

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPERNUTRIÇÃO NO PERÍODO PÓS-NATAL SOBRE OS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO RENAL EM RATOS ADULTOS JOVENS.

Anderson Apolonio da Silva Pedroza¹; Claudia Jacques Lagranha²

¹Estudante do Curso de Bacharelado em Educação Física- CAV – UFPE; E-mail: andersonggt@hotmail.com,

²Docente/pesquisador do Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte – CAV – UFPE. E-mail: lagranha@hotmail.com

Sumário: O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da supernutrição pós natal sobre as possíveis alterações no balanço oxidativo no córtex renal de ratos jovens (30 dias). Foi utilizado um modelo de ninhada reduzida para induzir a supernutrição pós-natal. Aos 21 dias de vida, a prole foi desmamada e passaram a receber dieta Labina. Aos 30 dias de vida, os animais macho foram sacrificados e o tecido renal (córtex) foi retirado para as análises bioquímicas: Níveis de peroxidação lipídica através da metodologia de MDA e níveis de oxidação proteica através da metodologia de carbonilas além da quantificação das atividades antioxidante das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione-S-transferase (GST). Nossos resultados mostraram que a supernutrição induz um aumento significativo nos níveis de peroxidação lipídica e oxidação proteica, e diminuição da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST. Nossos dados sugerem que a supernutrição pós-natal modula negativamente o balanço oxidativo no córtex renal por redução das defesas antioxidantes. Essas alterações podem estar relacionadas com uma redução da funcionalidade renal, que por sua vez pode estar associado a doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: estresse oxidativo; obesidade; rim

INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo armazenamento excessivo de gordura no organismo (AGUILA *et al.*, 1998). O sobrepeso e a obesidade estão se tornando cada vez mais prevalente em crianças e adolescentes (FORD *et al.*, 2002; GOODMAN *et al.*, 2005). Dados divulgados pelo IBGE no ano de 2010 mostraram que no Brasil, 30% das crianças e cerca de 20% dos adolescentes estão acima do peso. Estudos mostram que o excesso de gordura visceral pode aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio tais como o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, culminando no estresse oxidativo (CONCEIÇÃO *et al.*, 2012). O estresse oxidativo, que é caracterizado pelo desequilíbrio entre produção das espécies reativas de oxigênio (EROS) e as defesas celulares antioxidantes, está associado a diversas patologias crônicas como hipertensão arterial (CHANG, 2010). Um aumento no estresse oxidativo nos rins poderia levar o desenvolvimento de doenças renais, podendo este ser um dos possíveis mecanismos indutores da hipertensão arterial (FRASER; ARIEFF, 1988; ANDERSON *et al.*, 2009; WHALEY-CONNELL, 2012). Os rins são os órgãos responsáveis pelo equilíbrio iônico e ácido-base, produção de hormônios e eliminação de toxinas (SODRÉ *et al.*, 2007). É também um importante mantenedor da pressão sanguínea e osmorregulação (SODRÉ *et al.*, 2007). O desenvolvimento renal em ratos ocorre entre o 8º e 10º dia pós-natal e em humanos entre as 34ª e 36ª semana de gestação (BOUBRED *et al.*, 2007). Quando em desenvolvimento, organismo é passível de sofrer influências de fatores externos e pode vir a apresentar modificações bioquímicas e estruturais (MORGANE *et al.*, 2002). Essa fase

de susceptibilidade, em que ocorrem multiplicação e diferenciação celular, recebe a denominação de período crítico do desenvolvimento (MORGANE *et al.*, 2002). Alterações ambientais como supernutrição durante este período crítico de desenvolvimento, pode acarretar em um rápido aumento de peso seguido de uma predisposição permanente de doenças associadas com a obesidade (PLAGEMANN *et al.*, 1999). Hunger *et al.*, (2002) afirma que o excesso de gordura em tecidos não adiposos, a exemplo o tecido renal, pode desencadear uma série de fatores negativos intracelulares causando uma anormalidade estrutural e funcional dos rins. O que resulta em uma insuficiência renal seguido de uma disfunção cardiovascular a longo prazo (SINGHAL *et al.*, 2004).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos albinos da linhagem *Wistar* provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Após o nascimento, no primeiro dia de vida, todas as ninhadas foram normatizadas para nove neonatos por mãe. Para obtenção do grupo Supernutrido (S), o tamanho da ninhada foi reduzida para três filhotes por mãe, no terceiro dia de vida pelo fato da lactação está totalmente estabelecida a oferta de mais leite para os três filhotes é significativo (FIOROTTO *et al.*, 1991). Para o grupo controle (C), o número de filhotes permaneceu em nove neonatos por mãe (PLAGENMANN *et al.*, 1999). Aos 30 dias de vida os ratos foram sacrificados por decapitação em guilhotina e em seguida foi realizada a coleta do tecido, onde os mesmos foram armazenados imediatamente a -20°C . Preparo do homogeneizado do tecido coletado para utilização nas técnicas bioquímicas: Os tecidos coletados foram homogeneizados em tampão de extração (Tris base 50 mM, pH 7,4; EDTA 1mM; ortovanadato de sódio 1 mM; PMSF 2 mM, Nonidet P-40 Substitute à 1%). Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm, a 4°C , por 10 minutos e os sobrenadantes serão submetidos à quantificação de proteína. Dosagem de proteína: A concentração de proteína da suspensão de cada tecido foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Para a dosagem de TBARS foi utilizada a técnica colorimétrica de Buege e Aust (1978), a avaliação da oxidação de proteínas foi dada através da reação com o composto 2,4-dinitrofenilhidrazina descrito em Reznick e Meth (1994). A atividade da superóxido dismutase foi avaliada através do método da inibição da auto-oxidação da adrenalina como descrita em Misra e Fridovich, (1972), A atividade da catalase foi avaliada segundo o protocolo de Halliwell e Gutteridge (1989). A atividade da Glutathione-S-Transferase (GST) foi realizada segundo HABIG, (1974).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao avaliarmos o nível de peroxidação lipídica, através da quantificação do nível de MDA (Malondialdeído), foi observado um aumento significativo no grupo supernutrido (0.4428 ± 0.1020) em relação ao grupo Controle (0.1942 ± 0.04764) (Figura1).

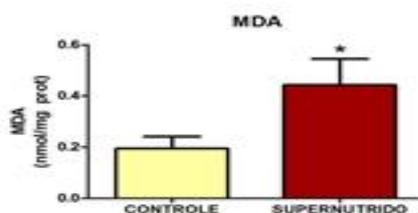


Figura 1. Níveis de MDA (Malondialdeído) no córtex renal de ratos controle (N= 9) e supernutrido (N= 9). Valores expressos em nmol/mg de proteína. Dados expressos como média \pm erro padrão (*p= 0,042).

A peroxidação lipídica é responsável por alterar negativamente a estrutura e fluidez das membranas plasmáticas. Nossos resultados mostram um aumento de MDA no córtex renal dos ratos supernutridos. Estas alterações podem estar relacionadas com uma menor seletividade no transporte iônico e ou na sinalização transmembrana, o que prejudica o transporte celular (DELL'ANNA *et al.*, 2007).

Ao avaliarmos o nível de oxidação proteica (Carbonilas), foi observado um aumento significativo, no grupo supernutrado (7.703 ± 0.4670) quando comparado ao grupo Controle (4.580 ± 0.6515) (Figura 2).

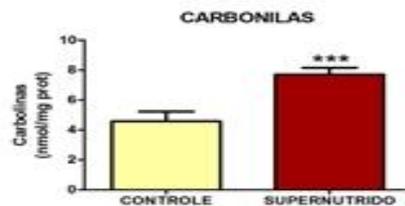


Figura 2. Níveis de oxidação de proteína (CARBONILAS) no tecido renal de ratos controle (N= 9) e supernutrado (N= 12). Valores expressos em nmol/mg de proteína. Dados expressos em média \pm erro padrão (**p=0,0008).

As carbonilas assim como o MDA, são biomarcadores de estresse oxidativo. As carbonilas em especial, são um biomarcador de dano oxidativo em proteínas, nossos resultados mostram um aumento significativo das carbonilas no grupo supernutrado. Além de estar envolvido à uma diversidade de patologias como diabetes, câncer e doenças neurodegenerativas, o aumento dos níveis de carbonilas tem sido observado em indivíduos que apresentam um quadro de disfunção renal (MASTSUYAMA *et al.*, 2009).

Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes:

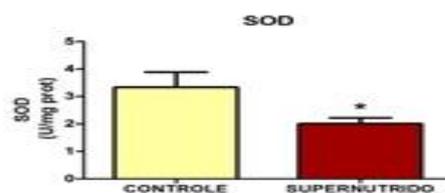


Figura 3. Atividade da Superóxido Dismutase no córtex renal de ratos controle (N= 10) e supernutrado (N= 11). Valores expressos em U/mg de proteína. Dados expressos como média \pm erro padrão (*p=0,033).

A enzima antioxidante Superóxido dismutase é a primeira enzima na linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio. A SOD é responsável por converter ânion superóxido em peróxido de hidrogênio que é convertido pela catalase e glutathione peroxidase em água e oxigênio. Com a supernutrição observamos que houve uma diminuição significativa na atividade da SOD no grupo experimental. Esta diminuição pode resultar numa maior quantidade de ânion superóxido livre para reagir com óxido nítrico para formar o peroxinitrito, um potente oxidante de grupamentos tióis (-SH), ou podendo gerar o radical hidroxil ou demais agentes oxidantes responsáveis pela oxidação de lipídeos de membrana, proteínas e/ou DNA (HALLIWELL e CHIRICO, 1993; HALLIWELL, 1994; KANNER, 1994).

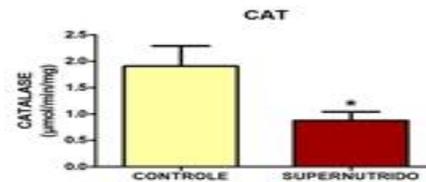


Figura 5. Atividade da Catalase no córtex renal de ratos controle (N=9) e supernutrido(N=9). Valores expressos em µmol/min/mg de proteína. Dados expressos como média ± erro padrão (*p=0,024).

O rim, assim como o fígado é um órgão que além de superexpressar, tem uma atividade aumentada da catalase. A atividade da catalase estava diminuída de forma significativa no grupo supernutrido. A diminuição da atividade da catalase no rim está associada a uma menor resistência ao peróxido de hidrogênio e a toxicidade com maior dano glomerular, sendo este último está associado a perda da função renal (BREZNICEANU, 2007).

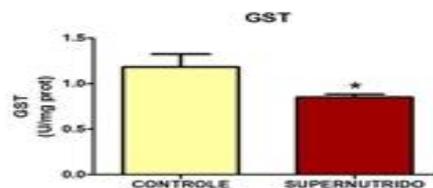


Figura 5. Atividade da Glutathione-S-Transferase no córtex renal de ratos controle (N=12) e desnutrido(N=11). Valores expressos em U/mg de proteína. Dados expressos como média ± erro padrão. (*p=0,039)

A enzima glutathione-s-transferase está envolvida no metabolismo de xenobióticos e tem como principal função a detoxificação de agentes tóxicos endógenos e exógenos (FERREIRA, 2013). O reparo de macromoléculas oxidadas por espécies reativas de oxigênio, a regeneração de proteínas S-tioladas e a biossíntese de metabólitos fisiologicamente importantes, são outras das funções da GST (ARMSTRONG, 1997; SHEEHAN *et al.*, 2001). Nossos resultados mostram uma diminuição significativa na atividade antioxidante da GST no grupo supernutrido comparado ao grupo controle. A literatura mostra que a diminuição da atividade desta enzima pode levar a um aumento das espécies reativas de oxigênio nos rins, e que este aumento pode proporcionar uma resposta fisiopatológica nas células renais, como diminuição da função (CRESSEY *et al.*, 2002; BLAITHIN *et al.*, 2010; ISAAC *et al.*, 2014).

CONCLUSÕES

Nosso trabalho observou que a supernutrição no período crítico de desenvolvimento (pós-natal), foi capaz de provocar danos oxidativos no córtex renal, principalmente por diminuição da atividade das enzimas antioxidantes. Estas alterações causadas pela supernutrição nas enzimas antioxidantes pode gerar uma série de efeitos deletérios sobre a função renal podendo ser considerada como um importante mecanismo patogênicos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus colegas de laboratório. E a FACEPE e CNPQ pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- AZAHARA I. RUPÉREZ, ANGEL GIL, CONCEPCIÓN M. AGUILERA. Genetics of Oxidative Stress in Obesity. **International Journal of Molecular Sciences**. v.15, p.3118, 2014.
- DING, WAI W CHEUNG, ROBERT H MAK. Impact of obesity on kidney function and blood pressure in children. **World J Nephrol**. v. 4, p. 223, 2015.

MORGANE P.J, MOKLER D.J, GALLER J.R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26, p.471, 2002.

PLAGEMANN A, HARDER T, RAKE A, VOITS M, FINK H, ROHDE W, DÖRNER G. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galanergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. **Brain Res.** v. 31, p.836, 1999