim como alcançar uma saturação de oxigênio (SaO₂) acima de 90% de forma que a PaO₂ esteja superior a 60 mmHg, e como consequência, obter um melhor metabolismo aeróbico (Treacher e Leach, 1998). Dados recentes de uma pesquisa no Reino Unido sugerem que, em determinado momento, 18% dos pacientes internados recebem oxigênio (O'driscoll *et al.*, 2011). Um pequeno estudo em Victoria, na Austrália sobre o fornecimento de oxigênio mostrou que quase a metade dos pacientes receberam oxigênio, sendo que as principais razões para a sua administração foram dispnéia (40%), dor torácica (35%) e hipoxemia (30%). Esse estudo mostrou ainda que os pacientes que receberam oxigênio eram mais velhos, possuíam mais chances de ter chegado de ambulância e mais propensos a ser internado no hospital (Branson e Johannigman, 2013). Utilizando-se de baixo fluxo de oxigênio, a oxigenoterapia é ofertada ao paciente, fornecendo oxigênio por meio de um fluxo inferior a demanda do paciente de modo diluir o O₂ fornecido com o gás inspirado (Rego e Anchieta, 2005).

Nos sistemas de baixo fluxo estão presente, cateter nasal, máscara facial simples (máscara de Venturi) e transtraqueal (máscara laríngea). Outro sistema utilizado, é o sistema de alto fluxo, que sobrepuja a demanda inspiratória de oxigênio do paciente, podendo regular a fração inspiratória de oxigênio (FiO₂) de acordo com as necessidades terapêuticas (Moraes e Barbeiro, 2012). No trabalho realizado por Robert *et al* (2001), onde avaliaram a hipótese de diminuir a resistência vascular pulmonar de cardiopatas com hipertensão pulmonar, utilizando oxigenoterapia com FiO₂ a 100%, ocorreu uma potencial vasodilatação da circulação pulmonar e um aumento da SaO₂, sendo incluído a prescrição de oxigenoterapia como método

terapêutico para essa disfunção (Roberts *et al.*, 2001). Segundo o II Consenso de Ventilação Mecânica (2000), o uso de concentrações de FiO₂ acima de 60% dentro de ambientes de cuidados intensivos e suporte ventilatório artificial, pode produzir efeitos secundários, sendo que, dentro desses efeitos estão presentes a alteração da formação de surfactante, os efeitos citotóxicos, as traqueobronquites, a síndrome da angústia respiratória aguda (SARA), entre outras (SBPT, 2000). A indicação da oxigenoterapia deve ter objetivos e metas definidos, como o sistema pelo qual será administrado o O₂, o tempo de permanência do paciente com esse suplemento e qual o fluxo (O₂) ofertado ao paciente; pois, o oxigênio é uma droga e deve ser prescrito e monitorizado constantemente, utilizando da coleta de gasometria arterial e registros de SaO₂ (SBPT, 2000). Segundo a Sociedade brasileira de pneumologia e fisiologia (SBPT), a toxicidade e efeitos colaterais no uso contínuo do oxigênio, principalmente a oxigenoterapia domiciliar prolongada, pode ocorrer quando usado frações de O₂ superiores a 50% por longo períodos, sendo que, é extremamente recomendável o uso do menor fluxo de O₂ contínuo, sendo, que a principal recomendação seja, a manutenção adequada da SaO₂ (SBPT_a, 2000).

Uma das principais doenças causadas pela toxicidade do O₂ é a displasia broncopulmonar, doença essa, associada a hospitalizações frequentes e prolongadas de lactentes expostos à ventilação mecânica invasiva (intubação orotraqueal) e a ventilação mecânica não invasiva ou por suporte de oxigênio (Monte *et al.*, 2005). Na prática clínica o oxigênio suplementar tem sido utilizado nas doenças pulmonares e cardíacas na tentativa de reverter a hipoxemia. Entretanto, deve-se seguir um criterioso método para avaliar a necessidade, tempo e quantidade de administração dessa droga. Todavia, o oxigênio é rotineiramente ofertado sem antes serem avaliados os seus potenciais benefícios e efeitos colaterais. Os danos oxidativos induzidos pelo oxigênio suplementar em altas concentrações têm sido mencionados como o fator de disparo para a instalação de lesões pulmonares, como por exemplo o edema pulmonar não cardiogênico, a formação de membrana hialina, o dano ao pneumócito tipo I, a hiperplasia do pneumócito tipo II, a infiltração neutrofílica, a hemorragia alveolar e o aumento da espessura do septo. Estudos mostraram que a hiperóxia é prejudicial (Valença, S. *et al.*, 2007; Nagato *et al.*, 2012) e que a hipoxemia moderada pode, ser benéfica (Martin e Grocott, 2013). A um nível celular, susceptibilidade a toxicidade do oxigênio parece ser maior durante o início da reperfusão pós-isquemia. De fato, enquanto os tecidos e as células têm extensos mecanismos adaptativos para hipoxemia não ocorre o mesmo para a hiperóxia (Ball e Ranzani, 2015). Um importante mecanismo de lesão

pulmonar associada à hiperóxia é a oxidação dos componentes do tecido, incluindo lipídios, proteínas e o DNA, que resulta subsequente à formação de espécies reativas de oxigênio (EROS). As EROS podem ser geradas diretamente a partir da interação de O₂ com os componentes do tecido ou pode resultar de uma resposta inflamatória secundária que amplifica a lesão pulmonar primária (Valença, S. *et al.*, 2007; Nagato *et al.*, 2012; Ball e Ranzani, 2015; Benipal *et al.*, 2015).

2.3 Desequilíbrio Redox

2.3.1 Radicais livres, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

O termo “radical livre” pode ser definido como uma espécie que tem um ou mais elétrons desemparelhados, e que são capazes de existência independente. Já as espécies reativas de oxigênio (EROs) inclui as espécies radicalares e outras que, embora não possuam elétrons desemparelhados, são reativas em decorrência de sua instabilidade, como os radicais peroxil (ROO•) e alcóxil (RO•). Além de espécies reativas derivadas do oxigênio existem aquelas derivadas do óxido nítrico (NO•), como por exemplo, o peroxinitrito (ONOO-) (Halliwell e Gutteridge, 2006). As espécies reativas podem se formar através de substâncias exógenas ou vias endógenas. As fontes exógenas incluem a luz ultravioleta, nos comprimentos de onda maiores que 280 nm (UV-A e UV-B), radiações ionizantes e agentes químicos, como o oxigênio. Já as espécies reativas formadas intracelularmente são originadas normalmente no nosso organismo como resultado do metabolismo celular na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, nas vias da xantina oxidase, na síntese de prostaglandinas no retículo endoplasmático liso, no sistema citocromo P-450 redutase microsomal, pela via do Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina (NADPH) oxidase e em células fagocíticas (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos) que destroem células infectadas por bactérias ou vírus (Berra e Menck, 2006; Berra e Menck, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2006).

A caracterização das principais EROs formadas *in vivo* são apresentadas no quadro abaixo.

Quadro 1. Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

Oxidante	Fórmula	Equação de reação
Ânion superóxido	O_2^-	$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^- + H^+$
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	Hipoxantina + $H_2O + O_2 \rightleftharpoons$ xantina + H_2O_2
		Xantina + $H_2O_2 + O_2 \rightleftharpoons$ ác. Úrico + H_2O_2
Radical hidroxila	$\bullet OH$	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$
Ácido hipocloroso	$HOCl$	$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O$
Radicais peroxila	ROO^\bullet	$R^\bullet + O_2 \rightarrow ROO^\bullet$
Radicais hidropoxila	HOO	$O_2^- + H_2O \rightleftharpoons HOO + OH^-$
Óxido Nítrico	NO	$L\text{-arginina} \rightarrow NO^\bullet + L\text{-citolina}$
Peroxinitrito	$ONOO^-$	$O_2^- + NO^\bullet \rightarrow ONOO^-$

Fonte: Adaptado de Birben *et al.*, 2012.

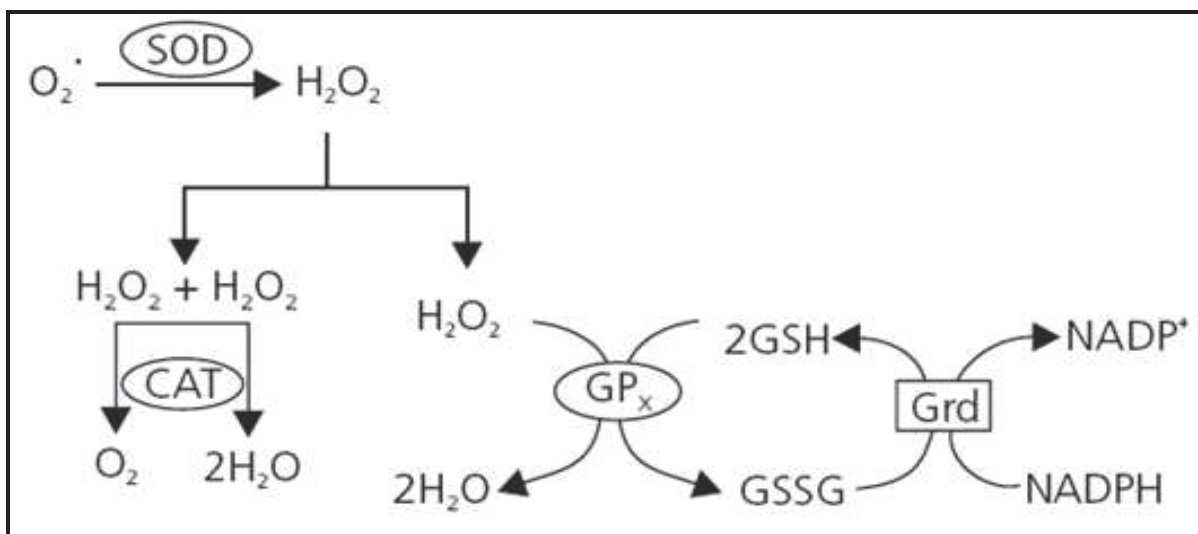
Das EROs, o radical hidroxila ($\bullet OH$), ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são de maior importância fisiológica. Desses o $\bullet OH$ é o mais reativo, uma vez que reage rapidamente com quase todos os tipos de moléculas, como os açúcares, os aminoácidos, as proteínas, os fosfolípidios e bases de DNA, proporcionando as principais reações de iniciação e propagação envolvendo EROs (peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e dano ao DNA) (Halliwell e Gutteridge, 2006; Birben *et al.*, 2012). As Eros em baixas a moderadas concentrações funcionam em processos celulares fisiológicos e possuem um papel benéfico nos organismos aeróbios, fazendo parte da regulação da sinalização celular e de expressão gênica, determinantes de mecanismos apoptóticos. Entretanto, em concentrações elevadas, podem causar um dano aos componentes celulares, tais como lípidios, proteínas e DNA (Valko *et al.*, 2006; Bindoli e Rigobello, 2013).

2.3.2 Defesas antioxidantes

Para contrabalançar as espécies reativas, o nosso organismo disponibiliza de um mecanismo de defesa antioxidante. Antioxidante é uma substância que mesmo em concentrações relativamente baixas é capaz de retardar ou prevenir a oxidação de substratos oxidáveis (Barbosa *et al.*, 2010). Devido à constante exposição e produção de espécies oxidantes pelo organismo, o nosso corpo possui um mecanismo de defesa antioxidante para a proteção ou até mesmo o reparo de danos causados pela oxidação (Barbosa *et al.*, 2010;

Birben *et al.*, 2012). Esse sistema de defesa pode atuar em duas linhas básicas. A primeira, caracterizada como processo detoxificador, é constituída pela linha de defesa dos antioxidantes: catalase, glutathiona reduzida (GSH), glutathiona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e vitamina E. A segunda linha se caracteriza pela fase de reparação da lesão, onde estão atuantes principalmente: o ácido ascórbico, glutathiona redutase (GRd) e glutathiona peroxidase (GSHPx) (Halliwell e Gutteridge, 2006).

Outra forma de classificar os antioxidantes se refere à estrutura do agente antioxidante, ou seja, enzimáticos e não enzimáticos. As enzimas envolvidas na proteção antioxidante primária do organismo humano constituem uma proteção intrínseca e incluem principalmente a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx) (Birben *et al.*, 2012; Cantin e Richter, 2012). A SOD tem o papel de converter o radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Birben *et al.*, 2012). Esse por sua vez, pode ser convertido em água (H_2O) e O_2 , pela enzima CAT ou em H_2O pela GPx, com oxidação da glutathiona reduzida (GSH) para formar a glutathiona oxidada (GSSG) (Birben *et al.*, 2012; Lowe, Luetlich e Gregg, 2013). A glutathiona redutase (Grd) catalisa a redução da glutathiona oxidada (GSSG) para formar glutathiona reduzida (GSH), mantendo elevada a razão GSH/GSSG nas células (Halliwell e Gutteridge, 2006; Birben *et al.*, 2012). Dos componentes não enzimáticos da defesa antioxidante destacam-se algumas vitaminas como as vitaminas E (Tocoferol), A (retinol), C (ácido ascórbico) e B2 (riboflavina) minerais (cobre, manganês, zinco, selênio e ferro), carotenóides (beta-caroteno, licopeno e luteína, entre outros) e bioflavonóides (genisteína, quercetina, etc.), além de outros componentes antioxidantes presentes em diversas espécies de plantas como Ginkgobiloba (Leite e Sarni, 2003; Birben *et al.*, 2012). A figura 3 representa um esquema das principais enzimas de defesa antioxidantes.



Fonte: Adaptado de Barbosa et al (2010).

Figura 3. Principais enzimas antioxidantes.

SOD: Superóxido Dismutase; H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio; CAT: Catalase, O²: Oxigênio, H₂O: água; GPx: Glutaciona Peroxidase, GSH: Glutaciona Reduzida, GSSG: Glutaciona oxidada; Grd: Glutaciona Redutase; NADPH: Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina.

Nota: A Superóxido dismutase (SOD), Por meio da reação de dismutação, catalisa a geração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a partir do radical superóxido (O₂[•]). As enzimas catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) se integram para impedir o acúmulo de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂). A CAT reduz H₂O₂ em duas moléculas de água e uma de oxigênio GPx reduz o H₂O₂ à água, no entanto o faz à custa da conversão da glutaciona reduzida (GSH) em oxidada (GSSG), essa última, por sua vez é novamente reduzida pela ação da Glutaciona redutase (Grd), à custa da oxidação do Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) em NADP⁺, possibilitando a manutenção da integralidade do ciclo redox da glutaciona e, conseqüentemente, do equilíbrio adequado entre os sistemas de defesa enzimáticos (Barbosa *et al.*, 2010).

Normalmente no nosso organismo, o balanço entre os radicais oxidantes e antioxidantes é suficiente para prevenir o rompimento das funções fisiológicas normais. Entretanto, quando há uma sobreposição dos níveis dos oxidantes sobre os antioxidantes ou há a diminuição dos níveis dos antioxidantes em relação aos oxidantes, caracteriza-se o desequilíbrio redox (Bindoli e Rigobello, 2013).

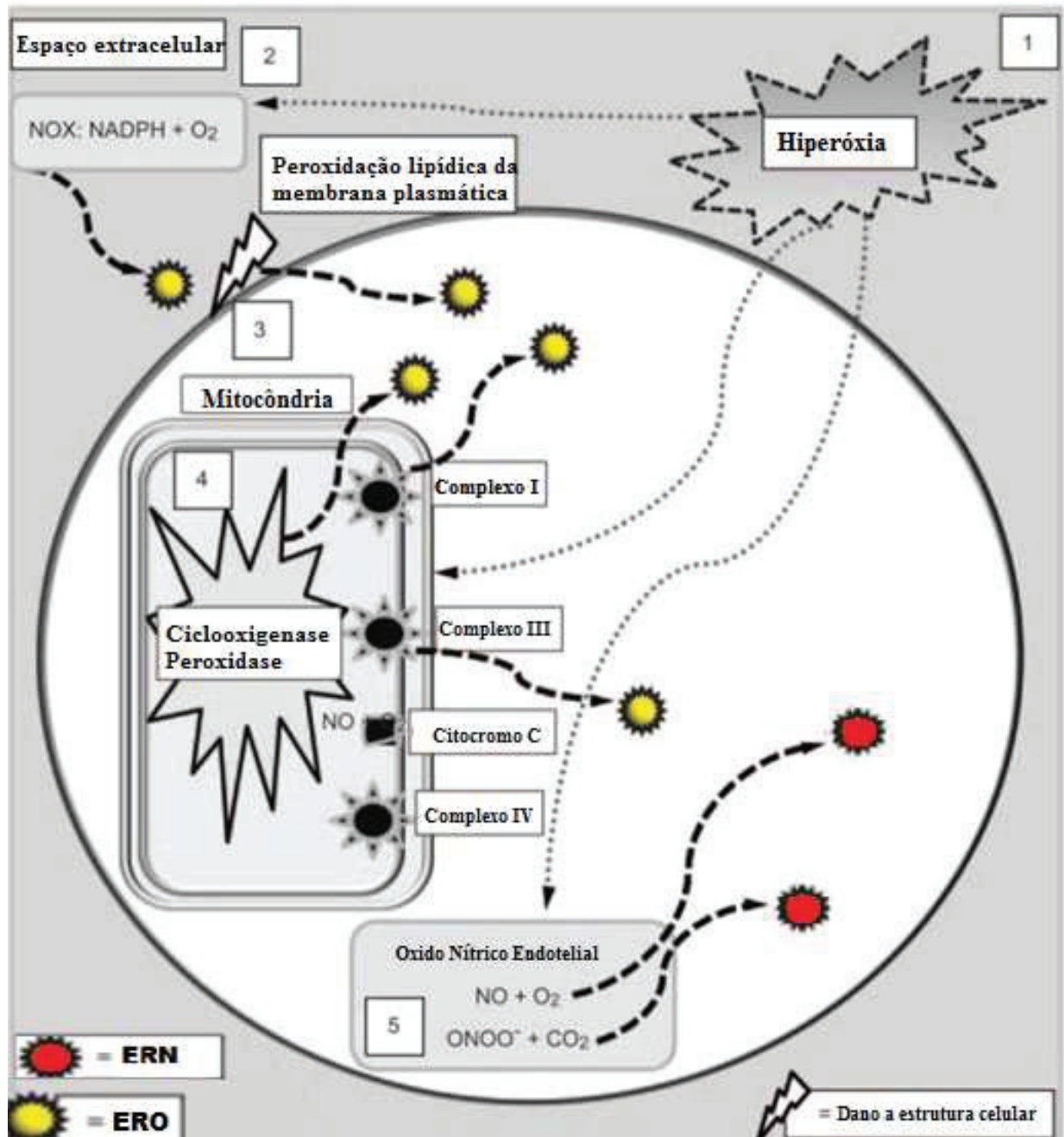
2.3.3 Hiperóxia, espécies reativas e dano celular

O oxigênio molecular (O₂) é utilizado como acceptor final de elétrons na cadeia de transporte mitocondrial no processo de respiração celular, sendo necessário para a produção de energia em todos os animais, plantas, fungos e microrganismos aeróbios. No metabolismo

celular desses organismos, aproximadamente 98% do oxigênio consumido é reduzido de forma tetravalente até H_2O , através de reações enzimáticas. Entretanto, o restante, cerca de 2%, não faz essa redução completa e liga-se de forma monovalente, levando à formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (Bindoli e Rigobello, 2013). Desta forma, o O_2 em decorrência a sua configuração eletrônica, pode sofrer reduções parciais e levar à formação de radicais livres que em altas concentrações, podem resultar em danos irreversíveis ao nosso organismo (Wilhelm Filho *et al.*, 2002; Halliwell e Gutteridge, 2006). A geração de espécies reativas ocorre principalmente na mitocôndria, embora possa ocorrer no endotélio e espaço extracelular. No metabolismo aeróbico, no interior da mitocôndria, o oxigênio molecular (O_2) é reduzido para formar o trifosfato de adenosina (ATP) e água (H_2O). Processo conhecido como fosforilação oxidativa, que ocorre em 3 complexos de proteínas na membrana interna das mitocôndrias, conhecido como complexo I, III, e IV. Normalmente, 1 a 2% desse O_2 perdem elétrons no complexo I e III, criando uma pequena quantidade de ânion superóxido (O_2^-). Na hiperóxia, por haver uma maior quantidade de O_2 disponível, haverá como consequência uma maior produção do radical superóxido. O O_2^- , é uma espécie altamente reativa e pode sofrer dismutação para formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 por sua vez reage com ferro ionizado (Fe^{2+}) para formar a radical hidroxila (OH^-). Outras reações enzimáticas mitocondriais que normalmente geram EROs, incluem as ciclooxigenases, lipooxigenases, peroxidases e oxigenases citocromo-dependentes. No endotélio, na presença de óxido nítrico (ON), o O_2 e O_2^- podem formar as espécies reativas de nitrogênio, como o dióxido de nitrogênio (NO_2) e peróxido nitrito ($ONOO^-$) respectivamente. O $ONOO^-$ pode ainda reagir com dióxido de carbono (CO_2) para formar mais espécies reativas de nitrogênio. Para a formação de EROs no espaço extracelular é necessário a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato de hidrogênio (NADPH) oxidase (NOX) que utiliza NADPH para reduzir O_2 em O_2^- . A hiperóxia também aumenta a produção de EROs por esta via, em proporção direta com pressão extracelular de O_2 (PO_2) (Figura 4) (Kallet e Matthay, 2013).

A hiperóxia desencadeia uma resposta inflamatória secundária que gera EROs por macrófagos ativados, plaquetas e neutrófilos. A intensidade desta resposta é dependente da espécie, explicando assim a susceptibilidade de diferentes animais para a lesão pulmonar hiperóxica (Kallet e Matthay, 2013).

Normalmente no nosso organismo há um equilíbrio entre as EROS e a defesa antioxidante. Entretanto, na presença de hiperóxia a produção de EROS ultrapassa a produção de antioxidantes e um desequilíbrio redox se estabelece (Kallet e Matthay, 2013).



Fonte: Adaptado de Kallet e Matthay (2013).

Figura 4. Vias de produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

NOX: NADPH Oxidase; NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato de hidrogênio; NO: Oxido Nítrico; O₂: Oxigênio; ONOO⁻: Peróxido nitrito; CO₂: Gás carbônico.

As EROs captam elétrons a partir de proteínas e lipídeos, provocando a ruptura da membrana celular, a disfunção enzimática e danos ao DNA e, como consequência, a morte celular. As EROs podem interagir com os componentes lipídicos das membranas celulares (peroxidação lipídica), o que leva ao rompimento da bicamada lipídica das membranas. Além disso essa interação com a membrana pode levar a formação adicional de EROs. As EROs podem ainda ativar ou desativar proteínas específicas e, como consequência, a inativação de vários sistemas de enzimas antioxidantes, aumentando assim a lesão tecidual enfraquecendo mecanismos de defesa celular (Kallet e Matthay, 2013).

2.3.4 Estresse oxidativo na obesidade

Após a ingestão de uma dieta rica em calorias há um aumento da glicemia, de triglicerídeos assim como de ácidos graxos livres na circulação, levando um estado de estresse oxidativo (Esposito e Giugliano, 2006), uma vez que os ácidos graxos livres ativam a produção de superóxido dependente de NADPH oxidases em várias células, como por exemplo, as fagocíticas (Schonfeld e Wojtczak, 2008). O aumento da glicose sanguínea aumenta o gradiente de prótons na membrana interna mitocondrial, levando ao seu limiar máximo e como consequência a transferência de elétrons no complexo III da cadeia respiratória é bloqueada, o que faz com que os elétrons da ubiquinona escapem formando o ânion superóxido (Choi *et al.*, 2008). O estresse oxidativo, causado por altas concentrações de glicose e ácidos graxos livres, está diretamente relacionado com disfunções das células β , assim como o desenvolvimento da resistência à insulina (Stefanovic *et al.*, 2008). Furukawa *et al* observaram que o aumento de EROS no tecido adiposo de camundongos obesos tem correlação direta com o aumento na expressão de NADPH oxidase, e diminuição da expressão de enzimas antioxidantes como a CAT e a SOD (Furukawa *et al.*, 2004).

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar os efeitos da associação entre uma dieta rica em carboidratos refinados e à hiperóxia sobre o desequilíbrio redox e a inflamação em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a avaliação nutricional dos animais: massa e adiposidade corporal, assim como a ingestão alimentar;
- Analisar e comparar o influxo de células inflamatórias no parênquima pulmonar e no sangue;
- Realizar avaliação bioquímica das amostras sanguíneas dos animais através da determinação da glicose, colesterol total, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), uréia e creatinina;
- Mensurar a oxidação de lipídeos (peroxidação lipídica) pela dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;
- Avaliar a atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD);
- Analisar o padrão histológico do parênquima pulmonar e dos adipócitos
- Determinar os níveis de citocinas INF- γ , IL-10 e TNF- α .

4. METODOLOGIA

4.1 Desenho experimental

4.1.1 Animais

Foram utilizados 24 camundongos BALB/c, machos, adultos, com idade entre 5 a 7 semanas, provenientes do biotério do Laboratório de Nutrição Experimental (LABNEX) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com temperatura e umidade controladas (21 ± 2 °C, $50 \pm 10\%$, respectivamente), submetidos aos ciclos invertidos claro/escuro de 12 h (luzes artificiais, 19 as 7 h) e exaustão 15 min/h.

Primeiramente os animais foram divididos em dois grupos:

Grupo 1 (G1), n=12: Recebeu uma dieta padrão para roedores Labina-Purina durante 12 semanas.

Grupo 2 (G2), n=12: Recebeu uma dieta rica em carboidratos refinados por 12 semanas, constituída de 10% de açúcar, 45% de dieta padrão, 45% de leite condensado.

Após o tratamento dietético com duração de 12 semanas, G1 foi randomicamente dividido em grupo Controle (GC) e Grupo Hiperóxia (GH), e G2 foi randomicamente dividido em Grupo Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados (GDC) e Grupo Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados + Hiperóxia (GDCH) conforme descrição abaixo:

Grupo Controle (GC): 6 animais que receberam uma dieta padrão para roedores Labina-Purina durante 12 semanas;

Grupo Hiperóxia (GH): 6 animais que receberam dieta padrão Labina-Purina, durante 12 semanas e foram expostos a hiperóxia por 24 horas;

Grupo Dieta com Alto Teor de Carboidratos Refinados (GDC): 6 animais que receberam dieta com alto teor de carboidratos refinados durante 12 semanas;

Grupo Dieta com Alto Teor de Carboidratos Refinados e Hiperóxia (GDCH): 6 animais que receberam dieta com alto teor de carboidratos refinados durante 12 semanas e foram expostos a hiperóxia por 24 horas.

Todos os procedimentos desta dissertação de mestrado obedeceram aos Princípios Éticos da Experimentação Animal estabelecidos pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA-UFOP) e foram aprovados com o seguinte número de protocolo: 2013/58. (Anexo 1)

4.1.2 Composição das Dietas

Os animais dos grupos GC e GH foram alimentados com ração padrão para roedores Labina-Purina e os camundongos dos grupos GDC e GDCH foram alimentados com ração de alta palatabilidade, composta por 10% de açúcar cristal, 45% de ração comercial e 45% de leite condensado Nestlé® utilizada para promover a obesidade nos animais conforme descrito por (Menezes-Garcia *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2013).

A composição nutricional de ambas as rações estão apresentados no quadro abaixo:

Quadro 2. Composição nutricional e análise quantitativa de sacarose da dieta controle e da dieta rica em carboidratos refinados.

	Dieta controle	Dieta rica em carboidratos refinados
kcal/g	4,0	4,4
Carboidratos (%)	65,8	74,2
Gordura (%)	3,1	5,8
Proteína (%)	31,1	20
Sacarose (g/100g)	37,0	48,4

Fonte: Oliveira *et al* (2013).

Todos os requerimentos nutricionais apresentados por ambas as dietas estão compatíveis com as recomendações do National Research Council (NRC, 1995) - Nutrient Requirements of Laboratory of the mouse (Council, 1995).

4.1.3 Ingestão alimentar e controle de massa corporal

Os controles da ingestão de alimentos e do ganho de massa corporal foram feitos uma vez por semana. As dietas foram pesadas antes de serem servidas para os animais e após o consumo, foram pesadas a quantidade que sobrou na bandeja e a quantidade que foi

desperdiçada junto com as fezes. Desta forma foi mensurada a quantidade ingerida. O controle do ganho de massa corporal dos animais foi realizado individualmente através de uma balança digital (MARK®, Série M/ Bel Equipamentos Analíticos LTDA, São Paulo, Brasil).

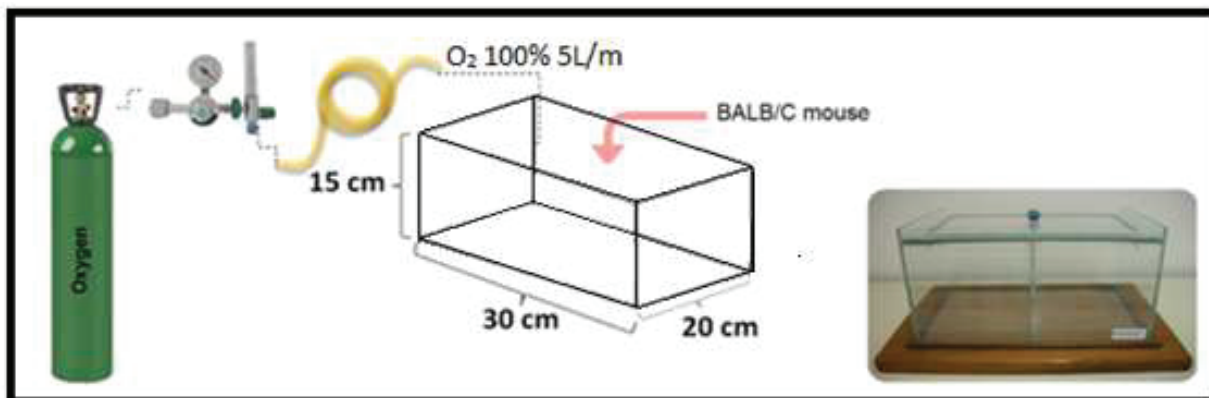
4.2 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

Uma semana antes do final do experimento, todos os animais foram utilizados para a investigação da sensibilidade à insulina utilizando um teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Para realização do teste, os animais permaneceram 12 horas em jejum e receberam uma solução de 2,5 g de glicose por kg de massa corporal, via gavagem orogástrica, e a glicemia foi determinada nos tempos zero (antes da sobrecarga), 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração, utilizando-se glicosímetro automatizado (Accu-Chek® Advantage / Roche Diagnóstica Brasil Ltda.) e fitas para mensurar a glicose sanguínea.

4.3 Exposição ao oxigênio

Foram adquiridos da empresa White Martins (São Paulo SP, Brasil) dois cilindros contendo O₂ medicinal (8.000 l de O₂/cilindro). Estes foram acoplados a uma válvula reguladora de pressão e um fluxômetro (com amplitude de mensuração de 0-15L/min.). Um conduto de silicone conectou o fluxômetro a uma câmara de isolamento de vidro (transparente), hermeticamente fechada, conforme mostra a figura 5 (Nagato *et al.*, 2009). Os animais do grupo GH e GDCH foram colocados na câmara no tempo zero (t=0) e oxigênio foi administrado durante 24 horas com fluxo contínuo de 5L/min. garantindo, assim, um fluxo de oxigênio suficiente para saturar o ambiente (Nagato *et al.*, 2012).

Os animais do GC e GDC foram expostos ao ar ambiente às mesmas condições dos outros grupos experimentais.



Fonte: Nagato *et al.*, (2009), Nagato *et al.*, (2012)

Figura 5. Esquema representativo da exposição ao oxigênio

O₂: oxigênio, L: litros, m: minutos, cm: centímetros.

4.4 Eutanásia

Após a exposição à hiperóxia, todos os animais foram submetido à anestesia com Ketamina (130 mg/kg) e Xilazina (0,3mg/kg) e eutanasiados por exsanguinação. Foram retirados o sangue, o Lavado broncoalveolar (LBA) os pulmões e os coxins adiposos (retroperitoneal, epididimal e mesentérico).

4.5 Coleta do Sangue

Duas alíquotas sanguíneas de cada animal foram coletadas em tubos de polipropileno com 15 μ L de anticoagulante Heparina para obtenção do plasma. A primeira alíquota com 200 μ L de sangue foi encaminhada ao laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC-OP) para a realização do Hemograma e Leucograma. A segunda alíquota com aproximadamente 800 μ L foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi retirado e armazenados em um freezer (-80°C) para a realização das seguintes dosagens bioquímicas: colesterol total, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), uréia e creatina realizadas no mesmo laboratório.

4.5.1 Esfregaço sanguíneo

O sangue (5 μ L) foi depositado (pipeta automática) em uma das extremidades de uma lâmina histológica estéril. Com uma lâmina extensora a 45° foi realizado um movimento firme e uniforme, deslizando-a sobre a lâmina histológica, de maneira que o sangue fosse espalhado formando uma fina camada ao longo da lâmina histológica. As lâminas foram

coradas com o *kit Panóptico Rápido*, através de um banho de imersão em cada uma das três soluções distintas: metanol, eosina e azul de metileno. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente para a retirada do excesso dos corantes e secadas em temperatura ambiente.

4.5.2 Contagem diferencial de leucócitos do sangue

Essa análise foi realizada da metade até o fim da borda do esfregaço. Foi contato um total de 100 leucócitos, os quais foram diferenciados entre monócitos, linfócitos e neutrófilos, através da coloração, morfologia nuclear e citoplasmática e presença ou ausência de grânulos citoplasmáticos.

4.5.3 Hemograma

Para a realização do hemograma, o sangue total foi diluído em salina (1:2) e os parâmetros hematológicos eritrócitos, hematócrito e hemoglobina foram avaliados utilizando um aparelho de contagem eletrônica (ABX diagnostics, micro 60) do Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC-UFOP).

4.5.4 Análises bioquímicas do plasma sanguíneo

As concentrações de triglicérides, colesterol total, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), uréia e creatina foram determinadas por espectrofotometria automática no analisador clínico Randon Acess Clinical Analyser, Wiener Lab, modelo CM-200 (WIENER LAB, Rosario, Argentina) pelo método enzimático-colorimétrico por meio de kits específicos disponíveis comercialmente (Bioclin®, Quibasa) pelo técnico responsável do Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

4.6 Coleta do Lavado Broncoalveolar (LBA)

Imediatamente após a eutanásia, o tórax de cada animal foi aberto para a coleta do lavado broncoalveolar. O pulmão esquerdo foi clampeado, a traquéia canulada e o pulmão direito foi lavado com 1,5 ml de solução salina (3 x 500 µL). As amostras foram mantidas no gelo até o final do procedimento, a fim de evitar lise celular.

4.6.1 Contagem total e diferencial de leucócitos do LBA

Para a contagem total de leucócitos no LBA, foi utilizada a câmara de Neubauer. Nesta foi colocado 0,1 ml do LBA e 0,3 ml de corante azul de tripano 0,2%, obtendo assim uma diluição 1/4. Logo após, os leucócitos foram contados nos quatro quadrados encontrados nos extremos da câmara. Para a contagem diferencial de células no LBA, 250 µL das amostras foram cito-centrifugadas em uma centrífuga cytopspin (Shandon, Waltham, MA, EUA) na qual foi colocadas lâminas e centrifugadas a 1000 rpm/min. Após obtenção das lâminas, estas foram coradas com o *kit Panóptico Rápido*, através de um banho de imersão em cada uma das três soluções distintas: metanol, eosina e azul de metileno. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente para a retirada do excesso de corantes, e secadas em temperatura ambiente. Um total de 100 células por lâmina foram contadas utilizando os critérios morfológicos padrão (Valenca *et al.*, 2006).

4.7 Pulmões

4.7.1 Homogeneizado pulmonar

Para análises de desequilíbrio redox e dano causado pela oxidação, 100 mg do pulmão direito foi colocado ao tubo de hemólise com 1,5 ml de tampão fosfato (KPE), e homogeneizado em 5 repetições séricas, utilizando um homogeneizador de tecidos. Em seguida as amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 10.000 RPM durante 10 minutos e o sobrenadante foi retirado e armazenado à -80° C para posteriores análises.

4.7.2 Processamento do tecido

Após a realização do lavado broncoalveolar, o ventrículo direito foi perfundido com solução salina para remoção do sangue nos pulmões. O pulmão direito foi clampeado para que fosse instilada, apenas no pulmão esquerdo, via traquéia, formalina tamponada 4% (pH 7,2) a uma pressão de 25 cmH₂O por 2 minutos. O pulmão esquerdo foi então removido e imerso em solução fixadora por 48 horas. Em seguida, o material foi processado da seguinte forma: banho em água corrente por 30 minutos; banho em álcool a 70% e 90% por 1 h cada etapa; 2 banhos em álcool a 100% por 1 h cada; 2 banhos de xilol de 1 h cada; 2 banhos em parafina de 1 h cada e inclusão em parafina. Após processamento de rotina e inclusão em parafina, foram feitos cortes seriados com quatro micrômetros de espessura, os quais foram corados em hematoxilina-eosina (HE) para a análise morfométrica.

4.7.3 Análises morfométricas: Estereologia do pulmão

A análise da densidade de volume do septo alveolar V_{vsa} foi realizada em um sistema-teste composto por 16 pontos e em uma área-teste conhecida (Imai e D'armiento, 2000) onde a linha proibida foi considerada como delimitação, a fim de evitar uma superestimação no número de estruturas. O sistema teste foi acoplado a um monitor ligado a um microscópio. O número de pontos (PP) que atingiram os septos alveolares (V_{vsa}) e os espaços alveolares (V_v) foram avaliados de acordo com o número total de pontos de um sistema teste (Pt). Então temos que $V_v = Pp/Pt$. Para se obter amostras uniformes e proporcionais do pulmão, foram analisados aleatoriamente 16 campos e um sistema ciclóide de ensaio sobreposto sobre a tela do monitor. O volume de referência foi estimado pela contagem de pontos de utilização dos sistemas de ponto de teste (PT). Uma área total de $1,94 \text{ mm}^2$ foi analisada para determinar as densidades de volumes dos septos alveolares (V_{vsa}) e dos espaços alveolares (V_v) em cortes corados em hematoxilina e eosina (HE), respectivamente.

4.8 Tecido adiposo

4.8.1 Índice de Adiposidade Corporal (IAC)

Os coxins adiposos (retroperitoneal, epididimal e mesentérico) foram pesados em balança de precisão de 0,001 g para determinação do índice de adiposidade que foi calculado segundo a seguinte equação (Oliveira *et al.*, 2013):

$$IAC = \frac{(TAE + TAR + TAM) \times 100}{\text{Massa corporal}}$$

IAC: Índice de adiposidade

TAE: Tecido adiposo epididimal

TAR: Tecido adiposo retroperitoneal

TAM: Tecido adiposo mesentérico

4.8.2 Ensaios imunoenzimáticos do TAE

Para as análises teciduais de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ e IL-10 , foi realizado um protocolo de homogeneização no qual 10 mg de tecido foi homogeneizado com 1ml de tampão fosfato (PBS). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C , retirado o infranadante que foi congelado a -20°C para posteriores análises por meio do método Enzyme-Linked Immuno

sorbent Assay (ELISA). Para estes ensaios foram utilizados kits, sendo todos os anticorpos e reagentes reconstituídos e aliquotados de acordo com as orientações dos fabricantes e as análises foram realizadas como descrito a seguir.

Em resumo, em placas de 96 poços foram adicionados 100 µl de anticorpo monoclonal contra o peptídeo (anticorpo de captura), reconstituído em PBS, sendo estas placas incubadas por 12 horas a temperatura ambiente. Os anticorpos não adsorvidos pelas placas foram descartados, por inversão e sucessivas lavagens em PBS-*Tween* (PBS adicionado de 0,05% de *Tween*20) e as placas foram bloqueadas com 100 µl/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1%, durante 1 hora a temperatura ambiente. A seguir as placas foram novamente lavadas. As amostras foram aplicadas em um volume de 100 µl para cada poço. Paralelamente, a proteína investigada foi diluída em várias concentrações para o estabelecimento da curva padrão e, a seguir, foi realizada incubação por 2 horas em temperatura ambiente. Os anticorpos secundários (anticorpo de detecção), após os poços serem devidamente lavados, foram diluídos em PBS-BSA 0,1% e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada e 100 µl de estreptoavidina ligada à peroxidase (na diluição recomendada pelo protocolo de cada kit) em PBS-BSA 0,1% foram adicionados à placa e a mesma incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. O cromógeno escolhido para revelação foi a Tetrametilbenzidina (*Color Reagent B* - R&D Systems, Minneapolis, USA). Cinco ml do cromógeno foi adicionado a 5 ml de água oxigenada (H₂O₂) adquirida pelo mesmo fabricante (*Color reagent A* - R&D Systems, Minneapolis, USA). Cem microlitros dessa solução foram adicionados em cada um dos poços e após vinte minutos de incubação em ausência de luz e temperatura ambiente, a reação foi bloqueada adicionando-se 100 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2,5M por poço. A leitura da intensidade de coloração foi realizada em leitor de ELISA utilizando-se o comprimento de onda de 450 nm, imediatamente após a adição de H₂SO₄ para o bloqueio das reações. A quantificação das quimiocinas e citocina presentes nas amostras foi determinada baseada na densidade óptica obtida com a curva padrão de concentrações conhecidas dos peptídeos, analisadas pelo software SOFT max PRO 4.0.

4.8.3 Análises histológicas e morfométricas do TAE

Aproximadamente 400 mg de TAE foram fixados em formaldeído por 48 horas e em seguida, o material foi processado da mesma forma que o pulmão esquerdo (item 4.7.3). Para análise histomorfométrica dos adipócitos, as lâminas foram fotografadas em microscópio de

luz equipado com câmera digital Leica BM5000 (Leica DFC 300 FX) acoplada e associada ao software de captura de imagens Leica Application Suite em objetiva microscópica de 10 vezes. A área foi obtida por meio da medida aleatória de 50 adipócitos por lâmina através do programa ImageJ® (National Institute of Health, NIH, Maryland, USA).

4.9 Análises do estresse oxidativo

4.9.1 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Atividade da SOD foi medida nos tecidos de acordo com o método de Marklund e Marklund (1974) que se baseia na capacidade da SOD em inibir a autooxidação do pirogalol. Os reagentes de trabalho utilizados foram: KH₂PO₄, Na₂HPO₄, Pirogalol, MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difenilterazolio) e DMSO (dimetilsulfóxido)).

Para a realização da dosagem, fragmentos de 100 mg do tecido foram homogeneizados com 1 mL de tampão fosfato (50mM), pH 7,0, em seguida, centrifugados por 10 minutos a 12.000 g a 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica. A confecção das dosagens nas amostras usando placa de Elisa seguiu a sequência de adições de reagentes, conforme o quadro a seguir.

Quadro 3. Reagentes utilizados para mensurar a atividade da Superóxido dismutase (SOD)

Poço	Amostra	Tampão	MTT (1,25 Mm)	Pirogalol (100µM)
Branco	-	144µl	6 µl	-
Padrão	-	129µl	6µl	15µl
Amostra	30µl	99 µl	6µl	15µl

As amostras foram incubadas por 5 minutos em estufa a 37°C. Logo após, 150 µL de DMSO foram adicionados às mesmas para parar a reação. As absorbâncias foram lidas no leitor de Elisa em um comprimento de onda de 570 nm. Considerando que uma unidade de SOD (U) é responsável pela oxidação de 50% do pirogalol, e que a absorbância da amostra obtida em unidades de SOD, é convertida a absorbância da amostra obtida em unidades de SOD. Para cálculo da atividade de SOD, foi subtraído o resultado obtido da amostra pelo

valor encontrado do branco e, a seguir, foi dividido esse valor pelo encontrado da subtração do padrão pelo branco.

4.9.2. Proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com o método de LOWRY *et al.* (1995). O princípio do método baseia-se na redução do reagente de Folin Ciocalteu, ao reagir com aminoácidos aromáticos catalisada por íons cobre, em meio alcalino formando uma coloração azul.

As soluções de trabalho utilizadas no ensaio foram preparadas conforme descrito abaixo:

Reagente A: Foram dissolvidos 0,25g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 0,5 de citrato de sódio em 100 ml de água destilada.

Reagente B: Foram dissolvidos 5 g de carbonato de sódio e 1 g de hidróxido de sódio em 250 ml de água destilada.

Reagente C: Em 50 mL de reagente B foram adicionados 1 mL de reagente A.

Reagente D: Em 1 mL de reagente de Folin foram adicionados 1 mL de água destilada.

Para a realização do ensaio, 10 μL do sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar, foram diluídos em 90 μL de água destilada.

Em tubos de polipropileno foram adicionados 100 μL da amostra diluída ou soluções padrão de albumina e água destilada (branco). Em seguida foram adicionados 1 ml do reagente C. Os tubos foram agitados no vórtex e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente foram adicionados 100 μL do reagente D em todos os tubos, misturou-se vigorosamente e após 30 minutos de incubação no escuro as absorbâncias das amostras relativas ao branco foram determinadas a 660 nm. Diluições seriadas de uma solução de concentração conhecida de albumina bovina sérica foram utilizadas para a construção da curva de calibração. Após análise de regressão linear, foi determinada a equação da reta, esta foi utilizada para determinar a concentração de proteínas totais no homogenato pulmonar.

4.9.3 Atividade da catalase

A atividade da CAT foi mensurada a partir da taxa de decréscimo de peróxido de hidrogênio a uma absorvância de 240nm, representada por U/mg de proteína (Aebi, 1984). Esse método baseia-se na decomposição do H₂O₂ pela enzima observada durante 1 minuto por espectrofotometria a 240 nm. Resumidamente, 100 mg do pulmão foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,2) e em seguida centrifugado a 10000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante retirado foi utilizado como amostra biológica. Em um becker, foi preparado uma solução Mix a qual era composta de 25 mL de tampão fosfato para 40 µL de peróxido de hidrogênio (30%), iniciando então a reação. As absorvâncias foram determinadas exatamente a cada 10 segundos, durante um minuto a 240 nm em espectrofotômetro com luz UV. O tampão fosfato foi utilizado como branco para zerar o aparelho. A atividade da catalase foi determinada pela diminuição da absorvância em 240 nm causada pelo desaparecimento o H₂O₂, de acordo com a Lei de Lambert Beer, onde 1 U equivale a 1µmol de hidrólise de H₂O₂ por minuto, por mL:

Onde:

$$C = \frac{\text{Abs} \times 1000}{\epsilon \text{ VA}}$$

Abs = absorvância;

ϵ = coeficiente de extinção molar em unidades de 39,4 M⁻¹ cm⁻¹;

VA = volume da amostra;

C = concentração do peróxido de hidrogênio expressa em mol L⁻¹.

A absorvância utilizada corresponde ao delta de absorvância por minuto. Os resultados foram expressos em unidade por miligrama de proteína. Uma unidade de catalase é equivalente a hidrólise de 1 µmol de H₂O₂ por minuto.

4.10 Análise do dano causado pela oxidação lipídica

4.10.1 Dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

A determinação da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é fundamental na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) se ligar a lipídios oxidados formando malondialdeído, conforme descrito por (Buege e Aust, 1978). Para a realização da dosagem, fragmentos de 100 mg do tecido foram homogeneizados com 1 mL de tampão fosfato, pH 7,4 e em seguida, centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica. Em um tubo foram adicionados 500 µL de homogeneizado, 250 µL de ácido tricloroacético (TCA) 28% p/v dissolvido em ácido clorídrico (HCL) 0,25N, 250µL de TBA 1% dissolvido em ácido acético 1:1 e 125 µL de BHT 5 Mm dissolvidos em etanol. Em seguida, o tubo foi levado ao vórtex e colocado em banho-maria a 95°C por 15 minutos. Após serem resfriados em banho de gelo, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10000 g e o sobrenadante retirado foi lido no espectrofotômetro a 535 nm, zerado com água destilada. A concentração de TBARS foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), seguindo a lei de Lambert Beer. Essa concentração foi representada em nmols/mL.

4.11. Análise estatística

Os dados foram testados quanto sua normalidade de distribuição através do teste Kolmogorov-Smirnov e foram expressos em média \pm erro padrão da média ou mediana (valor mínimo-máximo). Para os dados paramétricos foram utilizadas as análises de variância univariada (ANOVA one - way) e bivariada (ANOVA two - way) seguidas pelo pós-teste de Bonferroni e o teste t de Student não pareado. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunns. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism versão 5.00 para Windows 7, Graph Pad Software (San Diego, CA, USA) e foi considerada como diferença significativa o valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Ingestão alimentar e ganho de massa corporal

Para avaliar se a dieta com alto teor de carboidratos refinados foi capaz de influenciar na ingestão alimentar e ganho de massa corporal os animais foram pesados e tiveram seu consumo alimentar mensurados semanalmente e conforme mostra o gráfico 1 os animais do Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados (GDC) apresentaram um maior ganho de massa corporal a partir de 1 semana de experimento em relação ao Grupo Controle (GC) e esse ganho manteve-se no decorrer das 12 semanas.

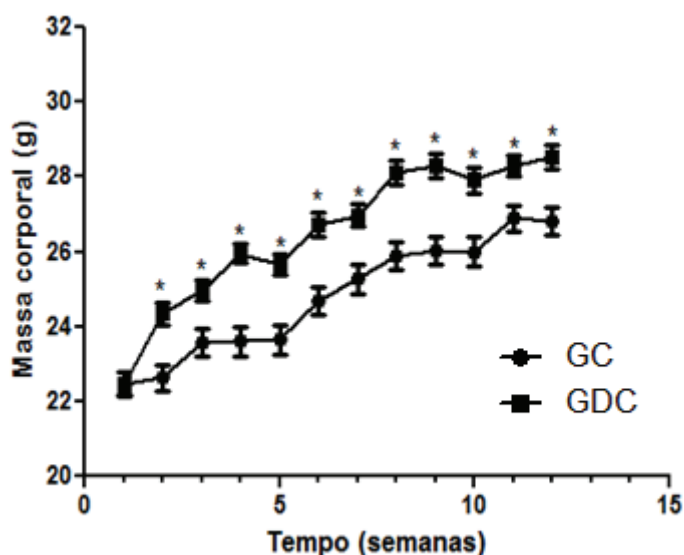


Gráfico 1. Ganho de massa corporal no decorrer de 12 semanas.

GC:Grupo Controle; GDC: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão de 6 animais por grupo. (a) representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao GC. Análise de Variância Two Way ANOVA. Pós teste de Bonferroni.

Para verificar se a hiperóxia teve influencia no ganho de massa corporal, a massa dos animais foi mensurada logo após a exposição à hiperóxia e conforme apresentado no gráfico 2-B os animais do grupo GDC no final do experimento apresentaram um aumento de massa corporal em relação ao controle e não houve diferenças significativas nos demais grupos.

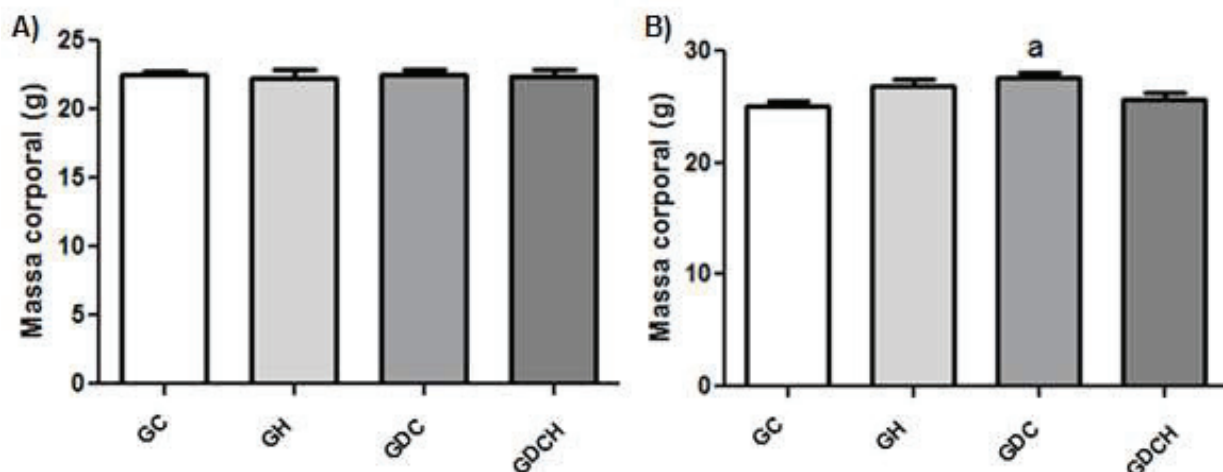


Gráfico 2. Massa corporal em gramas (g) dos animais experimentais.

A) Início do experimento B) Término do experimento. GC: Grupo Controle; GH: Grupo Hiperóxia; GDC: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados; GDCH: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados e Hiperóxia. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão de 6 animais por grupo. (a) representa diferença significativa em relação ao GC. Análise de Variância One Way ANOVA. Pós teste de Bonferroni.

Em relação ao consumo alimentar não houve diferenças significativas entre os grupos na quantidade (gramas) consumida nos grupos experimentais (gráfico 3-A), entretanto quando analisado a ingesta de calorias o grupo GDC apresentou um consumo maior na 11^a e 12^a semana de experimento quando comparado com o controle.

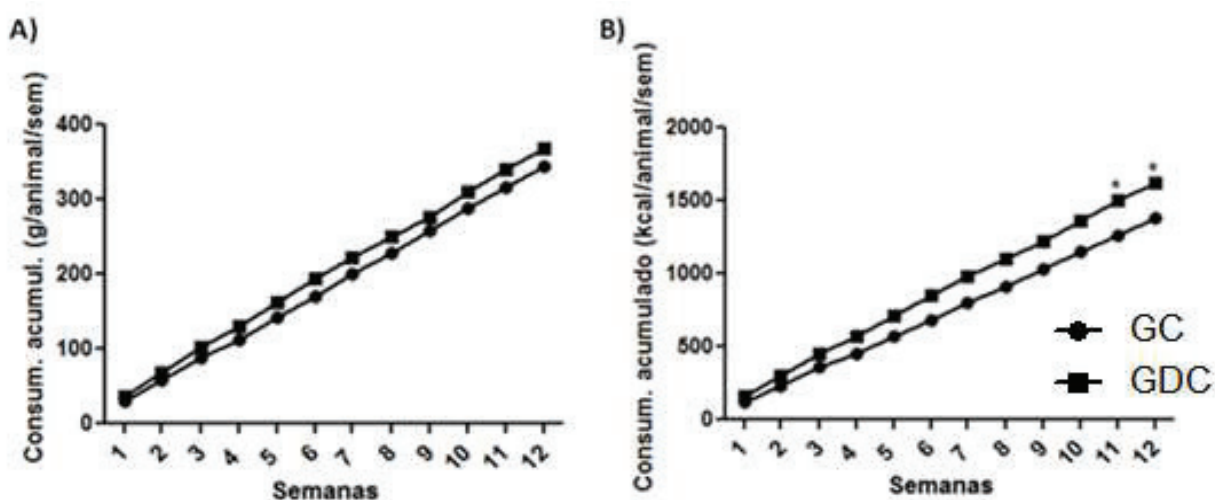


Gráfico 3. Consumo alimentar e calórico acumulado nos grupos experimentais.

A: Consumo alimentar acumulado (g/animal/semana); B: Consumo calórico acumulado (kcal/animal/semana). GC: Grupo Controle; GDC: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão de 6 animais por grupo. (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao GC. Análise de Variância Two Way ANOVA. Pós teste de Bonferroni.

5.2 Índice de adiposidade corporal e área dos adipócitos

A eficácia do modelo de dieta para indução de obesidade pode ser comprovada pelo índice de adiposidade corporal (gráfico 4) e área dos adipócitos avaliada através de análise morfométrica de secções do tecido adiposo epididimal (gráfico 4 e figura 6) os quais mostraram um aumento desses parâmetros no GDC quando comparado aos demais grupos assim como um aumento no grupo GDCH em relação ao GC e GH.

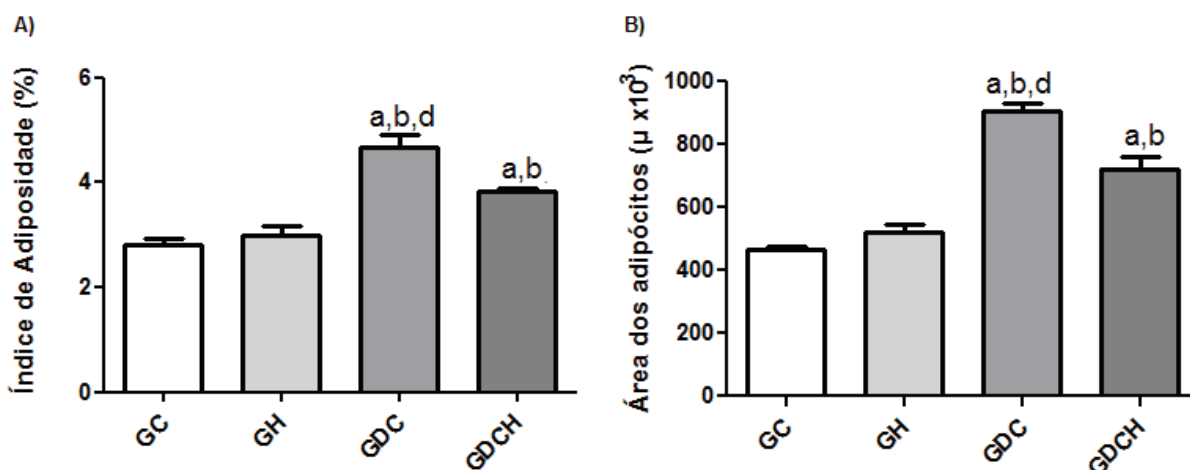


Gráfico 4. Adiposidade corporal (A) e área dos adipócitos (B) nos grupos experimentais.

GC: Grupo Controle; GH: Grupo Hiperóxia; GDC: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados; GDCH: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados e Hiperóxia. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão de 6 animais por grupo. (a), (b) e (d) representam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao GC, GH e GDCH respectivamente. Análise de Variância One Way ANOVA. Pós teste de Bonferroni.

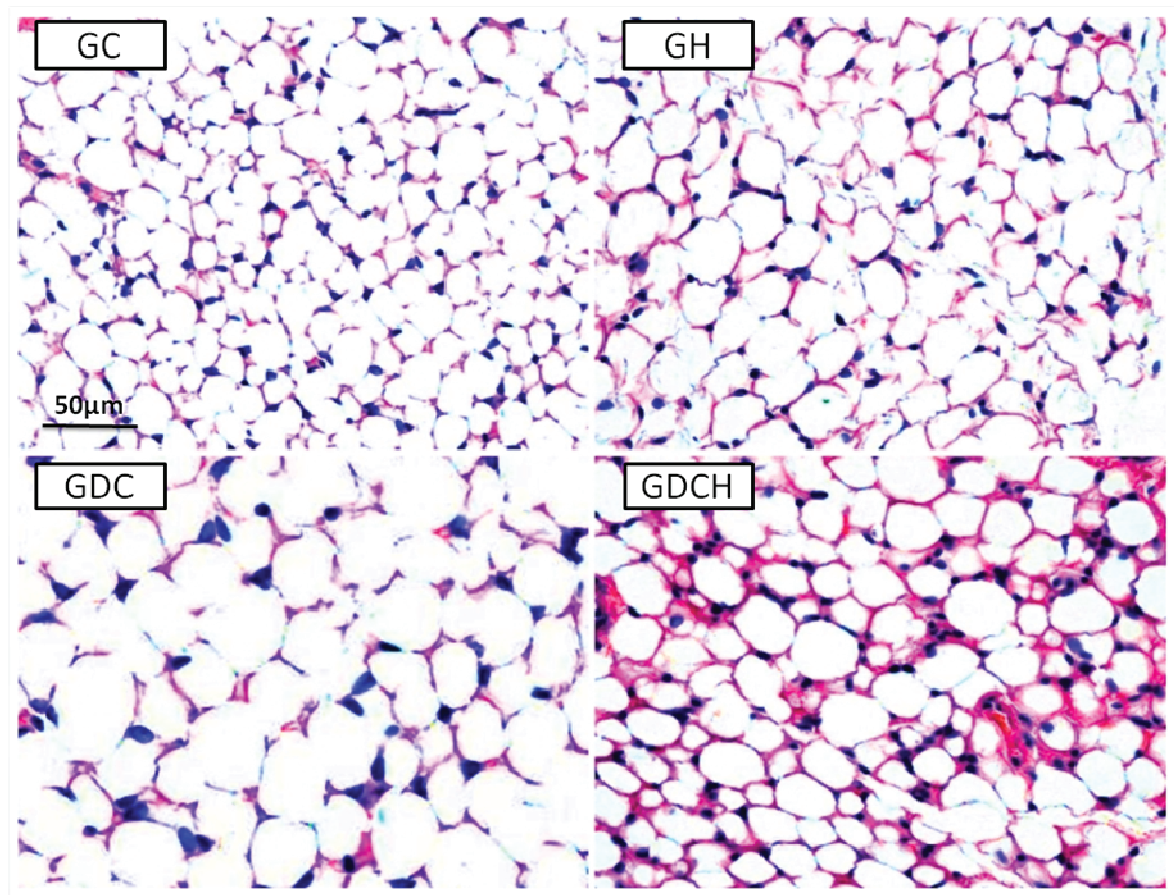


Figura 6. Análise histológica de seções do tecido adiposo epididimal corados com HE (10x).

GC: Grupo Controle; GH: Grupo Hiperóxia; GDC: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados; GDCH: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados e Hiperóxia.

5.3 Metabolismo de glicose e colesterol

Através do TOTG, pode-se avaliar se a glicose foi metabolizada pela insulina (Carnevale Schianca *et al.*, 2015). Segundo esse teste, os animais do grupo GDC apresentaram uma maior glicemia nos tempos 15, 30 e 60 minutos após uma sobrecarga de glicose quando comparados GC. Houve ainda um aumento significativo de colesterol total no GDC mostrando que essa dieta foi capaz de induzir uma resistência a insulina e hipercolesterolemia nesses animais.

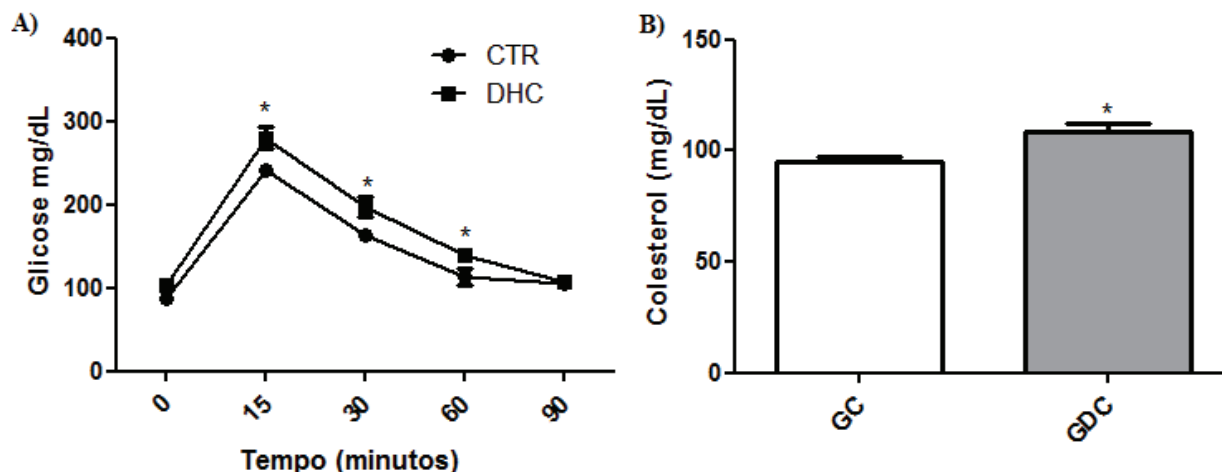


Gráfico 5. Níveis séricos de glicose (A) e colesterol (B).

GC: Grupo Controle; GDC: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão de 6 animais por grupo. (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao GC. Análise de Variância Two Way ANOVA. Pós teste de Bonferroni (A) e teste T não pareado (B).

5.4 Contagem total e diferencial de células no LBA

Para avaliar a dinâmica de recrutamento celular no lavado broncoalveolar (LBA) no modelo de dieta com alto teor de carboidratos refinados e de exposição à hiperóxia. Nós investigamos a presença de três tipos de leucócitos distintos: linfócitos, neutrófilos e macrófagos (tabela 1).

Conforme mostra a tabela 1, houve um aumento no número de leucócitos no GDCG e macrófagos no GDCH e GDC quando comparado ao GC e GH. Além disso, os macrófagos foram as principais células presente no LBA dos camundongos, seguida pelos neutrófilos e os linfócitos.

Tabela 1. Contagem total e diferencial de células do Lavado Broncoalveolar nos grupos experimentais

	GC	GH	GDC	GDCH	p
Leucócitos (x10³/mL)	140,0 ± 5,3	146,3 ± 6,0	161,3 ± 5,2	178,3 ± 4,8 ^{a, b}	< 0, 05
Macrófagos (x10³/mL)	92,1 ± 9,3	99,6 ± 7,4	128,5 ± 5,0 ^{a, b}	152,9 ± 7,4 ^{a, b}	< 0, 05
Linfócitos (x10³/mL)	18,2 ± 4,5	9,7 ± 3,5	7,1 ± 2,3	7,6 ± 3,5	> 0, 05
Neutrófilos (x10³/mL)	29,7 ± 6,3	37,0 ± 5,1	25,7 ± 5,0	17,9 ± 2,6	> 0, 05

Fonte: Dados obtidos experimentalmente.

Legenda: GC: Grupo Controle; GH: Grupo Hiperóxia; GDC: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados; GDCH: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados e Hiperóxia. Os dados são apresentados como média ± erro padrão de 6 animais por grupo. Valores de p < 0,05 indicam diferença estatística significativa na mesma linha. (a) e (b) representam diferenças significativas (p < 0,05) em relação ao GC e GH respectivamente. Análise de Variância One Way ANOVA. Pós teste de Bonferroni.

5.5 Contagem total e diferencial de células do sangue

Para verificar se houve um recrutamento de células do sangue foi feita a contagem total e diferencial de células e, conforme mostra a tabela 2, houve uma diminuição de leucócitos e linfócitos no sangue no grupo GH quando comparado ao grupo GC e GDC e uma diminuição no grupo GDCH em relação ao GC. A exposição à hiperóxia promoveu uma diminuição significativa de neutrófilos observado no grupo GH. Em relação aos monócitos houve uma diminuição nos grupos GH e GDCH quando comparado ao GC.

Tabela 2. Contagem total e diferencial de Leucócitos no sangue dos grupos experimentais

	GC	GH	GDC	GDCH	p
Leucócitos (x10³/mL)	7,2 ± 0,6	2,7 ± 0,4 ^{a,c}	5,4 ± 0,8	4,2 ± 0,5 ^a	<0,05
Linfócitos (x10³/mL)	4,9 ± 4,0	1,6 ± 0,3 ^{a,c}	3,6 ± 0,6	2,5 ± 0,3 ^a	<0,05
Neutrófilos (x10³/mL)	1,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1 ^a	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,2	<0,05
Monócitos (x10³/mL)	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,0 ^a	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,0 ^a	<0,05

Fonte: Dados obtidos experimentalmente.

Legenda: GC: Grupo Controle; GH: Grupo Hiperóxia; GDC: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados; GDCH: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados e Hiperóxia. Os dados são apresentados como média ± erro padrão de 6 animais por grupo. (a) representa diferença significativa (p< 0,05) em relação ao GC. Análise de Variância One Way ANOVA. Pós teste de Bonferroni.

5.6 Hemograma e análises bioquímicas do sangue

Conforme mostra a tabela 3, os animais do GH apresentaram menores níveis séricos de hemácias, hemoglobina e hematócrito quando comparado aos demais grupos (GC, GDC e GDCH).

Tabela 3. Hemograma dos grupos experimentais

	GC	GH	GDC	GDCH	p
Hemácias (*10⁶/μL)	9,5 ± 0,1	7,6 ± 0,4 ^{a,c,d}	9,27 ± 0,3	9,7 ± 0,2	<0,05
Hemoglobina (g/dL)	17,3 ± 0,3	14,4 ± 0,8 ^{a,c,d}	17,74 ± 0,3	17,6 ± 0,3	<0,05
Hematócrito (%)	52,9 ± 1,0	44,2 ± 2,4 ^{a,c,d}	55,38 ± 1,2	54,4 ± 1,4	<0,05

Fonte: Dados obtidos experimentalmente.

Legenda: GC: Grupo Controle; GH: Grupo Hiperóxia; GDC: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados; GDCH: Grupo Dieta Rica em Carboidratos refinados e Hiperóxia. Os dados são apresentados como média ± erro padrão de 6 animais por grupo. (a), (c) e (d) representam diferenças significativas (p< 0,05) em relação ao GC, GDC e GDCH respectivamente. Análise de Variância One Way ANOVA. Pós teste de Bonferroni.

Conforme mostra a tabela 4, em relação às análises bioquímicas, houve um aumento de aspartato aminotransferase (AST) e uma diminuição de alanina aminotransferase (ALT) no GDC em relação ao GC e GDCH. Houve também uma diminuição de ALT e Fosfatase

Alcalina no GH em relação ao GC e GDCH. A uréia sérica diminui nos grupos CDC e CDCH quando comparado ao GC e não houve diferenças significativas quando comparados os níveis séricos de creatinina.

Tabela 4. Análises bioquímicas do plasma sanguíneo nos grupos experimentais.

	GC	GH	GDC	GDCH	p
AST (mg/dL)	90,1 ± 9,0	94,8 ± 3,1	119,7 ± 8,1 ^{a,d}	86,7 ± 2,8	<0,05
ALT (mg/dL)	58,5 ± 0,4	37,0 ± 0,7 ^{a,d}	34,6 ± 4,8 ^{a,d}	59,2 ± 4,9	<0,05
ALP (mg/dL)	98,4 ± 3,1	78,0 ± 4,1 ^{a,d}	89,6 ± 3,2	93,5 ± 4,2	<0,05
Uréia (mg/dL)	56,7 ± 2,1	50,5 ± 1,0	46,6 ± 1,5 ^a	46,3 ± 2,0 ^a	<0,05
Creatinina (mg/dL)	0,4 (0,2 - 0,5)	0,3 (0,3 - 0,4)	0,4 (0,3 - 0,4)	0,4 (0,2 - 0,5)	>0,05

Fonte: Dados obtidos experimentalmente.

Legenda: ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato Aminotransferase, ALP: Fosfatase Alcalina, GC: Grupo Controle; GH: Grupo Hiperóxia; GDC: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados; GDCH: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados e Hiperóxia. Os dados são apresentados como média ± erro padrão de 6 animais por grupo (a), (c) e (d) representam diferenças significativas (p < 0,05) em relação ao GC, GDC e GDCH respectivamente. Análise de Variância One Way ANOVA. Pós-teste de Bonferroni.

5.7 Ensaios imunoenzimáticos do Tecido Adiposo Epididimal

Conforme mostra a tabela 5, o GH apresentou maior quantidade da citocina IFN- γ , quando comparado aos demais grupos e maiores níveis de IL-10 e TNF- α quando comparado ao GC e GDCH no tecido adiposo.

Tabela 5. Marcadores inflamatórios no tecido adiposo epididimal

	GC	GH	GDC	GDCH	p
INF- γ (ng/ml)	549,4 \pm 84,8	1027,0 \pm 149,4 ^{a,c,d}	558,1 \pm 40,7	384,1 \pm 88,4	< 0,05
IL10 (ng/ml)	1150,0 \pm 343,0	2606,0 \pm 568,1 ^{a,d}	1253,0 \pm 166,8	592,5 \pm 201,0	< 0,05
TNF- α (ng/ml)	528,0 \pm 148,7	1180,0 \pm 245,6 ^{a,d}	608,7 \pm 60,7	247,2 \pm 79,5	< 0,05

Fonte: Dados obtidos experimentalmente.

Legenda: GC: Grupo Controle; GH: Grupo Hiperóxia; GDC: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados; GDCH: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados e Hiperóxia; IFN- γ : Interferon Gama; IL-10: Interleucina 10; TNF- α : Fator de Necrose Tumoral. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão de 6 animais por grupo. (a), (b) e (c) representam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao GC, GDC e GDCH respectivamente. Análise de Variância One Way ANOVA. Pós-teste de Bonferroni.

5.8 Avaliações estereológicas do parênquima pulmonar dos grupos experimentais

As análises morfométricas do parênquima pulmonar mostraram que não houve diferença significativa entre o grupo GC e os demais grupos. Os grupos (GH, GDC e GDCH) apresentaram densidade de volume de espaço aéreo alveolar e densidade de volume de septos alveolares similares ao do GC.

Tabela 6. Avaliações estereológicas do parênquima pulmonar dos grupos experimentais

	GC	GH	GDC	GDCH	P
Vva (%/mm ²)	37,5 (18,7 - 43,7)	39,1 (25,0 - 46,8)	39,1 (31,2 - 46,8)	34,4 (25,0 - 37,5)	> 0,05
Vvsa (%/mm ²)	53,1 (43,7 - 56,2)	45,3 (43,7 - 62,5)	43,7 (40,6 - 50,0)	50,0 (43,7 - 50,0)	> 0,05

Fonte: Dados obtidos experimentalmente.

Legenda: Vva Densidade de volume de alvéolo; Vvsa: Densidade de volume de septo alveolar. GC: Grupo Controle; GH: Grupo Hiperóxia; GDC: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados; GDCH: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados e Hiperóxia. Os dados são apresentados como mediana, valor mínimo e valor máximo de 6 animais por grupo. Teste de Kruskal-Wallis. Pós-teste de Dunns.

5.9 Análise histopatológica

Nos grupos experimentais (GH, GDC e GDCH) a densidade de volume de espaço aéreo alveolar e densidade de volume de septos alveolares foram similares ao GC, porém os leucócitos foram mais frequentes nos alvéolos do grupo GDCH uma vez que a exposição à

hiperóxia concomitante a uma dieta com alto teor de carboidratos refinados levaram ao influxo de células para os pulmões (Figura 7).

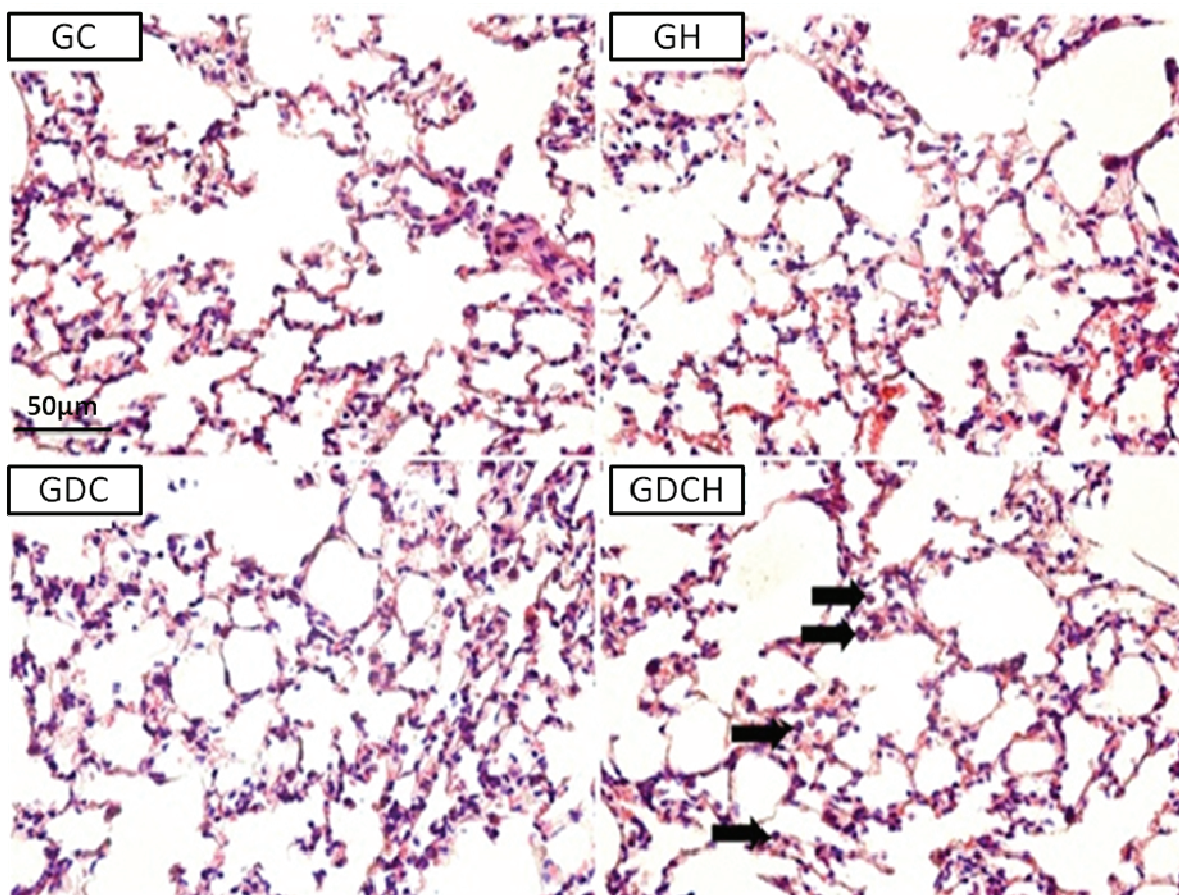


Figura 7. Fotomicrografias de cortes de pulmão corado com H&E (40x). Influxo celular no parênquima pulmonar.

GC: Grupo Controle; GH: Grupo Hiperóxia; GDC: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados; GDCH: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados e Hiperóxia. Parênquima pulmonar com aumento do influxo de células inflamatórias (setas) e densidade de volume de área alveolar e densidade de volume de septo alveolar sem alterações.

5.10 Análises do Estresse e dano causado pela oxidação

As enzimas antioxidantes, catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) são geralmente reguladas pelo estresse oxidativo e são responsáveis pelo balanço oxidativo nos pulmões. Conforme mostra a tabela 7, a atividade da SOD no parênquima pulmonar foi diminuída no grupo GDCH quando comparado ao GC e GH e a atividade da enzima CAT foi diminuída no grupo GDCH quando comparado ao GC.

A dosagem das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) revelou um aumento progressivo da peroxidação lipídica nos grupos GH, GDC e GDCH comparado ao GC, assim como um aumento de GDC comparado ao GH e do GDCG em relação ao GH e GDC.

Tabela 7. Avaliações do estresse e dano causados pela oxidação no parênquima pulmonar dos grupos experimentais

	GC	GH	GDC	GDCH	p
SOD (U/mg prot)	26,1 ± 1,8	24,4 ± 2,0	20,9 ± 1,7	17,5 ± 1,4 ^{a,b}	<0,05
CAT (U/mg prot)	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1 ^a	<0,05
TBARS (nM/mg prot)	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0 ^{a,cd}	0,6 ± 0,0 ^{a,d}	0,8 ± 0,0 ^a	<0,05

Fonte: Dados obtidos experimentalmente .

Legenda: GC: Grupo Controle; GH: Grupo Hiperóxia; GDC: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados; GDCH: Grupo Dieta Rica em Carboidratos Refinados e Hiperóxia; SOD: Superóxido Dismutase; CAT: Catalase; TBARS: substancias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Os dados são apresentados como média ± erro padrão de 6 animais por grupo. (a) e (b) representam diferenças significativas (p< 0,05) em relação ao GC e GH respectivamente. Análise de Variância One Way ANOVA. Pós teste de Bonferroni.

6. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram que uma dieta de alto teor de carboidratos refinados aumenta a massa e a adiposidade corporal nos animais experimentais. Essa dieta tem sido empregada como um modelo de indução de obesidade em ratos e camundongos que é representada pelo aumento da massa corporal, da adiposidade e das concentrações plasmáticas de leptina, colesterol, glicose e insulina (De Lima *et al.*, 2008; Barcellos, 2012; Oliveira *et al.*, 2013).

A obesidade acarreta em diversas complicações no metabolismo de glicose e lipídeos, como o desenvolvimento de resistência a insulina, tipo 2 e hiperlipidemia, levando a síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (Marinou *et al.*, 2010; Chang, H. P. *et al.*, 2011). Desta forma, nós investigamos nesse estudo se a dieta foi capaz de alterar a homeostase da glicose assim como os níveis séricos de lipídeos. Nossos achados corroboram com Oliveira *et al.* (2013) que demonstraram que a dieta rica em carboidratos refinados induziu resistência a insulina e hipercolesterolemia em camundongos BALB/c (Oliveira *et al.*, 2013). Estudos mostraram que o aumento da adiposidade causado pela dieta de alta palatabilidade parece ter influência pela maior ingestão alimentar (Menezes-Garcia *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2013). Porém, não foi encontrado uma diferença na ingestão alimentar dos animais experimentais. Entretanto, é possível especular os efeitos da composição da dieta sobre as respostas metabólicas, já que os nutrientes podem atuar sistemicamente como sinalizadores celulares (Oliveira *et al.*, 2013). Uma vez que a dieta com alto teor de carboidratos refinados possui uma maior quantidade de sacarose quando comparada a dieta controle, essa pode promover maior ativação de enzimas lipogênicas devido a ativação da proteína de ligação ao elemento responsivo ao carboidrato (ChREBP) assim como maior resposta inflamatória e resistência à insulina (Benhamed, Poupeau e Postic, 2013; Oliveira *et al.*, 2013). Além desse mecanismo citado, HAO *et al.* (2012) destacaram que a maior quantidade de sacarose na dieta leva a um maior índice glicêmico, o que resulta na elevação da concentração de glicose sanguínea e insulina pós-prandial, o que favorece o armazenamento de gordura (Hao *et al.*, 2012). Logo, é possível sugerir que a diferença na composição do carboidrato presente na ração de alta palatabilidade, contribuiu para que os animais que a ingeriram apresentassem aumento da massa corporal, adiposidade, área dos adipócitos, intolerância à glicose e hipercolesterolemia.

Evidencia-se na literatura que tanto a obesidade quanto a hiperóxia são desencadeadores de processos inflamatórios (Chang, H.-P. *et al.*, 2011; Bonomini, Rodella e

Rezzani, 2015). Para avaliar se a hiperóxia e/ou dieta com alto teor de carboidratos refinados poderiam gerar um influxo celular do sangue periférico para o parênquima pulmonar foram determinadas a quantidade total e diferencial de leucócitos presentes no lavado broncoalveolar (LBA) e no sangue dos animais. Nós observamos que os animais submetidos a uma dieta com alto teor de carboidratos refinados e que foram expostos a hiperóxia, apresentaram um aumento significativo de células inflamatórias no parênquima pulmonar, em comparação aos animais controle ou que foram submetidos apenas a hiperóxia. Nossos resultados corroboram com estudos anteriores de Nagato *et al.*, 2012, que relatam um aumento de macrófagos e neutrófilos no LBA de camundongos BALB/c expostos a hiperóxia por 24 horas e Valença *et al.*, 2007, que encontraram um aumento de macrófagos em ratos Wistar expostos a hiperóxia por 10, 30 e 90 minutos (Valença *et al.*, 2007; Nagato *et al.*, 2012). Apesar de ter sido encontrado um aumento de células inflamatórias no parênquima pulmonar, as análises estereológicas mostraram que não houve diferença significativa entre a densidade de volume de alvéolo (Vva) e densidade de volume de septo alveolar (Vvsa). Esses dados corroboram com Nagato *et al.* (2012) que não encontraram diferenças estatísticas entre Vva de camundongos BALB/c expostos a hiperóxia por 24 horas (Nagato *et al.*, 2012). Em outros animais e em tempos diferentes, os resultados se diferem, por exemplo, com 48 horas de exposição, Nagato *et al.* (2012) encontraram uma aumento de Vva (Nagato *et al.*, 2012). Todavia, Valença *et al.* (2007) não encontraram diferenças estatísticas na Vva e Vvsa em ratos expostos a hiperóxia por 10 e 30 minutos, mas em 90 minutos foi encontrado uma diminuição Vva concomitante a um aumento de Vvsa em comparação ao grupo controle (Valença *et al.*, 2007). Resultados semelhantes foram encontrados por Nagato *et al.* (2009) que acharam uma diminuição de Vva em ratos Wistar exposto a 100% de oxigênio por 90 minutos (Nagato *et al.*, 2009).

A resposta sistêmica ocorreu, pois houve uma diminuição de leucócitos e linfócitos no sangue do grupo GH quando comparado ao grupo GC e GDC e uma diminuição no grupo GDCH em relação ao GC. Além disso, a exposição à hiperóxia promoveu uma diminuição significativa de neutrófilos e monócitos observados no grupo GH. A contagem dos monócitos também foi menor no grupo GDCH quando comparado ao controle indicando assim, que houve um recrutamento de células do sangue para o local de inflamação. Os nossos dados demonstraram ainda que a hiperóxia pode promover uma inflamação no tecido adiposo de camundongos eutróficos, o que foi evidenciado pelo aumento das citocinas pro-inflamatórias INF- γ e TNF- α . Os macrófagos são a fonte principal de TNF- α e outras moléculas pró-

inflamatórias no tecido adiposo (Weisberg *et al.*, 2003). Dessa forma sugerimos que além do recrutamento de monócitos para o parênquima pulmonar também ocorreu uma migração dessas células para o tecido adiposo. Oliveira *et al* (2013), demonstraram que simultaneamente ao aumento de macrófagos no tecido adiposo, há um aumento do número de linfócitos T reguladores (T reg), indicando um mecanismo contra-regulador para suprimir o aumento agudo na inflamação (Oliveira *et al.*, 2013). Linfócitos T-reg estão diretamente relacionados com o aumento da IL-10 (Feuerer *et al.*, 2009). Dessa forma, o aumento dessa citocina no tecido adiposo dos animais expostos a hiperóxia é justificado. O interferon Gama (IFN- γ) é conhecido por ser liberado por células inflamatórias, inclusive linfócitos, após a exposição a hiperóxia (Valença *et al.*, 2007) . Nossos resultados mostraram um aumento de IFN- γ no tecido adiposo e uma diminuição de linfócitos no sangue indicando uma possível migração dessas células para o tecido adiposo.

Um dos meios para saber sobre o estado de saúde dos animais é através da hematologia clínica que por sua vez pode ser determinada através de vários exames como, por exemplo, o hemograma, um método de análise laboratorial que nos permite verificar aspectos qualitativos e quantitativos dos eritrócitos (eritrograma), dos leucócitos (leucograma) e das plaquetas (plaquetograma) (Descat, 2002). Em nosso estudo, houve uma diminuição significativa de Hemácias, Hemoglobina e Hematócrito nos animais expostos a hiperóxia. Evidencia na literatura que a baixa pressão parcial do oxigênio, em resposta a uma hipóxia arterial, ocorre a ativação do fator de transcrição HIF-1 (*hypoxic-inducible factor 1*) o principal regulador da transcrição no ambiente hipóxico que estimula um aumento na produção de eritropoetina, também chamado de hormônio eritrócito-estimulante pelos rins que age na medula óssea de ossos longos, estimulando a produção de hemácias a fim de compensar essa baixa concentração de oxigênio no sangue. Quando os níveis de oxigênio celulares são normais, esta proteína é rapidamente degradada (Crawford *et al.*, 2006; Gonzalez-Muniesa *et al.*, 2015). Dessa forma em condições de hiperóxia por haver uma maior quantidade do oxigênio disponível acreditamos que haverá uma diminuição mais acentuada do HIF e como consequência uma menor produção de hemácias.

Com o objetivo de avaliar as funções metabólicas desempenhadas pelos órgãos e tecidos, assim como evidenciar patologias ocultas foi realizada as dosagens bioquímicas do sangue (Feldman, Zinkl e Jain, 2000). Os perfis bioquímicos do sangue são utilizados na

veterinária para a avaliação clínica individual, assim como, para avaliar populações de animais. Para animais experimentais, não há um valor de referência único para dosagens hematológicas. Desta forma alguns laboratórios se dedicam a estabelecer seus próprios intervalos de referência, entretanto essa prática tem um alto custo, uma vez que de acordo com a International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) para a amostragem são necessários 120 animais consideráveis sadios de cada linhagem, sexo e idade. Sendo assim a maioria dos estudos adotam os intervalos de referência que constam nas instruções de uso dos fabricantes dos reagentes ou seguem valores de biotérios nacionais ou internacionais (Spinelli e Cruz, 2012). A creatinina e a uréia são marcadores da função renal. A creatinina é derivada do catabolismo da creatina e está presente no fígado, rins, músculos esquelético e cardíaco. Normalmente é excretada pelos rins, principalmente por filtração glomerular (Guyton e Hall, 2006; Wallach, 2013). Segundo Wallach (2013) a creatinina sérica é aumentada no caso de ingestão elevada de carne, doenças musculares e perda da função renal em mais de 50% e pode ser diminuída pela ação de alguns fármacos como cimetidina e trimiotropina (Wallach, 2013). A uréia é sintetizada principalmente no fígado sendo um produto do catabolismo de aminoácidos e proteínas e é a principal fonte de excreção do nitrogênio do organismo, principalmente pela urina. Os seus valores podem estar aumentados em doenças renais e diminuídos nos casos de desnutrição e em dietas hipoprotéicas e ricas em carboidratos (Wallach, 2013). Dessa forma, a dieta empregada nesse estudo contribuiu para redução sérica de uréia.

Os testes utilizados para avaliação da função hepática incluem as dosagens de alanina aminotransferase (ALT/TGP), aspartato aminotransferase (AST/TGO) e fosfatase alcalina (ALP). A ALT é encontrada principalmente no fígado, mas pode ser encontrada em quantidades moderadas no rim e em pequenas quantidades na musculatura esquelética e no coração. Após uma lesão hepática, a sua concentração no plasma se eleva rapidamente. A AST é encontrada em diversos órgãos e tecidos como fígado, coração, eritrócitos e músculo esquelético. Essa enzima está presente no citoplasma e mitocôndrias, portanto sua elevação indica um comprometimento celular (Siekman *et al.*, 2002). Em pequenos animais, o aumento desta enzima é verificado em situações de desordens inflamatórias e degenerativas da musculatura esquelética, bem como em cardiomiopatias, isquemia, congestão, necrose, neoplasia e trauma (Coles, 1986). A fosfatase alcalina está localizada em vários tecidos, em especial o fígado (células epiteliais do ducto biliar), ossos (osteoblastos), intestinos (bordas em escova das células da mucosa), placenta e tecidos associados ao tumor. A sua atividade

sérica elevada, pode ter origem hepatobiliar, principalmente devido à colestase e necrose por obstrução biliar intra-hepática e sua diminuição pode ser devido a doença celíaca, escorbuto, hipotireoidismo e deficiências nutricionais de vitamina B₁₂, Zinco e Magnésio (Feldman, Zinkl e Jain, 2000; Wallach, 2013). Não há na literatura uma correlação entre hiperóxia e diminuição dos níveis séricos de ALT, entretanto Wallach (2013) relatou uma diminuição dos valores dessa enzima em cirurgia cardíaca com oxigenação extracorpórea (Wallach, 2013).

Neste estudo, as atividades de Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT) foram avaliadas para melhor compreensão de suas contribuições para o desequilíbrio redox. A SOD é a principal defesa enzimática no pulmão contra os efeitos deletérios do radical superóxido (O₂⁻) através da conversão do O₂⁻ em peróxido de hidrogênio (H₂O₂), um substrato para a enzima CAT (Barbosa *et al.*, 2010). O presente estudo mostrou uma diminuição da atividade da SOD e CAT nos animais submetidos à dieta com elevada concentração de carboidratos e hiperóxia, quando comparado ao controle. A enzima CAT é responsável por impedir o acúmulo de H₂O₂, convertendo-o em duas moléculas de água. O acúmulo de H₂O₂, possibilita, através das reações de Fenton e Haber-Weiss, a geração do radical hidroxila (OH•) (Barbosa *et al.*, 2010), que pode reagir na cadeia lateral, onde ataca preferencialmente aminoácidos como a cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina que podem gerar danos em proteínas e como consequência perda da atividade enzimática (Berger *et al.*, 1999). Uma vez que a CAT é formada por aminoácidos, em uma situação em que a defesa da enzima CAT esteja prejudicada, haverá como consequência um acúmulo de H₂O₂ o que levará uma maior produção do radical OH e um maior ataque a essa enzima, o que intensifica o dano.

Dietas com altas concentrações de lipídeos e carboidratos levam um aumento de ácidos graxos livres (AGLs) o que resulta em aumento da β-oxidação mitocondrial e sobrecarga na cadeia transportadora de elétrons provocando aumento da produção das EROS (Lomonaco *et al.*, 2013). A hiperóxia expõe o organismo a níveis elevados de espécies reativas e causam injúria celular presumidamente porque torna a defesa antioxidante celular sobrecarregada, conduzindo a um aumento de ERO. E a carga oxidativa criada pode reduzir os níveis de enzimas antioxidantes (Valença, S. *et al.*, 2007; Nagato *et al.*, 2012). Assim como nossos resultados Nagato *et al.* (2012), não encontraram diferenças significativas na atividade da CAT em BALB/c expostos a hiperóxia por 24 horas. Entretanto encontraram uma diminuição da atividade da SOD. Já, Nagato *et al.* (2009) encontraram uma diminuição da CAT e SOD em ratos Wistar expostos a hiperóxia por 90 minutos. Todavia, diferente dos

demais estudos, nossos animais foram expostos a hiperóxia com 12 semanas, devido ao recebimento da dieta. Dessa forma sugerimos que os animais mais velhos apresentam-se mais resistente a exposição a hiperóxia. Entretanto, quando associado dois fatores que alteram o desequilíbrio redox, como a dieta e a hiperóxia, a atividade dessas enzimas ficam comprometidas. Esses achados comparados com os dados da literatura mostraram ainda, que as respostas pulmonares de desequilíbrio redox variam de acordo com a espécie do animal, bem como com o tempo e concentração de exposição à hiperóxia.

Quando as concentrações de ERO ultrapassam a capacidade antioxidante do organismo há modificações adversas aos componentes celulares, tais como dano as proteínas e ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e oxidação de lipídios (Bindoli e Rigobello, 2013). Na dosagem das substancias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), produtos da peroxidação lipídica reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando malondialdeído dessa forma, a peroxidação lipídica é usada rotineiramente como um indicador do desequilíbrio redox resultante do ataque dos radicais livres sobre a membrana celular (Venkatraman *et al.*, 1998). Assim como nossos resultados Valença *et al* (2007) encontraram um aumento progressivo de malondialdeído em ratos Wistar exposto a hiperóxia por 10, 30 e 90 minutos em comparação ao grupo controle assim como Nagato *et al* (2012) em camundongos BALB/c expostos a hiperóxia por 24 horas (Valença *et al.*, 2007) e Nagata *et al.*, (2007) que encontraram um aumento da peroxidação lipídica em camundongos balb/C expostos a 95% de oxigênio por 72 horas (Nagata *et al.*, 2007).

Em nossos estudos verificamos que tanto a dieta quanto a exposição à hiperóxia são fatores que isoladamente são capazes de causar um dano na bicamada lipídica das membranas das células pulmonares e quando em associação esse dano de intensifica.

7. CONCLUSÕES

- Nosso estudo demonstrou que uma dieta com alto teor de carboidratos refinados foi capaz de promover um aumento de massa corporal, área dos adipócitos, índice de adiposidade, níveis séricos de colesterol e resistência à insulina.
- A hiperóxia isoladamente promoveu uma inflamação no tecido adiposo evidenciada pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias, assim como uma diminuição dos níveis séricos de hematócrito, hemoglobina e hemácias.
- A dieta com alto teor de carboidratos refinados associada à exposição à hiperóxia foi capaz de produzir uma inflamação pulmonar, bem como o desequilíbrio redox.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESO. Diretrizes brasileiras de obesidade-Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. ABESO. Itapevi, SP: AC Farmacêutica:85 p. 2009.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984. ISSN 0076-6879. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727660>>.

AIRES, M. **Fisiologia**. . 2ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, 2012. 1352 p. ISBN 9788527721110.

AKERBOOM, T. P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 373-82, 1981. ISSN 0076-6879. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7329314>>.

ANJOS, L. A. Índice de massa corporal (massa corporal.estatura-2) como indicador do estado nutricional de adultos: revisão da literatura. **Rev. Saúde Pública**, v. 26, n. 6, p. 431-436, 12/1992 1992. ISSN 0034-8910. Disponível em: <http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-89101992000600009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

ARITA, Y. et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 257, n. 1, p. 79-83, Apr 2 1999. ISSN 0006-291X (Print)0006-291x. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

ARKAN, M. C. et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nat Med**, United States, v. 11, n. 2, p. 191-8, 2005. ISSN 1078-8956 (Print)1078-8956 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nm1185>>.

BAHCECI, M. et al. The correlation between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and high sensitivity C-reactive protein levels. Is adipocyte size associated with inflammation in adults? **J Endocrinol Invest**, v. 30, n. 3, p. 210-4, Mar 2007. ISSN 0391-4097. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

BALL, J.; RANZANI, O. T. Hyperoxia following cardiac arrest. **Intensive Care Med**, Jan 29 2015. ISSN 0342-4642. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00134-015-3660-1>>.

BARBOSA, K. B. F. et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev. Nutr.**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 08/2010 2010. ISSN 1415-5273. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1415-52732010000400013&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>.

BARCELLOS, L. A. M. Resposta do sistema serotoninérgico central ao treinamento físico em ratos alimentados com dieta de alta palatabilidade. 2012. 144 (Dissertação de mestrado apresentada no Programa de Pós graduação em Ciências do Esporte) EEEFTO-UFMG, UFMG, Belo Horizonte.

BARRIOS, C. et al. Anthropometry and body composition profile of girls with nonsurgically treated adolescent idiopathic scoliosis. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 36, n. 18, p. 1470-7, Aug 2011. ISSN 1528-1159. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21242873>>.

BASTOS, D. H. M. et al. Effects of dietary bioactive compounds on obesity induced inflammation. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 5, p. 646-656, 07/2009 2009. ISSN 0004-2730. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0004-27302009000500017&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>

BENHAMED, F.; POUPEAU, A.; POSTIC, C. The transcription factor ChREBP: a key modulator of insulin sensitivity? **Med Sci (Paris)**, France, v. 29, n. 8-9, p. 765-71, 2013. ISSN 0767-0974 (Print)0767-0974 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1051/medsci/2013298016>>.

BENIPAL, B. et al. Inhibition of the phospholipase A activity of peroxiredoxin 6 prevents lung damage with exposure to hyperoxia. **Redox Biol**, v. 4c, p. 321-327, Jan 16 2015. ISSN 2213-2317. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.011>>.

BERGER, P. et al. Ozone and hydroxyl radicals induced oxidation of glycine. **Water Research**, v. 33, n. 2, p. 433-441, Fevereiro de 1999 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00230-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00230-9)>.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Química Nova*, 2006.

BINDOLI, A.; RIGOBELLO, M. P. Principles in redox signaling: from chemistry to functional significance. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 13, p. 1557-93, May 1 2013. ISSN 1523-0864. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1089/ars.2012.4655>>.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ J**, v. 5, n. 1, p. 9-19, Jan 2012. ISSN 1939-4551. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>>.

BONOMINI, F.; RODELLA, L. F.; REZZANI, R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. **Aging Dis**, United States, v. 6, n. 2, p. 109-20, 2015. ISSN 2152-5250 (Electronic)2152-5250 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14336/ad.2014.0305>>.

BOURLIER, V.; BOULOUMIE, A. Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance. **Diabetes Metab**, France, v. 35, n. 4, p. 251-60, 2009. ISSN 1878-1780 (Electronic)1262-3636 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2009.05.001>>.

BRANSON, R. D.; JOHANNIGMAN, J. A. Pre-hospital oxygen therapy. **Respir Care**, v. 58, n. 1, p. 86-97, Jan 2013. ISSN 0020-1324 (Print)0020-1324. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4187/respcare.02251>>.

BRAY, G. A. Pathophysiology of obesity. **Am J Clin Nutr**, v. 55, n. 2 Suppl, p. 488s-494s, Feb 1992. ISSN 0002-9165 (Print)0002-9165. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

BRAY, G. A. et al. Overweight and obesity: the pathogenesis of cardiometabolic risk. **Clin Cornerstone**, United States, v. 9, n. 4, p. 30-40; discussion 41-2, 2009. ISSN 1873-4480 (Electronic)1873-4480 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-10, 1978. ISSN 0076-6879. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/672633>>.

BUSETTO, L. et al. Assessment of abdominal fat distribution in obese patients: anthropometry versus computerized tomography. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 16, n. 10, p. 731-6, Oct 1992. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

CANTIN, A. M.; RICHTER, M. V. Cigarette smoke-induced proteostasis imbalance in obstructive lung diseases. **Curr Mol Med**, v. 12, n. 7, p. 836-49, Aug 2012. ISSN 1566-5240. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

CARNEVALE SCHIANCA, G. P. et al. Oral glucose tolerance test-based calculation identifies different glucose intolerance phenotypes within the impaired fasting glucose range. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 5, n. 5, p. 533-538, 2015. ISSN 2040-1124. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jdi.12185/abstract>>. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jdi.12185/full>>. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jdi.12185/pdf>>.

CARSWELL, E. A. et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 72, n. 9, p. 3666-70, Sep 1975. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

CHANG, H.-P. et al. Antiobesity activities of indole-3-carbinol in high-fat-diet-induced obese mice. **Nutrition**, v. 27, n. 4, p. 463-470, 01/04/2011 2011. ISSN 0899-9007. Disponível em: <<http://www.nutritionjrnal.com/article/S0899900710003370/abstract>>.

CHANG, H. P. et al. Antiobesity activities of indole-3-carbinol in high-fat-diet-induced obese mice. **Nutrition**, United States, v. 27, n. 4, p. 463-70, 2011. ISSN 1873-1244 (Electronic)0899-9007 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2010.09.006>>.

CHOI, S. W. et al. Acute hyperglycemia and oxidative stress: direct cause and effect? **Free Radic Biol Med**, United States, v. 44, n. 7, p. 1217-31, 2008. ISSN 0891-5849 (Print)0891-5849 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.005>>.

COLES, E. H. **Veterinary Clinical Pathology**. Philadelphia: Saunders, 1986. 486 ISBN 0721618286. Disponível em: <<http://www.amazon.com/Veterinary-Clinical-Pathology-Embert-Coles/dp/0721618286>>.

COOK, G. A.; LAUER, C. M. The Encyclopedia of the Chemical Elements. New York: In: Clifford A. Hampel. Reinhold Book Corporation, 1968.

COUNCIL, N. R. Nutrient requirements of laboratory animals. <http://www.nap.edu/catalog/4758.html>, 1995. Acesso em: 28 de Agosto de 2015.

CRAWFORD, J. H. et al. Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation. **Blood**, v. 107, n. 2, p. 566-74, Jan 15 2006. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-07-2668>>.

CZERNICHOW, S. et al. Body mass index, waist circumference and waist-hip ratio: which is the better discriminator of cardiovascular disease mortality risk?: evidence from an individual-participant meta-analysis of 82 864 participants from nine cohort studies. **Obes Rev**, v. 12, n. 9, p. 680-7, Sep 2011. ISSN 1467-7881. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-789X.2011.00879.x>>.

DE LIMA, D. C. et al. The enhanced hyperglycemic response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex. **Metab Brain Dis**, v. 23, n. 4, p. 361-73, Dec 2008. ISSN 0885-7490 (Print)0885-7490 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11011-008-9101-x>>.

DESCAT, F. Hématologie du rat : hémogramme et myélogramme. 2002. PeerReviewed Ecole Nationale Veterinaire, Toulouse, France, 2002.

DUARTE, A. C. G. Avaliação Nutricional - Aspectos Clínicos e Laboratoriais. 1 ed. Rio de Janeiro, Brasil: Atheneu, 2007. 639 ISBN 9788573799071.

DUQUIA, R. P. et al. Epidemiology of elevated tricipital and subscapular skinfolds in adolescents. **Cad. Saúde Pública**, v. 24, n. 1, p. 113-121, 01/2008 2008. ISSN 0102-311X.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0102-311X2008000100011&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>.

DÂMASO, A. R. et al. Tratamento multidisciplinar reduz o tecido adiposo visceral, leptina, grelina e a prevalência de esteatose hepática não alcoólica (NAFLD) em adolescentes obesos. **Rev Bras Med Esporte**, v. 12, n. 5, p. 263-267, 10/2006 2006. ISSN 1517-8692. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1517-86922006000500008&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_a](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1517-86922006000500008&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)[rttext](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1517-86922006000500008&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>.

ESPOSITO, K.; GIUGLIANO, D. Diet and inflammation: a link to metabolic and cardiovascular diseases. **Eur Heart J**, England, v. 27, n. 1, p. 15-20, 2006. ISSN 0195-668X (Print)0195-668X (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehi605>>.

ESPOSITO, K. et al. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 3, p. 1055-8, Mar 2003. ISSN 0021-972X (Print)0021-972x. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1210/jc.2002-021437>>.

FELDMAN, B.; ZINKL, J.; JAIN, N. Schalm's Veterinary Hematology. 5° ed. Baltimore: 147 Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

FEUERER, M. et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. **Nat Med**, United States, v. 15, n. 8, p. 930-9, 2009. ISSN 1546-170X (Electronic)1078-8956 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nm.2002>>.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J Clin Invest**, v. 114, n. 12, p. 1752-61, Dec 2004. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1172/jci21625>>.

GARN, S. M.; LEONARD, W. R.; HAWTHORNE, V. M. Three limitations of the body mass index. **Am J Clin Nutr**, v. 44, n. 6, p. 996-7, Dec 1986. ISSN 0002-9165 (Print)0002-9165. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

GONZALEZ-MUNIESA, P. et al. Effects of Hyperoxia on Oxygen-Related Inflammation with a Focus on Obesity. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2015, p. 8957827, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2016/8957827>>.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de fisiologia médica. . 10 ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan 2002.

_____. Tratado de fisiologia médica. . 10 ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan 2006.

HAJER, G. R.; VAN HAEFTEN, T. W.; VISSEREN, F. L. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. **Eur Heart J**, England, v. 29, n. 24, p. 2959-71, 2008. ISSN 1522-9645 (Electronic)0195-668X (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehn387>>.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Ed. 4, Oxford: Clarendon Press. 2006.

HAO, Q. et al. High-glycemic index carbohydrates abrogate the antiobesity effect of fish oil in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, United States, v. 302, n. 9, p. E1097-112, 2012. ISSN 1522-1555 (Electronic)0193-1849 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00524.2011>>.

HARROLD, J. A. et al. Individual severity of dietary obesity in unselected Wistar rats: relationship with hyperphagia. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 279, n. 2, p. E340-7, Aug 2000. ISSN 0193-1849. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10913034>>.

HAUNER, H. The new concept of adipose tissue function. **Physiol Behav**, v. 83, n. 4, p. 653-8, Dec 30 2004. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.09.016>>.

HOSOGAI, N. et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. **Diabetes**, United States, v. 56, n. 4, p. 901-11, 2007. ISSN 0012-1797 (Print)0012-1797 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2337/db06-0911>>.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). POF 2008 2009 - Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. IBGE 2010.

IMAI, K.; D'ARMIENTO, J. Activation of an Embryonic Gene Product in Pulmonary Emphysema: Identification of the Secreted Frizzled-Related Protein. **CHEST Journal**, v. 117, n. 5_suppl_1, p. 229S-229S, 2000/05/01 2000. ISSN 0012-3692. Disponível em: <<http://journal.publications.chestnet.org/data/Journals/CHEST/21946/229S.pdf>>.

JAMES, P. T. et al. The worldwide obesity epidemic. **Obes Res**, v. 9 Suppl 4, p. 228S-233S, Nov 2001. ISSN 1071-7323. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11707546>>.

KALLET, R. H.; MATTHAY, M. A. Hyperoxic acute lung injury. **Respir Care**, v. 58, n. 1, p. 123-41, Jan 2013. ISSN 0020-1324 (Print)0020-1324. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4187/respcare.01963>>.

KARALIS, K. P. et al. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. **FEBS J**, England, v. 276, n. 20, p. 5747-54, 2009. ISSN 1742-4658 (Electronic)1742-464X (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07304.x>>.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 6, p. 2548-56, Jun 2004. ISSN 0021-972X (Print)0021-972x. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1210/jc.2004-0395>>.

KHAN, M. M. **Immunopharmacology - Springer**. 15^oed. Springer US, 2008. ISBN 978-0-387-77976-8. Disponível em: <<http://link.springer.com/book/10.1007%2F978-0-387-77976-8>>.

LEAN, M. E.; HAN, T. S.; DEURENBERG, P. Predicting body composition by densitometry from simple anthropometric measurements. **Am J Clin Nutr**, v. 63, n. 1, p. 4-14, Jan 1996. ISSN 0002-9165 (Print)0002-9165. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 18, p. 60-65, 2003.

LEMIEUX, S. et al. A single threshold value of waist girth identifies normal-weight and overweight subjects with excess visceral adipose tissue. **Am J Clin Nutr**, v. 64, n. 5, p. 685-93, Nov 1996. ISSN 0002-9165 (Print)0002-9165. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

LIEB, W. et al. Association of Parental Obesity With Concentrations of Select Systemic Biomarkers in Nonobese Offspring : The Framingham Heart Study. In: (Ed.). **Diabetes**, v.58, 2009. p.134-7. ISBN 0012-1797 (Print)1939-327X (Electronic).

LOMONACO, R. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: current issues and novel treatment approaches. **Drugs**, v. 73, n. 1, p. 1-14, Jan 2013. ISSN 0012-6667 (Print)0012-6667. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s40265-012-0004-0>>.

LOWE, F. J.; LUETTICH, K.; GREGG, E. O. Lung cancer biomarkers for the assessment of modified risk tobacco products: an oxidative stress perspective. **Biomarkers**, v. 18, n. 3, p. 183-95, May 2013. ISSN 1354-750x. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3109/1354750x.2013.777116>>.

LOWRY, O. H; ROSEBROUGH, N.J; FARR, A.L; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v.193. n.1. p.265-275, 1951.

MARINOU, K. et al. Obesity and cardiovascular disease: from pathophysiology to risk stratification. **Int J Cardiol**, Netherlands, v. 138, n. 1, p. 3-8, 2010. ISSN 1874-1754

(Electronic)0167-5273 (Linking). Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2009.03.135>>.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur J Biochem**, v. 47, n. 3, p. 469-74, Sep 1974. ISSN 0014-2956. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4215654>>.

MARTIN, D. S.; GROCCOTT, M. P. Oxygen therapy in critical illness: precise control of arterial oxygenation and permissive hypoxemia. **Crit Care Med**, v. 41, n. 2, p. 423-32, Feb 2013. ISSN 0090-3493. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1097/CCM.0b013e31826a44f6>>.

MENEZES-GARCIA, Z. et al. Lack of platelet-activating factor receptor protects mice against diet-induced adipose inflammation and insulin-resistance despite fat pad expansion. **Obesity (Silver Spring)**, v. 22, n. 3, p. 663-72, Mar 2013. ISSN 1930-739X (Electronic)1930-7381 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/oby.20142>>.

MOKHTAR, N. et al. Diet culture and obesity in northern Africa. **J Nutr**, v. 131, n. 3, p. 887S-892S, Mar 2001. ISSN 0022-3166. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238780>>.

MOLARIUS, A.; SEIDELL, J. C. Selection of anthropometric indicators for classification of abdominal fatness--a critical review. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 22, n. 8, p. 719-27, Aug 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

MONTE, L. F. V. et al. Bronchopulmonary dysplasia. **J. Pediatr. (Rio J.)**, v. 81, n. 2, p. 99-110, 04/2005 2005. ISSN 0021-7557. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0021-75572005000300004&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>

MOORE, K.; DALLEY, A. F. **Anatomia Orientada para Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. ISBN 8527712571.

MORAES, M. E. D. F. F.; BARBEIRO, T. **Oxigenoterapia domiciliar em adultos**. Rio de Janeiro, Brasil: Nova Fisio, Revista Digital. 15 2012.

NAGATA, K. et al. Overexpression of manganese superoxide dismutase by N-acetylcysteine in hyperoxic lung injury. **Respiratory Medicine**, v. 101, n. 4, p. 800-807, 01/04/2007 2007. ISSN 0954-6111. Disponível em: <
<http://www.resmedjournal.com/article/S0954611106003908/abstract>

NAGATO, A. et al. Hyperoxia-induced lung injury is dose dependent in Wistar rats. **Exp Lung Res**, v. 35, n. 8, p. 713-28, Oct 2009. ISSN 1521-0499. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19895324>>.

NAGATO, A. C. et al. Time course of inflammation, oxidative stress and tissue damage induced by hyperoxia in mouse lungs. **Int J Exp Pathol**, v. 93, n. 4, p. 269-78, Aug 2012. ISSN 1365-2613. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22804763>>.

NATURE. Spoonful of medicine. Disponível em: <http://blogs.nature.com/spoonful/2010/10/lungs_can_taste_bitterness_sci.html> Acesso em 15 de setembro de 2015.

O'DRISCOLL, B. R. et al. British Thoracic Society emergency oxygen audits. **Thorax**, v. 66, n. 8, p. 734-5, Aug 2011. ISSN 0040-6376. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-200078>>.

OLIVEIRA, M. C. et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 9, p. E396-406, Sep 2013. ISSN 1930-7381. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/oby.20230>>.

PEIXOTO, M. D. R. G. et al. Circunferência da cintura e índice de massa corporal como preditores da hipertensão arterial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 4, p. 462-470, 10/2006 2006. ISSN 0066-782X. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0066-782X2006001700011&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>

PRADO, W. L. D. et al. Obesity and inflammatory adipokines: practical implications for exercise prescription. **Rev Bras Med Esporte**, v. 15, n. 5, p. 378-383, 10/2009 2009. ISSN 1517-8692. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1517-86922009000600012&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>.

PRENTICE, A. M.; JEBB, S. A. Beyond body mass index. **Obes Rev**, v. 2, n. 3, p. 141-7, Aug 2001. ISSN 1467-7881 (Print)1467-7881. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

PRINS, J. B. et al. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells. **Diabetes**, v. 46, n. 12, p. 1939-44, Dec 1997. ISSN 0012-1797 (Print)0012-1797. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

REGO, M. A. S.; ANCHIETA, L. M. **Assistência hospitalar ao neonato**: Secretaria de estado de saúde de Minas Gerais. 1: 269 p. 2005.

ROBERTS, D. H. et al. Oxygen Therapy Improves Cardiac Index and Pulmonary Vascular Resistance in Patients With Pulmonary Hypertension. **CHEST Journal**, v. 120, n. 5, p. 1547-1555, 2001/11/01 2001. ISSN 0012-3692. Disponível em: <<http://journal.publications.chestnet.org/data/Journals/CHEST/21969/1547.pdf>>.

ROTELLA, C. M.; DICEMBRINI, I. Measurement of body composition as a surrogate evaluation of energy balance in obese patients. **World J Methodol**, v. 5, n. 1, p. 1-9, Mar 26 2015. ISSN 2222-0682 (Print)2222-0682 (Electronic). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5662/wjm.v5.i1.1>>.

SALVE, M. G. C. Obesidade e Peso Corporal: riscos e conseqüências. **Movimento & Percepção**, v. 6, n. 6, p. 20, 2006.

SBPT. Sociedade Brasileira De Pneumologia e Tisiologia (SBPT). II Consenso de Ventilação Mecânica. SBPT 2000.

SBPT_A. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia_a (SBPT_a). Oxigenoterapia domiciliar prolongada (ODP). SBPT_A. São Paulo, Brasil: J. Pneumologia. 26 2000.

SCHONFELD, P.; WOJTCZAK, L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. **Free Radic Biol Med**, United States, v. 45, n. 3, p. 231-41, 2008. ISSN 0891-5849 (Print)0891-5849 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.029>>.

SEIDELL, J. C. et al. Waist and hip circumferences have independent and opposite effects on cardiovascular disease risk factors: the Quebec Family Study. **Am J Clin Nutr**, v. 74, n. 3, p. 315-21, Sep 2001. ISSN 0002-9165 (Print)0002-9165. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

SIEKMANN, L. et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 7. Certification of four reference materials for the determination of enzymatic activity of gamma-glutamyltransferase, lactate dehydrogenase, alanine aminotransferase and creatine kinase accord. **Clin Chem Lab Med**, v. 40, n. 7, p. 739-45, Jul 2002. ISSN 1434-6621 (Print)1434-6621. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1515/cclm.2002.127>>.

SPINELLI, M. O.; CRUZ, M., M.C. Comparison of biochemical parameters of mice created in different health conditions. **Scientia Plena**, v. 8, n. 2, 2012-03-16 2012. Disponível em: <<http://www.scientiaplenu.org.br/sp/article/view/484>>.

STEFANOVIC, A. et al. The influence of obesity on the oxidative stress status and the concentration of leptin in type 2 diabetes mellitus patients. **Diabetes Res Clin Pract**, Ireland,

v. 79, n. 1, p. 156-63, 2008. ISSN 1872-8227 (Electronic)0168-8227 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2007.07.019>>.

STEVENS, J. Impact of age on associations between weight and mortality. **Nutr Rev**, v. 58, n. 5, p. 129-37, May 2000. ISSN 0029-6643 (Print)0029-6643. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

STRACZKOWSKI, M. et al. Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor-alpha system. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 10, p. 4602-6, Oct 2002. ISSN 0021-972X (Print)0021-972x. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1210/jc.2002-020135>>.

STUNKARD, A. Factores determinantes de la obesidad: opinión actual. In: La obesidad en la pobreza: un novo reto para la salud pública. . **Organização Panamericana da Saúde** v. 576, p. 6, 2000.

TATEYA, S. et al. An increase in the circulating concentration of monocyte chemoattractant protein-1 elicits systemic insulin resistance irrespective of adipose tissue inflammation in mice. **Endocrinology**, United States, v. 151, n. 3, p. 971-9, 2010. ISSN 1945-7170 (Electronic)0013-7227 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1210/en.2009-0926>>.

TORTORA, G. J. Princípios de Anatomia Humana. 10ªed. Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan, 2007. ISBN 8527712750.

TREACHER, D. F.; LEACH, R. M. Oxygen transport—1. Basic principles. **BMJ**, v. 317, n. 7168, p. 1302-6, Nov 7 1998. ISSN 0959-8138 (Print)1468-5833 (Electronic). Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

VALENCA, S. S. et al. Light cigarette smoke-induced emphysema and NFkappaB activation in mouse lung. **Int J Exp Pathol**, v. 87, n. 5, p. 373-81, Oct 2006. ISSN 0959-9673 (Print)0959-9673. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2613.2006.00492.x>>.

VALENÇA, S. S. et al. Efeitos da hiperóxia sobre o pulmão de ratos Wistar. **Bras Pneumol**, v. 33, n. 6, 2007.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**, Ireland, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006. ISSN 0009-2797 (Print)0009-2797 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>>.

VENKATRAMAN, J. T. et al. Effects of dietary n-6 and n-3 lipids on antioxidant defense system in livers of exercised rats. **J Am Coll Nutr**, v. 17, n. 6, p. 586-94, Dec 1998. ISSN 0731-5724 (Print)0731-5724. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WAJCHENBERG, B. L. et al. Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 53, n. 2, p. 145-50, Mar 2009. ISSN 1677-9487 (Electronic)0004-2730 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/>>.

WALLACH, J. B. Interpretação de exames laboratoriais. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1: 985 p. 2013.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, United States, v. 112, n. 12, p. 1796-808, 2003. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1172/jci19246>>.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. Schalm's Veterinary Hematology. 6. Ames, IA: Wiley-Blackwell, 2010. 1232.

WHO. World Health Organization. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of WHO Consultation on Obesity. Geneva; 1998.

_____. World Health Organization. Report of a WHO Consultation. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Geneva 1999.

_____. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser. WHO. 894: i-xii, 1-253 p. 2000.

_____. World Health Organization. Obesity and overweight. Fact. Sheet. No. 311. WHO: WHO- World Health Organization 2015.

WHO, W. H. O. Global Infobase. <<https://apps.who.int/infobase>>, 2010. Acesso em: 24/10/2013.

WILHELM FILHO, D. et al. Comparison between the antioxidant status of terrestrial and diving mammals. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 133, n. 3, p. 885-92, Nov 2002. ISSN 1095-6433. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12443944>>.

WONG, C.; MARWICK, T. H. **Obesity cardiomyopathy: pathogenesis and pathophysiology**. Nat Clin Pract Cardiovasc Med. England. 4: 436-43 p. 2007.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-32, Dec 1 1994. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/372425a0>>.

ZOU, C.; SHAO, J. Role of adipocytokines in obesity-associated insulin resistance. **J Nutr Biochem**, United States, v. 19, n. 5, p. 277-86, 2008. ISSN 0955-2863 (Print)0955-2863 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.06.006>>.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado da comissão de ética de uso de animais



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559 -1368 Fax: (31) 3559-1370
E-mail: ceua@propo.ufop.br



OFÍCIO CEUA Nº. 12/2014, de 21 de fevereiro de 2014

**Ilustríssimo Senhor
Professor Doutor Frank Silva Bezerra
DECBI/ICEB/UFOP**

Senhor Pesquisador,

Em sua 48ª reunião ordinária, realizada em 07/02/2014, a Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP -, ao analisar o protocolo para uso de animais em pesquisa nº. 2013/58, com o título "A INFLUÊNCIA DA OBESIDADE SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA PULMONAR DE CAMINDONGOS EXPOSTOS À HIPERÓXIA", de sua autoria, considerou-o com pendências. Recomendamos as seguintes alterações, para que possamos reavaliá-lo e emitir um parecer final.

- I. No item 10.2 USO DE FÁRMACOS ANESTÉSICOS, as doses definidas não atendem às indicadas nos manuais vigentes, devem ser revistas. Corrigir a dose dos anestésicos, apresentando referências.

2 As alterações devem ser listadas em carta de encaminhamento com as devidas explicações e justificativas, e destacadas no corpo do formulário. Toda a documentação que sofrer alteração deverá ser entregue na secretaria da CEUA, em versão impressa e em versão eletrônica por e-mail ou entregue na secretaria da CEUA em CD ou DVD.

Atenciosamente,

Wanderson Geraldo de Lima

**Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coordenador da CEUA/UFOP**