



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
NÚCLEO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E CIÊNCIAS DO ESPORTE

ANDERSON APOLONIO DA SILVA PEDROZA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPERNUTRIÇÃO NO PERÍODO PÓS-NATAL
SOBRE OS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO CÓRTEX RENAL DE RATOS
JOVENS**

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
NÚCLEO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E CIÊNCIAS DO ESPORTE

ANDERSON APOLONIO DA SILVA PEDROZA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPERNUTRIÇÃO NO PERÍODO PÓS-NATAL
SOBRE OS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO CÓRTEX RENAL DE RATOS
JOVENS**

TCC apresentado ao Curso de Bacharelado em Educação Física da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Educação Física.

Orientador: Prof^a Dr^a Claudia
Jacques Lagranha

Co orientador: Prof^a Dr^a Mariana
Pinheiro Fernandes

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2015

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Ligia Feliciano dos Santos, CRB4: 2005

P372a Pedroza, Anderson Apolonio da Silva.

Avaliação dos efeitos da supernutrição no período pós-natal sobre os níveis de estresse oxidativo no córtex renal de ratos jovens/ Anderson Apolonio da Silva Pedroza. – Vitória de Santo Antão: O Autor, 2015.

29 folhas: il.

Orientador: Claudia Jacques Lagranha.

Co-orientador: Mariana Pinheiro Fernandes.

TCC (Graduação) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV,
Bacharelado em Educação Física, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Obesidade. 2. Estresse oxidativo. 3. Córtex Renal. I. Lagranha, Claudia Jacques (Orientador). II. Fernandes, Mariana Pinheiro (Co-orientador). III. Título.

616.398 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-078/2013

ANDERSON APOLONIO DA SILVA PEDROZA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUPERNUTRIÇÃO NO PERÍODO PÓS-NATAL
SOBRE OS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO CÓRTEX RENAL DE RATOS
JOVENS**

TCC apresentado ao Curso de Bacharelado em Educação Física da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Educação Física.

Aprovado em: 24/07/2015.

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Mariana Pinheiro Fernandes (Co-Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Ms. Diorginis José Soares Ferreira (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Luciana Caroline Paulino do Nascimento (Mestranda)
Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo armazenamento excessivo de gordura no organismo e está se tornando cada vez mais prevalente em crianças e adolescentes. Estudos mostram que o excesso de gordura pode aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio e/ou diminuir a atividade antioxidante do organismo, culminando no estresse oxidativo. O presente estudo tem como objetivo avaliar se a supernutrição no período crítico de desenvolvimento (lactação) pode induzir alterações no balanço oxidativo renal de ratos jovens. 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 ($p=0,03$) e oxidação proteica ($p=0,008$) no grupo supernutrido. Em relação a atividade das enzimas antioxidantes, houve uma redução na atividade da Superóxido dismutase ($p=0,033$), Catalase ($p=0,0248$) e Glutathione-S-transferase ($p=0,0397$). 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: Obesidade; Estresse oxidativo e Rim.

ABSTRACT

Obesity is a chronic disease characterized by excessive fat storage in the body and is becoming increasingly prevalent in children and adolescents. Studies show that excess fat can increase the formation of reactive oxygen species and / or decrease the antioxidant activity in the body, resulting in oxidative stress. This study aims to evaluate the overnutrition in the critical period of development (lactation) may induce alterations in renal oxidative balance of young rats. It was used a model to induce reduced litter postnatal supernutrição. At 21 days, the offspring were weaned and have received Labina® diet. At 30 days of life, male animals were sacrificed and kidney tissue (cortex) was removed for biochemical analysis such as lipid peroxidation levels by MDA methodology oxidation and protein carbonyl levels through the addition methodology of quantifying antioxidant activities of the enzymes superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), and glutathione-S-transferase (GST). Our results showed that overnutrition induces a significant increase in the levels of malonaldehyde ($p = 0.03$) and carbonyl ($p = 0.008$) in supernutrido group. Regarding the activity of antioxidant enzymes, there was a reduction in the activity of superoxide dismutase ($p = 0.033$), Catalase ($p = 0.0248$) and Glutathione S-transferase ($p = 0.0397$). Our data suggest that postnatal overnutrition negatively modulates the oxidative balance in the renal cortex, by reduction of antioxidant defenses. These changes may be related to a reduction of renal function, which in turn can be associated with cardiovascular disease.

Keywords: Obesity; Oxidative stress and Kidney.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Obesidade	10
2.2 Plasticidade Fenotípica e Rim	10
2.3 Estresse Oxidativo Renal e Obesidade	12
3 OBJETIVOS	14
4 METODOLOGIA	15
5 RESULTADOS	18
6 CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS	25

1 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 semanas 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 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 seguida de uma disfunção cardiovascular a longo prazo (SINGHAL *et al.*, 2004).

Modelos experimentais de superalimentação pós-natal estão sendo utilizados para avaliar as possíveis implicações do excesso de gordura no estresse oxidativo. Porém, existem poucos estudos relacionados com o estado oxidativo nos tecidos renais de animais jovens submetidos a supernutrição no período crítico do desenvolvimento. Pesquisas epidemiológicas evidenciam que o excesso nutricional na infância pode trazer malefícios para a vida adulta, comprometendo o funcionamento metabólico, induzindo a obesidade e consequentemente, aumentando o risco de desenvolver doenças correlatas que afetam o sistema cardiovascular (BOUBERD *et al.*, 2009).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Obesidade

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo de gordura corporal, provocado por um baixo gasto energético combinado a um desequilíbrio nutricional, podendo está associado ou não a distúrbios genéticos e endocrinometabólicos (OMS, 2000; FISBERG, 1995). O sobrepeso e a obesidade está aumentando em diversos países, principalmente nos países subdesenvolvidos, sendo 30% maior nos países desenvolvidos. Em 2013, 42 milhões de crianças menores de cinco anos estavam acima do peso ou obesas (OMS, 2015).

Além de ser um problema de saúde pública, independente da classe social ou faixa etária, o excesso de peso e a obesidade tem um impacto sobre uma variedade de alterações nos processos biológicos moleculares. Quanto mais cedo é o seu surgimento, maior é o risco de sua persistência na vida adulta (SÁ LEAL *et al.*, 2012; STUPIN; ARABIN, 2014).

O impacto da obesidade sobre as doenças metabólicas tem sido bem demonstrado, e, recentemente, há evidências crescentes de que a obesidade é um fator de risco independente para o desenvolvimento de várias doenças crônicas, como o diabetes tipo 2, o desenvolvimento de câncer, síndrome metabólica, doença renal crônica e doenças cardiovasculares (FORD *et al.*, 2002; DE PERGOLA; SILVESTRIS, 2013; WEI DING *et al.*, 2015). A literatura mostra que a supernutrição e o rápido ganho de peso nas primeiras fases da vida tem sido associada a uma maior susceptibilidade a obesidade e doenças correlacionadas (KAUNG HL, 1994; STETTLER *et al.*, 2005; MORRISON *et al.*, 2008).

2.2 Plasticidade Fenotípica e Rim

Quando em desenvolvimento, o organismo é passível de sofrer influências de fatores externos podendo vir a apresentar modificações bioquímicas e estruturais (MORGANE *et al.*, 2002). Este período é marcado por uma rápida proliferação e diferenciação celular e denomina-se período crítico do desenvolvimento (DOBBING, 1985; MORGANE *et al.*, 2002).

Em relação ao desenvolvimento renal, a nefrogênese é predominantemente completa em humanos no período pré-natal e em ratos no período pós-natal, ocorre respectivamente, até 34^a e 36^a semanas de gestação e 8º a 10º dia (RODRIGUES *et al.*, 2004). Tanto em humanos quanto em ratos, a maturação renal, que é caracterizada pelo tamanho glomerular e aumento do comprimento tubular, continuam após o nascimento (BOUBRED *et al.*, 2007; BOUBERD *et al.*, 2009). Durante este período, se exposto a situações adversas como desequilíbrio nutricional, por exemplo, o organismo sofrerá uma série de adaptações, tais como diminuição da taxa de proliferação celular, podendo alterar a plasticidade da estrutura e função dos sistemas orgânicos (MORGANE *et al.*, 2002). A expressão “plasticidade fenotípica” pode então ser entendida como a capacidade de mudança do fenótipo em resposta às alterações ambientais durante períodos críticos do desenvolvimento (gestação e lactação), e suas possíveis repercussões tanto agudas como crônicas (GLUCKMAN, 2005). A supernutrição no período pós-natal, parece estar associada à uma debilitada nefrogênese, que tem como repercussão, um aumento do número de néfrons e uma diminuição do volume glomerular (BOUBERD *et al.*, 2009). Tais modificações podem contribuir para um aumento do risco de doenças cardiovasculares e renais (BOUBERD *et al.*, 2009).

Os rins são os órgãos responsáveis pela filtração, excreção e reabsorção de componentes plasmáticos, além de exercer funções metabólicas e endócrinas. Este órgão tem como principal função, a manutenção da homeostasia, regulando o meio interno pela reabsorção e excreção de substâncias e íons (H₂O, Cl, Na⁺, Bicarbonato, Glicose, Uréia, K⁺, Ácido úrico, Creatinina). Por minuto, os rins recebem e filtram, através dos glomérulos, aproximadamente 1.200 a 1.500 ml de sangue e produzem 180 ml/minuto de um fluido praticamente livre de células e proteínas (SODRÉ *et al.*, 2007). A função renal é regulada por uma série de hormônios além de outras substâncias como o óxido nítrico. A literatura mostra que a obesidade contribui para o desenvolvimento e/ou progressão de patologias em múltiplos órgãos, além de estar relacionada com disfunções renais (YIM HE, 2012).

Além de função reguladora da homeostase corporal, os rins também participam da regulação da pressão arterial, através da liberação de hormônios pelas células justaglomerulares, denominado renina (RABI; CAMPBELL, 2015). A renina juntamente com o angiotensinogênio, a enzima conversora da angiotensina e os receptores para a angiotensina II são as quatro principais proteínas do sistema

renina-angiotensina-aldosterona. Desregulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona tem sido relacionada à gênese de várias doenças crônicas como a hipertensão arterial, acidente vascular encefálico e insuficiência renal crônica (FYHRQUIST, 2008).

2.3 Estresse Oxidativo Renal e Obesidade

Um dos possíveis mecanismos para o desenvolvimento de patologias em indivíduos obesos é o aumento do estresse oxidativo local e sistêmico (ANDERSON *et al.*, 2009). Estudos relacionados com disfunção renal, têm mostrado que injúrias neste tecido podem ser mediadas pelo estresse oxidativo (SMALL *et al.*, 2012; MARSEGLIA, 2015). O estresse oxidativo pode ser definido como uma perturbação da função molecular e celular, causada por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a capacidade de defesa antioxidante do organismo (SMALL *et al.*, 2012).

As espécies reativas de oxigênio podem ser classificadas como radicais livres (moléculas que contém um ou mais elétrons não pareado na camada externa do orbital) e não radicais (não contém elétrons desemparelhados em sua última camada, mas é um agente oxidante ou pode ser facilmente convertido em um radical livre) (SMALL *et al.*, 2012). O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são considerados como as principais espécies reativas de oxigênio. As mitocôndrias, além de exercer papel fundamental no metabolismo aeróbio, na produção de adenosina trifosfato (ATP) através da cadeia respiratória, são as principais fontes geradoras de espécies reativas de oxigênio nos mamíferos (SILVA *et al.*, 2011). Para o combate às espécies reativas de oxigênio, existe o sistema antioxidante que é dividido em enzimático e não enzimático (FERRARI, 2001). Que são responsáveis por defender as células e tecidos dos danos oxidativos, sistema enzimático compreende principalmente as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e as enzimas dos sistemas das Glutathionas (Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Redutase (GR), Glutathione-S-transferase (GST) (FERRARI, 2001).

O rim é um órgão altamente energético, e seu metabolismo é predominantemente aeróbio, por esta razão um bom funcionamento do sistema antioxidante é um fator chave contra a indução de dano oxidativo (LIU *et al.*, 2002). A excessiva ingestão calórica associada a obesidade, Dessa forma o aumento do

tecido adiposo nos rins pode causar um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio concomitante à uma diminuição da atividade antioxidante enzimática (GRATTAGLIANO, 2008), tendo como principal mecanismo envolvido o aumento na produção e liberação de adipocitocina e citocinas tais como o factor de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucinas 1 β (IL1 β) e 6 (IL6) pelo tecido adiposo renal induzindo assim processos inflamatórios e danos oxidativos renais (AZAHARA, 2014).

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral: Avaliar se a supernutrição na lactação é capaz de induzir estresse oxidativo no córtex renal de ratos jovens (aos 30 dias de vida)

Objetivos Específicos:

Avaliar no córtex renal:

- Níveis de peroxidação lipídica;
- Níveis de oxidação proteica;
- Atividade das enzimas antioxidantes:
 - Superóxido Dismutase (SOD),
 - Catalase (CAT),
 - Glutathione-S-transferase (GST).

4 METODOLGIA

4.1 Grupos experimentais

Foram utilizados ratos albinos da linhagem *Wistar* provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em sala com temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro-escuro de 12/12h (luz das 23:59 h às 12:00 h) e com livre acesso à alimentação e à água. Para a obtenção dos neonatos, foram acasalados animais machos e fêmeas nulíparas (proporção 1:2), com idade entre 60 e 70 dias com peso entre 150 e 180 gramas. Quando detectado o estado de prenhez, as ratas foram acomodadas individualmente em gaiolas recebendo dieta comercial do biotério (LABINA, Purina Brasil: 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídeos - LABINA). Após o nascimento, no primeiro dia de vida, todas as ninhadas foram normatizadas para nove neonatos por mãe. Para obtenção do grupo Supernutrado (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).

4.2 Coleta dos tecidos

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 .

4.3 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 homogenização as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm, a 4°C , por 10 minutos e os sobrenadantes serão submetidos à quantificação de proteína.

4.4 Dosagem de proteína

A concentração de proteína da suspensão de cada tecido foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Este complexo absorve em comprimento

de onda de 595 nm. A absorbância será considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de albumina de soro bovino a 1% foi utilizada como padrão.

4.5 Medida do índice de lipoperoxidação de membranas pela metodologia da substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para a dosagem de TBARS foi utilizada a técnica colorimétrica de Buege e Aust (1978), sendo uma técnica muito utilizada para avaliar a lipoperoxidação, pois o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da lipoperoxidação, entre eles o malondealdeído. Coloca-se uma alíquota do homogeneizado, de ácido tricloroacético a 30% e de ácido tiobarbitúrico a 0,73% que reage com os produtos da lipoperoxidação formando um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada por 15 minutos a 100°C e em seguida resfriada. Na sequência, foi adicionado n-butanol e as amostras agitadas por 30 segundos, com o objetivo de extrair o pigmento formado. O material foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos, leitura da absorbância a 535nm, utilizando cubetas de quartzo. Os resultados foram expressos em nmoles de TBARS por miligrama de proteína.

4.6 Medida de oxidação proteica (CARBONILAS)

A avaliação da oxidação de proteínas foi dada através da reação com o composto 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) descrito em Reznick e Meth (1994). Ao tecido, foi adicionado DNPH 10mM e HCl 2,5M e estes foram agitados a cada 15 minutos a temperatura ambiente durante uma hora. Após esse procedimento, proteínas precipitadas em adição ao TCA 30% foram centrifugadas e passadas por uma série de lavagens até o pellet ser ressuspenso em tampão fosfato e levado ao espectrofotômetro a um comprimento de onda de 370nm.

4.7 Atividade enzimática

4.7.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase foi avaliada através do método da inibição da auto-oxidação da adrenalina, o qual compete com a SOD podendo ser medido em espectrofotômetro a 480nm. Em uma cubeta de quartzo de 1 mL, adiciona-se tampão carbonato (pH= 10,2), amostra e adrenalina a 3mM. A

absorbância foi registrada por um período de aproximadamente 1 minuto. Os resultados foram expressos em Unidade por miligrama proteína (MISRA e FRIDOVICH, 1972).

4.7.2 Catalase (CAT)

A atividade da catalase é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, sendo assim, a atividade da enzima pode ser medida através da avaliação do consumo de peróxido pelo decréscimo na absorção a 240 nm (λ máx do H_2O_2) de um meio de reação, contendo tampão fosfato (pH=7,4) e H_2O_2 (30 mM). Os resultados foram expressos em micro mol por minuto por miligrama de proteína (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

4.7.3 Glutathione-S-transferase (GST)

A atividade da Glutathione-S-Transferase (GST) foi realizada segundo HABIG, (1974). O procedimento se constitui da adição de tampão fosfato de potássio 0.1M (pH 6.5); EDTA 1mM; GSH 1mM; amostra e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 1mM. A atividade da enzima foi avaliada pela formação de 2,4-dinitrofenil-s-glutathione (DNP-SG) por minuto a 30°C, o qual foi verificado via espectrofotômetro em comprimento de onda igual a 340nm.

4.8 Análise estatística

Todos os dados foram analisados segundo a normalidade da distribuição pelo teste de KOLMOGOROV-SMIRNOV. Os dados que estiveram dentro da distribuição gaussiana foram expressos em média e erro padrão da média (EPM). Estes dados foram analisados pelo teste “*T-Student*” não pareado, sendo adotado o nível de significância de 5% em todos os casos. A construção do banco de dados e as análises estatísticas foram desenvolvidas no programa Excel (versão 2010, Microsoft, USA) e Graphpad Prisma 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), respectivamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação dos níveis de Malondialdeído

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

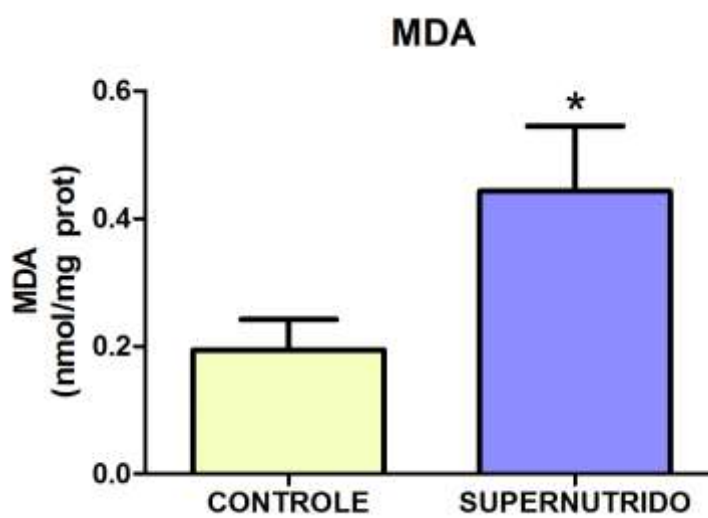


Figura 1. Níveis de MDA (Malondealdeído) no córtex renal de ratos controle (N= 9) e supernutrado (N= 9). Valores expressos em nmol/mg de proteína. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão (*p= 0,042).

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).

Avaliação dos níveis de Carbonilas

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).

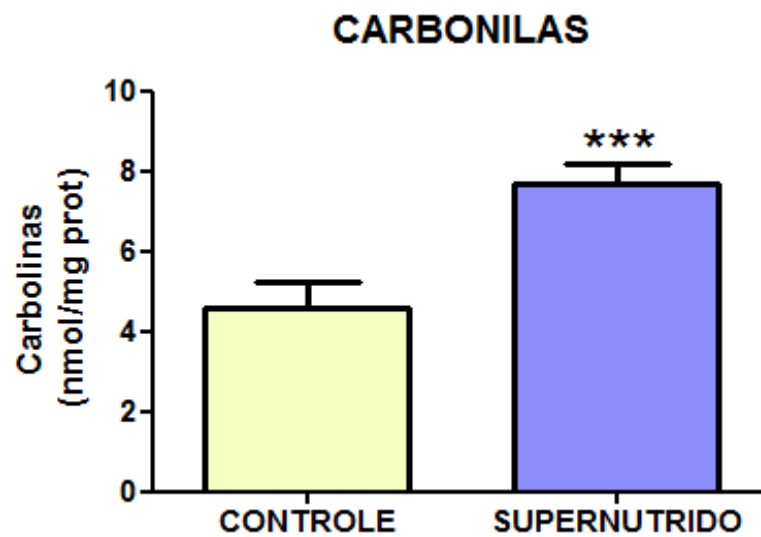


Figura 2. Níveis de oxidação de proteína (CARBONILAS) no tecido renal de ratos controle (N= 9) e supernutrido (N= 12). Valores expressos em nmol/mg de proteína. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão (**p=0,0008)

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 supernutrido. 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

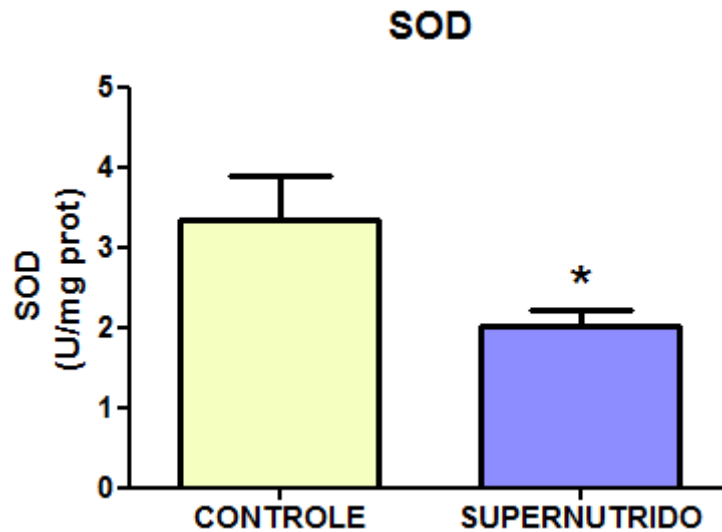


Figura 3. Atividade da Superóxido Dismutase no córtex renal de ratos controle (N= 10) e supernutrído (N= 11). Valores expressos em U/mg de proteína. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão (*p=0,033).

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 a partir da reação de Fenton ou demais agentes oxidantes responsável pela oxidação de lipídeos de membrana, proteínas e/ou DNA (HALLIWELL e CHIRICO, 1993; HALLIWELL, 1994; KANNER, 1994).

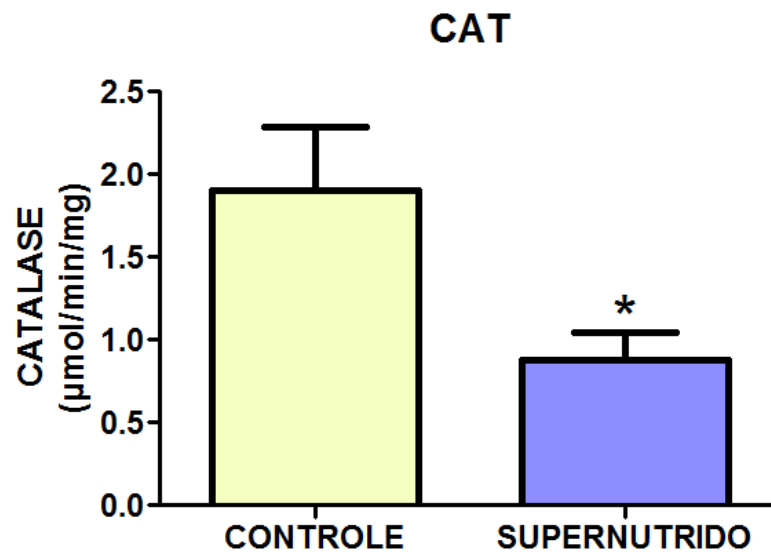


Figura 5. Atividade da Catalase no córtex renal de ratos controle (N=9) e supernutrído(N=9). Valores expressos em $\mu\text{mol/min/mg}$ de proteína. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão (* $p=0,024$).

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 supernutrído. 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).

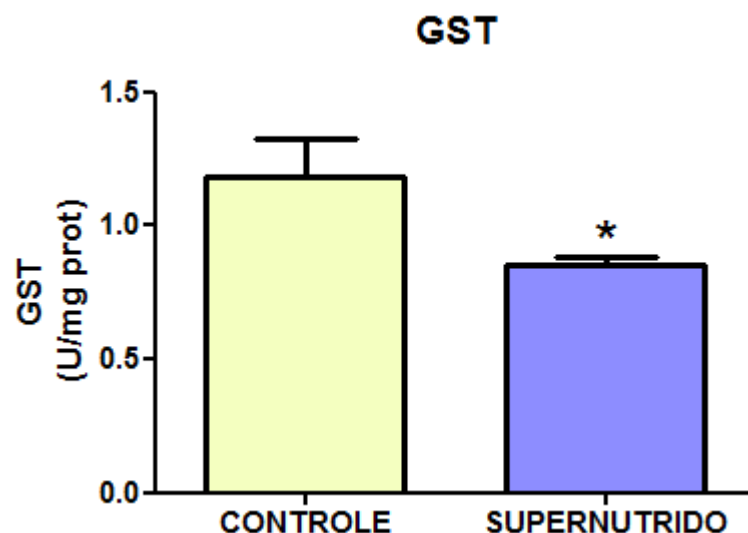


Figura 5. Atividade da Glutathione-S-Transferase no córtex renal de ratos controle (N=12) e supernutrído(N=11). Valores expressos em $\mu\text{mol/min/mg}$ de proteína. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. (* $p=0,039$)

A enzima glutathiona-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 sua função (CRESSEY *et al.*, 2002; BLAITHIN *et al.*, 2010; ISAAC *et al.*, 2014).

6 CONCLUSÃO

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 patogênico.

6 APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho teve suporte financeiro da **FACEPE** (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco).

REFERÊNCIAS

- AGUILA MB, RODRIGUES-APFEL MI, MANDARIM-DE-LACERDA CA. Stereology of the myocardium and blood biochemistry in aged rats fed with a cholesterol-rich and canola oil diet (n-3 fatty acid rich). **Basic Res Cardiol.**, v.93, p.182(INICIO E FIM DO ARTIGO), 1998.
- ANDERSON EJ, LUSTIG ME, NEUFER PD. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. **J Clin Invest.** v.119, p.573, 2009.
- ARMSTRONG, R.N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione S-transferase. **Chemical Research in Toxicology**, v. 10, n. 1, p. 2, 1997.
- AZAHARA I. RUPÉREZ, ANGEL GIL, CONCEPCIÓN M. AGUILERA. Genetics of Oxidative Stress in Obesity. **International Journal of Molecular Sciences.** v.15, p.3118, 2014.
- BARKER, D. J. Fetal Origins Of Coronary Heart Disease. **BMJ.** v.311, p.171, 1995.
- BARKER, D. J., CLARK, P. M.. Fetal Undernutrition And Disease In Later Life. **REV REPROD.** v.2, v.105, 1997.
- Blaithin A. McMahon, Jay L. Koyner, Patrick T. Murray. Urinary glutathione S-transferases in the pathogenesis and diagnostic evaluation of acute kidney injury following cardiac surgery: a critical review. **Curr Opin Crit Care.** v.16, p.550, 2010.
- BOUBRED F, BUFFAT C, FEUERSTEIN JM, DANIEL L, TSIMARATOS M, OLIVER C, LELIEVRE-PEGORIER M, SIMEONI U. Effects of early postnatal hypernutrition on nephron number and long-term renal function and structure in rats. **Am J Physiol Renal Physiol.** v, 293, p. 944, 2007.
- BOUBRED F, DANIEL L, BUFFAT C, FEUERSTEIN JM, TSIMARATOS M, OLIVER C, DIGNAT-GEORG E F, LELIEVRE-PEGORIER M, SIMEONI U. Early postnatal overfeeding induces early chronic renal dysfunction in adult male rats. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 297, p. 51, 2009
- BOUBRED, F.; BUFFAT, C.; SIMEONI, U. Effects of early postnatal hypernutrition on nephron number and long-term renal function and structure in rats. **Am J Physiol Renal Physiol** v.293, p.1944, 2007.
- BRADFORD, M. M. A Rapid And Sensitive Method For The Quantitation Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing The Principle Of Protein-Dye Binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248, 1976.
- BREZNICEANU ML, LIU F, WEI CC, TRAN S, SACHETELLI S, ZHANG SL, GUO DF, FILEP JG, INGELFINGER JR, CHAN JS. Catalase overexpression attenuates

angiotensinogen expression and apoptosis in diabetic mice. **Kidney International**. v.71, p.912, 2007.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal Lipid Peroxidation. **Methods Enzymol**. v. 52, p. 302, 1978.

CHANG YC, CHUANG LM. The Role Of Oxidative Stress In The Pathogenesis Of Type 2 Diabetes: From Molecular Mechanism To Clinical Implication. **Am J Transl Res**. v.23, p.16, 2010.

CONCEIÇÃO, E.P.S.; Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition — role of insulin resistance. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 24, p.81, 2012.

CRESSEY G, ROBERTS DR, SNOWDEN CP. Renal tubular injury after infrarenal aortic aneurysm repair. **J Cardiothorac Vasc Anesth**. v. 16, p. 290, 2002.

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.

DOBBING, J., SANDS, J. Cell size and cell number in tissue growth and development. An old hypothesis reconsidered. **Arch Fr Pediatr**, v.42, p.199, 1985.

DOYLE LW, FABER B, CALLANAN C, MORLEY R. Blood Pressure In Late Adolescence And Very Low Birth Weight. **Pediatrics**. v.111, p.252, 2003.

FERRARI CKB. Oxidative stress pathophysiology: searching for an effective antioxidant protection. **Intern Med J**. v. 8, p.175, 2001.

FISBERG M. Obesidade na infância e adolescência. In: Fisberg M (ed.). **Obesidade na infância e adolescência**. São Paulo: Fundação BYK, p. 9-13, 1995

FORD ES, GILES WH, DIETZ WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. **JAMA**. v.16; p.287, 2002.

FRASER CL, ARIEFF AI. Nervous system complications of uremia. **Ann Intern Med**. v.109, p.143, 1988.

FYHRQUIST, F.; SAIJORUNAA, O. Renin-angiotensin system revisited. **J. Intern. Med**. v. 264, p. 224, 2008.

GIOVANNI DE PERGOLA, FRANCO SILVESTRIS. Obesity as a Major Risk Factor for Cancer. **Journal of Obesity**. v.2, p.546, 2013.

GLUCKMAN PD, HANSON MA, PINAL C. The developmental origins of adult disease. **Matern Child Nutr**. v.1, p. 130, 2005.

GOODMAN E, DOLAN LM, MORRISON JA & DANIELS SR. Factor Analysis Of Clustered Cardiovascular Risks In Adolescence: Obesity Is The Predominant Correlate Of Risk Among Youth. **Circulation** v.111, p.1970, 2005.

ISAAC E. HALL, RONIK S. BHANGOO; PETER P. REESE ;MONA D. DOSHI; FRANCIS L. WENG; KWANGIK HONG; HAIQUN LIN; GANG HAN ;RICK D. HASZ; MICHAEL J. GOLDSTEIN; BERND SCHRÖPPEL; CHIRAG R. PARIKH.HALL IE, BHANGOO RS, REESE PP. Glutathione S-Transferase Iso-Enzymes in Perfusate From Pumped Kidneys Are Associated With Delayed Graft Function. **American Society of Transplant Surgeons**. v.14, p.886, 2014.

KAUNG HL. Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. **Dev Dyn**. v.2, p.163, 1994

KUMAR SHARMA. Obesity, oxidative stress, and fibrosis in chronic kidney disease. **Kidney International Supplements**. v.4, p.113, 2014

LIU Y, FISKUM G, SCHUBERT D.Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. **J. Neurochem**. v.80, p.780, 2002.

MARIA LUCIA DELL'ANNA, MONICA OTTAVIANI, VERONICA ALBANESI, ANDREA PARO VIDOLIN, GIOVANNI LEONE, CARMELA FERRARO, ANDREA COSSARIZZA, LUISA ROSSI, MAURO PICARDO. Membrane lipid alterations as a possible basis for melanocyte degeneration in vitiligo. **J Invest Dermatol**. v.127, p.1226, 2007.

MCMAHONA, JAY L. KOYNERB; PATRICK T. MURRAYA. Urinary glutathione S-transferases in the pathogenesis and diagnostic evaluation of acute kidney injury following cardiac surgery: a critical review Blaithin A.. Published in final edited form as: **Curr Opin Crit Care**. v.16, p. 550, 2010.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The Role Of Superoxide Anion In The Autoxidation Of Epinephrine And A Simple Assay For Superoxide Dismutase. **J Biol Chem**. v. 247, p. 3170, 1972.

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.

MORGANE, P. J., AUSTIN-LAFRANCE,R. Prenatal Malnutrition And Development Of The Brain. **Neurosci Biobehav**, v.17, p.91, 1993.

MORRISON JA, FRIEDMAN LA, WANG P, GLUECK CJ. Metabolic syndrome in childhood predicts adult metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus 25 to 30 years later. **J Pediatr**. v.6 , p.152, 2008.

OZANNE S.E., JENSEN C.B., TINGEY K.J., STORGAARD H., MADSBAD S., VAAG A.A. Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression. **Diabetologia**. v. 48, p. 547, 2005.

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

PLAGEMANN, A.; HARDER, T.; Perinatal Elevation Of Hypothalamic Insulin, Acquired Malformation Of Hypothalamic Galaninergic Neurons, And Syndrome X-

Like Alterations In Adulthood Of Neonatally Overfed Rats. **Brain Res.** v. 836: p.146, 1999.

RABI YACOUB; KIRK N CAMPBELL , Inhibition of RAS in diabetic nephropathy. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease.** v. 8, p. 29, 2015

RODRIGUEZ MM, GOMEZ AH, ABITBOL CL, CHANDAR JJ, DUARA S, ZILLERUELO GE. Histomorphometric analysis of postnatal glomerulogenesis in extremely preterm infants. **Pediatr Dev Pathol.** v. 7, p.17, 2004.

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V.M.; DOWD, C.A. Structure, function and evolution of glutathione transferase: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily, **Biochemical Journal**, v. 360, p.1, 2001.

SINGHAL A, COLE TJ, FEWTRELL M, DEANFIELD J, LUCAS A. Is Slower Early Growth Beneficial For Long- Term Cardiovascular Health? **Circulation.** v.109, p.1108, 2004.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J.C.B.; LIMA, J.C.C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **J Bras Patol Med Lab.** v.43, p.329, 2007.

STETTTLER N, STALLINGS V.A, TROXEL A.B, ZHAO J, SCHINNAR R, NELSON S.E, ZIEGLER E.E, STROM B.L. Weight gain in the first week of life and overweight in adulthood: a cohort study of European American subjects fed infant formula. **Circulation.** v.111, p.1897, 2008.

UNGER, R. H.; **Annual Review of Medicine.** v. 53. p. 319, 2002.

VANESSA SÁ LEAL, PEDRO ISRAEL CABRAL DE LIRA, JULIANA SOUZA OLIVEIRA, RISIA C. E. DE MENEZES, LEOPOLDINA AUGUSTA DE SOUZA SEQUEIRA, MANOEL ALEXANDRE DE ARRUDA NETO, SONIA LÚCIA LUCENA SOUSA DE ANDRADE, MALAQUIAS BATISTA FILHO. Excesso de peso em crianças e adolescentes no Estado de Pernambuco, Brasil: prevalência e determinantes. **Cad. Saúde Pública.** v.28, p.1175, 2012.

WAHBA I.M, MAK R.H. Obesity and obesity-initiated metabolic syndrome: mechanistic links to chronic kidney disease. **Clin J Am Soc Nephrol.** v. 2, v.550, 2007.

WALLISON JUNIO MARTINS DA SILVA, CARLOS KUSANO BUCALÉN FERRARI. Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento. **Rev. B Ras. Geriatr. Gerontol.** v. 14, p. 441, 2011.

Wei Ding, Wai W Cheung, Robert H Mak. Impact of obesity on kidney function and blood pressure in children. **World J Nephrol.** v.4(2): p.223, 2015.

WHALEY-CONNELL. A; SOWERS J.R. Oxidative stress in the cardiorenal metabolic syndrome. **Curr Hypertens Rep.** v.14, p. 360, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2000. Obesity e overweight. Disponível em
<http://search.who.int/search?q=OBESITY&ie=utf8&site=who&client=_en_r&proxystylesheet=_en_r&output=xml_no_dtd&oe=utf8&getfields=doctype> 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2015 Obesity and overweight. Disponível

em < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> > 2015.

Yukie Matsuyama, Hiroyuki Terawaki, Tomoyoshi Terada, Seiichi Era. Albumin thiol oxidation and serum protein carbonyl formation are progressively enhanced with advancing stages of chronic kidney disease. **Clinical and Experimental Nephrology**. v. 13, p. 308, 2009

YIM H.E, HA K.S, BAE I.S, YOO K.H, HONG Y.S, LEE J.W. Postnatal early overnutrition dysregulates the intrarenal renin-angiotensin system and extracellular matrix-linked molecules in juvenile male rats. **J.Nutr. Biochem**. v.23, p. 937, 2012.