

PAPEL DO ADRENORECEPTOR BETA 3 NO PROCESSO DE ESTRESSE OXIDATIVO

Michael Balsante Fragoso (IC) e Vera de Moura Azevedo Farah (Orientadora)

Apoio:PIVIC Mackenzie

RESUMO

O estresse oxidativo promovido por partículas chamadas Espécies Reativas do Oxigênio e do Nitrogênio é capaz de alterar significativamente a resposta de diversas vias metabólicas e assim levando ao desenvolvimento de doenças crônicas, como a síndrome metabólica. Neste contexto, sabe-se ainda que o Sistema Nervoso Simpático (SNS) é um componente importante de controle e proteção contra distúrbios metabólicos. O adrenoreceptor $\beta 3$ (AR- $\beta 3$), um dos componentes do SNS, tem chamado a atenção no campo da pesquisa. Até o presente momento, a função destes receptores no tecido adiposo é a mais bem estudada, principalmente nas áreas de lipólise e controle termogênico. Sabe-se que parte das respostas ativadas pelo adrenoreceptor $\beta 3$ se dá pela produção de óxido nítrico. Desta maneira, questionamos o papel destes receptores durante os processos de estresse oxidativo no fígado. Avaliou-se o estresse oxidativo no fígado de animais selvagens FVBC (n=8) e em animais knockout para o adrenoreceptor $\beta 3$ (n=8). Nossos resultados evidenciaram um aumento significativo na atividade dos agentes oxidantes nos animais knockout para o adrenoreceptor $\beta 3$ quando comparado com os animais FVBC. Além disso, não houve alteração significativa dos agentes antioxidantes entre os dois grupos de animais. Esses resultados sugerem que a ausência dos adrenoreceptores $\beta 3$ leva à um quadro de estresse oxidativo no fígado. Em conclusão, nossos resultados sugerem um papel importante nos adrenoreceptores $\beta 3$ no desenvolvimento do estresse oxidativo hepático.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Adrenoreceptor, Oxido Nítrico.

ABSTRACT

Oxidative stress promoted by particles called Reactive Species of Oxygen and Nitrogen is capable of significantly altering the response of various metabolic pathways and thus leading to the development of chronic diseases such as the metabolic syndrome. In this context, it is also known that the Sympathetic Nervous System (SNS) is an important component of control and protection against metabolic disorders. Adrenoreceptor β_3 (AR- β_3), one of the components of SNS, has attracted attention in the field of research. To date, the role of these receptors in adipose tissue is the best studied, especially in the areas of lipolysis and thermogenic control. It is known that part of the responses activated by β_3 adrenoreceptor is produced by the production of nitric oxide. In this way, we questioned the role of these receptors during the processes of oxidative stress in the liver. The oxidative stress in the liver of FVBC wild animals (n = 8) and knockout animals for β_3 adrenoreceptor (n = 8) were evaluated. Our results evidenced a significant increase in the activity of the oxidizing agents in knockout animals for β_3 adrenoreceptor when compared with the FVBC animals. In addition, there was no significant alteration of the antioxidant agents between the two groups of animals. These results suggest that the absence of β_3 -adrenoreceptors leads to oxidative stress in the liver. In conclusion, our results suggest an important role in β_3 adrenoreceptors in the development of hepatic oxidative stress.

Keywords: Oxidative Stress; Adrenoreceptor; Nitric Oxid

1. INTRODUÇÃO

1.1 Problema de pesquisa

O estresse oxidativo gera danos em diversas moléculas, tais como lipídios, proteínas, carboidratos e DNA. Estes danos são promovidos por partículas chamadas Espécies Reativas do Oxigênio e do Nitrogênio. Estas partículas são radicais livres que atuam modificando outras moléculas, fazendo com que ocorra deficiência na resposta de diversas vias metabólicas, levando ao desenvolvimento de doenças crônicas, como hipertensão arterial, diabetes tipo I, síndrome metabólica, insuficiência cardíaca e doença renal crônica. Neste contexto, sabe-se ainda que o Sistema Nervoso Simpático (SNS) é um componente importante de controle e proteção contra distúrbios metabólicos. O adrenoceptor $\beta 3$ (AR- $\beta 3$), um dos componentes do SNS, tem chamado a atenção no campo da pesquisa pois mostram ser um potente mecanismo para terapias auxiliares contra disfunções metabólicas, cardiovasculares e renais. Até o presente momento, a função destes receptores no tecido adiposo é a mais bem estudada, principalmente nas áreas de lipólise e controle termogênico. Entretanto, algumas vias acionadas pelos AR- $\beta 3$ permanecem sem definição conclusiva.

1.2 Justificativa

Os receptores adrenérgicos do tipo beta 3 exercem um importante papel no metabolismo energético e no controle da produção de óxido nítrico (NO) pois, pelo pouco que se sabe, as pesquisas recentes apontam potenciais terapias que podem ser desenvolvidas a partir do estudo destes receptores. Sabe-se também que o NO é um agente oxidante que quando em grandes concentrações pode ser tóxico as células, levando a gênese de doenças crônicas.

Partindo desta relação, e somado ao fato de que o **estresse oxidativo** é um processo danoso as células, questionamos a importância desse receptor no perfil do **estresse oxidativo**.

1.3 Objetivo

Caracterizar o papel do adrenoceptor $\beta 3$ no perfil do estresse oxidativo no fígado de camundongos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

O sistema nervoso central (SNC) é responsável por realizar processos cognitivos como memória, atenção, linguagem e percepção, além de auxiliar no funcionamento dos sistemas fisiológicos a fim de manter a homeostasia. A porção do SNC que controla a maioria das funções viscerais do organismo é chamada de Sistema Nervoso Autônomo (SNA), subdividido em Sistema Nervoso Simpático (SNS) e Sistema Nervoso Parassimpático (SNP) (GUYTON & HALL, 2017).

Informações vão via aferente através de nervos do SNS até o SNC, onde então são integradas para que possa haver uma resposta, como por exemplo auxiliar o controle da pressão arterial, realizar os movimentos do sistema digestório, estimular ou inibir a produção hormonal e até mesmo na taxa de filtração do sangue pelos rins (BRANDÃO *et al.* 2013; VANZELLA *et al.*, 2018)

A atividade do SNS é mediada por substâncias endógenas chamadas catecolaminas, que se ligam a receptores adrenérgicos tipo alfa e beta. Por sua vez os receptores tipo beta se dividem em beta 1 e beta 2. Diferente dos adrenoreceptores beta 1 e 2, o Adrenoreceptor beta 3 (AR- β 3) tem seus efeitos produzidos sob altas concentrações de catecolaminas, sendo assim ativados em situações em que o organismo não esteja em homeostasia (BALLIGAND, 2016).

Estudos demonstraram o papel do AR- β 3 na lipólise do tecido adiposo, na termogênese do musculo esquelético, no relaxamento da musculatura lisa (GRUJIC *et al.*, 1997; COLLINS & SURWIT, 2001; YAMAGUCHI & CHAPPLE, 2007).

No sistema Cardiovascular, Balligand (2017) demonstrou que o AR- β 3 tem alta expressão gênica em doenças do miocárdio, causando por exemplo, vasodilatação dos vasos através da síntese de Oxido Nítrico (NO) afim de auxiliar no controle da pressão arterial e manter a homeostasia.

O NO é uma molécula gasosa produzida a partir da L-arginina através da enzima NADPH oxidase em vários tipos de células, sendo um importante mensageiro celular para a realização de várias funções, como consolidação da memória e do aprendizado, controle visual e olfativo, na perfusão glomerular dos rins, na vasodilatação e em outras várias funções fisiológicas (FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

Porém, o NO pode se tornar tóxico dependendo de sua concentração e do tecido onde age, já que também possui ação oxidante por ser uma Espécie Reativa de Oxigênio (ERO) (SILVA; GONÇALVES, 2010).

A oxidação ocorre através de Espécies Reativas, moléculas conhecidas como radicais livres que possuem um elétron desemparelhado ligado ao átomo de oxigênio ou de nitrogênio. Quando em grandes quantidades, agentes oxidantes causam peroxidação lipídica e oxidação de proteínas estruturais, enzimas, carboidratos e até mesmo do DNA, podendo levar a gênese de doenças crônicas como hipertensão, dislipidemia e diabetes tipo 2 (BARREIROS *et al.*, 2006).

A geração de moléculas oxidantes é constante, proveniente do metabolismo, além das que ingerimos na dieta. Para combater seus efeitos danosos, a célula possui um sistema de defesa antioxidante que atua eliminando agentes oxidantes antes que eles causem lesões. Este sistema é um complexo constituído por diversas enzimas, entre elas a superóxido-dismutase (SOD), responsável por converter ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, e a enzima Catalase (CAT), responsável por converter peróxido de hidrogênio em água e gás oxigênio.

O estresse oxidativo é o processo derivado tanto de um aumento da capacidade oxidativa quanto de uma redução da capacidade antioxidativa. Ou seja, trata-se do desequilíbrio entre os sistemas com predomínio dos danos consequentes da ação oxidante (BARBOSA *et al.*, 2010; FRANÇA *et al.*, 2013)

3. METODOLOGIA

3.1 Amostra

Para a realização dos experimentos, foram utilizados 8 camundongos da linhagem FVBC e 8 camundongos com Knockout para o adrenoreceptor $\beta 3$ obtidos de matrizes do Biotério Central da Universidade Presbiteriana Mackenzie, todos pesando entre 8-10g.

Assim, os grupos experimentais foram distribuídos como:

Grupo Controle FVBC (n=8); e Grupo Experimental Knockout Beta 3 (n=8);

O protocolo teve início a partir do desmame, no 21^o dia de vida dos animais, e teve duração total de 8 semanas.

Os animais foram mantidos em caixas apropriadas para pequenos roedores, contendo até 4 animais por caixa, com temperatura controlada na faixa de 21-22°C, ciclo claro-escuro de 12h e livre acesso a água potável e ração padrão (Nuvilab).

Todos os procedimentos metodológicos descritos neste projeto foram submetidos ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Presbiteriana Mackenzie (UPM nº 151/01/2017).

3.2 Eutanásia e coleta de tecidos

Os animais foram eutanasiados recebendo uma overdose intraperitoneal da mistura de Ketamina (300mg/kg) e Xilazina (30mg/Kg), livres de sofrimento ou dor.

O fígado foi coletado e congelado em tubos individuais a -80°C. Em torno de 1ml de sangue foi coletado diretamente acessando a veia cava inferior durante anestesia.

O fígado coletado foi pesados, cortado e separado cerca de 300mg para os experimentos de estresse oxidativo. Em um béquer com Buffer Fosfato, os tecidos foram cortados em pedaços menores e lavados até que se retirasse o excesso de sangue para posterior homogeneização durante 30 segundos em homogeneizador Ultra-Turrax, com KCL 1.15% e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100mmol/L em isopropanol e na quantidade de 10µL/ml de KCL adicionado. Os homogeneizados foram transferidos para microtubos e centrifugados por 10 minutos numa velocidade de 3000rpm sob temperatura de 4°C. O sobrenadante foi separado e mantido congelado em freezer a -80°C. As proteínas totais foram quantificadas seguindo o método de Lowry et al. (1951), utilizando solução padrão de albumina bovina (1mg/ml).

3.4 Lipoperoxidação por quimioluminescência (QL)

O método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética (o hidroperóxido de tert-butil – t-BOOH) ao homogeneizado de tecido, avaliando-se a capacidade de resposta produzida pela amostra. A quimioluminescência foi medida em um contador beta (TriCrab 2800TR, PerkinElmer) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. As determinações foram realizadas em câmara escura, em frascos de vidro mantidos na penumbra para evitar a fosforescência ativada pela luz fluorescente. O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consiste em 960µL de uma solução tampão de fosfatos 20 mmol/L, contendo KCl 140 mmol/L (pH 7,4), à qual foi adicionado 30µL de homogenato da amostra. Após esse momento, foi realizada uma leitura inicial, considerada como a emissão basal de luz pelo homogenato. O hidroperóxido de tert-butila foi usado na concentração de 400 mmol/L, dos quais foram adicionados 10µL no meio de reação para obter-se uma concentração final de 3mmol/L. Foi registrada a emissão de luz e desta é descontada a emissão basal do homogenato para fins de cálculo (FLECHA et al., 1991).

3.5 Dosagem de Carbonilas

O ensaio para detecção das carbonilas é uma das técnicas utilizadas para a determinação de proteínas modificadas oxidativamente (Reznick, Packer, 1994). A técnica se

baseia na reação das proteínas oxidadas do homogeneizado das amostras com 2,4 DNPH em meio ácido, seguido de sucessivas lavagens com ácidos e solventes orgânicos e incubação final com guanina. Desta forma, a absorvância das carbonilas foi medida em um espectrofotômetro a 360nm, num meio de reação contendo os seguintes reagentes: guanidina 6M em HCL 2,5M, pH= 2,5; 2,4 DNPH em HCL 2,5N; ácido tricloroacético (TCA) 20%; TCA 10%; etanol/acetato de etila 1:1 (V/V).

3.6 Atividade da Catalase (CAT)

A taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade da CAT. Desta forma, o consumo de H₂O₂ pode ser utilizado como uma medida de atividade da enzima CAT. O ensaio consiste em medir a diminuição da absorvância a 240nm, comprimento de onda em que há a maior absorção pelo peróxido de hidrogênio, utilizando-se cubetas de quartzo. Para a realização das medidas foi usada uma solução tampão constituída de fosfatos a 50 mmol/L em pH 7,4. Foram adicionados 985µL deste tampão e 5 µL do homogenato das amostras na cubeta do espectrofotômetro, sendo esta mistura descontada contra um branco de tampão fosfato. A seguir foram adicionados 10µL de peróxido de hidrogênio 0,3mol/L e monitorada a diminuição da absorvância no espectrofotômetro (BOVERIS; CHANCE, 1973).

3.7 Superóxido dismutase (SOD)

A técnica utilizada está baseada na inibição da reação do radical superóxido com o piragalol. Uma vez que não se consegue determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, se utiliza a quantificação em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector. A oxidação do piragalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420nm durante 2 minutos.

A atividade da SOD foi determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado. No meio de reação, foram utilizados 5 µL de homogeneizado, 985µL de tampão Tris-Fosfato a 50 mmol/L (pH 8,8), 5 µL de pirogalol a 24mmol/L, 5µL de CAT a 30µmol/L. Foram feitas curvas-padrão utilizando três concentrações distintas de SOD (0,25U, 0,4U e 12U), através da qual foi obtida a equação da reta para realização dos cálculos (Marklund, 1985).

3.8 NADPH oxidase

A atividade da enzima NADPH oxidase foi determinada em homogeneizado das amostras e foi avaliada pela produção de superóxido determinado por meio de ELISA. Para realização do ensaio foi utilizado buffer fosfato 50mM contendo EDTA 2mM e sucrose 150mM, NADPH 1,3mM e 10 µl do homogenato da amostra. A produção de superóxido foi expressa em µm/min/mg de proteína (TIETZE, 1969).

3.9 Poder antioxidante de redução do Ferro (FRAP)

O poder de redução férrica (FRAP) é um teste direcionado para avaliar o poder antioxidante total através de uma reação não específica, na medida que, em condições, qualquer meia reação que tenha um potencial redox menor que uma meia reação férrica/ferrosa conduzirá a reação férrica (FeIII) a ferrosa (FeII). Assim, a mudança na absorbância é diretamente relacionada ao poder da redução total de doação de elétrons antioxidantes presentes na reação. A técnica consiste em realizar em uma microplaca uma curva com solução-padrão de sulfato ferroso heptahidratado e água destilada. Incuba-se 10 µL de amostra e 290µL de reativo de FRAP (Buffer de acetato de sódio e ácido acético pH 3,6; Solução de Tripiridil 2,4,6-S-tiazina 10mM; Solução de cloroeto férrico hexahidratado), durante 5 minutos com shake, à 37°C. A leitura é realizada a 593nm (BENZIE; STRAIN, 1996).

3.10 Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

Levando em consideração o menor volume do homogenato dos ventrículos esquerdos, a técnica abaixo descrita foi realizada apenas nas amostras de fígado.

O H₂O₂ foi dosado como descrito por Pick e Keisari (1980) a partir da oxidação de vermelho de fenol mediada pela peroxidase de rabanete (PRS), o que leva a formação de um composto mensurável a 630nm. A curva utilizada foi construída utilizando água destilada, H₂O₂ 250uM, Solução de PRS composto de Buffer Dextrose, Vermelho de Fenol (Sigma-Aldrich Corporation) e Peroxidase de Rabanete tipo II (Sigma-Aldrich Corporation).

O ensaio foi montado em placa de Elisa com 70uL do homogenato da amostra e 180uL de PRS, passando por incubação de 25min (temperatura ambiente). Então, foi adicionado 5uL de NaOH 0.5N e realizada leitura em leitor de placa de Elisa (Robonik) (PICK; KEISARI, 1980).

3.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 6. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão e foram analisados por teste T de student. Consideramos significativamente diferente apenas somente quando $p < 0.05$.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

O NO é um radical livre produzido no endotélio dos vasos, que tem uma de suas vias de produção através do estímulo do β_3 -AR. Esse receptor tem sua atividade em altas concentrações de catecolaminas, tendo demonstrado um efeito positivo sobre diversos sistemas do corpo. É responsável pela termogênese da musculatura esquelética, lipólise do tecido adiposo, relaxamento da musculatura lisa, dilatação dos vasos e outros processos fisiológicos.

Dentro da homeostasia, a produção de radicais livres é necessária para que processos fisiológicos ocorram corretamente, como a sinalização celular e a defesa contra micro-organismos. Mas quando em excesso, essas moléculas provocam danos oxidativos em macromoléculas. Estudos realizados por Malfitano e colaboradores (2014) demonstrou que tanto um nível de oxidação elevado quanto uma redução da capacidade anti-oxidativa possui consequências sistêmicas degenerativas.

Sabe-se que a enzima NAD Peroxidase converte NADPH em ânion superóxido, este que sofre ação da SOD e forma peróxido de hidrogênio. (DE ANGELIS et al., 2014). Nossos resultados demonstram que a ausência do adrenoreceptor β_3 produziu um aumento da atividade da NADPH (figura 1).

Por outro lado, não houve alteração na atividade da SOD quando comparados grupos FVBC e Knockout para o adrenoreceptor β_3 (figura 2). Portanto, um aumento da NADPH sem alteração da SOD sugere que há um excesso de ânion superóxido.

Figura 1. NADPH do fígado. Os valores estão expressos como média \pm EP. * $p < 0.05$ vs. FVBC

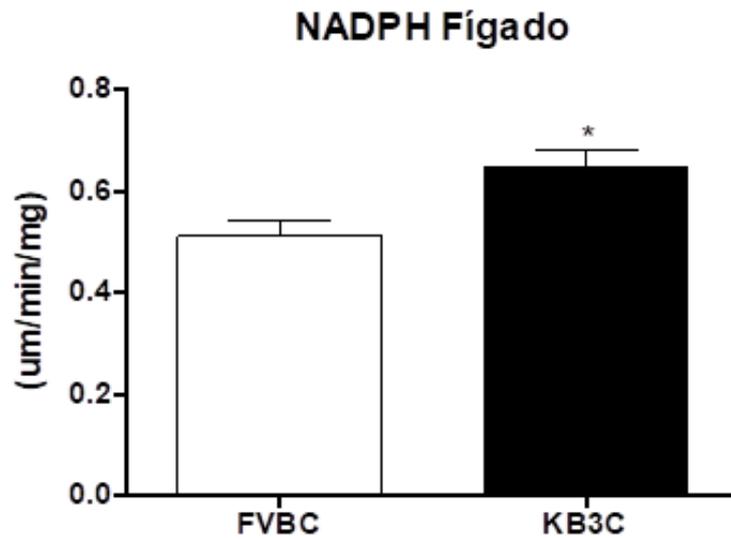
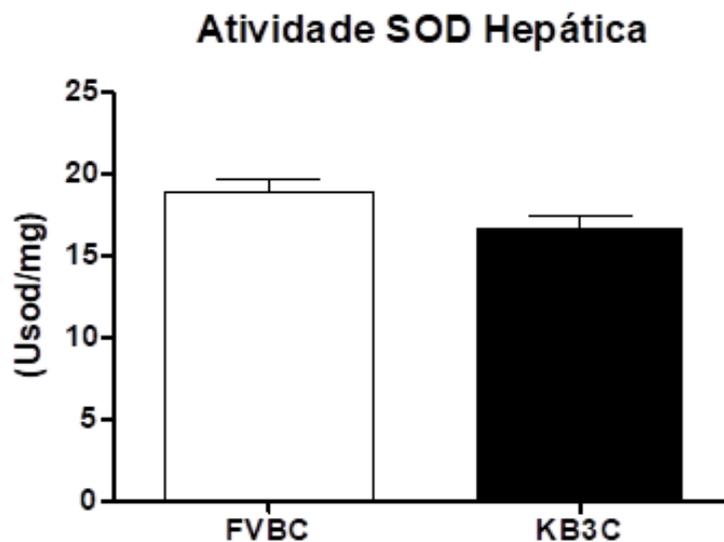
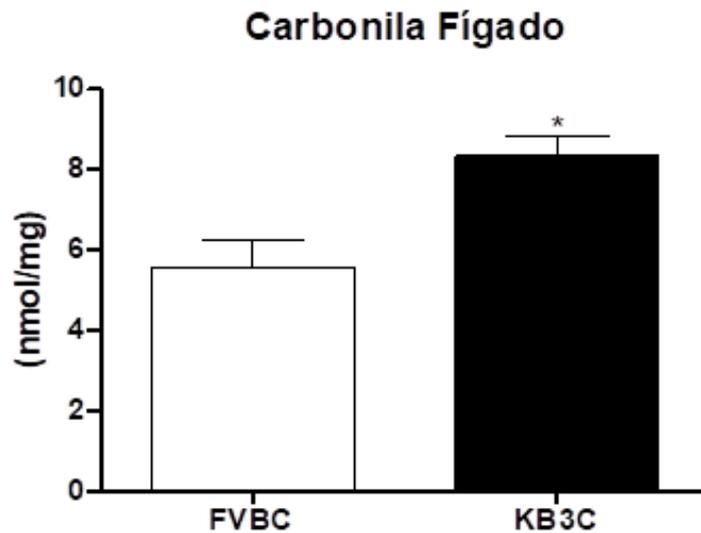


Figura 2. Atividade da SOD do fígado. Os valores estão expressos como média \pm EP.



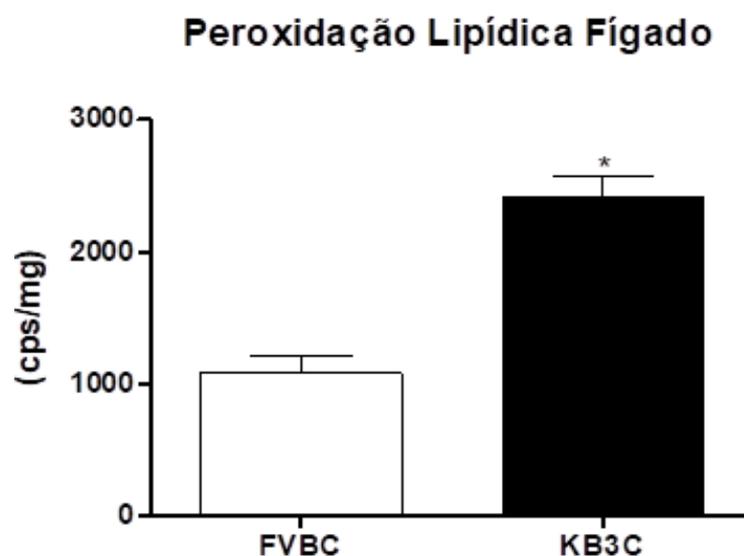
O ânion superóxido é particularmente uma ROS danosa, pois, quando em excesso, sua reação com NO resulta na produção de peroxinitrito, que por sua vez, leva principalmente a oxidação de proteínas (CONTI, 2015). Em corroboração, ao dosar a concentração de carbonilas reativas, nosso estudo demonstrou um aumento dos danos oxidativos proteicos (Figura 3) ocasionados pela ausência do AR- β 3.

Figura 3. Carbonila do fígado. Os valores estão expressos como média \pm EP. * $p < 0.05$ vs. FVBC



Benzie e colaboradores (1996) demonstraram que o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio podem também reagir com íons de ferro e cobre. Quando fazem essa reação, liberam íons hidroxila que formam peroxilipídeo, responsável pela peroxidação lipídica. Nosso estudo observou aumento significativo na peroxidação lipídica das células hepáticas do grupo knockout para o receptor $\beta 3$ quando comparado ao grupo controle (figura 4).

Figura 4. Peroxidação Lipídica do fígado. Os valores estão expressos como média \pm EP. * $p < 0.05$ vs. FVBC



Está bem estabelecido que a enzima CAT é um importante agente antioxidante, sendo responsável principalmente por converter peróxido de hidrogênio em água e gás oxigênio (referência). Entretanto, nosso estudo demonstrou que mesmo com o aumento na concentração de peróxido de hidrogênio (figura 5), não houve alteração na atividade da CAT no tecido hepático (figura 6).

Figura 5. Peróxido do Fígado. Os valores estão expressos como média \pm EP. * $p < 0.05$ vs. FVBC

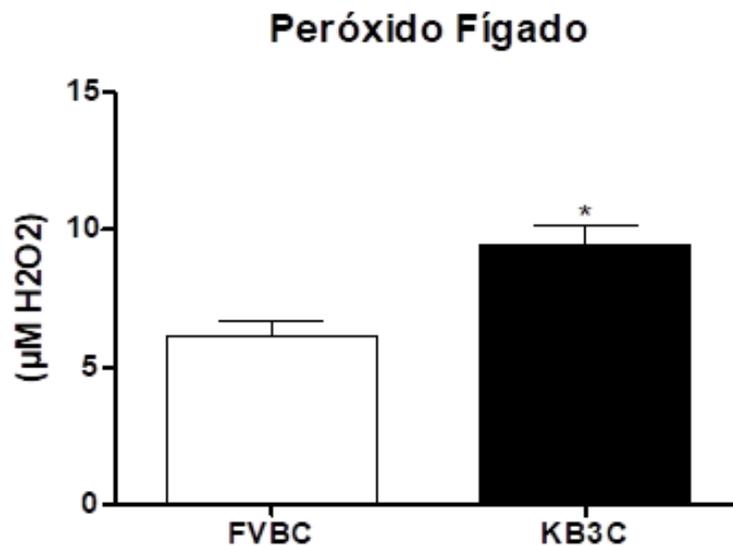
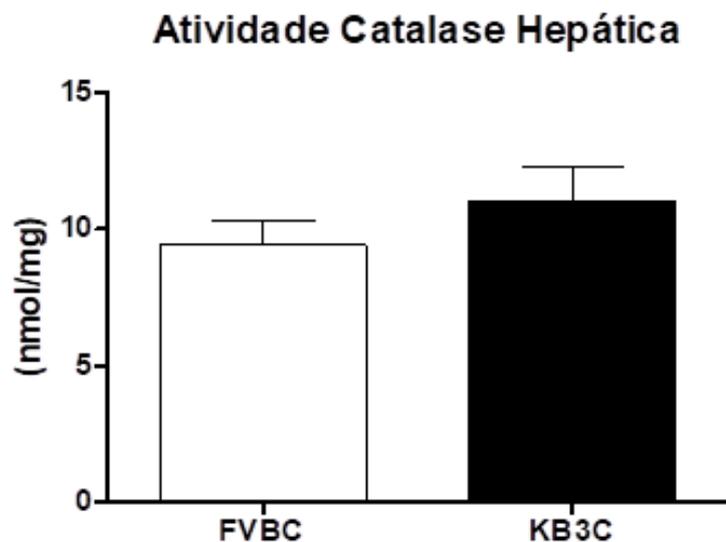


Figura 6. Atividade da enzima Catalase do fígado. Os valores estão expressos como média \pm EP.



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos dados sugerem que a falta dos receptores adrenérgicos beta 3 determinou um quadro de estresse oxidativo no tecido hepático caracterizado por um desbalanço dos agentes oxidantes e antioxidantes. Em conclusão, nossos resultados sugerem que os receptores adrenérgicos beta 3 possuem um papel protetor contra o estresse oxidativo no tecido hepático.

6. REFERÊNCIAS

- BALLIGAND, J. L. Cardiac beta3-adrenergic receptors in the clinical arena the end of the beginning. **European Journal of Heart Failure**, v. 19, p. 576–578, 2017.
- BALLIGAND, J. L. Cardiac salvage by tweaking with beta-3-adrenergic receptor. **Cardiovascular research**, v. 111, n. 2, p. 128-133, 2016.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, ago. 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 1, n. 239, p. 70-76, 1996.
- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**, v. 134, n. 3, p. 707-716, 1973.
- BRANDÃO, A. A.; CAMPANA, E. M. G.; MAGALHÃES, M. E. C.; et al. Desnervação simpática renal no tratamento da hipertensão arterial resistente. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 101, n. 4, p. 364-371, 2013.
- CHRISTIANE, M.; BARBOZA, C. A.; MOSTARDA, C.; et al. Diabetic hyperglycemia attenuates sympathetic dysfunction and oxidative stress after myocardial infarction in rats. **Cardiovascular diabetology**, v. 13, n. 1, p. 131, 2014.
- COLLINS, S.; SURWIT, R. S. The β -adrenergic receptors and the control of adipose tissue metabolism and thermogenesis. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 56, n. 1, p. 309-328, 2001.
- CONTI, F. F.; BRITO, J. O.; BERNARDES, N.; et al. Positive effect of combined exercise training in a model of metabolic syndrome and menopause: autonomic, inflammatory, and oxidative stress evaluations. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 309, n. 12, p. 1532-1539, 2015.
- DE ANGELIS, K. Cardiovascular autonomic dysfunction and oxidative stress induced by fructose overload in an experimental model of hypertension and menopause. **Bmc Cardiovascular Disorders**, v. 14, n. 1, p.1-7, 2014.
- FILHO, R. F.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev Ass Med Brasil**, v. 46, n. 3, p. 71-265, 2000.
- FLECHA, B. G.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 10, n. 2, p. 93-100, 1991.
- FRANÇA, B. K.; ALVES, M. R.; SOUTO, F. M. S.; et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **Ge Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 20, n. 5, p.199-206, 2013.
- GRUJIC, D.; SUSULIC, V. S.; HARPER, M. E.; et al. β 3-Adrenergic Receptors on White and Brown Adipocytes Mediate β 3-Selective Agonist-induced Effects on Energy Expenditure, Insulin Secretion, and Food Intake: a study using transgenic and gene knockout mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 28, p. 17686-17693, 1997.
- HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**, 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

IRIGOYEN, M. C.; SANTOS, F.; FARAH, V.; et al. Revisitando a fisiologia do sistema nervoso simpático: o que há de novo? **Revista Socesp**, São Paulo, p. 9- 15, 2014.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

MARKLUND, S. L. Pyrogallol autooxidation. **Handbook of methods for oxygen radical research**, v. 24, p. 3-247, 1985.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of immunological methods**, v. 2, p. 161-70, 1980

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **InMethods in enzymology**, jan, v. 233, p. 357-363, 1994

SILVA, A. A.; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, 2010.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical biochemistry**, v. 1, n. 27, p. 221-502, 1969.

VANZELLA, L.M.; BERNARDO, A. F. B.; CARVALHO, T. D.; et al. Complexidade do Sistema nervosa autônomo em indivíduos com DPOC. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, n. 1, p. 24-30, 2018.

YAMAGUCHI, O.; CHAPPLE, C. R. β 3-Adrenoceptors in urinary bladder. *Neurourology and Urodynamics*: **Official Journal of the International Continence Society**, v. 26, n. 6, p. 752-756, 2007.

Contatos: michaelbfragoso@gmail.com e vera.farah@mackenzie.br