



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA

CURSO DE BACHARELADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

AVALIAÇÃO DO EQUILÍBRIO OXIDATIVO NO
TECIDO CARDÍACO DE RATOS MACHOS
SUBMETIDOS À SUPERNUTRIÇÃO.

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
CURSO DE BACHARELADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

**AVALIAÇÃO DO EQUILÍBRIO OXIDATIVO NO
TECIDO CARDÍACO DE RATOS MACHOS
SUBMETIDOS À SUPERNUTRIÇÃO.**

Projeto apresentado ao Curso de Bacharelado em Educação Física como requisito parcial para a elaboração do Trabalho de Conclusão do Curso de Bacharel em Educação Física.

Autor: Maria Vitória Interaminense
Barbosa

Orientador: Prof^a. Dr^a. Claudia Jacques
Lagranha

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
2015

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB4-2018

B238a Barbosa, Maria Vitória Interaminense.

Avaliação do equilíbrio oxidativo no tecido cardíaco de ratos machos submetidos à supernutrição / Maria Vitória Interaminense Barbosa. Vitória de Santo Antão: O Autor, 2015.

33f.; il.

Orientadora: Cláudia Jacques Lagranha.
TCC (Graduação) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV. Bacharelado em Educação Física, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Hipernutrição. 2. Estresse oxidativo - Ratos. 3. Fármacos Cardiovasculares.
I. Lagranha, Cláudia Jacques (Orientador). II. Título.

615.71 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-077/2015

MARIA VITÓRIA INTERAMINENSE BARBOSA

AVALIAÇÃO DO EQUILÍBRIO OXIDATIVO NO TECIDO CARDÍACO DE RATOS MACHOS SUBMETIDOS À SUPERNUTRIÇÃO.

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 graduação em Bacharel em Educação Física.

Aprovado em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Mariana Fernandes Pinheiro (Co-orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

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

Prof^a. Ms. Diorginis José Soares Ferreira (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

*À minha família, por sempre se
fazer presente em todos os
momentos e pela confiança
depositada em mim.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que concedeu que tudo isso acontecesse em minha vida, por ter me dado forças durante esses quatro anos e por todas minhas realizações e mais esta conquista dentro na universidade.

À minha professora orientadora, Claudia Jacques Lagranha pela oportunidade de trabalhar com ela por um longo tempo, pelo auxílio, disponibilidade de tempo, por todo aprendizado, por toda compreensão e paciência diante das minhas limitações. Agradeço também a minha co-orientadora Marina Fernandes Pinheiro pelo apoio no trabalho.

À todos os queridos amigos do LABBEX que contribuíram com a construção do meu trabalho, obrigada também pela amizade, pelo agradável convívio, pelos conhecimentos adquiridos nas reuniões de grupo, e também pelos divertidos momentos de lazer.

Agradeço a todos os professores por me proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender.

Agradeço aos meus pais Tânia e Manoel pelo amor, apoio incondicional pelo incentivo nas horas mais difíceis, de desânimo e cansaço.

Aos meus irmãos Natália, Emanoele e Matheus, que sempre me apoiaram na escolha do meu curso e pelo incentivo diário e apoio em minhas decisões durante minha graduação.

Meus agradecimentos aos amigos Anderson, Rudá e D'arc companheiros de trabalhos e irmãos na amizade, que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza. Para sempre seremos a bicamada lipídica, independente da distância ou do rumo que nossas vidas iram tomar. Vocês estarão pra sempre em meu coração e em minha memória.

À todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, e contribuíram para que a conclusão desse trabalho se tornasse possível o meu muito obrigada.

*“O entusiasmo é a maior força da alma.
Conserva-o e nunca te faltará poder para
consequires o que desejas.”*

Napoleão Bonaparte

RESUMO

Introdução: Estudos sugerem que a supernutrição pós-natal em ratos ocasiona excesso de peso induzindo a obesidade. A supernutrição pode ocasionar as alterações metabólicas desencadeando assim as doenças crônico-degenerativas tais como hipertensão, diabetes entre outras. O coração é um dos órgãos que pode ser afetado pela supernutrição devido a indução de estresse oxidativo. Entretanto, ainda são poucos os estudos que avaliam o efeito da supernutrição no balanço oxidativo cardíaco. **Objetivo:** Avaliar o balanço oxidativo no tecido cardíaco aos 30 dias de vida de ratos que sofreram supernutrição no período crítico de desenvolvimento (lactação). **Metodologia:** Para tentar responder nosso objetivo foram utilizados dos ratos machos da raça Wistar distribuídos randomizadamente de acordo com as mães. Para induzir a supernutrição (Grupo supernutrido – GS) a prole foi reduzida para 3 filhotes por gaiola, e o grupo controle (GC) foi mantido com nove filhotes por mãe três dias depois do nascimento de acordo com estudos prévios (PLAGEMANN *et al.*, 2009). Aos trinta dias de vida o tecido cardíaco foi coletado para as análises bioquímicas da peroxidação lipídica pelo método da quantificação do malondialdeído (MDA), quantificação da atividade das enzimas antioxidantes Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione-S-transferase (GST) e as concentrações de Glutathione reduzida (GSH). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM), e analisados pelo teste *t-student*, com significância de 5%. **Resultados:** A supernutrição no período pós-natal induziu alteração no balanço oxidativo dos ratos machos. Houve um aumento significativo nos níveis de MDA do GS em relação ao GC (S=12.55 \pm 1.57; C=9.88 \pm 0.82 nmol/mg proteína; P= 0.021). Em relação às enzimas antioxidantes, houve uma diminuição significativa na atividade da SOD no (GS) (S=47.10 \pm 6.08; C=84.99 \pm 12.62 U/mg proteína; P=0.022). Já a CAT não apresentou diferença significativa entre os grupos (S=3.86 \pm 0.69; C=4.33 \pm 0.67 U/mg proteína; P= 0.634). Em relação a GST houve uma diminuição significativa no GS (S=5.40 \pm 1.30; C=15.45 \pm 3.81 U/mg proteína; P=0.036). Em relação a GSH houve uma tendência a redução no (GS) (S=0.07 \pm 0.008; C=0.11 \pm 0.02 uM/mg proteína; P=0.067). **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que a supernutrição no período crítico do desenvolvimento altera o balanço oxidativo cardíaco por modular negativamente as atividades antioxidantes no tecido cardíaco de ratos machos, aumentando assim o risco para o surgimento de doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: Supernutrição. Estresse oxidativo. Coração.

ABSTRACT

Introduction: Studies have suggested that a post-natal overnutrition in rats induces overweight leading to an early obesity. The overnutrition triggers metabolic changes that are related to chronic degenerative diseases such as hypertension and diabetes. The heart is one of the tissues affected by overnutrition and the damage might be induced by oxidative stress. However, there are few studies that evaluate the effects of overnutrition in oxidative balance on heart. **Aim:** Evaluate the oxidative balance in the cardiac tissue at 30 days of age in rats that were submitted to overnutrition during the lactation period. For this, we analyze level of malondialdehyde (MDA), antioxidant enzymes activities: Superoxide dismutase-SOD, Catalase-CAT, Glutathione-S-transferase-GST and the levels of reduced glutathione-GSH. **Methodology:** Male *Wistar* rats were randomly distributed. To induce the overnutrition (OG), the litter was reduced to 3 pups per dam, whereas in control group (CG) the litter remained with 9 pups per cage according to (PLAGEMANN *et al.*, 2009). At 30 days of age the heart was collected for the biochemical analyzes. The data were expressed by mean \pm standard error of mean (SEM) and analyzed by *t-student* test with significance level of 5%. **Results:** The overnutrition induced alterations in the oxidative balance in heart. There was a significant increase in MDA levels in OG comparing to CG (OG=12.55 \pm 1.57; CG=9.88 \pm 0.82 nmol/mg of protein; P= 0.021). In addition we observe a significant decrease in SOD (OG=47.10 \pm 6.08; CG=84.99 \pm 12.62 U/mg of protein; P=0.022) and GST (OG=5.40 \pm 1.30; CG=15.45 \pm 3.81 U/mg of protein; P=0.036) activities in the OG. The CAT activity and GSH levels were not changed in OG. **Conclusion:** Our results suggest that overnutrition alters the oxidative balance by reducing the antioxidant enzymes activities in the heart of male rats and thus increasing the risk to develop cardiovascular diseases.

Keywords: Overnutrition. Oxidative stress. Heart.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
3. OBJETIVOS	15
3.1 OBJETIVO GERAL	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	16
4.2 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO	16
4.3 PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO PARA ANÁLISE BIOQUÍMICA	16
4.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS DOSAGEM DE PROTEÍNA	17
5. RESULTADOS	20
6. DISCUSSÃO	25
7. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29
ANEXO A	33

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Este trabalho foi realizado com o intuito de avaliar o efeito da supernutrição no tecido cardíaco de ratos machos no período crítico do desenvolvimento (lactação). Este trabalho teve como objetivo avaliar os níveis de lipoperoxidação lipídica, a atividade das enzimas antioxidantes e os níveis da glutatona reduzida. Para justificar a proposta desse trabalho será apresentada uma introdução sobre a temática e posteriormente os procedimentos envolvidos nas análises, assim como os resultados encontrados. Estudos evidenciam que o efeito da supernutrição pós-natal em ratos ocasiona excesso de peso induzindo por sua vez uma obesidade precoce. Evidências clínicas e experimentais sugerem que o ambiente durante a infância tem um papel importante no surgimento de distúrbios metabólicos, hormonais e cardiovasculares a longo prazo (WATERLAND; GARZA, 1999; ANDERSON; COHEN; NAUMOVA, 2006). Alguns autores sugerem que durante este período uma redução ou excesso de nutrientes definitivamente altera a modulação dos mecanismos hormonais relacionados com o metabolismo. Especificamente, para o coração, o início da vida é altamente sensível a mudanças na qualidade nutricional (TREVENZOLI *et al.*, 2007; LAUSTSEN *et al.*, 2007). A obesidade é caracterizada pelo aumento no peso corporal que resulta em um acúmulo de gordura excessiva (SIKARIS, 2004) e tem sido conhecido como um importante fator subjacente na patogênese de diversas doenças (ALBERTI; ZIMMET, 1998). Obesidade e excesso de peso estão associados com o aumento do estresse oxidativo, não só na corrente sanguínea, mas também no tecido do miocárdio (LAIGHT; VICENT, 1999).

O excesso de peso coloca os indivíduos em risco elevado de doença cardiovascular, hipertensão, resistência à insulina e hiperinsulinemia (WATERLAND; GARZA, 1999). Uma das prioridades atuais da Organização Mundial de Saúde (OMS) refere-se ao combate às doenças crônico-degenerativas entre elas a obesidade. A OMS inclui como estratégias para combater tais doenças uma alimentação adequada e mudanças do estilo de

vida priorizadas desde a infância. Assim os dados do presente estudo poderão auxiliar a responder questões a respeito da supernutrição associadas ao equilíbrio oxidativo e a possível relação com o aparecimento e/ou progressão das doenças cardíacas. Além de fortalecer subsídios em relação à base metabólica das doenças prevalentes da vida adulta, relacionadas ao binômio inadequação nutricional/doenças não comunicáveis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

PLASTICIDADE FENOTÍPICA

O crescimento e o desenvolvimento do indivíduo são marcados por períodos de rápida proliferação e diferenciação celular (tal como gestação, lactação e primeira infância) (WINICK, 1972). Esses períodos estão mais críticos para o desenvolvimento uma vez que órgãos e sistemas são vulneráveis às alterações ambientais (WINICK, 1972; DOBBING, 1964). Uma possível explicação para a relação entre agressões sofridas nos períodos críticos e as repercussões tardias sobre os sistemas fisiológicos é proposta pela plasticidade fenotípica, que corresponde à capacidade de o indivíduo modificar o fenótipo de acordo com alterações ambientais (GLUCKMAN *et al.*, 2015).

OBESIDADE E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

A obesidade é caracterizada pela expansão do tecido adiposo com consequências significativas devido à perturbação de um complexo sistema de regulação energética (LENZ; DIAMOND JR., 2008). A prevalência de obesidade em crianças está aumentando em todo o mundo. Em 2003, o Internacional Obesity Task Force relatou que em todo o mundo 1 em cada 10 crianças, com idades entre 5 e 17 anos, está acima do peso ou obeso (IOTF, 2003). A supernutrição ocasiona as alterações metabólicas desencadeando assim doenças crônico-degenerativas tais como hipertensão, sendo o coração um dos órgãos mais afetado pela supernutrição (TREVENZOLI *et al.*, 2007; LAUSTSEN *et al.*, 2007).

A obesidade é um dos fatores de risco mais importantes para o aparecimento de doença cardíaca entretanto os mecanismos celulares envolvidos na patogênese da cardiopatia induzida pela obesidade são complexos e envolvem a interação de inúmeros processos e tipos celulares, incluindo os cardiomiócitos em ratos Wistar, a supernutrição pós-natal pode

induzir a hipertrofia cardíaca ao desmame, com um aumento significativo na espessura da parede ventricular, redução do diâmetro ventricular esquerdo, o alargamento da área de cardiomiócitos, e uma diminuição na densidade de vasos coronários (MOREIRA, *et al.*, 2009). Recentemente, observou-se que a supernutrição pós-natal levou a modificações de parâmetros cardiovasculares basais em ratos adultos. Estes incluíram um aumento dos diâmetros ventriculares e fração de ejeção ventricular esquerda (HABBOUT, *et al.*, 2013). Até o momento, nenhuma destas modificações foi relatada em ratos jovens com excesso de peso.

OBESIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaís (CLARKSON; THOMPSON, 2000). Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, seja capaz de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz. Tais substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres (ou espécies reativas de oxigênio-EROS) e espécies não-radicaís, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). As EROs estão envolvidas em várias funções fisiológicas e tem seus níveis regulados por elementos antioxidantes, dos quais destacam-se os enzimáticos. A diminuição destes e consequente aumento nos níveis de EROs esta diretamente relacionado com diversas patologias, inclusive as cardiovasculares(FERREIRA. 2013). Essas enzimas antioxidantes agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-

radicais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Quando a produção de radicais livres e/ou espécies reativas supera a capacidade de ação dos antioxidantes, se favorece a oxidação de biomoléculas, gerando metabólitos específicos, os marcadores do estresse oxidativo, que podem ser identificados e quantificados. (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Um desses marcadores é o malondealdeído (MDA). Entre os produtos da oxidação de lipídeos, o mais abundante, é o MDA, resultado da oxidação dos ácidos graxos AA, EPA e DHA (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Segundo Fridovich, (1989). Citado por Ferreira, (2013, p. 54) “A primeira forma enzimática de combate a produção de EROs acontece por meio da dismutação do íon superóxido, o qual é catalisada por uma família de enzimas metabólicas chamadas de superóxido dismutase (SOD). A SOD é classificada de acordo com os tipos de cofatores metálicos presentes em seu sítio ativo, os quais atuam alternadamente como agentes redutores e oxidantes para formar $H_2O_2 + O_2$. E outra forma enzimática é a enzima catalase, que tem como função catalisar a reação de formação de O_2 e H_2O a partir de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), através de duas reações entre o peróxido de hidrogênio com o ferro heme, o qual é constituído por um anel orgânico com um átomo de ferro no seu centro catalítico e capaz de realizar ligações com o oxigênio.” Segundo Circu, (2008). Citado por Ferreira. (2013, p. 55). “Em adição as enzimas supra mencionadas, tem o sistema das glutationas. O sistema das glutationas detoxificam agentes tóxicos provenientes do estresse oxidativo ou de fatores exógenos tóxicos”. A glutathione-S-transferase (GST) faz parte dos sistema das glutationas, estando envolvida no metabolismo de xenobióticos, sua principal função metabólica é proteger a célula contra agentes tóxicos tanto endógenos quanto exógenos (LABORDE, 2010; RAZA, 2011). Segundo Da Costa, (2012); Josephy, (2010). Citado por Ferreira, (2013, p. 56) “Diferente de outras enzimas que possuem uma única via de atuação, a GST é capaz de metabolizar diferentes substratos através de reações com a GSH, inibindo / minimizando o dano destas espécies a componentes celulares como proteínas e ácidos nucleicos”. Segundo Appenzeller-herzog, (2011); Circu, (2008).

Citado por Ferreira, (2013, p. 56) “Entre as proteínas não enzimáticas do sistema das glutathionas, a glutathiona reduzida (GSH) é a mais importante, a GSH é um tripeptídeo intracelular de baixo peso molecular sintetizado no citosol e encontrado abundantemente na maioria das células. Por ser um composto redox ativo, desenvolve importante papel nas atividades fisiológicas para a manutenção do equilíbrio intracelular”.

Segundo Ceretta, (2012); Mansego, (2011). Citado por Ferreira,(2013, p. 56) “O estresse oxidativo vem sendo implicado em diversas fisiopatologias tais como obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e inúmeras desordens neurológicas. Contudo, o acometimento deste quadro difere entre os sistemas e tecidos, onde alguns apresentam maior susceptibilidade a este tipo de dano”.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o balanço oxidativo no tecido cardíaco aos 30 dias de vida de animais que sofreram supernutrição no período crítico de desenvolvimento (lactação).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar no coração de ratos jovens (30 dias), Controles e Supernutridos no período da lactação:

- Os níveis de peroxidação lipídica (MDA);
- A atividade antioxidante da superóxido dismutase. (SOD);
- A atividade antioxidante da catalase (CAT);
- A atividade antioxidante da glutathione-S-transferase (GST);
- Os níveis de glutathione reduzida (GSH).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

O presente estudo conta com a utilização de quatro ratas fêmeas virgens da linhagem wistar e dois ratos machos da raça wistar. Foram abrigadas em biotério sob condições padrão de temperatura, iluminação e umidade com água e comida (dieta Labina – Purina S/A) *ad libitum* (VAN ZUTPHEN, 1993). O período de acasalamento durou uma semana onde no acasalamento foram duas ratas para cada macho. Após o período pós-natal os ratos foram distribuídos de forma 3 filhotes/mãe para obtenção do grupo supernutrido. Para o grupo controle foram mantidos 9 filhotes/mãe (PLAGEMANN *et al.*, 2009). Os animais foram desmamados aos 21 dias e após passaram a receber dieta LABINA até os 30 dias de vida, onde foram sacrificados.

4.2 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Aos 30 dias de vida os animais foram sacrificados por decapitação na guilhotina, e passaram por uma cirurgia para a retirada do tecido cardíaco para as análises bioquímicas.

4.3 PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO PARA ANÁLISE BIOQUÍMICA

O coração foi homogeneizado em tampão de extração (Tris base 100 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM; contendo um coquetel de inibidores de protease). Para quantificação protéica e avaliação da atividade enzimática as amostras foram centrifugadas a 1.000 rpm, a 4° C, por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado.

4.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS 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 foi considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de albumina de soro bovino a 1% foi utilizada como padrão.

MEDIDA DA SUBSTÂNCIA REATIVA AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Para a dosagem de TBARS será utilizada a técnica colorimétrica de Buege e Aust (1978) para avaliar a lipoperoxidação. Colocou-se uma alíquota do homogenizado, de ácido tricloroacético a 10% e de ácido tiobarbitúrico que reage com os produtos da lipoperoxidação para formar 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 5000 rpm por 10 minutos, sendo então a fase com o n-butanol utilizada para a leitura da absorbância a 535nm, utilizando cubetas de quartzo. Os resultados foram expressos em nmoles de TBARS por mg de proteína.

ATIVIDADE ENZIMÁTICA: *SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)*

A atividade da SOD foi avaliada através do método de auto-oxidação da adrenalina, podendo ser medido em espectrofotômetro a 480nm. Em uma cubeta de quartzo de 1mL, adicionou-se tampão fosfato, amostra e adrenalina. A absorbância foi registrada por um período de aproximadamente 3 minutos. Os resultados foram expressos em Unidades por mg proteína (MISRA; FRIDOVICH, 1972).

ATIVIDADE ENZIMÁTICA: *CATALASE*

A atividade da catalase foi medida através da avaliação do consumo de peróxido de hidrogênio pelo decréscimo na absorção a 240 nm ([] máx do H₂O₂) de um meio de reação, contendo tampão fosfato (pH=7,4) e H₂O₂. Os resultados foram expressos em pmol Catalase por minuto por mg de proteína (AEBI, 1989).

ATIVIDADE ENZIMÁTICA: *GLUTATIONA-S-TRANSFERASE*

A GST foi quantificada pela reação onde a própria se combina com o produto tóxico CDNB e com a GSH para que a bomba de glutatona jogue para fora da célula esse composto tóxico, quantificando a atividade da enzima. Uma unidade é a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol de DNP-SG por minuto a 30 °C, usando 1mM de concentração de GSH e CDNB (HAGIB, 1974).

NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA

Fazer uma curva de GSH com concentrações que variam de 0,01–0,1 μmol de GSH. Fazer com no mínimo 5 pontos para Cada 50 μl de sobrenadante da amostra e adicionado 450 μl de tampão fosfato + EDTA Formando um mix. Na mistura final 200 μl contendo: 180 μl de tampão fosfato EDTA mais 10 μl do sobrenadante da amostra mais 10 μl de OPT. Após misturada a solução e incubada por 15 minutos exatamente em temperatura ambiente já na placa de wells. Depois dos 15 minutos, foi realizada a leitura no fluorímetro. A intensidade de fluorescência foi mensurada com 350 nm de excitação e 420 nm de emissão (HISSIN, 1976).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), e analisados pelo teste *t-student* não pareado. foi adotado um nível de significância de 5%. A construção do banco de dados e as análises estatísticas

foram desenvolvidas no programa Excel (versão 2007, Microsoft, USA) e Graphpad Prisma 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), respectivamente.

5. RESULTADOS

Ao analisar a peroxidação lipídica no coração, notamos um aumento significativo na formação de MDA no grupo supernutrido em comparação ao grupo controle (C=6,880±0,8216; S=12,55±1,574 nmols/mg prot, p=0,0217)(figura 1).

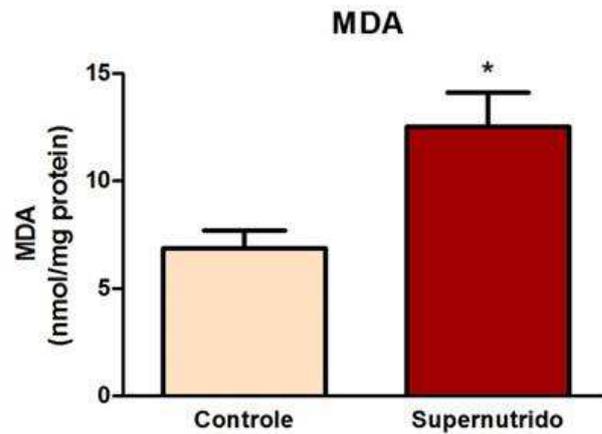


Figura 1. Níveis de peroxidação lipídica pelo indicador malondealdeído-MDA, em nmol/mg proteína, no coração de ratos controle e supernutridos durante o período crítico de desenvolvimento. Dados apresentados em média ± erro padrão da média. *p<0,05 (n=9). Analisados pelo Teste *t student* não pareado.

Em relação as defesas antioxidantes, verificamos que no coração dos supernutridos, ocorreu uma diminuição significativa na atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD), quando comparado ao grupo controle (C=84,99±12,62; S=47,10±0,10 U/mg prot, p=0,0229) (Figura 2).

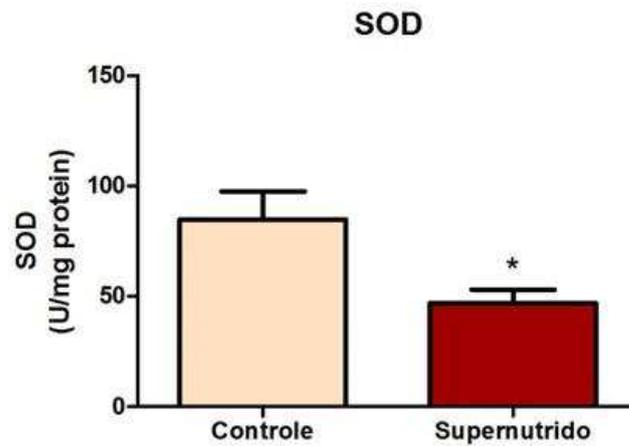


Figura 2. Atividade da superóxido dismutase-SOD, em U/mg proteína, no coração de ratos controle e supernutridos durante o período crítico de desenvolvimento. Dados apresentados em média ± erro padrão da média. *p<0,05 (n=9). Analisados pelo Teste *t student* não pareado.

Já no que se refere à atividade da enzima catalase (CAT) observamos que a supernutrição não altera a atividade no grupo supernutrido, quando comparado ao grupo controle. (C=4,337±0,6738; S= 3,860±0,6996U/mg proteína, P=0,6342)(Figura3).

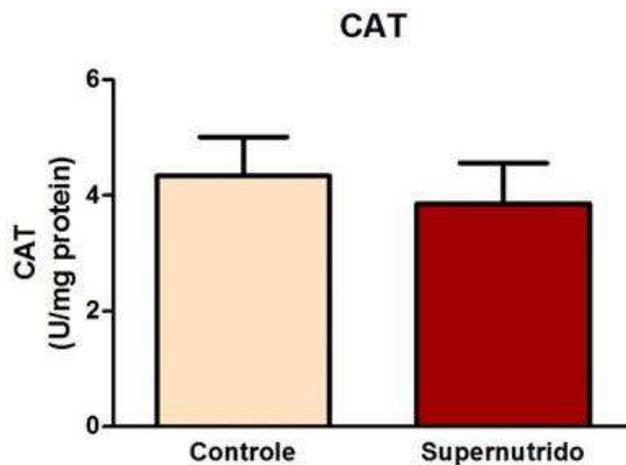


Figura 3. Atividade da catalase-CAT, em U/mg proteína, no coração de ratos controle e supernutridos durante o período crítico de desenvolvimento. Dados apresentados em média ± erro padrão da média. P= 0.6342 (n=9). Analisados pelo Teste *t student* não pareado.

Mas ao avaliarmos uma enzima do sistema das glutathionas, observamos que a atividade da GST apresentou uma redução significativa no grupo supernutrido quando comparado com o controle ($C=15,45\pm 3,810$; $S=5,400\pm 1,306$ U/mg prot, $P=0,0364$) (Figura 4).

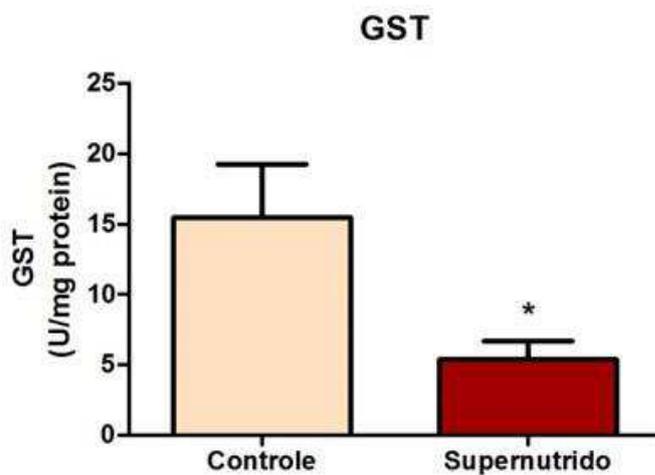


Figura 4. Atividade da glutathione-S-transferase-GST, em U/mg proteína, no coração de ratos controle e supernutridos durante o período crítico de desenvolvimento. Dados apresentados em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ ($n=9$). Analisados pelo Teste *t student* não pareado.

Após a avaliação de algumas defesas enzimáticas avaliamos a principal defesa não enzimática. Nossos dados mostraram que em relação aos níveis de glutathiona reduzida a supernutrição promove uma tendência a diminuição no grupo supernutrido quando comparado ao controle. (C= $0,108 \pm 0,01777$; $0,080 \pm 0,00809$ P=0,0672) (Figura 5).

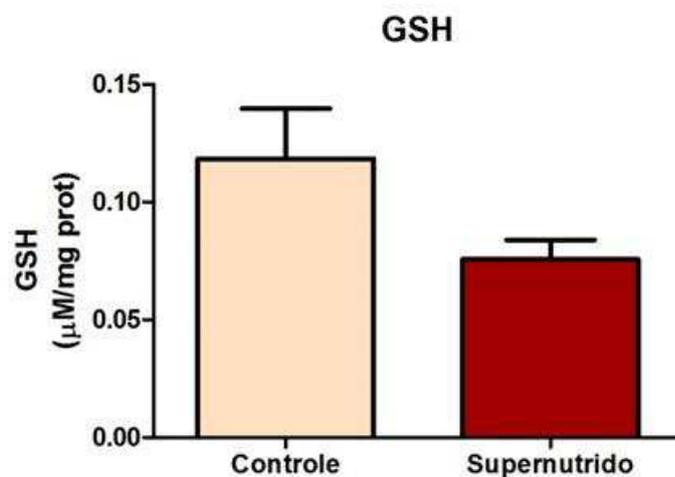


Figura 5. Níveis de glutathiona reduzida-GSH, em $\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína, no coração de ratos controle e supernutridos durante o período crítico de desenvolvimento. Dados apresentados em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ (n=9). Analisados pelo Teste *t student* não pareado.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliado o efeito da supernutrição no período no período crítico de desenvolvimento no tecido cardíaco de ratos machos de 30 dias da linhagem *wistar*.

Atualmente a obesidade e as doenças crônicas não transmissíveis representam um grave problema de saúde pública atingindo milhões de pessoas no mundo. No Brasil, o excesso de peso acomete cerca de 50% da população adulta e essas doenças foram as principais responsáveis pelas mortes por causa conhecida registradas em 2009 (REIS *et al.*, 2011). Costa *et al.* (2011) destacam que a obesidade pode ser considerada como fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e a incidência tem sido relacionada com vários fatores de risco, incluindo presença de dislipidemia aterogênica, intolerância à glicose, hipertensão arterial e obesidade visceral.

Evidências clínicas e experimentais sugerem que o ambiente durante a infância tem um papel importante no surgimento de distúrbios metabólicos, hormonais e cardiovasculares a longo prazo (WATERLAND; GARZA, 1999; ANDERSON; COHEN; NAUMOVA, 2006). 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). Para a avaliação do estresse oxidativo, um método frequentemente utilizado é a medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) onde se avalia os níveis de malondealdeído (LEITE; SARNI, 2003). No presente estudo, observou-se que a supernutrição no período crítico de desenvolvimento foi capaz de aumentar os níveis de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica constitui uma reação em cadeia dos ácidos gordos polinsaturados das membranas celulares, gerando radicais livres que alteram a permeabilidade, fluidez e integridade da membrana (MAHATTANATAWEE, 2006; STAHL, 2001). Esses danos celulares, que se encontram aumentados nos indivíduos obesos, predispõem às co-morbidades como hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, eventos tromboembólicos, diabetes mellitus, além de neoplasias (FERREIRA, 2007; ALVES, 2011).

Apesar do aumento da lipoperoxidação, não podemos ainda afirmar que a supernutrição induz estresse oxidativo, pois como relatado anteriormente o estresse oxidativo tem que tanto ter o aumento na ação pro-oxidante, como também apresentar uma redução na defesa antioxidante. Entre as enzimas antioxidantes, avaliamos a SOD, CAT e GST. No que se refere a atividade da SOD, observamos uma diminuição significativa na atividade da SOD, a qual atua como agente redutor e oxidante para formar $H_2O_2 + O_2$ (FLOHÉ; OTTING, 1984). Ou seja menor atividade da SOD maior acúmulo de íon superóxido podendo favorecer assim a formação de outras espécies reativas que poderia induzir o estresse oxidativo

Na sequência de reações e enzimas antioxidante, avaliamos a atividade enzimática da catalase, a qual não teve alteração nos animais supernutridos, quando comparados aos controles. Possivelmente, essa não alteração da atividade da catalase seja devido a redução da atividade da SOD nos supernutridos quando comparados ao grupo controle. Já que a catalase, como a linha de defesa contra as EROs, tem como substrato o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que a SOD forma na reação de dismutação do íon superóxido (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Ou seja, baixa SOD menor formação de H_2O_2 que é o substrato da enzima catalase.

Com os dados da atividade da CAT ainda não podemos inferir um efeito específico da supernutrição, por isso avaliamos a atividade enzimática da GST que tem como principal função metabólica proteger a célula contra agentes tóxicos tanto endógenos quanto exógenos (LABORDE, 2010; RAZA, 2011). Nossos dados, mostraram que em animais supernutridos a atividade dessa enzima tem uma redução significativa. Portanto, com sua atividade diminuída, podemos sugerir que a supernutrição promove uma redução da proteção celular contra agentes tóxicos, potencializando assim os danos aos componentes celulares como proteínas e ácidos nucleicos (ARMSTRONG, 1997; SHEEHAN *et al.*, 2001).

Em relação a avaliação da GSH a principal defesa não enzimática, verificamos que a supernutrição levou a uma tendência a diminuição no grupo

supernutrido quando comparado ao controle nos níveis desse importante antioxidante. A GSH é o único tiol não protéico presente em espécies aeróbias e seu papel intracelular inclui a desintoxicação de xenobióticos e de EROs. A manutenção de elevados níveis de GSH é essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular, pois, baixas concentrações de GSH estão associadas a estresse oxidativo (SCHAFER, 2001).

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a supernutrição no período crítico do desenvolvimento altera o balanço oxidativo no tecido cardíaco de ratos jovens por diminuir a atividade de enzimas antioxidantes. Além disso, também levando a dano tecidual, como observado nos altos níveis de MDA. aumentando assim o risco para o surgimento de doenças cardiovasculares associadas ao estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 121-6, 1984.
- ALBERTI, K.G.; ZIMMET, P.Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabet.Med.**, v. 15, n. 7, p. 539-53, 1998.
- ALVES, M. R. M. *et al.* Avaliação do estresse oxidativo em indivíduos obesos no pré-operatório de cirurgia bariátrica. **Arq. Bras. Cir. Dig.**, v. 24, Suppl 1, p. 9, 2011.
- ANDERSON, S.E.; COHEN, P.; NAUMOVA E.N.; MUST A. Relationship of childhood behavior disorders to weight gain from childhood into adulthood. **Ambul.Pediatr.**, v. 6, n. 5, p. 297-301, 2006.
- ARMSTRONG, R. N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione S-transferase. **Chemical Research in Toxicology**, v. 10, n. 1, p. 2-18, 1997.
- BEAU, I.; MEHRPORM, M; CODOGNO P. Autophagosomes and human diseases. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 43, p. 460-64, 2011.
- BOULLU-CIOCCA, S. *et al.* Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood its relationship with the metabolic syndrome. **Diabetes**, v. 54, n. 1, p. 197-203, 2005.
- 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. 248-54, 1976.
- BUCHANAN, J. *et al.* Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. **Endocrinology**, v. 146, n. 12, p. 5341-49, 2005
- BUEGE, J.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 52, p. 302-10, 1978.
- CIRCU, M. L., AW, T. Y. Glutathione and apoptosis. **Free Radic. Res.**, v. 42, n. 8, p. 689-706, 2008.
- COSTA, M. P. *et al.* Prevalência de sedentarismo, obesidade de risco de doenças cardiovasculares em frequentadores do CEA FIR. Ver. Colloq., v. 3, n. 1, p. 22-6, 2011.

DOBBING J. The influence of early nutrition on the development and myelination of the brain. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** v. 159, n.18, p. 503-9, 1964.

FANG, Y. H. *et al.* Therapeutic inhibition of fatty acid oxidation in right ventricular hypertrophy: exploiting Randle's cycle. **J Mol Med (Berl)**, v, 90, n. 1, p. 31-43, 2012.

FERREIRA, A. L. A; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, A. P.; OLIVEIRA, C. E. R.; FRANÇA, N. M. Síndrome metabólica em crianças obesas e fatores de risco para doenças cardiovasculares e acordo com a resistência à insulina (HOMA-IR). **J Pediatr**; v. 83, 2007.

FERREIRA, D. J. S.; LAGRANHA, C. J. Desequilíbrio oxidativo: um mecanismo bioquímico associado a desordens cardiovasculares induzidas no início da vida. **Neurobiologia**; v. 76, 2013.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, New York, v. 105, p. 114-21, 1984.

FREEDMAN, D. *et al.* Classification of body fatness by body mass index-for-age categories among children. **Arch. Pediatr. Adolesc. Med.**, v. 163, n. 9, p. 801-811, 2009.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; PINAL, C. The developmental origins of adult disease. **Matern Child Nutr.**, v. 1, n. 3, p.130-41, 2005.

HABBOU, A. *et al.* Postnatal overfeeding causes early heart-gene expression shifts and long-term cardiometabolic and oxidative alterations. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1-12, 2013. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0056981&representation=PDF>> Acesso em: 30, jun.2015.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.**, v. 249, p. 7130-39, 1974.

HALESTRAP, A. P.; CLARKE, S. J.; JAVADOV, S. A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion target for cardioprotection. **Cardiovasc. Res.**, v. 15, n. 61, p. 372-85, 2004. Disponível em: <<http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/61/3/372.full-text.pdf>> Acesso: 30, jun. 2015.

HISSIN, P., HILF, R. A Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues. **Anal Biochem.**, v. 74, n. 1, p. 214-26, 1976.

IOTF. **Childhood obesity in the new crisis in public health**. London: International Obesity Task Force, 2003.

KHAN, M. M.; AHMAD A.; ISLAM, F.; Resveratrol attenuates 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage and dopamine depletion in rat model of Parkinson's disease. **Brain Research.**, v. 1328, p.139, Abr. 2010.

KUDO, N. *et al.* High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. **J BiolChem**, v. 270, p. 17513-20. 1995.

LAIGHT, D. W. *et al.* F2-isoprostane evidence of oxidant stress in the insulin resistant, obese Zucker rat: effects of vitamin E. **Eur J Pharmacol.**, v. 377, p. 89-92, 1999.

LAUSTSEN, P. G. *et al.* Essential role of insulin and insulin-like growth factor 1 receptor signaling in cardiac development and function. **Mol Cell Biol**, v. 27, 1649-64. 2007.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. **Revista brasileira de nutrição clínica**, v.18, n.2, p.87-94, 2003.

LENZ, A.; DIAMOND JR, F. B. Obesity: the hormonal milieu. **Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.** v. 15, p. 9-20, 2008.

LIONETTI, V. *et al.* Carnitinepalmitoyltransferase-I inhibition prevents ventricular remodeling and delays decompensation in pacing-induced heart failure. **Cardiovasc Res.**, v. 66, p. 454-461, 2005.

LIU, Q. *et al.* High levels of fatty acids delay the recovery of intracellular pH and cardiac efficiency in post-ischemic hearts by inhibiting glucose oxidation. **J Am CollCardiol.**, v. 39, p. 718-25, 2002.

LOPASCHUK, G. D. *et al.* Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. **Physiol Rev**, v. 90, p. 207-58, 2010.

MAHATTANATAWE, K. *et al.* Total antioxidant activity and fiber content of select Flori-dagrown tropical fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, n. 12, 7355-63, 12, 2006.

MARTINS, M. R. *et al.* Early overnutrition impaired insulin signaling in the heart of adult swiss mice. **J. Endocrinol.**, v. 198, p.591-8, 2008.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J BiolChem.**, v. 247, n. 10, p. 3170-5, 1972.

MOREIRA, A. S. *et al.* Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life. **NutrMetabCardiovasc Dis.**, v.19, p. 805–10, 2009.

MURPHY, E.; STEENBERGEN, C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. **Physiol Rev.**, v. 88, p. 581-609, 2008.

ONAY-BESIKCI, A. *et al.* The effects of chronic trimetazidine treatment on mechanical function and fatty acid oxidation in diabetic rat hearts. **Can J PhysiolPharmacol**, v. 85, n. 5, p. 527–535, 2007.

PIAO, L. *et al.* FOXO1-mediated upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase-4 (PDK4) decreases glucose oxidation and impairs right ventricular function in pulmonary hypertension: therapeutic benefits of dichloroacetate. **J Mol Med (Berl)**, v. 91, n. 3, p. 333-46. 2013.

PLAGEMANN, A. *et al.* Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. **J Physiol**, v. 587, n. 20, p. 4963-76, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2770159/> > Acesso em: 30, jun. 2015.

REIS, B. Z. *et al.* Associação de medidas antropométricas para diagnosticar a obesidade em mulheres usuárias de um programa de atividade física regular “Academia da Cidade”, **Ver. Scient. Plena.**, v. 7, n. 9, p. 1-8, 2011.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R.; Free Radical, **Biol. Med.**, v. 30, n. 1191, 2001.

SCHULZ, R. *et al.* Connexin 43 in ischemic pre- and postconditioning. **Heart Fail Rev.**, v. 12, p. 261–266, 2007.

SIKARIS, K. The clinical biochemistry of obesity. **Clin.Biochem.Rev.**, v. 25, 165-81, 2004.

STAHL, W *et al.* Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: Tocopherols and carotenoids. **J Chromatogr.**, v. 936, p. 83-93, 2001.

TREVENZOLI, I.H. *et al.* Neonatal hyperleptinaemiaprogrammes adrenal medullary function in adult rats: effects on cardiovascular parameters. **J. Physiol.**, v. 580, n. 2, p. 629-37, 2007.

VINCENT, H. K. *et al.* Obesity is associated with increased myocardial oxidative stress. **Int. J. Obes. Relat.Metab.Disord.**, v.23, n. 1, p.67–74, 1999.

WATERLAND, R. A. GARZA, C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 69, n. 2, p. 179-97, 1999.

WINICK, M.; ROSSO, P.; BRASEL, J. A. Malnutrition and cellular growth in the brain. **Bibl. Nutr. Dieta.**, n. 17, p. 60-8, 1972.

ANEXO A – Comissão de Ética.



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Cavaca, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8900 | 2126 9351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 9 de outubro de 2014.

Ofício nº 58/14

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Profª. Claudia Jacques Lagranha**
Centro Acadêmico de Vitória - CAV
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.017808/2014-51

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "Estudo da programação fetal de doenças metabólicas da vida adulta nos tecidos vitais: Avaliação dos efeitos da supernutrição".

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos parecer favorável aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério; Animal: ratos; Linhagem: Wistar;
Idade: Progenitores adultos e prole após desmame e adulta;
Peso: Após desmame: 30 – 90g; Sexo: machos e fêmeas;
Número total de animais previsto no protocolo: 92

Atenciosamente,

Profª Maria Vasconcelos
Vice-Presidente da CEUA/UFPE
SAPE 219905

CCB: Integrar para desenvolver