

## EFEITOS DE UMA RESTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL NA SEGUNDA GERAÇÃO DE RATAS JOVENS: AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO HEPÁTICO DA PROLE.

Gizele Santiago de Moura Silva<sup>1</sup>; Mariana Pinheiro Fernandes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Educação Física Bacharelado- CAV – UFPE; E-mail: gy.moura\_13@hotmail.com

<sup>2</sup>Docente/pesquisador do Depto do Laboratório de Bioquímica e Bioquímica do Exercício – CAV – UFPE.  
E-mail: marianapfernandes@yahoo.com.br.

**Sumário:** A restrição proteica por duas gerações no período crítico do desenvolvimento altera o equilíbrio redox hepático de ratos jovens de segunda geração, sendo o principal objetivo do trabalho avaliar o metabolismo oxidativo hepático desses animais submetidas à restrição proteica perinatal por duas gerações. Para a metodologia ratas gestantes foram divididas em dois grupos de acordo com a dieta experimental: Controle, caseína 17% e Denutridas, caseína 8%, utilizando essas dietas durante a gestação e lactação. Sua prole, por sua vez, sofreu a mesma manipulação na gestação e lactação, dando origem a segunda geração (F2). Aos 30 dias de vida foi feita a avaliação do peso corpóreo dos animais, remoção e pesagem do fígado para posterior análises bioquímicas: medição dos níveis de peroxidação lipídica, atividade das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx). Para a análise estatística foi utilizado o teste *t-Student* ( $p < 0,05$ ). Foi encontrado diminuição do peso corporal e do fígado do grupo desnutrido. Esse mesmo grupo apresentou menor peroxidação lipídica e aumento da atividade de SOD e CAT, mas redução da GPx. Conclui-se que animais F2 estão mais resistentes a restrição proteica perinatal, talvez como uma estratégia de compensação metabólica devido aos insultos sofridos.

**Palavras-chave:** desnutrição; fígado; metabolismo oxidativo

### INTRODUÇÃO

A desnutrição vem sendo apontada como um dos principais fatores não genéticos implicados na etiologia de doenças metabólicas associadas à obesidade (BARKER, 2007). As relações entre saúde e dieta demonstram que dependendo do estado nutricional do indivíduo ocorre uma maior predisposição ao aparecimento e/ou progressão dessas doenças (GLUCKMAN E HANSON, 2004). Apesar de alguns estudos epidemiológicos mostrarem a relação entre programação fetal e doenças crônico-degenerativas, pouco se sabe dos mecanismos bioquímicos e moleculares indutores dessas patologias. Em contrapartida, já é sabido que inúmeras doenças metabólicas são induzidas pelo desequilíbrio oxidativo (BARBOSA *et al.*, 2010), aumentando assim a produção de espécies reativas de oxigênio nesses tipos celulares, potencializando assim o aparecimento das doenças em uma fase posterior (FERREIRA E MATSUBARA, 1997). Estudos em modelos animais, abordando os efeitos da desnutrição durante a prenhez e a lactação, têm relatado ocorrer comprometimento na massa corporal das mães, com repercussões nas crias (MCMILLEN IC *et al.*, 2008 e SCHULER SL, *et al.*, 2008), como alterações permanentes no crescimento e no metabolismo, além de mudanças irreversíveis no tamanho e na função de órgãos, especialmente o fígado e o pâncreas (MINANA-SOLIS MC, *et al.*, 2007). Contudo, se tem pouco conhecimento sobre os efeitos de uma restrição proteica perinatal no metabolismo hepático da segunda geração de ratas submetidas a este modelo experimental. Logo, a hipótese do projeto é que uma restrição proteica no período crítico do desenvolvimento altere o equilíbrio redox hepático da segunda geração de ratas jovens. Em função disso, o

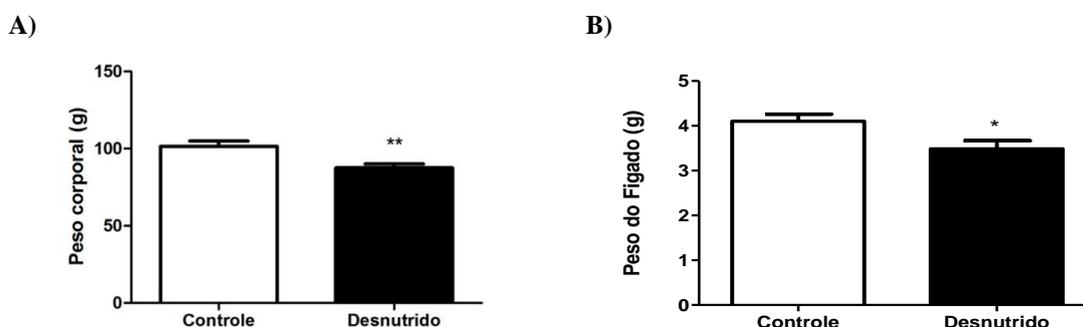
objetivo desse trabalho foi avaliar o metabolismo oxidativo hepático da segunda geração de ratos jovens submetidas à restrição proteica perinatal a fim de compreendermos se o fígado é capaz ou não de se adaptar a longo prazo aos efeitos deletérios decorrentes de uma desnutrição sofrida na geração anterior.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Ratas da linhagem *Wistar* foram colocadas para acasalar na proporção 2 fêmeas para 1 macho. Animais nascidos a partir do 1<sup>o</sup> acasalamento (geração F1) após crescimento, foram acasalados para obtenção da 2<sup>a</sup> geração (geração F2). Os machos da segunda geração (F2) foram avaliados aos 30 dias de idade. O projeto teve aprovação do Comitê de Ética do CCB da UFPE (n<sup>o</sup> 23076.018417/2013-73). As ratas prenhas foram divididas em dois grupos de acordo com a dieta fornecida: controle (C, caseína a 17%) e desnutridas (D, caseína a 8%). Na lactação, as ratas continuaram recebendo dieta conforme o grupo experimental e após o desmame, os filhotes receberam dieta de laboratório Labina®. Aos 30 dias de idade, os animais dos grupos controle e desnutridos F2 foram pesados e depois sacrificados. Imediatamente após o sacrifício, o fígado foi removido e pesado. O tecido hepático foi homogeneizado em tampão de extração, para quantificação proteica e avaliações bioquímicas. A concentração de proteína totais da suspensão do tecido foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Em seguida foram avaliados os níveis de peroxidação lipídica pela metodologia da substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizando a técnica colorimétrica de (BUEGE & AUST, 1978). Para a avaliação da atividade da enzima antioxidante Catalase (CAT) foi utilizado o método descrito por (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1989). A Superóxido Dismutase (SOD) foi avaliada segundo (MARKLUND, 1985). A atividade da Glutathione Peroxidase (GPx) foi feita de acordo com (FLOHÉ E GUNZLER, 1984). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). A análise estatística foi realizada através do teste “t” de student não pareado considerando  $p < 0,05$ .

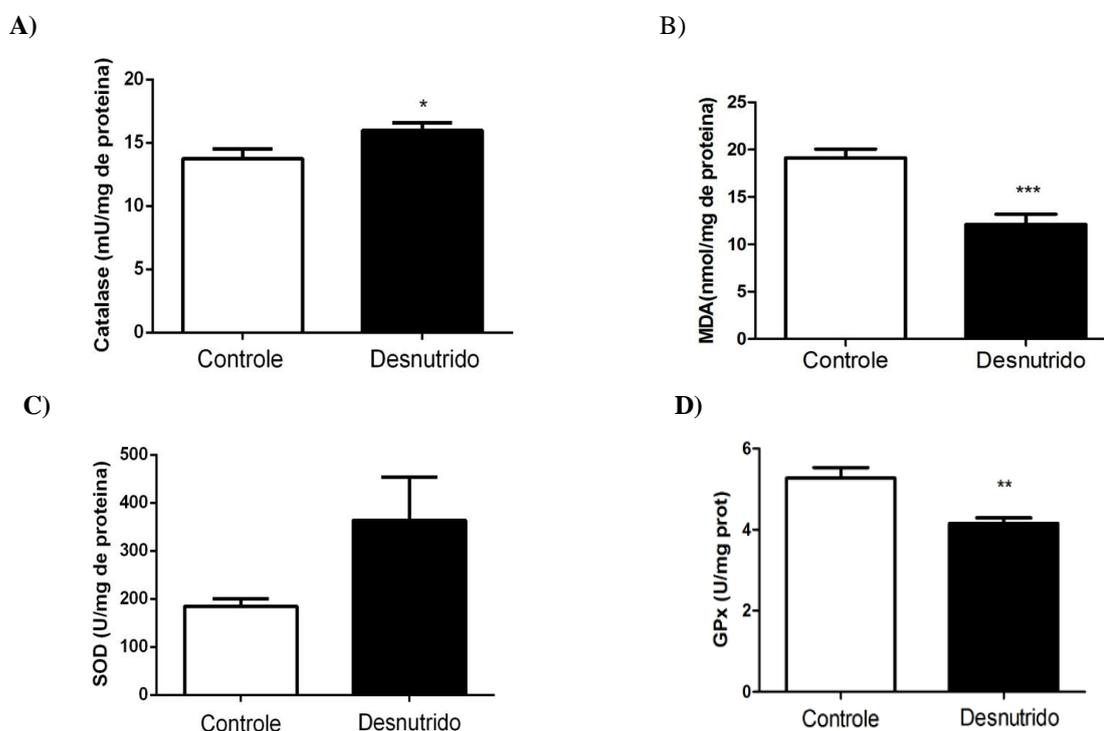
## RESULTADOS

Verificamos uma redução significativa tanto no peso corporal quanto no peso dos fígados (Figura 1) de ratos machos aos 30 dias de vida no grupo desnutrido em comparação com o grupo controle. Foi observada uma diminuição significativa da peroxidação lipídica, acompanhado de um aumento nas atividades das enzimas antioxidantes SOD e catalase nos animais desnutridos de segunda geração (Figura 2).



**Figura 1: Avaliação do peso corporal (A) e do peso do fígado (B) de animais de segunda geração.** Para essa análise foram utilizados peso corporal (C,n=8; D,n=8) e peso

do fígado (C,n=6; D,n=6). Os valores, em gramas, representam média  $\pm$  erro padrão da média (\* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01)



**Figura 2. Avaliação da peroxidação lipídica (A) e da atividade das enzimas superóxido dismutase (B), catalase (C) e glutathiona peroxidase (D) no tecido hepático de animais de segunda geração.** Para essa análise foram utilizados MDA(C,n=8; D,n=10), SOD(C,n=8; D,n=8), CAT(C,n=8; D,n=9) e GPx(C,n=7; D,n=7). Os valores, em U/mg de proteína, representam média  $\pm$  erro padrão da média. (\* $p$ =0,05, \*\* $p$ <0,01 e \*\*\* $p$ <0,001).

## DISCUSSÃO

A hipótese do trabalho é que a restrição proteica por duas gerações no período crítico do desenvolvimento altera o equilíbrio redox hepático de ratos jovens. Verificamos uma redução tanto no peso corporal quanto no peso dos fígados dos animais desnutridos F2. Uma explicação possível para a redução do peso corporal dos filhotes pode ser devido ao baixo estoque de nutrientes oferecidos à mãe que provavelmente resultou em deficiência de nutrientes para a prole (BARKER, 2007). Esses efeitos da desnutrição proteica perinatal na redução do peso corporal e hepático dos animais, já tinha sido observado previamente pelo nosso grupo de pesquisa na primeira geração de ratos jovens submetidos ao mesmo protocolo experimental e persistiu na prole da segunda geração (SIMÕES *et al.* – dados ainda não publicados). Nossos resultados também mostraram que os níveis de peroxidação lipídica de membrana nos animais desnutridos F2 estão reduzidos. Isso pode ser justificado, visto que a atividade antioxidante das enzimas superóxido dismutase e catalase apresentaram aumento nesses animais. Já a atividade da enzima Glutathiona Peroxidase foi significativamente reduzida, podendo ser explicado pelo aumento da catalase que por sua vez, apresenta função semelhante à GPx. Esses resultados em conjunto, sugerem que o fígado desses animais adquiriu resistência a desnutrição com o passar do tempo, se adaptando as alterações do ambiente exposto. Pouco se sabe sobre os efeitos da desnutrição

proteica em animais de segunda geração, porém já foi observado pelo nosso grupo um aumento de peroxidação lipídica sem alteração na atividade da SOD e tendência a aumento na atividade da CAT em fígado de animais aos 30 dias de vida de primeira geração (SIMÕES *et al.* – dados ainda não publicados). Isso nos permite supor que a diminuição da peroxidação lipídica e aumento da SOD e CAT, como observado em nossos resultados, pode ser uma estratégia de compensação metabólica devido aos insultos sofridos.

## CONCLUSÕES

Nossos dados mostram que os animais desnutridos F2 não apresentaram estresse oxidativo, diferentemente do que se tinha visto em animais F1 que já mostram alteração no balanço oxidativo. Assim, esses dados sugerem que os animais de segunda geração estão mais resistentes a restrição proteica perinatal, como uma estratégia de compensação metabólica hepática devido aos insultos sofridos e possivelmente estariam menos predispostos ao aparecimento de doenças metabólicas na vida adulta, causadas por um desequilíbrio oxidativo. Alguns estudos mostram comportamentos bioquímicos diferentes entre machos e fêmeas, sabendo disso, seria interessante avaliar os mesmos efeitos em fêmeas (F2), bem como a atividade de enzimas metabólicas nos dois gêneros.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por mais um objetivo alcançado, e também ao CNPq pelo apoio financeiro e pela oportunidade de desenvolver um importante trabalho na iniciação científica. Agradeço de forma especial a minha orientadora Mariana Fernandes pela dedicação e aprendizado, aos meus amigos de laboratório e minha família pelo incentivo.

## REFERÊNCIAS

- BARBOSA, K.B.F. ET AL. 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.*, 23(4): 629-643.
- BARKER, D.J., OSMOND, C., FORSEN, T.J., KAJANTIE, E., ERIKSSON, J.G. 2007. Maternal and social origins of hypertension. *Hypertension.*; 50(3):565-71.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, v. 52, p. 302-10.
- BRADFORD ET AL. 1976. *Anal Biochem.*72:248-254.
- FERREIRA ALA, MATSUBARA LS. 1997 Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *RAMB*; 43(1): 61-8.
- FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, v.105, p.114-121, 1984.
- GLUCKMAN, P. D., HANSON, M. A. 2004. Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatr.Res.*, v. 56, n. 3, p. 311-317.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M. Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol.* 1989; 2(2):195-256. Review.
- MARKLUND, S. 1985 *Handbook of Methods for Oxygen radical Research*. Boca Raton. CRC Press. 243-247.
- MINANA-SOLIS MC, ESCOBAR C. 2007. Increased susceptibility to metabolic alterations in Young adult females exposed to early malnutrition. *Int J Biol Sci.*;3:12-9
- MCMILLEN IC, MACLAUGHLIN SM, MUHLHAUSLER BS, GENTILI S, DUFFIELD JL, MORRISON JL. 2008. Developmental origins of adult health and disease: the role of periconceptual and fetal nutrition. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*;102:82-9.