



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Paloma Rodrigues Chaves

**Efeito da inalação de pó de carvão nos parâmetros de
estresse oxidativo e inflamação em ratos obesos.**

Porto Alegre

2016

Paloma Rodrigues Chaves

Efeito da inalação de pó de carvão nos parâmetros de estresse oxidativo e inflamação em ratos obesos.

Trabalho de conclusão de curso de Ciências Biológicas apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Claudio Fonseca Moreira

Porto Alegre

2016

Paloma Rodrigues Chaves

**Efeito da inalação de pó de carvão nos parâmetros de estresse oxidativo e
inflamação em ratos obesos**

Trabalho de conclusão de curso de Ciências Biológicas apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Diana Carolina Rostirolla –
Departamento Bioquímica UFRGS

Prof. Dra. Vera Maria Treis Trindade –
Departamento Bioquímica UFRGS

Prof. Dr. José Claudio Fonseca Moreira –
Departamento Bioquímica UFRGS

Porto Alegre

2016

Agradecimentos

A Deus, pelo seu amor e zelo comigo. Através da fé tenho vencido barreiras e me fortalecido.

À minha família, que sempre me apoiou, me fortaleceu e me incentivou dia após dia e foi fundamental para que eu chegasse até o exato momento. Em especial meus pais Rogério e Floraine e meus irmãos Bruna, Rafaela, João Pedro e Gabriel, assim como meu vô João Chaves, vocês foram os maiores incentivadores e eu amo muito todos vocês.

Ao meu marido Misael, pelo amor e carinho dedicados a mim e por toda a atenção e paciência, foste meu alicerce durante este trabalho. Te amo demais!

Ao meu orientador, professor Dr. José Claudio, pela oportunidade, paciência, atenção e confiança. Admiro-lhe muito!

A todos os colegas do laboratório 32 que me acolheram com tanto amor desde o início da minha graduação e até hoje me proporcionam momentos de alegria. Todos de uma forma direta ou indireta foram muito importantes para a minha formação durante a Iniciação Científica. Em especial, a Dra. Kátia Martinello e ao Me. Juciano Gasparotto a quem devo a minha admiração e carinho, pois foram fundamentais para que este trabalho fosse concluído. À Kátia por permitir que eu iniciasse este projeto junto a ela e por ter me amparado em todos os momentos necessários. Ao Juciano pela dedicação e paciência voltada a mim na finalização deste trabalho. Muito obrigada de coração!

Aos membros da banca examinadora, Dra. Diana Carolina Rostirolla e Prof. Dra Vera Maria Treis Trindade, muito obrigada por aceitarem o convite e pelas considerações para melhoria deste trabalho.

À Pró-Reitoria de Pesquisa da UFRGS (Propesq-UFRGS), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), seja pelo suporte financeiro ao projeto de pesquisa ou pelas bolsas fornecidas ao longo da minha graduação.

Muito obrigada a todos os que estiveram ao meu lado no meio acadêmico, aos meus colegas do curso que todos os dias me fortalecem e aos meus irmãos da igreja que sempre me apoiam e me impulsionam a seguir. Muito obrigada!

RESUMO

A Obesidade é um transtorno nutricional mais importante a nível mundial, a sua associação com a poluição ambiental pode ser um gatilho para modificar os parâmetros de estresse oxidativo e inflamação. O carvão é um recurso utilizado mundialmente e é uma importante fonte combustível para a geração de energia elétrica. Cerca de 85% do carvão produzido no Brasil é destinado as termoelétricas, porém este combustível causa graves problemas a saúde humana devido a sua alta toxicidade e capacidade de bioacumulação. Sabendo disso, nosso principal objetivo foi estudar os efeitos da inalação de pó de carvão no sangue, fígado e pulmão de animais obesos e não obesos. Para a realização desse trabalho utilizamos ratos Wistar que foram divididos em 2 grupos de 16 animais, o primeiro foi alimentado com uma normolipídica (NL) e o segundo com uma dieta hiperlipídica (HL). Depois de cinco meses de dieta, os animais foram submetidos à inalação de pó de carvão por 28 dias e subdivididos em: NL controle, NL com inalação, HL controle e HL com inalação. O carvão utilizado é da termoelétrica Tractebel Energia GDF Suez localizada em Santa Catarina e a concentração deste foi de 10 mg/m³ durante 3 horas por dia. As técnicas avaliadas foram Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPX), Glutathione S-Transferase (GST), Sulfidril (SH), Carbonil e Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBA), assim como as citocinas interleucina 1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e HSP70 que foram quantificados por ELISA indireto. Além disso, foram feitas análises histológicas, cometa e micronúcleo. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 5. Os dados foram analisados de forma grupada por meio de uma anova de duas vias, calculando o valor P, sendo considerado significativo quando $P < 0,05$. Os nossos resultados mostram que o modelo para induzir obesidade através da dieta foi eficiente e que a inalação de carvão alterou o padrão de atividade enzima CAT no sangue diminuindo a atividade da mesma, tanto os níveis de TBA como os de grupamentos Carbonil tiveram um aumento significativo no pulmão e fígado, respectivamente. As interleucinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α mostraram-se aumentadas tanto nos animais obesos como nos animais que receberam inalação de pó de carvão. Na análise histológica observamos esteatose microvesicular grave no fígado e no Cometa observamos dano ao DNA nos animais submetidos ao carvão. Com isso concluímos que no geral a inalação de carvão contribuiu para um decréscimo nas atividades enzimáticas da CAT, GPX e GST, assim como um decréscimo no SH e um aumento no TBA e carbonil podendo indicar um possível dano oxidativo que

pode ser evidenciado, também, pelo ensaio cometa, na maior parte das vezes a obesidade não representou um fator de risco a mais para a inalação de carvão.

ABSTRACT

Obesity is an important nutritional disorder in the world, its association with environmental pollution can be a trigger to increase oxidative stress and inflammatory parameters. Coal is a resource used throughout the world as an important fuel source for generating electricity. About 85% of the coal produced in Brazil is destined for the thermoelectric, but this fuel causes serious problems to human health due to its high toxicity and bioaccumulation potential. Our objective was to study the effects of coal dust inhalation in the blood, liver and lungs of obese and non-obese animals. To perform this work we used Wistar rats that were divided into 2 groups of 16 animals, the first group was fed with a normolipide diet (NL) and the second group received a fat diet (HL). After five months of diet the animals were subjected to inhalation of coal dust for 28 days and divided into: control NL, NL with inhalation, HL, and HL with inhalation. The coal used was from the thermoelectric Tractebel Energia GDF Suez located in Santa Catarina/Brazil and the concentration was 10 mg/m³ for 3 hours per day. The evaluated techniques were catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), glutathione S-transferase (GST), sulfhydryl (SH), carbonyl and Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The cytokines interleukin 1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) and the protein HSP70 were quantified in serum by ELISA. Furthermore, histological analysis, comet assay and micronucleus were investigated. Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism 5. Data were analyzed grouped by means of a two-way ANOVA, *p* value was considered significant when *p*<0.05. Our results show that the model to induce obesity by diet was efficient and coal inhalation decreased the CAT activity in the blood. TBARS and carbonyl levels in lung and liver were increased. The pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α were increased in obese animals and in animals that inhaled coal dust. Histological analysis showed serious microvesicular steatosis in the liver and comet assay observed DNA damage in animals subjected to coal. We conclude that inhalation coal dust contributed to decrease enzymatic activity of CAT, GPX and GST, as well as a decrease in SH groups and an increase in the TBARS and carbonyl levels may indicate a possible oxidative damage that was evidenced by comet assay, in most cases, obesity does not represent an additional risk factor for inhalation of coal.

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT	Catalase
CDNB	Cloro 2, 4 Dinitrobenzeno
CEUA	Comitê de Ética para Uso de Animais da UFRGS
COAL	Carvão
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNPB	Dinitrofenilhidrazina
EH	Esteatose hepática
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GSH	Glutationa reduzida
GPX	Glutationa Peroxidase
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa S-Transferase
HL	Dieta Hiperlipídica
NL	Dieta Normolipídica
•OH	Radical hidroxila
O₂ •-	Ânion superóxido ou radical superóxido
SOD	Superóxido Dismutase
SH	Sulfidril
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TBARS	Espécies reativas do Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloro Acético

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Esquema do modelo experimental.....	11
Figura 2 – Câmara de inalação.....	12
Figura 3 - Disposição do tecido adiposo no animal.....	12
Figura 4 – Ensaio Cometa.....	15
Figura 5 – Pesos dos tecidos do animal.....	17
Figura 6 – Danos oxidativos representados pelo SH, TBA e Carbonil.....	20
Figura 7 – Enzima de detoxificação (GST).....	20
Figura 8 – Citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e HSP70.....	21
Figura 9 – Histologia.....	22
Figura 10 – Ensaio de cometa e micronúcleo.....	22
Tabela 1- Enzimas CAT, SOD, GPX e o conjunto delas SOD/CAT+GPX.....	18
Tabela 2- Concentração dos elementos do carvão.....	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
	1.1 Obesidade.....	1
	1.2 Carvão Mineral.....	2
	1.3 Metais Pesados e o risco a Saúde.....	4
	1.4 Parâmetros Oxidativos.....	5
	1.5 Detoxificação Enzimática.....	5
2	JUSTIFICATIVA.....	8
3	OBJETIVOS.....	9
	3.1 Objetivo Geral.....	9
	3.2 Objetivos Específicos.....	9
4	METODOLOGIA	10
	4.1 Animais.....	10
	4.2 Material Poluente.....	10
	4.3 Modelo experimental.....	10
	4.4 Exposição dos ratos ao pó de carvão mediante inalação.....	11
	4.5 Coleta e armazenamento dos tecidos.....	12
	4.6 Atividade enzimática.....	13
	4.7 Peroxidação lipídica (TBARS)	13
	4.8 Carbonilação de proteínas (Carbonil)	13
	4.9 Quantificação de grupo Sulfidrila (SH)	13
	4.10 Citocinas no Soro – Inflamação.....	14
	4.11 Ensaio cometa.....	14
	4.12 Histologia.....	14
	4.13 Teste de micronúcleo.....	15
5	RESULTADOS.....	16
	5.1 Pesos dos tecidos e mensuração de glicemia.....	16
	5.1.1 Efeito da inalação sobre o peso dos animais	16
	5.1.2 Efeito da inalação sobre a glicemia dos animais.....	16
	5.2 Atividade enzimática.....	17
	5.3 Parâmetros de danos oxidativos.....	19
	5.4 Enzima de Detoxificação.....	20

5.5	Parâmetros pró-inflamatórios	21
5.6	Histologia	21
5.7	Micronúcleo e Cometa.....	22
6	DISCUSSÃO	23
7	CONCLUSÃO.....	27
8	REFERÊNCIAS.....	28
9	APÊNDICE	34

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

A obesidade é um transtorno mundial e está associado a doenças cardiovasculares, diabetes e alterações cognitivas (Rummel et al., 2016) e é um dos maiores desafios para a saúde pública. Os fatores genéticos, ambientais e comportamentais são importantes contribuintes para o desenvolvimento desta condição e as principais causas desta epidemia atual de obesidade estão associadas ao estilo de vida sedentário, aumento do consumo de alimentos ricos em gorduras saturadas e açúcares e reduzida atividade física (Awada et al., 2013) sendo que todas essas mudanças podem estar correlacionadas com a urbanização e industrialização.

A alimentação descontrolada e em excesso é estimulado pela disponibilidade de alimentos ricos em gordura e açúcar (Aguila e Mandarin, 2003; Woods et al., 2003). Por outro lado, os transtornos metabólicos provocados pela obesidade, caracterizam-se principalmente por alterações produzidas nos mecanismos reguladores do apetite e do gasto energético e essas alterações no “balanço energético” (energia ingerida versus energia gasta) darão lugar a variações da massa corporal.

A obesidade, fisiologicamente, é caracterizada por um aumento na quantidade de gordura no tecido adiposo, na forma de triglicerídeos, podendo afetar negativamente a saúde. Esse transtorno nutricional a nível mundial está associado a várias desordens metabólicas como o aumento na expressão de marcadores pró-inflamatórios e risco elevado de várias doenças incluindo resistência a insulina, osteoartrite, apnéia do sono, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, doenças gastrointestinais, dificuldades respiratórias e vários tipos de câncer (Haslam e James, 2005). Associando-se com um aumento da morbidade e mortalidade (World Health Organization, 2003), De modo geral, a obesidade, também pode ser um fator que acelera o processo normal de envelhecimento (Tzanetakou et al., 2012) e pode-se dizer que a perda de peso permite diminuir significativamente estes riscos e apresentar melhorias

significativas nos distintos fatores de risco como a pressão arterial, a tolerância à glicose e a concentração de lipídios séricos.

Algumas mutações estão associadas a esta condição de obesidade como as mutações que produzem o gene do receptor de melanocortina (Yeo et al., 2003) e esta síndrome é herdada de forma co-dominante. Outra mutação associada com a obesidade é a deficiência do gene de leptina (Montague et al., 1997) ou a deficiência do gene receptor de leptina (Clemente et al., 1998). Ainda que estas mutações verifiquem a importância dos fatores genéticos, não explicam a obesidade em todo o mundo (Froguel et al., 2000).

O aumento de massa adiposa associada à obesidade está relacionada com um baixo grau de resposta inflamatória crônica, caracterizada pela produção alterada de adipocinas e o aumento biológico de marcadores de inflamação, tais como o Fator de Necrose Tumoral- α e Interleucina-1. Alguns estudos realizados sugerem que os adipócitos não são as principais fontes de secreção de adipocinas inflamatórias no tecido adiposo. As células não adiposas que constituem uma fração do estroma vascular, que inclui pré-adipócitos, células endoteliais, os fibroblastos, os leucócitos e macrófagos parecem ser o responsável pela resposta inflamatória crônica observada na obesidade (Weisberg et al., 2003).

1.2 Carvão Mineral

O carvão é uma rocha sedimentar que é composta por uma mistura constituída de carbono, hidrogênio, oxigênio e enxofre e é um recurso muito utilizado mundialmente. É um mineral formado a partir da vegetação compactada entre os estratos da rocha que ao longo do tempo foi alterada devido às condições de calor e pressão. Nas centrais elétricas, o carvão é moído antes da queima para que seja obtido um pó fino, aumentando a área de superfície para que a queima seja mais rápida e é continuado o processo para a geração de eletricidade. Além de ser usado para fornecer energia elétrica, o carvão é usado na produção de cimento e é essencial na produção de ferro e aço, também é utilizado em refinarias de alumínio, fábricas de papel e indústrias farmacêuticas. Os sub-produtos do carvão são aplicados como componentes para sabonete, aspirina, solventes, corantes, plásticos e fibras (León-Mejía et al., 2016).

A composição química do carvão mineral brasileiro varia, dependendo da sua formação geológica e os diferentes processos metamórficos sofridos pelos materiais orgânicos. Adicionalmente, o carvão brasileiro teve sua origem há cerca de 240 milhões de anos e de um modo geral, tem características diferentes se comparado aos carvões procedentes dos Estados Unidos da América, África do Sul e outros países, pois o regime de deposição trouxe, simultaneamente, matéria vegetal e mineral (Oliveira et al., 2012). Quando ocorre o processo de combustão, nos geradores de vapor das termelétricas, podem ocorrer danos à saúde humana tanto das pessoas envolvidas diretamente (trabalhadores e funcionários em geral) e indiretamente (moradores da vizinhança) com as centrais termelétricas a carvão.

Sabe-se que durante a trituração do carvão produzem-se enormes quantidades de partículas de pó e de material particulado. A inalação contínua de partículas deste pó de carvão é uma importante fonte celular e não celular de espécies reativas do oxigênio (ERO) no organismo, no dano de células alvo de pulmão e também de outras linhagens celulares assim como de importantes macromoléculas como o DNA, se difundindo e circulando pela corrente sanguínea (Schins e Borm, 1999). Os alvos de ataque das ERO são macromoléculas como os lipídios (peroxidação lipídica), proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (DNA).

As ERO compreendem numerosos radicais, entre os quais estão os radicais hidroxílicos, superóxidos, óxidos de nitrogênio e radicais peroxílicos, muitos dos quais induzem mutações pontuais e aberrações cromossômicas nas células, produzidas principalmente pela indução de alterações e modificações oxidativas. Tais mudanças podem incluir a indução de rompimentos de cadeia simples no DNA, modificação oxidativa do DNA, modificação de bases, mudanças nas sequências, ativação das quinases, ativação de proto-oncogenes e a inativação de genes supressores de tumores (Cooke et al., 2003)

No Brasil, o carvão é principalmente encontrado na região sul do país que corresponde aos estados do Rio Grande do Sul com volume de reserva de 89,25%, Santa Catarina, 10,41% e Paraná com 0,32% (ABCM, 2015; Aneel, 2009). Cerca de 85% do carvão no país é investido na produção de termoeletricidade, 6% na indústria cimenteira, 4% na indústria de papel celulose e os outros 5% na indústria de alimentos, cerâmica e secagem de grãos. (Aneel, 2009). Atualmente, as maiores centrais termoelétricas movidas a carvão mineral da América Latina estão localizadas no estado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. No estado de Santa

Catarina (RS) se localiza o complexo termoeletrico (Tractebel Suez) que é a maior planta de energia de carvão da América do Sul (Silva e Da Boit, 2011). A exploração do carvão em Santa Catarina é feita tanto em minas subterrâneas como a céu aberto e este processo acarreta problemas ambientais modificando a estrutura do ambiente natural, havendo deposição inadequada dos resíduos da mineração e por consequência causando contaminação de águas superficiais e subterrâneas (Junior, 2009). Além disso, promove a contaminação da atmosfera nas proximidades das minas, pela geração de gases e material particulado, ou perda de solo fértil (Sanchez e Formoso, 1990). Essas mudanças, provocadas pela produção de energia através do carvão é muito agressiva ao meio ambiente causando fortes impactos socioambientais através de seu processo de produção, extração e até combustão do mesmo (Aneel, 2009; Burt et al., 2013). Sendo assim, um dos maiores desafios da atualidade, na questão ambiental, é o conhecimento dos efeitos relacionados às doses e concentrações múltiplas dos poluentes, de forma realística a exposição ambiental.

1.3 Metais Pesados e o Risco a Saúde

Como espécies elementais, os metais não são biodegradáveis. Essa indestrutibilidade combinada com a bioacumulação contribui para grande preocupação com relação aos metais como agentes tóxicos. O carvão tem grande capacidade de bioacumulação e traz consigo diversas doenças que prejudicam o organismo.

As doenças pulmonares ocupacionais são geradas pela inalação de pós-minerais como o amianto, sílica e o pó de carvão. Sendo que a inalação de pó de carvão pode causar diversas doenças pulmonares, como a pneumoconiose que é caracterizada pela agregação de macrófagos que fagocitam as partículas de poeira, em áreas próximas às zonas de trocas respiratórias (Rom et al., 1987; Ghanem et al., 2004), a fibrose maciça progressiva (PMF), bronquite, crônica, perda da função pulmonar e enfisema (Schins e Borm, 1999; Santo Tomas, 2011; Burt et al., 2013). Além disso, há inflamação em resposta ao material particulado de carvão inspirados, e, quando crônica, é descrita como um dos principais desencadeadores da carcinogênese em diferentes tecidos. (Leite e Schuler-Faccini, 2001). Como a carga de partículas no pulmão encontra-se aumentada, os macrófagos alveolares e células epiteliais são ativadas induzindo a liberação de mediadores inflamatórios, espécies reativas de oxigênio,

enzimas, citocinas e fatores de crescimento que controlam e estimulam a fibrose, os eventos genotóxicos e a morte celular (Gilmour et al., 2004; Sambandam et al., 2015).

Estudos mostram que metais como ferro, cobre, cromo e vanádio são capazes de catalisar o início do ciclo redox dentro da célula (pela reação de Feton), gerando Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) ou radicais livres, enquanto cádmio, mercúrio, níquel e chumbo, reduzem o nível da glutathione e dos grupamentos – SH proteicos. Como consequência disto ocorrem peroxidação lipídica, danos no DNA e alterações na homeostase do cálcio e dos grupamentos sulfidril (Stohs e Bagchi, 1995). Os macrófagos são outras fontes importantes de EROS em resposta dos metais pesados. Outros dados sugerem que íons de metais podem elevar a produção de Fator de Necrose Tumoral alfa e ativar a proteína quinase C, assim como introduzir a produção de proteínas de estresse e apoptose (Stohs e Bagchi, 1995).

1.4 Parâmetros Oxidativos

Como parâmetros oxidativos temos os antioxidantes endógenos e exógenos que atuam sinergicamente. Um sistema antioxidante endógeno inclui enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Esses antioxidantes endógenos são sintetizados no organismo e compõem um sistema enzimático e não enzimático de defesa (Bianchi e Antunes, 1999).

A superóxido dismutase (SOD) está presente nos organismos aeróbios sob três formas distintas, de acordo com a presença do cofator metálico no seu sítio ativo: cobre e zinco (Cu/Zn-SOD), manganês (Mn-SOD) e ferro (Fe-SOD; somente em bactérias) (Diplock et al., 1998; Sarni e Leite, 2003). A SOD é uma das enzimas mais importantes que atuam como antioxidantes celulares e são encontradas no citosol de células eucariontes, na mitocôndria e no espaço extracelular dos mamíferos e catalisam a conversão do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio (reação de dismutação).

A catalase (CAT) está presente em grande quantidade em quase todos os tecidos, principalmente em peroxissomas hepáticos sendo escassa no cérebro, coração e músculo esquelético. Possui como sítio ativo um grupo heme (Fe +2) que catalisa a reação onde o peróxido de hidrogênio é detoxificado especificamente em H₂O e O₂•.

A glutathione peroxidase (GPx) é a principal peroxidase em vertebrados. Tanto a catalase como a glutathione peroxidase possuem efeito protetor, no sentido de que ambas removem o peróxido de hidrogênio (Sagara et al., 1998; Sarni e Leite, 2003). A GPx é uma enzima responsável pela detoxificação de peróxidos, através da oxidação do NADPH e a sua atividade depende da glutathione reduzida (GSH), que é oxidada em glutathione oxidada (GSSG). Os níveis de GSH celular são mantidos a partir da enzima glutathione reductase, que reduz a GSSG em GSH através da oxidação do NADPH.

Além das enzimas citadas acima, os danos oxidativos evidenciados pelas técnicas de TBARS (Espécies reativas do Ácido Tiobarbitúrico), SH (Sulfidril) e Carbonil também são parâmetros para ver o estresse oxidativo. O TBARS é usado como indicador da peroxidação lipídica ou lipoperoxidação que constitui o maior evento consequente do estresse oxidativo de lipídios poliinsaturados em membranas celulares. Já o SH quantifica a reação do DTNB com grupamentos SH de proteínas e outros compostos tiólicos como GSH. E o carbonil é usado para averiguar a oxidação de proteínas que ocorre principalmente pelo ataque de radicais $O_2 \bullet$ e $\bullet OH$ e também por mecanismos, como a oxidação do sítio catalítico, oxidação induzindo a quebra da cadeia polipeptídica, oxidação de aminoácidos, e conjugação de produtos de peroxidação lipídica. Sendo que a principal consequência da oxidação proteica é a geração de proteína carbonilada (PC). A carbonilação é um tipo de oxidação protéica que forma cetonas ou aldeídos reativos que podem reagir com 2,4 – dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar hidrazonas.

Esses parâmetros oxidativos são acionados quando os processos fisiológicos não funcionam corretamente. Sabe-se que a geração contínua das EROs é um processo fisiológico característico do ciclo respiratório celular (Sies, 1985) e os organismos obtêm o ATP da redução completa do O_2 na membrana mitocondrial, o qual é reduzido à água.

No entanto quando o O_2 não é reduzido completamente, origina intermediários altamente reativos e danosos às células como radicais hidroperoxila, hidroxila e superóxido, além do oxigênio e peróxido de hidrogênio (Floyd, 1984). Um exemplo é o radical hidroxila ($\bullet OH$) que é considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, e pode lesionar o DNA, proteínas, lipídios e carboidratos (Nordberg e Arnér, 2001). Eles podem inativar várias proteínas e enzimas e oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (S-S), além de

reagir com os fosfolipídios presentes nas membranas celulares (Valko et al., 2006). Outro exemplo é o radical superóxido ($O_2 \bullet^-$) que está em grandes quantidades nas células e produz grandes quantidades de $O_2 \bullet^-$ devido à ativação da enzima NADPH oxidase, que está presente na membrana celular (Diaz et al., 1998). Já o processo de peroxidação lipídica está ligado a uma série de processos patológicos envolvendo EROs, como a inflamação (Middleton, 2000; Nordberg E Arnér, 2001).

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre os mecanismos que causam condições oxidativas e das defesas antioxidantes celulares presentes nos organismos vivos e que provoca uma variedade de mudanças fisiológicas (Sies, 1985; Scandalios, 1997). A toxicidade do estresse oxidativo está relacionada ao potencial das EROs que acarreta a oxidação dos constituintes celulares, incluindo proteínas, lipídios e DNA, os quais podem levar a morte celular.

1.5 Detoxificação Enzimática

A glutathione S-transferase (GST) é da família de enzimas multifuncionais que catalisam o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutathione (GSH) a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico. As GSTs geralmente se encontram no meio biológico como homo ou heterodímeros (outros complexos também podem existir) em mamíferos podem ser divididos em três grandes famílias: GST citossólica, GST mitocondrial e GST microsomal. Através da GST ocorre a detoxificação de xenobióticos e compostos endógenos, como peróxidos lipídicos. A GST catalisa a conjugação do grupamento tiol da glutathione com os centros eletrófilos de xenobióticos. Ela utiliza GSH para eliminar compostos tóxicos, incluindo os produzidos como resultado do estresse oxidativo (Joseph et al., 1997).

2 JUSTIFICATIVA

A obesidade é um transtorno nutricional mundial e ano após ano vem crescendo e tomando força devido aos nossos maus hábitos alimentares e uma vida urbana agitada. Dados de 2009 da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimaram que 50% da população brasileira está acima do peso e que cerca de 56% dos adultos do Rio Grande do Sul se encontram nesta condição. Além disso, a previsão para 2025 da OMS é que cerca de 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso e mais de 700 milhões obesos.

O carvão mineral é uma importante fonte combustível para a geração de energia elétrica no mundo causando diversos impactos socioambientais no entorno da unidade geradora afetando conseqüentemente a saúde humana. Além disso, a região Sul do país abastece grande parte das outras regiões do Brasil gerando energia elétrica através das termoelétricas movidas a carvão.

Nesse contexto, o sul do país comporta linhas de pesquisa que abrangem o estudo destes dois fatores, porém não associados. Dessa forma, a presente proposta tem por objetivo estudar se a população obesa é mais prejudicada com a inalação de carvão ou se a inalação de carvão não agrava o fator obesidade, o qual já é um grande prejudicial em potencial a saúde humana.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Tendo em vista que uma grande parte da geração elétrica no Brasil ainda se dá por termoelétricas e que este tipo de produção de eletricidade gera uma grande quantidade de resíduo de pó de carvão e que também a obesidade se tornou uma epidemia mundial e que na região sul estes dois fatores se encontram de maneira única no país, este trabalho teve como objetivo geral detectar os possíveis efeitos diferenciais causados pela inalação do pó de carvão em animais obesos e não obesos.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar os efeitos da inalação do pó de carvão mineral em fígado, pulmão e sangue de animais obesos e não obesos através dos parâmetros de estresse oxidativo.
2. Avaliar os efeitos da inalação do pó de carvão mineral em fígado e pulmão de animais obesos e não obesos através da análise histopatológica.
3. Avaliar os efeitos da inalação do pó de carvão mineral em animais obesos e não obesos através do teste de cometa e micronúcleo.
4. Avaliar os efeitos da inalação do pó de carvão mineral em animais obesos e não obesos através da determinação de parâmetros anti e pró-inflamatórios.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar com 60 dias de idade pesando 250-300g. Os animais foram criados e obtidos no biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS e mantidos numa sala específica para os mesmos. Os animais foram mantidos em ciclo de 12h/12h, claro/escuro, à temperatura constante de 22°C + 1°C com acesso a alimento e à água ad libitum; ficaram alojados em caixas de propileno (41x34x16cm), com distribuição de quatro animais por caixa, as quais foram limpas e trocadas três vezes por semana. Também foram respeitadas as leis de uso e manipulação de animais em pesquisa: A Lei Federal nº 11794, de 8 de outubro de 2008 e a resolução de nº 879, de 15 de fevereiro de 2008.

Projeto aprovado no CEUA/UFRGS sob o numero 25739

4.2 Material Poluente

As amostras de carvão utilizadas neste projeto são provenientes da maior termoelétrica da América latina, a Tractebel Suez, localizada em Santa Catarina e foram caracterizadas por Silva et al em 2010 (Anexo 1).

4.3 Modelo experimental

Os animais foram divididos em dois grupos de 16 animais. O primeiro grupo foi alimentado com uma dieta com teor normal de lipídios (Comida padrão de laboratório (Nuvilab[®] CR-1 tipo - Curitiba, PR , Brasil)) e o segundo grupo com uma dieta rica em lipídios (Descrito por De Assis, AM et al, 2009). A dieta hiperlipídica (HL) foi constituída de 60% de gordura, composto por 59% de banha e 1% de óleo de feijão de soja, 20% de proteína e 15% de carboidratos e 5% de sais minerais e a dieta normolipídica (NL) proteína total (22%), fibra vegetal (8%), minerais (10%), cálcio (1,4%), e fósforo (0,8%). Enriquecimento por kg: Vitamina A (12,000 IU), vitamina D3 (1,800 UI), vitamina E (30 UI), vitamina K3 (3 mg), vitamina B1 (5 mg), vitamina B2 (6 mg), vitamina B6 (7mg), vitamina B12 (20 µg), niacina (60 mg), ácido fólico (1 mg), biotina (0,05 mg), colina (600 mg), ferro

(50 mg), de cobre (10 mg), zinco (60 mg), manganês (60 mg), cobalto (1,5 mg), iodo (2 mg), selênio (0,05 mg), lisina (100 mg) e de metionina (300 mg).

Após cinco meses de dieta, os animais foram divididos em: NL sem exposição (controle, n = 8); NL expostos ao pó de carvão (COAL, n = 8); HL sem exposição (controle, n = 8); HL expostos ao pó de carvão (COAL, n = 8). Durante a experiência, a ingestão de alimentos foi monitorada três vezes por semana e o peso corporal determinado uma vez por semana. Esquema de acordo com a figura 1.

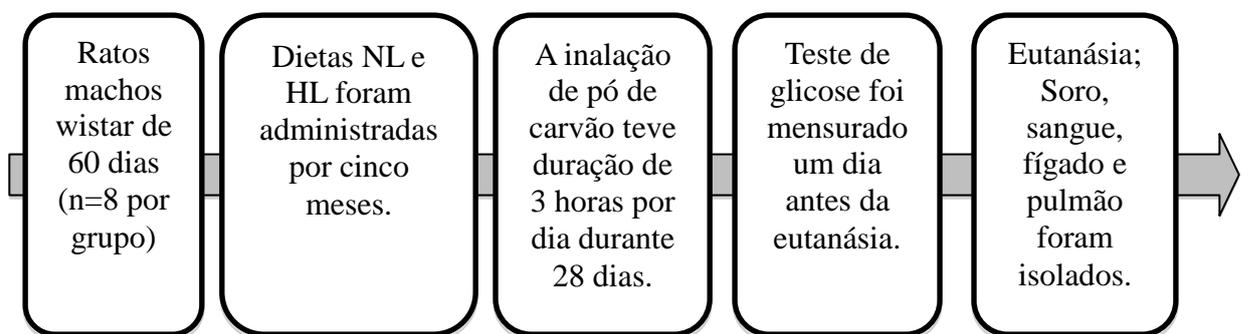


Figura 1: Esquema do modelo experimental e suas respectivas etapas.

4.4 Exposição dos ratos ao pó de carvão mediante inalação

Um grupo de animais alimentados com NL e outro com HL foi expostos ao pó de carvão mineral na concentração de 10 mg/m^3 , a exposição durou 3 horas por dia num total de 28 dias (OECD, 1993, Mani et al., 2007). Foram utilizadas câmaras de inalação (Fig. 2) de vidro para corpo inteiro, com capacidade de 21 L com um diâmetro interno de 30 cm e esta receberá ar filtrado mediante um secador de ar compacto. O aerossol do carvão mineral foi gerado mediante um gerador de aerossol com uma taxa de fluxo de 15 L/min. As concentrações foram verificadas continuamente usando um filtro de 25 mm (Intox Products, USA).

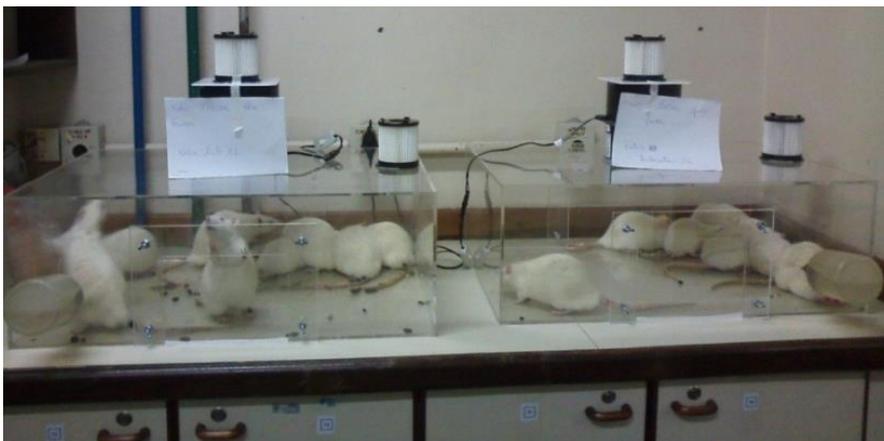


Figura 2: Câmera de inalação para corpo inteiro, desenvolvida pelo nosso laboratório.

4.5 Coleta e armazenamento dos tecidos

Depois do último período de inalação e passada 24 horas, os animais foram mortos por decapitação com auxílio de guilhotina e as estruturas removidas para as posteriores análises. O fígado de cada animal foi pesado bem como os seguintes depósitos de gordura: Tecido adiposo marrom, retroperitoneal, visceral e omental. O sangue extraído foi centrifugado a 2.000 rpm durante 15 min e o soro retirado. As amostras de soro foram armazenadas em freezer a -20°C . Os tecidos extraídos foram congelados em gelo seco e armazenados a -80°C até sua utilização.

Os tecidos foram coletados após a decapitação enquanto que a obtenção do sangue para as análises foi via troncular no momento em que cada animal for decapitado. Os tecidos foram armazenados para análise de atividades de enzimas antioxidantes, danos oxidativos e histologia.

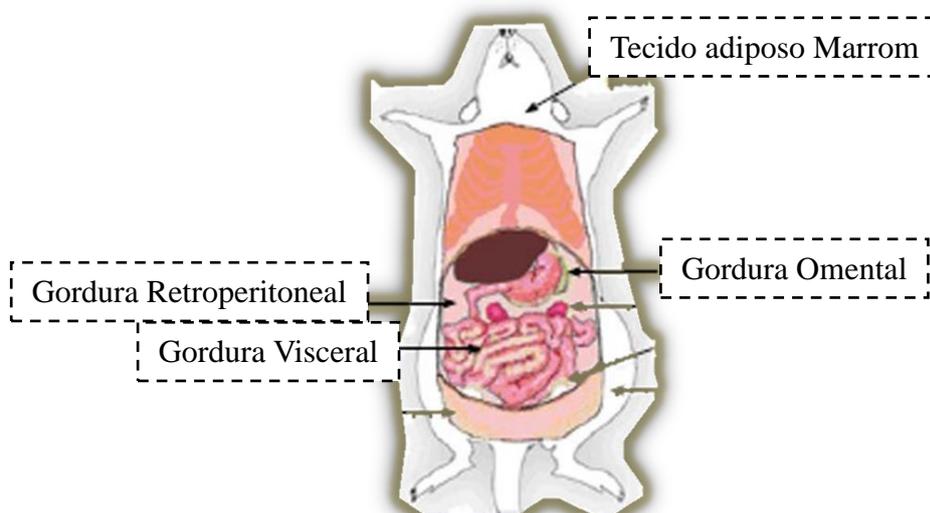


Figura 3: Esquema da disposição do tecido adiposo branco e marrom no corpo do animal. Fonte: Anna Park, et al. 2014. Modificado.

Análises bioquímicas

4.6 Atividade enzimática

As enzimas que tiveram suas atividades determinadas foram:

1) Catalase (CAT), que é realizada através da medição da taxa de diminuição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em absorbância do espectrofotômetro a 240nm (Aebi H., 1984);

2) A Superóxido Dismutase (SOD), avaliada quantificando-se a inibição da adrenalina dependente de superóxido num espectrofotômetro a 480nm (Misra HP & Fridovich I., 1972);

3) Glutathione Peroxidase (GPX), medindo a taxa de oxidação de NADPH a 340 nm num espectrofotômetro, tal como descrito anteriormente (Wendel A., 1981);

4) Glutathione S-Transferase (GST), na qual a atividade é determinada por espectrofotometria a 340 nm através da medição da formação do conjugado de GSH (Glutathione) e CDNB (cloro-dinitro benzeno) (Habig et al., 1972).

4.7 Peroxidação lipídica (TBARS)

A formação de espécies reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) é determinada em uma reação ácida aquecida e lida em espectrofotômetro a 532 nm (Draper and Hadley, 1990).

4.8 Carbonilação de proteínas (Carbonil)

A quantificação dos grupos de carbonila é determinada como um parâmetro para danos oxidativos a proteínas, com base na reação com dinitrophenylhydrazine (DNPH). As proteínas são precipitadas por adição de TCA a 20% e o pellet é lavado três vezes com 1:1 Etanol:Acetato de Etila para remover o excesso de DNPH e após as amostras são dissolvidas em Ureia 8M pH 2,3. Em seguida, a absorbância é lida num espectrofotômetro a 370 nm (Levine et al., 1990).

4.9 Quantificação de grupo Sulfidrila (SH)

As amostras são analisadas para determinação dos níveis de grupos tiol das suas proteínas, o qual foi utilizado como uma estimativa das alterações oxidativas em proteínas.

Adiciona-se ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) em etanol e é lido num espectrofotômetro a 412 nm (Ellman, 1959).

4.10 Citocinas no Soro – Inflamação

O TNF- α , IL-1 β e HSP-70 foram quantificados por ELISA indireto. O soro foi incubado numa placa de ELISA e após 24 h as placas foram lavadas três vezes com Tween-Tris solução salina (TTBS, 100 mM de Tris-HCl, pH 7,5, contendo 0,9% de NaCl e 0,1% de Tween-20). Depois foi adicionado 200 μ L de anti-TNF- α , anti-IL-1 β (1: 1000) ou anti-HSP-70 e incubado 24 h a 4 ° C. As placas foram lavadas três vezes com TTBS e incubado novamente com anticorpo secundário de coelho ou rato ligado a peroxidase de IgG (1: 1000) durante 2 h de acordo com as indicações do fabricante. Após lavou-se novamente a placa três vezes com TTBS e 200 μ L de solução de substrato (TMB ELISA kit de detecção espectrofotométrica) foi adicionado a cada poço e incubado durante 15 min. A reação foi parada 50 μ L de ácido sulfúrico 12 M, por poço e a placa lida a 450 nm num leitor de microplacas.

4.11 Histologia

Seções de pulmão e fígado fixados foram embebidas em parafina, para a realização de cortes histológicos com 4 μ m de espessura. As lâminas contendo os cortes pulmonares foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e analisadas por microscopia óptica (Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) segundo seus aspectos qualitativos e quantitativos. Para a análise descritiva, toda a superfície da lâmina foi observada.

4.12 Ensaio cometa

O ensaio do cometa alcalino foi realizada como descrito por Singh et al. (1998) e Collins et al. (1997) e adaptado por Silva et al. (2013). As amostras de sangue foram homogeneizadas em soro fetal bovino e embebidas numa solução de agarose com baixo ponto de fusão (0,7%) e dispostas em lâmina pré coberta com agarose 1,5 % e colocadas em cuba com solução de lise. Após a lise, as lâminas foram dispostas em cuba horizontal e submetidas ao processo de desenovelamento do DNA (Ácido Desoxirribonucléico) com tampão alcalino

por 20 minutos, em seguida aplicou-se uma corrente elétrica (25 V - 300 mA) por 15. As lâminas foram neutralizadas, fixadas e coradas com nitrato de prata. A análise foi feita através de microscopia ótica convencional, aplicando-se os critérios de análise descritos na literatura. Para calcular um índice de dano (ID), os nucleoides foram classificados de acordo com o tamanho da cauda em relação à cabeça do cometa (sem dano = 0 a dano máximo = 4) (Figura 3). Assim, o índice de dano (ID) do grupo pode variar de 0 (sem danos = 100 células completamente X 0) a 400 (dano máximo = 100 células X 4). A frequência de dano (FD em%) foi calculada para cada amostra de base sobre o número de células com cauda *versus* número de células sem cauda.

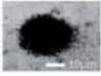
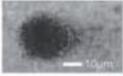
Imagem Observada	Classes de Danos
	0
	1
	2
	3
	4

Figura 4. Tabela para classificação das imagens dos nucleoides (Adaptado de Villela et al., 2006)

4.13 Teste de micronúcleo

O teste foi feito de acordo Da Silva et al. (2000) e Fenech et al. (2010). Após a eutanásia dos animais, foram coletados os fêmures para confecção dos esfregaços de medula óssea. Após secos os esfregaços, em duplicata, foram fixados em ácido acético e metanol e corados com corante Giemsa 10 % em tampão fosfato. Analisou-se 2000 eritrócitos e se avaliou a frequência de micronúcleos (MN) em eritrócitos policromáticos (EPC) e normocromáticos (ENC), em microscopia ótica convencional.

5 RESULTADOS

5.1 Pesos dos tecidos e mensuração de glicemia

Afim de verificar se o modelo de obesidade foi eficaz, realizamos a pesagem dos animais (Fig. 5A). Os animais que foram tratados com a dieta HL tiveram um aumento de 29% no seu peso corporal total quando comparados com os animais submetidos à dieta NL. O fígado teve aumento de peso cerca de 24% nos animais HL em relação aos animais NL (Fig. 5B). Observamos alterações de peso em diferentes tipos de tecido adiposo nos animais que receberam HL: Gordura omental (Fig. 5C) teve aumento de peso de 95% em comparação ao grupo NL, a gordura retroperitoneal (Fig. 5D) aumentou em 28%; a gordura visceral (Fig. 5E) teve um aumento de 58% e por fim o tecido adiposo marrom (Fig. 5F) aumentou em 91% quando comparadas com o grupo NL. O teste de glicose realizado antes da exposição dos animais a inalação de pó de carvão (Fig. 5G) não resultou em diferença significativa.

5.1.1 Efeito da inalação sobre o peso dos animais

Os animais HL-Coal apresentaram uma diminuição de 28% no peso da gordura retroperitoneal quando comparados com os animais HL (Fig. 5D).

5.1.2 Efeito da inalação sobre a glicemia dos animais

No teste de glicose feito após a exposição dos animais ao pó de carvão observamos que os animais expostos tiveram um aumento significativo da glicemia quando comparado com os animais que não foram expostos independentes da dieta (Fig. 5G).

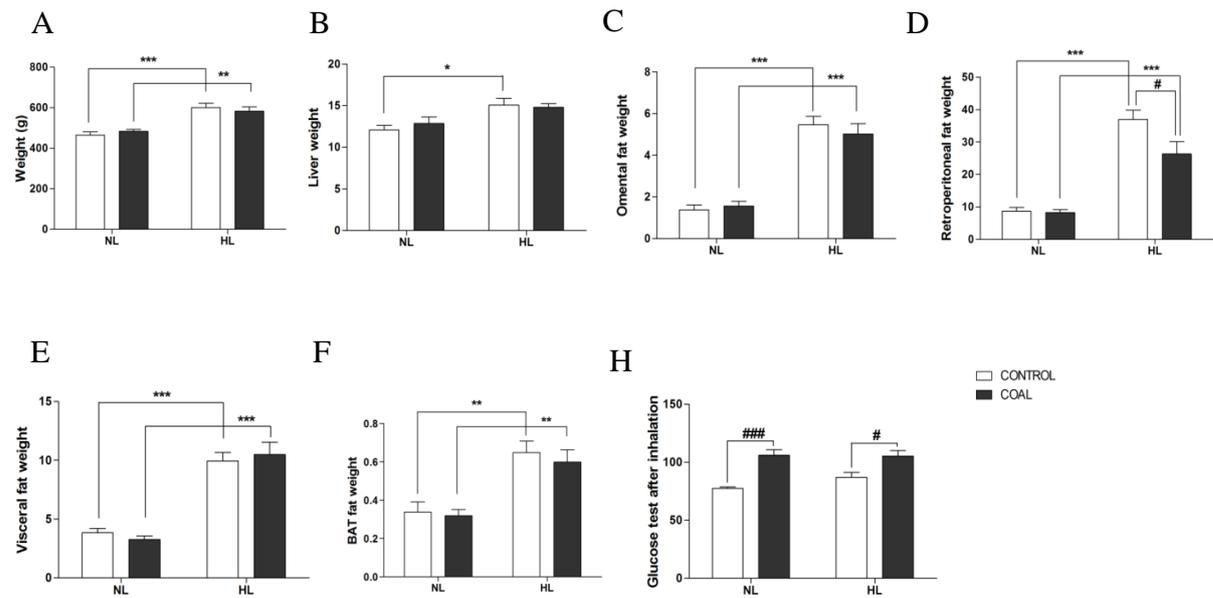


Figura 5: Pesos dos tecidos do animal. 4a) Peso do animal; b) Peso do fígado; c) Peso da gordura Omental; d) peso da gordura retroperitoneal; e) peso da gordura Visceral; f) peso do tecido adiposo marrom e H) medição da taxa de glicose.

5.2 Atividades enzimáticas

Na tabela estão representadas as atividades enzimáticas CAT, SOD, GPX e o balanço entre as três enzimas no sangue, fígado e pulmão de animais obesos e não obesos expostos ou não a inalação de carvão. No sangue observamos que há um decréscimo significativo na atividade da enzima CAT no grupo de animais HL-Coal em relação aos animais HL. Nos demais tecidos a atividade da enzima CAT não apresentou alterações significativas. Na atividade da enzima SOD não observamos alterações significativas em nenhum dos tecidos estudados. No fígado observamos que houve uma diminuição significativa na atividade da enzima GPX nos animais HL em relação aos animais NL. Além disso, no fígado, vemos que os animais HL-Coal tiveram a atividade da enzima GPX reduzida em relação aos animais NL-Coal. Nos demais tecidos a atividade da enzima GPX não mostra alterações significativas. No balanço das três enzimas (SOD/CAT+GPX) não observamos variações significativas nos tecidos estudados (Tab.1).

Tabela 1: Quantificação das enzimas CAT, SOD, GPX e o conjunto delas SOD/CAT+GPX nos tecidos do fígado, pulmão e sangue

	CAT				SOD				GPX				SOD/CAT+GPX			
	NL		HL		NL		HL		NL		HL		NL		HL	
	Controle	Cavão	Controle	Cavão	Controle	Cavão	Controle	Cavão	Controle	Cavão	Controle	Cavão	Controle	Cavão	Controle	Cavão
Sangue	103.75±16.36	81.42±10.77	180.68±33.31	77.41±12.46#	26.62±7.07	40.82±8.45	32.76±5.29	307.82±40.12	204.65±23.38	194.28±36.37	188.78±13.63	0.07±0.05	0.09±0.03	0.11±0.03	0.12±0.02	
Fígado	133.23±16.62	123.64±20.47	121.01±12.68	124.72±17.45	70.30±5.68	72.15±7.04	70.96±6.78	346.21±40.02	311.30±42.59	133.64±5.93*	137.48±13.96*	0.17±0.03	0.19±0.05	0.28±0.03	0.31±0.04	
Pulmão	11.54±2.67	14.56±3.55	12.42±2.50	13.33±2.74	31.14±0.92	27.39±1.96	30.53±2.36	102.13±23.65	92.62±14.85	70.19±10.84	68.57±10.94	0.35±0.07	0.28±0.04	0.40±0.06	0.43±0.05	

5.3 Parâmetros de danos oxidativos

O Suldidril (-SH) foi investigado no fígado (Fig. 6A), pulmão (Fig. 6D) e sangue (Fig. 6G). A inalação de carvão diminuiu os grupamentos-SH ligados ao sangue (24%), mas no fígado e no pulmão não tiveram alterações significativas. A dieta não interferiu no conteúdo – SH.

As espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram investigadas como um indicativo de dano lipídico. No fígado (Fig. 6B) houve um aumento de 20% nos níveis de TBARS causado pela dieta e a inalação de pó de carvão não apresentou alterações significativas. No pulmão (Fig. 6E) a dieta aumentou os níveis de danos lipídicos em 100% e, além disso, o carvão aumentou significativamente os níveis de TBARS no grupo NL-coal (101%). No sangue (Fig. 6H) níveis de TBARS foram diminuídos nos animais que receberam dieta rica em gordura em 28%.

Os níveis de grupamentos carbonil foram avaliados para verificar o dano à proteína. O fígado (Fig.6C) foi o tecido mais sensível à inalação de carvão, houve um aumento de 206% nos danos as proteínas. Nos animais que receberam a dieta HL também tiveram mudanças nos danos à proteína, no entanto, a inalação de carvão não mostrou nenhum efeito significativo. No Pulmão (Fig. 6F) e no sangue não observamos diferença significativa (Fig.6I).

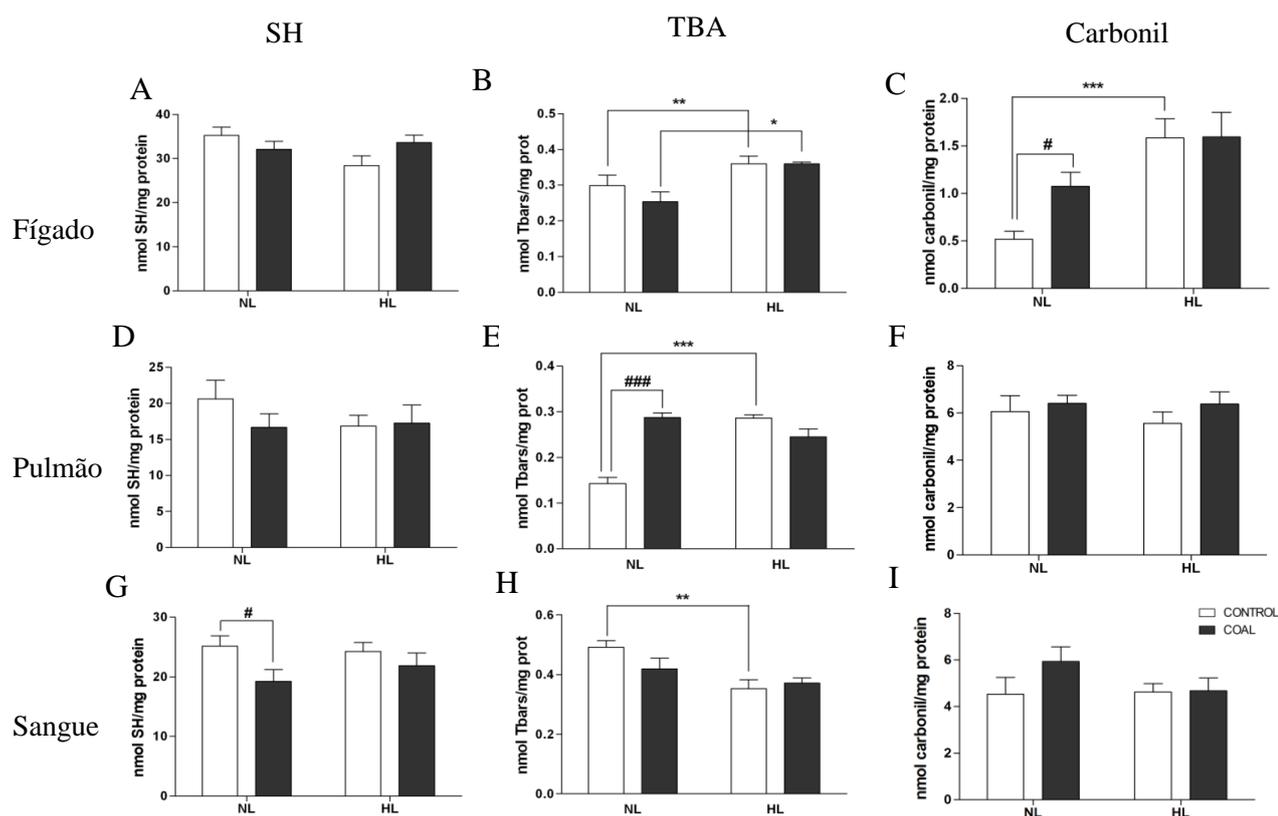


Figura 6: Gráficos relativos aos danos oxidativos representados pelo SH, TBA e Carbonil. 5A), B) E C) Representação dos grupamentos sulfidrilas, Lipoperoxidação e Grupamentos carbonis no fígado; 5D), E) e F) Representação das três técnicas no rim e 5G), H) e I) Técnicas de dano oxidativo quantificadas no sangue.

5.4 Enzima de Detoxificação

A atividade da enzima Glutationa S-Transferase (GST) foi analisada no fígado e no pulmão (Fig. 7). No fígado observamos que houve uma diminuição na atividade da enzima GST no grupo de animais HL em relação ao grupo NL (Fig. 7A). Já no pulmão não observamos alterações significativas mesmo nos animais submetidos à inalação (Fig. 7B).

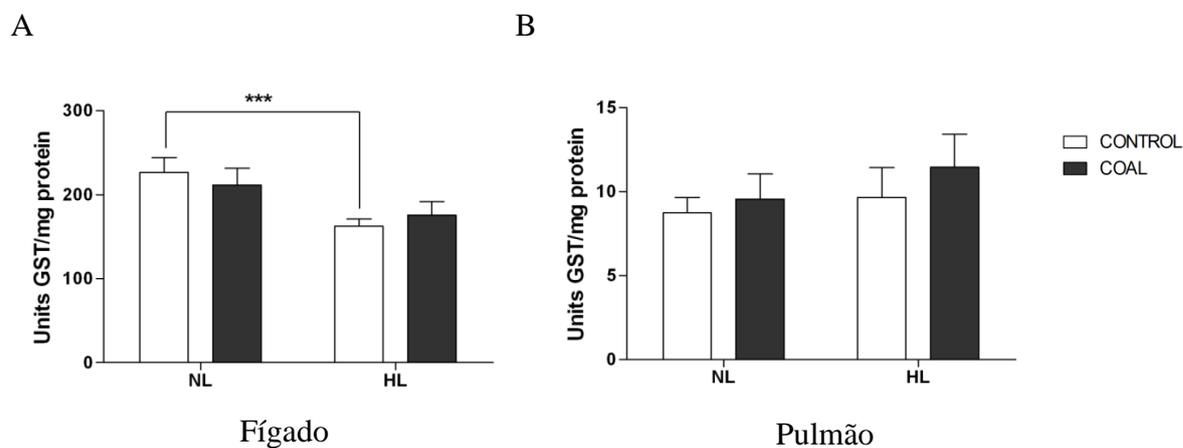


Figura 7: Representação da enzima de detoxificação no fígado e pulmão, respectivamente.

5.5 Parâmetros pró-inflamatórios

TNF- α , IL-1 β e HSP70 foram quantificados pelo ensaio de ELISA indireto no soro (Fig.8). As citocinas TNF- α e IL-1 β apresentaram um perfil similar, animais expostos à inalação e que ingeriram a dieta NL apresentaram um aumento em ambas as citocinas pró-inflamatórias (Fig.8A e B). Os animais submetidos à dieta HL tiveram também os níveis de citocinas aumentados em relação à dieta NL, no entanto não foram estatisticamente diferentes dos animais que tiveram a dieta HL e a inalação de pó de carvão. Os animais que tiveram a dieta HL apresentaram uma redução nos níveis de HSP70 em relação aos animais NL. A inalação de pó de carvão não induziu uma diferença estatisticamente significativa (Fig. 8C).

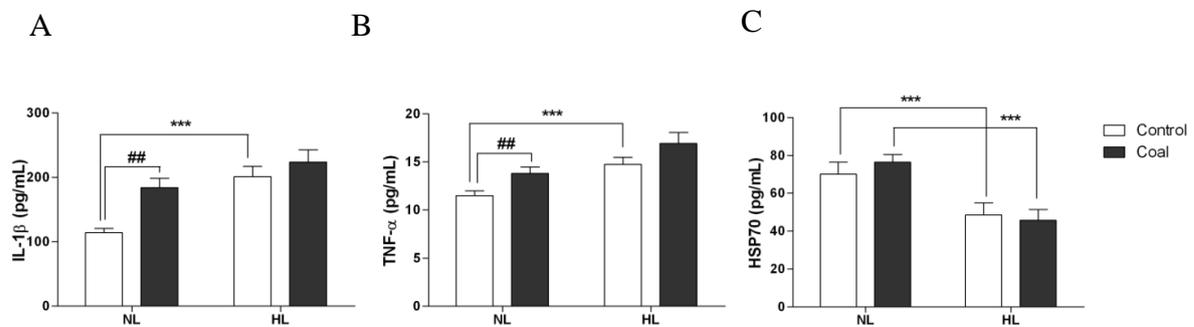
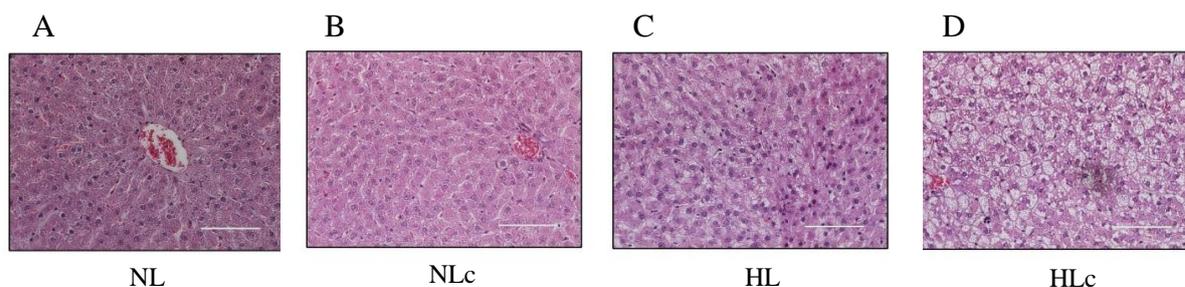


Figura 8: Citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e HSP70 quantificadas no soro dos animais por ELISA indireto.

5.6 Histologia

No fígado dos animais NL e NLc (Fig. 9A e B) não foram observadas alterações histológicas. No entanto, nos animais HL e HLc (Fig. 9C e D) respectivamente, exibiram esteatose microvesicular grave. Isto foi associado com um aumento dos hepatócitos vacuolados com múltiplos vacúolos pequenos, compressão proeminente e deslocamento citoplasmático dos núcleos de hepatócitos. Na figura 8F e H, podemos observar que os ratos expostos ao pó de carvão não apresentaram danos nas regiões do duto bronquíolo-alveolares dos pulmões. Além disso, não foram observadas partículas de carvão dentro de macrófagos alveolares.

Fígado



Pulmão

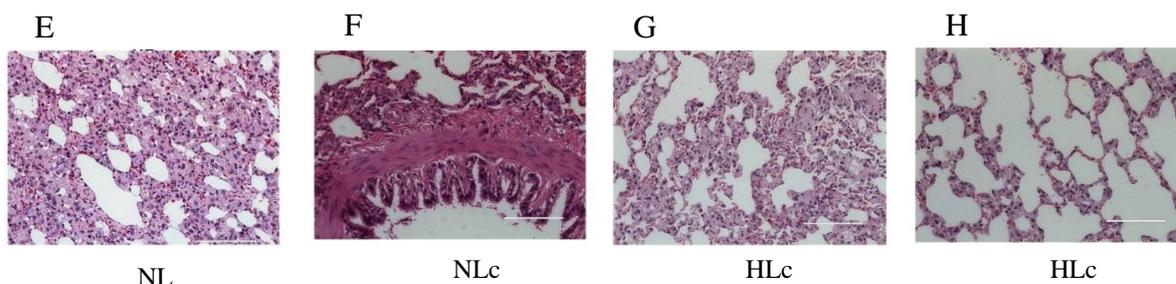


Figura 9: Imagens da histologia de fígado (A, B, C e D) e pulmão (E, F, G e H). Animais NL normolipídico sem inalação, HL hiperlipídico sem inalação, NLc normolipídico com inalação e HLc hiperlipídico com inalação.

5.7 Micronúcleo e Cometa

O índice de dano ao DNA evidenciado pelo ensaio de cometa e a frequência de micronúcleo estão representados graficamente na Fig.10 A a C. Os animais que foram expostos ao pó de carvão tiveram um aumento significativo na taxa de lesões ao DNA (Fig. 10 A), independentemente da dieta. Não observamos diferenças significativas no número de micronúcleos entre os grupos, apenas no controle positivo que serviu para controle da técnica (Fig. 10 B).

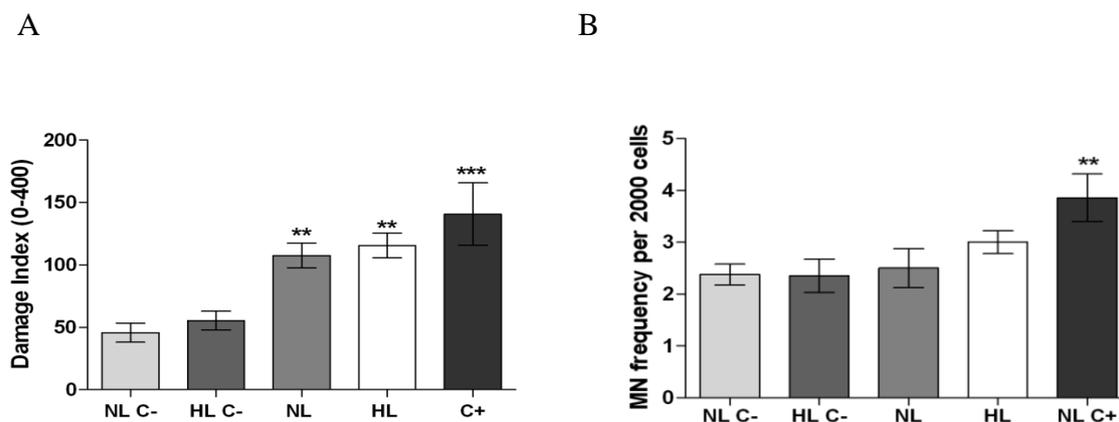


Figura 10: Representação dos ensaios de cometa e micronúcleo. Os animais são representados NL c- normolipídico sem inalação, HL c- hiperlipídico sem inalação, NL normolipídico com inalação e HL hiperlipídico com inalação e o C+ dano induzido (controle positivo). Fig. 9A) Representa o índice de dano ao DNA analisado a partir do sangue dos animais. Fig. 9B) Representa a frequência de micronúcleos por 2000 células analisados a partir do fêmur dos animais. Os controles positivos foram observados através da ciclofosfamida.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, nós investigamos o efeito da inalação de pó de carvão sobre a obesidade. Para induzir a obesidade submetemos os animais a uma dieta HL (60% gordura) e observamos que os animais submetidos à mesma tivessem seu peso significativamente aumentado quando comparado aos animais que receberam uma dieta padrão de biotério. Alguns estudos indicam que níveis elevados de gordura na dieta aumentam a chance de desencadear a obesidade estimulando dessa forma a ingestão calórica, aumento de gordura e ganho de peso (Ghibaudi et al., 2002). No geral, as dietas contendo mais do que 30% de gordura provocam o desenvolvimento da obesidade (Hariri e Thibault, 2010). No nosso estudo foi possível observar o aumento de peso dos animais e o aumento no peso dos tecidos específicos armazenadores de gordura.

O tecido adiposo é o principal reservatório energético do organismo (Miriam et al., 2006) e a alta ingestão de uma alimentação rica em gordura dependente de recirculação de ácidos graxos livres (Marchesini et al., 2008). O Tecido adiposo branco (TAB), neste estudo, é representado pelos tecidos adiposos Omental, Retroperitoneal e Visceral e a proporção de lipídios nestes TAB pode ocupar até 85% da massa total do tecido (Pond C, 2001). O TAB representa cerca de 15-20% do peso corporal em situação controle podendo aumentar significativamente em indivíduos obesos (Awada et al., 2013). O aumento do peso das gorduras brancas observadas neste estudo é relativo à condição de obesidade que leva ao acúmulo de lipídios no tecido adiposo do organismo. No tecido adiposo visceral o conteúdo de gordura poderia ser associado com a G3PDH aumentada e a expressão do gene da leptina (Lopez et al., 2003). A acumulação dessa gordura visceral compromete a secreção de insulina e o transporte de glicose no tecido muscular e adiposo. Além disso, induz um aumento na peroxidação lipídica sistêmica através dos ácidos graxos em excesso e citocinas que provocam o dano oxidativo sistêmico (Grattagliano et al., 2008). O outro tipo de tecido adiposo avaliado neste estudo foi o tecido adiposo marrom (TAM) que está envolvido na termogênese. O efeito termogênico da leptina, hormônio produzido pelo tecido adiposo, é melhor observado no TAM. Assim, o TAM é essencial para a termogênese induzida pela leptina em roedores (Barbara e Jan, 2003). O TAM encontrou-se aumentado nos ratos que receberam a dieta HL em nosso estudo provavelmente contribuindo para o aumento geral de peso do animal. Nossos resultados confirmam que nosso modelo foi efetivo em induzir a obesidade.

A inalação de pó de carvão pode causar diversas doenças pulmonares, como a pneumoconiose (Rom et al., 1987; Ghanem et al., 2004), fibrose maciça progressiva (PMF), bronquite crônica, perda da função pulmonar e enfisema (Schins and Bronm, 1999; Santo Tomas, 2011; Burt et al., 2013). Além disso, há inflamação em resposta ao material particulado de carvão inspirados, e, quando crônica, é descrita como um dos principais desencadeadores da carcinogênese em diferentes tecidos (Leite e Schuler-Faccini, 2001). Quando as partículas de carvão encontram-se no organismo, os macrófagos alveolares e células epiteliais são ativadas induzindo a liberação de mediadores inflamatórios, espécies reativas de oxigênio, enzimas, citocinas e fatores de crescimento que controlam e estimulam a fibrose, os eventos genotóxicos e a morte celular (Gilmour et al., 2004; Sambandam et al., 2015). A inalação de pó de carvão nos animais obesos provocou uma diminuição no peso da gordura retroperitoneal, não esperado. Assim como a elevação dos níveis plasmáticos de glicose que pode ser justificado pelo aumento dos níveis de gordura provocados pela dieta (Ghibaudi et al., 2002). Essa glicose aumentada pode desencadear um aumento de estresse oxidativo no organismo (Mokdad et al., 2003) Aumentando também os AGE's, que pode ser agravado pela inalação de pó de carvão.

A obesidade desencadeia um estresse oxidativo no organismo assim como a inalação de pó de carvão. No entanto, com isso podemos ver (Tabela 1) que a enzima CAT teve sua atividade diminuída no sangue dos animais obesos submetidos à inalação de carvão sugerindo que as partículas de carvão diminuíram a defesa antioxidante exercida pela catalase. Essa queda na atividade da enzima CAT pode contribuir ainda mais para o estresse oxidativo celular assim como sobre a disfunção das células, podendo alterar cascatas de sinalização ou aumentando o dano a macromoléculas através de oxidação (Rupérez et al., 2014). Além disso, vemos que a obesidade diminuiu a atividade da enzima GPX no fígado reduzindo também a possibilidade de uma possível defesa antioxidante neste órgão, muito provavelmente pelo esgotamento da glutathione, uma coenzima fundamental ao funcionamento desta enzima. Vemos o mesmo efeito em outros estudos que relatam o fato da atividade da enzima GPX celular e extracelular ser mais baixa em tecido adiposo de ratos obesos (Asayama et al., 2001).

A geração de ROS a partir da exposição ao pó do carvão acarreta o estresse oxidativo gerado pela excessiva ativação de células fagocitárias, como os macrófagos e os neutrófilos,

na tentativa de eliminar estas partículas (Nadif et al., 2001). A condição de estresse oxidativo pode ser evidenciada neste estudo inicialmente pela diminuição nos níveis de grupos tióis proteicos reduzidos no sangue, elevação nas concentrações de TBARS no pulmão e de carbonilação das proteínas no fígado, os quais são indicadores diretos do aumento da geração de ROS. Sendo assim, os principais efeitos das ROS incluem dano às membranas celulares, por processos de lipoperoxidação, oxidação de proteínas, oxidação dos grupamentos sulfidril, além de dano ao DNA, por oxidação das bases nitrogenadas e das riboses (Janssen et al., 1993). As alterações lipídicas têm sido consideradas um dos fatores que contribuem para o estresse oxidativo na obesidade (Leopold et al., 2008). O aumento de peso contribuiu para que houvesse aumentos nos níveis de TBARS e nos níveis de carbonil nos animais submetidos à dieta hiperlipídica, vemos isso tanto no fígado e como no pulmão. A obesidade pode causar aumento da peroxidação lipídica por lesão celular progressivo e cumulativo resultante da pressão da grande massa corporal. O aumento da carbonilação na obesidade pode ser devido ao dano a proteínas celulares gerados por ROS na obesidade e a acumulação de proteínas oxidadas pode prejudicar a função celular (Saad, 2011).

Neste estudo também determinamos a atividade da enzima de detoxificação (GST) e esta atividade mostrou-se diminuída nos animais obesos e nos obesos submetidos à inalação. Essa diminuição pode ser devido ao rápido consumo de glutathione, cofator essencial ao funcionamento desta enzima (Saad et al., 2011).

A obesidade está associada a várias desordens metabólicas uma delas é o aumento na expressão de marcadores pró-inflamatórios (Haslam e James, 2005). O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória potente e é segregada principalmente a partir de células mielóides através da ativação de MAPK e vias de sinalização de NF κ B, resultando na liberação de outras citocinas inflamatórias, tais como IL-1 β (Chen e Goeddel, 2002). Neste estudo podemos observar que os animais obesos tiveram um aumento na expressão de IL-1b e TNF-a. O material particulado de carvão inspirado também induziu um aumento na resposta pró-inflamatória nossos resultados concordam com os achados de Leite e Schuler-Faccini, 2001, que observou que a simples inalação de pó de carvão seria capaz de induzir uma resposta pró-inflamatória. O que poderia explicar o fato dessas duas citocinas também estarem aumentadas nos animais não obesos submetidos à inalação de pó de carvão. As análises de inflamação foram feitas a partir do soro dos animais, sendo assim a HSP70 está em um meio extracelular. Uma vez

neste meio acredita-se que essa proteína de choque térmico atue como citocina resultando num aumento da expressão de IL-1b e TNF-a (ASEA, 2000).

A esteatose hepática (EH) está normalmente associada à obesidade e já foi visto que a deposição aguda ou crônica de gordura no fígado está associada à peroxidação lipídica e o grau de peroxidação é proporcional à gravidade da EH (Reis et al., 2001). Nos nossos resultados podemos observar que os animais obesos com e sem a inalação de pó de carvão apresentaram a esteatose microvesicular grave. Sabe-se também que na EH, na obesidade, existe um desequilíbrio entre síntese e secreção de triglicérides no fígado (Moysés e Ricardo, 2006) e, além disso, admite-se que haja, entre outros mecanismos, disfunção das células de Kupffer (Yang et al., 1996).

O dano ao DNA observado pela técnica de cometa e micronúcleos evidenciou que em nosso experimento houve um dano genotóxico, mas não mutagênico induzido aos animais pela inalação de pó de carvão independente da dieta e da condição de peso. O dano foi reparado rapidamente e assim não observamos alterações no micronúcleo. O que sugere que os mecanismos de reparo gênico não foram afetados pelas condições testadas.

Esta monografia faz parte de um trabalho muito maior que avaliou os efeitos da obesidade e da inalação de pó de carvão e de cinzas das termoelétricas em vários outros tecidos, principalmente o sistema nervoso, e juntando todos os dados dos dois trabalhos conseguimos ver que a inalação de pó de carvão junto com a obesidade causam grandes problemas à saúde em geral.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo analisamos o efeito que o pó de carvão causa nos tecidos dos animais obesos e não obesos e conseguimos ver que tanto a inalação de pó de carvão como a obesidade levou o organismo a uma geração de estresse oxidativo e inflamação. Porém não conseguimos ver o efeito esperado da ação em conjunto da inalação mais obesidade, pelo menos não nos tecidos apresentados.

A administração da dieta hiperlipídica resultou no aumento expressivo de peso nos animais e foi efetiva para conduzir a um padrão de obesidade. Com este padrão observamos que houve alteração no peso dos animais e aumento de todos os tecidos adiposos assim como provocou, também, uma esteatose hepática grave no fígado desses animais submetidos a HL.

A inalação de pó de carvão foi um fator contribuinte para as alterações observadas nos parâmetros de dano oxidativo contribuindo para maior oxidação de grupos tióis proteicos no sangue, aumento na lipoperoxidação no pulmão e dano a proteína nos grupamentos carboxila do fígado. Além disso, podemos ver que a inalação de pó de carvão propiciou o aumento de citocinas pró-inflamatórias e também um dano expressivo ao DNA.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. **Catalase in vitro**. *Methods Enzymol.* 1984, 105 121-126.
- AGUILA M.B. & MANDARIM-DE- LACERDA C.A. **Heart and blood pressure adaptations in Wistar rats fed with different high-fat diets for 18 months**. *Nutrition.* 19:347–352, 2003.
- ANNA PARK, WON KON KIM and KWANG-HEE BAE. **Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells**. *World J Stem Cells.* Jan 26, 2014; 6(1): 33-42 Published online Jan 26, 2014. doi: 10.4252/WJSC.v6.i1.33
- Aneel – agencia nacional de energia elétrica. **Atlas de energia elétrica do brasil**. Capitulo 9-carvão mineral 2009.
- ASAYAMA K. et al. **Effect of obesity and troglitazone on expression of two glutathione peroxidases: cellular and extracellular types in serum, kidney and adipose tissue**. *Free Radic Res.* 2001 Apr; 34(4):337-47.
- ASEA, A. **HSP70 stimulates cytokine production through a CD14- dependant pathway, demonstrating its dualrole as a chaperone and cytokine**. *Natural medicine*, v.6, n.4, p.435-42, doi 10.1038/74697,2000.
- Associação brasileira do carvão mineral, ABCM. 2012. **História do carvão no Brasil**.
- AWADA R; PARIMISSETTY A and D’HELLEN COURT C L. **Influence of Obesity on Neurodegenerative Diseases**. França: 2013. Intech DOI: 10.5772/53671
- BARBARA CANNON and JAN NEDERGAARD. **Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance**. *Physiological Reviews* Published 1 January 2004 Vol. 84 no. 1, 277-359 DOI: 10.1152/physrev.00015.2003
- BIANCHI, MLP and ANTUNES, LMG. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta**. *Rev. Nutr.*, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BURT E, ORRIS P and BUCHANAN S. **Scientific evidence of health effects from coal use in energy generation**. *Environmental and occupational health sciences*, 2013.
- COLLINS, AR. et al. **The comet assay: what can it really tell us?** *Mutat res.* 1997 apr 29;375(2):183-93.
- COOKE MS; EVANS MD; DIZDAROGLU M and LUNEC J. **Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease**. *FASEB J.* 10:1195-214, 2003.
- CHEN G. and GOEDDEL D V. **“TNF-R1 signaling: a beautiful pathway”**. *Science*, vol. 296, no. 5573, pp. 1634–1635, 2002.
- CLÉMENT K. et al. **A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction**. *Nature.* 398-401, 1998.

DA SILVA, AL. et al. **Evaluation of DNA damage in COPD patients and its correlation with polymorphisms in repair genes.** *bmc med genet.* 2013 sep 20;14:93. doi: 10.1186/1471-2350-14-93.

DA SILVA, J. et al. **Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues.** *mutat res.* 2000 oct 10;470(1):39-51.

DIAZ, et al. **References intervals for four biochemistry analytcs in plama for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma.** *Clin. Chem*, v. 44, p. 2215-2217, 1998.

DIPLOCK, AT. et al. **Functional food science and defense against reactive oxidative species BR.** *J. Nutr.* v. 80, p. 77S-112S, 1998.

DRAPER, HH and HADLEY, M. **Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation.** *Methods Enzymol.* (1990) 186 421– 431.

ELLMAN, GL. **Tissue sulfhydryl groups.** *Arch. Biochem.* 1959. *Biophys.* 82, 70–77.

FENECH, M. **The in vitro micronucleus technique.** *CSIRO Health Sciences and Nutrition*, PO Box 10041, Adelaide BC 5000, South Australia, Australia *Mutation Research* 455 (2000) 81–95.

FLOYD, R. A. **Free radicals in molecular biology.** *Aging and disease.* New York: Raven, 1984. 416p.

FROGUEL, P; GUY-GRAND B AND CLEMENT K. **Genetics of obesity: towards the understanding of a complex syndrome.** *Presse Med*, 29, 564–571, 2000

GILMOUR MI; O'CONNOR S; DICK CA; MILLER CA and LINAK WP. **Differential pulmonar inflammation and in vitro cytotoxicity of size-fractionated fly ash particles from pulverized coal combustion.** *J Air Waste Manag Assoc.* 2004 Mar;54(3):286-95.

GHIBAUDI, L. et al. **Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats.** *Obes Res.* 2002 Sep;10(9):956-63.

GHANEM M. et al. **Respirable coal dust particles modify cytochrome P4501A1 (CYP1A1) expression in rat alveolar cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004 Aug;31(2):171-83.

GRATTAGLIANO, V. et al. **Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis.** *J. Nutr. Biochem.* (2008). 19 , pp. 491–504

HABIG, WH; PABST, MJ and JACOBY, WB. **Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation.** *J. Biol. Chem.* v. 249, p.7130-7139, 1976.

HARIRI, N and THIBAUT, L. **High-fat diet-induced obesity in animal models.** *School of Dietetics and Human Nutrition, McGill University, Quebec, Canada. Nutr Res Rev.* 2010 Dec;23(2):270-99. doi: 10.1017/S0954422410000168. Epub 2010 Oct 27.

HASLAM DW and JAMES WP. **Obesity**. Lancet 2005; 366(9492) 1197-209

JANSSEN, Y. M.; MARSH, W.; ABSHER J. P. et al. **Expression of antioxidant enzymes in rat lungs after inhalation of asbestos or silica**. J. Biol. Chem. 267, 10625-10630,1993.

JOSEPH, PD.; MANNERVIK, B. and ORTIZ DE MONTELLANO, P.; **Molecular Toxicology**, 1st ed., Oxford University Press: New York, 1997, p.152-186.

JUNIOR, S.A. **Avaliação do estresse oxidativo em indivíduos expostos direta e indiretamente à atividade de mineração do carvão, antes e após suplementação com vitaminas “c” e “e”**. UFSC, 2009

LEOPOLD JA, LOSCALZO and J DRUG. **Oxidative mechanisms and atherothrombotic cardiovascular disease**. Discov Today Ther Strateg. 2008 Mar; 5(1):5-13.

LEITE, J; SCHULER-FACCINI, L. **Defeitos congênitos em uma região de mineração de carvão**. Rev Saude Publica. 2001 Apr;35(2):136-41

LEVINE, RL; GARLAND, D. and OLIVER, C.N. **Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins**. Methods Enzymol. 186, 464–478. 1990.

León-Mejía G. et al. **Occupational exposure to coal, genotoxicity and câncer risk**. Intech, chapter 7, 2016

LOPEZ, I. P. et al. **DNA microarray analysis of genes differentially expressed in diet-induced (cafeteria). obese rats**. (2003) Obes Res. 11: 188–194.

MARCHESINI G, MOSCATIELLO S, DI DOMIZIO S and FORLANI G. **Obesity-associated liver disease**. J Clin Endocrinol Metab. 2008 Nov;93(11 Suppl 1):S74-80. doi: 10.1210/jc.2008-1399.

MAVOURNIN KH. et al. **The in vivo Micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood**. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Gene-Tox Program. Mutat. Res. 1990, 239, 29–80.

MIDDLETON, Jr. E.; KANDASWAMI, C and THEOHARIDES, TC. **The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer**. Pharmacol. Rev., n. 52, p. 673-751, 2000.

MIRIAM H. FONSECA-ALANIZ. et al. **The adipose tissue as a regulatory center of the metabolismo**. Arq Bras Endocrinol Metab vol.50 no.2 São Paulo Apr. 2006.

MISRA HP and FRIDOVICH I. **The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase**. J. Biol. Chem. (1972) 247 3170–3175.

MOKDAD AH. Et al; **Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors,2001**. JAMA. 2003 Jan 1;289(1):76-9

MONTAGUE CT. et al. **Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans**. Nature, 387, 903–908, 1997

MOYSÉS MINCIS and RICARDO MINCIS. **Steatosis and steatohepatitis nonalcoholic.** São Paulo: 2006. Moreira Jr. Editora 564 a 570.

NADIF, R.; ORYSZCZYN, M. P.; FRADIER-DUSCH, M. et al. **Cross sectional and longitudinal study on selenium, glutathione peroxidase, smoking, and occupational exposure in coal miners.** *Occup. Environ. Med.* v. 58, p. 239-245, 2001.

NORDBERG, J and ARNÉR, ESJ. **Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system.** *Free Radic. Biol. Med.*, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

OLIVEIRA, MLS. et al. **Mineralogy and leaching characteristics of beneficiated coal products from Santa Catarina, Brazil.** *International Journal of Coal Geology*, 2012.

POND C. **Ecology of storage and allocation of resources: animals.** *Encyclopedia of Life Sciences* 2001;1-5.

REIS KAA, ROQUETE MLV and PENNA FJ. **Esteatohepatite não-alcoólica na infância e adolescência: revisão.** *Pediatria.* 2001;23(4): 329-39.

ROM WN, BITTERMAN PB, RENNARD SI, CANTIN A, CRYSTAL RG. **Characterization of the lower respiratory tract inflammation of nonsmoking individuals with interstitial lung disease associated with chronic inhalation of inorganic dusts.** *Am Rev Respir Dis.* 1987 Dec;136(6):1429-34.

RUMMEL C. et al. **Obesity Impacts Fever and Sickness Behavior During Acute Systemic Inflammation.** *Physiology (Bethesda).* 2016 Mar;31(2):117-30. doi: 10.1152/physiol.00049.2015.

RUPÉREZ AI; GIL A and AGUILERA CM. **Genetics of oxidative stress in obesity.** *Int J Mol Sci.* 2014 Feb 20;15(2):3118-44. doi: 10.3390/ijms15023118.

SAAD A N; HALA E H and AMAL A B. **Biochemical Study of Oxidative Stress Markers in the Liver, Kidney and Heart of High Fat Diet Induced Obesity in Rats.** *Diabetol Metab Syndr.* 2011; 3: 17. Published online 2011 Aug 3. doi: 10.1186/1758-5996-3-17.

SAGARA, Y. et al. **Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress.** *Free Radic. Biol. Med.* vol. 24, n. 9, p. 1375-1389, 1998.

SAMBANDAM B; DEVASENA T; ISLAM VI and PRAKHYA BM. **Characterization of coal fly ash nanoparticles and their induced in vitro cellular toxicity and oxidative DNA damage in different cell lines.** *Indian J Exp Biol.* 2015 Sep;53(9):585-93

SANTO TOMAS, LH. **Emphysema and chronic obstructive pulmonary disease in coal miners.** *Curr Opin Pulm Med.* 2011 Mar;17(2):123-5. doi: 10.1097/MCP.0b013e3283431674

SANCHEZ, JCD and FORMOSO, MII. **Utilização do carvão e meio ambiente.** Porto Alegre: Cientec, p. 34, 1990

SARNI, RS and LEITE, HP. **Radicais livres, antioxidantes e nutrição**. Rev. Bras. De Nutr. Clín. vol. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.

SCANDALIOS, JG. **Introduction to Oxyradicals**. Free Radic. Biol. Med., v. 23, n. 3, p. 471-472, 1997.

SCHINS RP and BORM PJ. **Mechanisms and mediators in coal dist induced toxicity: a review**. Ann Occup Hyg. 1999 Jan;43(1):7-33.

SCHINS RP and BORM PJ. **Mechanisms and mediators in coal dist induced toxicity: a review**. Ann Occup Hyg. 1999 Jan;43(1):7-33.

SIES, H. **Oxidative stress: introductory remarks**. In: SIES, H. Oxidative Stress, USA: Academic press. 1985. p. 1-7.

SILVA, LFO. et al. **mineralogy and leaching characteristics of coal ash from a major Brazilian power plant**. Santa Catarina: 2010. Coal Combustion and Gasification Products (CCGP) Doi: 10-00005.

SILVA, LFO and DA BOIT, KM. **Naniminerals and nanoparticles in feed coal and bottom ash: implications for human health effects**. Environ Monit Assess. 2011 Mar;174(1-4):187-97. doi: 10.1007/s10661-010-1449-9

SINGH, NP. et al. **A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells**. Exp. Cell Res. 1998, 175, 184–191.

STOHS, SJ and BAGCHI, D. **Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions**. Free Radic. Biol. Med 18, 321-336, 1995.

TZANETAKOU IP. et al. **"Is obesity linked to aging?": adipose tissue and the role of telomeres**. Ageing Res Rev 2012; 11(2) 220-9

VALKO, M. et al. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease**. Intern. J. Biochem. & Cell Biol.. v. 39, p. 44- 84, 2007.

VILLELA, I. V., OLIVEIRA, I.M., SILVA, J. and HENRIQUES, J.A. **DNA damage and repair in hae - molymp cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contami - nants**. Mutation Research ,2006. 605:78-86.

WENDEL, A. **Glutathione peroxidase**. Methods Enzymol. (1981) 77 325–333.

WEISBERG SP. et al. **Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue**. J Clin Invest. 112(12):1796-808, 2003

WOODS S.C. et al. **A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats**. J Nutri, 133:1081–1087, 2003

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. World Health Organ Tech Rep Ser, 916:1-149, 2003.

YANG SQ. et al. **Kupffer cell abnormalities associated with obesity-related steatosis**. Hepatology 1996; 24:350 A.

YEO GS. et al. Mutations in the human melanocortin-4 receptor gene associated with severe familial obesity disrupts receptor function through multiple molecular mechanisms. Hum Mol Genet. 2003 Mar 1;12(5):561-74.

APÊNDICE

Tabela 2: Concentração dos elementos do carvão (mg/kg).

As	12.8	Hf	5.7	Sr	61.9
B	60.2	Hg	0.2	Ta	5.2
Ba	215.3	Ho	1.1	Tb	0.9
Be	4.1	La	32.4	Pr	8.4
Bi	<0.8	Li	42.3	Rb	56.0
Cd	<0.8	Lu	<0.8	Th	15.4
Ce	85.9	Mn	120.5	Tl	1.8
Co	8.4	Mo	2.7	Tm	<0.8
Cr	61.8	Nb	32.9	U	6.1
Cs	10.4	Nd	36.2	V	108.4
Cu	21.1	Ni	19.1	W	4.1
Dy	5.4	Pb	25.1	Y	33.8
Er	2.8	Sb	0.6	Yb	3.2
Eu	1.0	Sc	14.8	Zn	91.2
Ga	16.8	Se	3.8	Zr	245.5
Gd	7.2	Sm	7.9		
Ge	6.5	Sn	4.0		

Fonte: Artigo Silva, et al. 2010.