



LYLIAN GABRIELA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS E
MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM
MODELO DE RESTRIÇÃO E HIPERALIMENTAÇÃO
PÓS-NATAL**

LAVRAS-MG

2020

LYLIAN GABRIELA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS E
MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO DE
RESTRIÇÃO E HIPERALIMENTAÇÃO PÓS-NATAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade Federal de Lavras, como parte
das exigências do Curso de Nutrição, para a
obtenção do título de Bacharel.

Dra. Isabela Coelho de Castro

Orientadora

Msc. Brenda Loise Monteiro

Coorientadora

LAVRAS-MG

2020

LYLIAN GABRIELA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS E MARCADORES DO
ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO DE RESTRIÇÃO E
HIPERALIMENTAÇÃO PÓS-NATAL**

**EVALUATION OF METABOLIC AND OXIDATIVE STRESS MARKERS IN
THE UNDERNUTRITION AND POSTNATAL OVERNUTRITION MODELS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade Federal de Lavras, como parte
das exigências do Curso de Nutrição, para a
obtenção do título de Bacharel.

APROVADO em 03 de agosto de 2020.

Dra. Isabela Coelho de Castro – DNU/UFLA

Msc. Brenda Loise Monteiro – PPGNS/UFLA

Nutr. Estéfany Ribeiro Leão – PPGNS/UFLA

Prof (a). Dr (a). Isabela Coelho de Castro

Orientadora

Msc. Brenda Loise Monteiro

Coorientadora

LAVRAS-MG

2020

RESUMO

O período pós-natal é considerado um dos períodos críticos do desenvolvimento, pois é quando o indivíduo está mais exposto à programação metabólica, a qual é estimulada por alterações nutricionais e/ou hormonais. Neste período o organismo está mais suscetível a alterações influenciadas pelos fatores ambientais, e quando submetidos a estes fatores estressantes o organismo tende a se programar de acordo. O presente estudo teve como objetivo investigar a influência da hiperalimentação e da restrição alimentar pós-natal em marcadores bioquímicos e em parâmetros de estresse oxidativo hepático em camundongos C57Bl6. Após a aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFLA nº 002/18) os animais foram divididos em grupo controle (C; 8-10 animais/caixa), restrição alimentar por indução pelo aumento de ninhada (S; 15-16 animais/caixa) e hiperalimentado por indução da redução de ninhada (H; 3-4 animais/caixa). Após o desmame foram reajustados os grupos experimentais pelo utilização apenas nos machos, onde o grupo H e C permaneceu com n=8 e o grupo S com n=6. Aos 120 dias de experimento os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12/12 horas), em ambiente com temperatura controlada de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, com ração e água à vontade. Foram avaliados semanalmente o peso corporal e o consumo alimentar de cada grupo. Os marcadores de estresse oxidativo do tecido hepático foram analisados através da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), da concentração de hidroperóxidos, das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e atividade da catalase. As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism®, sendo o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Aos 21 e 120 dias, o grupo H apresentou maior peso corporal e apenas aos 21 dias, o grupo S apresentou menor peso, ambos comparados ao grupo C. O consumo alimentar não diferiu entre os grupos experimentais durante o período avaliado. Ao analisar a glicemia em jejum, o grupo H apresentou maior valor, enquanto o grupo S não obteve diferença significativa, ambos comparados ao grupo C. Em relação ao lipidograma, a concentração de colesterol total e LDL-c do grupo H foi maior quando comparado ao grupo C, enquanto o grupo S apresentou próximo do grupo C. Quanto as concentrações plasmáticas de HDL-c o grupo S apresentou valor diminuído e o grupo H não obteve diferença, ambos comparados ao grupo C. Já os triacilgliceróis plasmáticos esteve aumentado no grupo S e não houve diferença significativa no grupo H, ambos comparados ao grupo C. No teste de TBARS e hidroperóxidos ambos os grupos obtiveram valores aumentados quando comparado ao grupo C. As concentrações de SOD não apresentaram diferença significativa entre os grupos. A atividade de catalase foi diminuída nos grupos H e S, quando comparados ao grupo C. Dessa forma, os modelos de hiperalimentação e restrição alimentar pós-natal foram capazes de induzir alterações metabólicas através dos marcadores bioquímicos, este com maior intensidade no grupo H, e do estresse oxidativo, que persistiram na vida adulta, em ambos os grupos. Assim, a eficácia destes modelos como métodos de pesquisa para determinar estratégias de prevenção precoce das complicações causadas pela programação metabólica inadequada é evidenciada.

Palavras-Chaves: Programação Metabólica. Lipidograma. Radicais livres.

ABSTRACT

The postnatal period is considered one critical period of development, as it is when the individual is most exposed to metabolic programming, which is stimulated by nutritional and/or hormonal changes. In this period, the organism is more susceptible to changes influenced by environmental factors, and when subjected to these stressors the organism tends to program itself accordingly. The present study aimed to investigate the influence of undernutrition and postnatal overnutrition on biochemical markers and hepatic oxidative stress in C57Bl6 mice. After approval by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA/UFLA nº 002/18) the animals were divided into a control group (C; n=8-10), undernutrition by increasing the litter (S; n=15-16) and overnutrition by litters reduction (H; n=3-4). After weaning, the experimental groups were readjusted using only males, where groups H and C n=8 and group S with n=6. To 120 days of the experiment, the animals were kept in a light/ dark cycle (12/12 hours), in an environment with a controlled temperature of $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, with food and water ad libitum. The body weight and food consumption of each group were evaluated weekly. Oxidative stress markers in the liver were analyzed by the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), the concentration of hydroperoxides by testing the ferrous oxidation of xylenol Orange, the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD and catalase activity. Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism®, with a level of significance at $p < 0.05$. The animals in the H group had the highest body weight, while the S group obtained the lowest value, at 21 and 120 days. Food consumption did not differ between experimental groups during the period evaluated. When analyzing fasting blood glucose, the H group showed a higher value, while group S did not obtain a significant difference, both compared to group C. In lipogram, the concentration of total cholesterol and LDL-c in the H group was higher when compared to C, while S presented close to C group. Plasma HDL-c concentrations in the S group was decreased, without a difference in the H group, both compared to group C. In triacylglycerols analyzes, it increased in the S group and there was no significant difference in H group. In the TBARS and hydroperoxides test, groups H and S obtained increase values when compared to the C group. SOD concentrations showed no significant difference between groups. Catalase activity was decreased both the groups when compared to group C. Thus, the models of undernutrition and postnatal overnutrition were able to induce metabolic changes through biochemical markers, with greater intensity in group H, and oxidative stress, which persisted in adulthood. In this way, the effectiveness of these models as research methods to determine strategies for early prevention of complications caused by inadequate metabolic programming is evidenced.

Keywords: Metabolic Programming. Lipidogram. Free radicals.

1. INTRODUÇÃO

Após ocorrer uma mudança do perfil da sociedade brasileira, ou seja, devido a transição epidemiológica, com o aumento do sedentarismo e do consumo de alimentos ultraprocessados em detrimento aos alimentos “in natura”, as DCNT têm se destacado como a principal causa de morte, um problema de saúde pública que afeta a economia do país, onde acarreta mais gastos para os sistemas de saúde, através de maior necessidade por medicamentos e consultas médicas (MARIATH et al., 2007; DIAS et al., 2017).

Obesidade, doenças cardiovasculares e diabetes mellitus são exemplos de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), as quais acometem grande parte da população. De acordo com a Organização Pan Americana de Saúde (OPAS) acontecem 16 milhões de mortes prematuras por ano devido à alta incidência de DCNT. Sendo assim, estudos tem se relacionado esta incidência com o ambiente do indivíduo nos primeiros 1000 dias de vida (HABBOUT et al, 2013).

A programação metabólica é um fenômeno desencadeado por alterações nutricionais e/ou hormonais que modulam fases críticas do desenvolvimento, promovendo ajustes morfológicos, metabólicos e funcionais, que determinam a maior predisposição a estados patológicos na vida adulta. Por sua vez, uma nutrição adequada nas fases iniciais da vida como, condição metabólica materna e dieta na gestação e lactação, o aleitamento materno oferecido de forma exclusiva nos primeiros seis meses de vida e posteriormente uma alimentação equilibrada, favorece ao indivíduo uma programação metabólica adequada e com menores chances de desenvolver DCNT (ALMEIDA, et al.; XAVIER et al., 2015).

O período pós-natal é uma das fases da vida, onde organismo está suscetível a alterações influenciadas pelos fatores ambientais, e quando submetidos a estes fatores estressantes tende a se programar de acordo. Com o atual cenário da transição epidemiológica, o indivíduo está exposto a um ambiente que pode acarretar em alterações metabólicas. Posto isto, a programação metabólica tem sido alvo de estudo, pois quando inadequada está relacionado com o crescente aumento das DCNT na vida adulta (GILLOTEAU et al., 2009; XAVIER et al., 2015; MALTA, 2019).

Com isso, avaliações metabólicas como glicemia em jejum e lipidograma são ferramentas eficazes para avaliar a situação nutricional em que o indivíduo se encontra, sendo efetivo também, para identificar modificações precoces a fim de prevenir a ocorrência de DCNT (HABBOUT et al., 2013; XAVIER et al., 2015).

De acordo com o ambiente no qual o indivíduo é exposto, pode-se aumentar a produção de radicais livres em detrimento da capacidade antioxidante, caracterizada pelo estresse oxidativo (EO). O EO tem sido bastante associado com o excesso de tecido adiposo, e conseqüentemente, relacionado às DCNT e é decorrente do desequilíbrio metabólico resultante entre a produção em excesso de substâncias oxidantes e diminuição de mecanismos de defesa antioxidante. O mesmo é controlado pelo sistema antioxidante impedindo que ocorra danos aos tecidos do organismo (BARBOSA et al., 2010; SOUSA et al., 2019).

Modelos experimentais são usados para explicar os elementos moleculares e fisiológicos que caracterizam a programação metabólica, dentre eles, se encontram os modelos de hiperalimentação e restrição alimentar pós-natal. Estes modelos viabilizam investigações sobre possíveis alterações da ingestão e do estado nutricional em seres humanos, nesta mesma fase, assumindo grande relevância para elaborar estratégias de prevenção em saúde (GILLOTEAU et al., 2009; XAVIER et al., 2015).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo investigar a influência dos modelos de hiperalimentação e de restrição alimentar pós-natal em marcadores bioquímicos e no estresse oxidativo hepático em camundongos C57Bl6.

2. METODOLOGIA

Desenho Experimental

O projeto foi conduzido entre 2018 e 2019 no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição (DNU) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), durante cerca de 180 dias. Aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFLA nº protocolo 002/18), Lavras, MG.

A princípio foram utilizados 5 machos e 15 fêmeas adultos, camundongos C57Bl6, onde permaneceram 3 fêmeas em cada caixa durante 15 dias para adaptação, após esse período foi adicionado um macho em cada caixa, para o período de acasalamento durante 10 dias. Logo após o acasalamento foi removido os machos de cada caixa e as fêmeas permaneceram juntas durante o período gestacional. Após o nascimento, as ninhadas dos animais foram reajustadas para 3-4 filhotes por ninhada para formação do grupo Hiperalimentação pós-natal (H), aumentada a ninhada para 15-16 animais nos grupos denominados de Restrição alimentar pós-natal (S), aumento esse

devido à transferência de animais da ninhada dos grupos H para as ninhadas dos grupos S, e mantida em 8-10 filhotes por ninhada nos grupos denominados Controle (C). Após 21 dias de lactação, ao desmame foram separados apenas os animais machos para as análises, assim os grupos foram reajustados permanecendo o grupo Hiperalimentado e Controle com n=8 (H e C, n=8) e o grupo Restrição alimentar com n=6 (S, n=6). Em todo o período experimental os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12/12 horas), em ambiente com temperatura controlada de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, com ração padrão Presence® e água a vontade. Os animais foram pesados semanalmente, para determinar o ganho de peso durante quatro meses de período experimental. Além disso, foram mensurados na balança analítica Marte AD200 o consumo de ração semanalmente. Aos 120 dias de vida, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma mistura de Ketamina (180mg/kg) e Xilazina (30mg/kg) e então, eutanasiados por exsanguinação cardíaca. A partir da coleta de sangue foi obtido o soro. Sendo assim, o soro e o tecido hepático coletados foram armazenados à -20°C (CARON et al., 2012; HABBOUT et al., 2013).

Análises bioquímicas

O perfil lipídico sérico foi determinado pelos métodos enzimáticos colorimétricos, conforme os sistemas comerciais Liquiform® (Labtest Diagnóstica). As amostras foram preparadas e a leitura da absorbância em espectrofotômetro realizadas de acordo com as instruções do fabricante. O LDL – colesterol foi calculado a partir das determinações do perfil lipídico, através da fórmula de Friedewald (1972), onde $\text{LDL-c} = [(\text{Triglicerídeos} / 5) + \text{HDL}] - \text{Colesterol total}$.

As concentrações de glicose no soro foram dosadas a partir do kit enzimático colorimétrico Liquiform® (Labtest Diagnóstica). As amostras foram preparadas e a leitura da absorbância em espectrofotômetro realizadas de acordo com as instruções do fabricante.

Análise do estresse oxidativo hepático

Para as análises de estresse oxidativo usou-se amostras coletadas do tecido hepático, os testes realizados foram o de dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), dosagem da concentração de hidroperóxidos e homogenatos de tecidos pelo ensaio da oxidação ferrosa do xilenol orange, dosagem da atividade da superóxido dismutase (SOD) e dosagem da atividade da catalase (CAT). A princípio foram pesados de cada animal 100mg de tecido hepático em tubos de 2mL mantidos em

gelo durante o período de análise. Em seguida, adicionou-se 1mL de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) ou tampão fostato-salino e esta preparação foi triturada no homogenizador Ultra Stirrer® por aproximadamente 1 minuto e posteriormente centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos. Após a identificação dos tubos com as alíquotas das amostras do sobrenadante, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C para posteriores análises.

Para dosagem indireta de produtos do estresse oxidativo foi utilizada a técnica de presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), protocolo adaptado de acordo com Buege e Aust (1978). O malondialdeído (MDA) é o produto final da peroxidação lipídica e reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar o complexo MDA-TBA de coloração rósea que pode ser quantificado pela leitura em espectrofotômetro, sendo os resultados expressos em termos de TBARS. Para isto, o tecido hepático foi homogeneizado a 1:10 em solução tampão fosfato-salina (PBS) a 4°C e o sobrenadante da amostra foi isolado após a centrifugação por 10 min a 12000 rpm a 4°C. A solução de TBARS, preparada com Ácido tricloroacético (TCA) a 15%, Ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,375% e HCl a 0,25N em água destilada foi homogeneizada em banho-maria, a 60°C sem contato com a luz. Foram preparadas amostras, branco e soluções para a construção da curva padrão utilizando diversas concentrações conhecidas de MDA e PBS. Foi adicionado sobre as amostras solução TBARS em 1:2 em todos os tubos, inclusive nos padrões e branco. Em seguida os tubos foram cobertos da luz e colocados em banho-maria, a 90-100°C por 15 min. Após resfriar os tubos em água corrente fria foram adicionados na capela butanol (1:1 em volume total) em todos os tubos, tampando-os imediatamente após e homogeneizando-os cuidadosamente em agitador de tubos. Os tubos foram então centrifugados a 6000rpm por 10 min. Na microplaca foi coletado o sobrenadante das misturas em duplicata e a leitura foi realizada em comprimento de onda a 530nm. A dosagem de TBARS é expressa pela concentração de MDA (uM)/concentração de proteína (mg).

As proteínas foram mensuradas através da técnica de Bradford (1976), que é baseada na ligação das proteínas com o corante Coomassie Blue G-250, o que resulta em uma coloração azulada detectável pelo espectrofotômetro. Para preparar a solução foi utilizado 100 mg de corante Coomassie Blue G-250, 50 ml de etanol 95%, 100 ml de ácido fosfórico 85% e água miliQ (q.s.p. para 1000 mL). O comprimento de onda lido pelo espectrofotômetro foi de 630nm. A curva padrão de proteína foi calculada pela concentração de albumina sérica.

Como proposto por Banerjee et al. (2002) foi utilizado o protocolo para a dosagem da concentração de hidroperóxidos e homogenatos de tecidos pelo ensaio da oxidação ferrosa do xilenol orange. Essa dosagem é feita a partir de diferentes soluções, H₂SO₄ a 250Mm (solução A), Xylenol Orange 100 µM, sulfato ferroso amoniacal 250 µM e H₂SO₄ a 25 mM, (solução FOX/solução B), hidroxitoluenobutilado (BHT) a 4 mM e metanol a 90% v/v) (solução C) e metanol 100 mL e 0,262g de TPP (solução de trifenilfosfina-TPP). Durante o experimento foi preparado o Reagente FOX-2, dado através da diluição de um volume da solução B/solução FOX em nove volumes da diluição C. Sendo assim foram feitos dois experimentos, um com TPP e outro sem TPP. A leitura foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 550 nm. O resultado também foi normalizado pela concentração de proteínas tecidual.

A dosagem da atividade da superóxido dismutase (SOD) foi baseada no que propôs Dieterich et al. (2000), que demonstra a capacidade da SOD em consumir o radical superóxido (O₂⁻) e reduzir a razão de auto-oxidação do pirogalol. Sendo assim, em uma microplaca com 96 poços foram pipetados 30µL de homogenato do tecido hepático em PBS e adicionados 99µL de tampão fosfato, 6µL de brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium (MTT) e 15 µL de pirogalol. Para a preparação do branco, o pirogalol foi trocado pelo PBS e para o padrão, o PBS foi utilizado no lugar da amostra. Ao decorrer 5 minutos de incubação a temperatura ambiente (37°C), a reação foi parada para adicionar 150µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura da absorbância foi feita em um comprimento de onda de 550nm. Para o resultado foi considerado o cálculo do padrão como uma unidade de SOD e assim, o resultado foi expresso em Unidade por miligrama de proteína (U/mg de PTN) mensurada pela técnica de Bradford (1976).

A dosagem da atividade da catalase (CAT) foi realizada segundo o protocolo de Aebi (1984), onde se baseia pela redução da absorbância em 240 nm devido a metabolização do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que é feita pela catalase. Para a execução do teste precisou-se de 50µL de homogenato do tecido hepático diluído em água MiliQ, no qual foi adicionado 1 mL do tampão fosfato 50 mM em uma cubeta de quartzo, na mesma foi acrescentada 50µL de solução de H₂O₂ a 0,3 M. A leitura da absorbância foi feita a 240 nm durante 1 minuto. O cálculo foi feito pela diferença de leitura do tempo inicial pelo tempo final dividido pelo volume (mL) da amostra. O resultado é referido pela concentração da proteína (mg/mL), mensurada pela técnica de Bradford (1976).

Análise estatística

Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism®, versão 5.0. Os resultados foram expressos em média \pm SEM. Foram analisados para normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A comparação entre dois grupos foi realizada utilizando teste t de Student, para os paramétricos, ou Mann-Whitney para dados não paramétricos. Critério de significância adotado foi de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Como demonstrado na tabela 1, aos 21 e 120 dias, averiguou-se que o grupo H apresentou maior valor no peso corporal ($p < 0,001$ e $p < 0,01$ respectivamente), quando comparado ao grupo C. Enquanto os animais do grupo S obtiveram menor peso apenas aos 21 dias ($p < 0,001$), quando comparados ao grupo C.

Tabela 1 – Média do peso corporal (g) aos 21 dias e aos 120 dias da vida, grupos Controle (C, n=8), Hiperalimentado (H, n=8) e Restrição alimentar (S, n=6).

Peso corporal (g)	C	H	S
21 dias	8,213 \pm 0,1875	10,22 \pm 0,4283***	5,283 \pm 0,6640 ***
120 dias	24,73 \pm 0,2186	26,13 \pm 0,3307**	23,95 \pm 0,4177

Dados apresentados como Média \pm Erro padrão da média.

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; comparados ao grupo Controle (C).

Na tabela 2 pode se verificar que o consumo alimentar dos grupos experimentais ao serem mensurados semanalmente não obtiveram diferença significativa entre os grupos durante todo período experimental ($p > 0,05$).

Tabela 2 – Consumo alimentar (g) dos grupos Controle (C, n=8), Hiperalimentado (H, n=8) e Restrição alimentar (S, n=6) em períodos diferentes.

Média de consumo alimentar (g)	C	H	S
Semanas 1 – 3	17,35 \pm 2,645	19,40 \pm 1,720	15,95 \pm 2,282
Semanas 4 – 6	24,58 \pm 1,315	25,08 \pm 1,747	27,19 \pm 2,257
Semanas 7 – 9	24,29 \pm 0,829	25,08 \pm 0,992	28,09 \pm 3,987
Semanas 10 – 13	23,66 \pm 0,364	24,77 \pm 1,073	24,91 \pm 0,8937

Dados apresentados como Média \pm Erro padrão da média.

*($p < 0,05$) comparados ao grupo controle (C).

Os dados bioquímicos estão demonstrados na Tabela 3, onde a glicemia em jejum do grupo H ($p < 0,001$) foi maior quando comparado ao grupo C, enquanto o grupo S não apresentou diferença. O mesmo pode ser observado na concentração de colesterol total e LDL-c ($p < 0,0001$). Quanto as concentrações de HDL-c, o grupo S ($p < 0,01$) apresentou redução nos valores comparado ao grupo C, sem diferenças no grupo H. Já em relação ao triacilgliceróis (TAG), o grupo S ($p < 0,01$) apresentou um valor aumentado, sem mudanças no grupo H, ambos comparados ao grupo C.

Tabela 3 – Glicemia em jejum, colesterol total, HDL-c, LDL-c e triacilgliceróis (mg/dL) dos grupos Controle (C, n=8), Hiperalimentado (H, n=8) e Restrição alimentar (S, n=6).

	C	H	S
Glicemia em jejum (mg/dL)	117,2±5,919	148,4±4,026**	124±4,127
Colesterol total (mg/dL)	72,82±5,223	141,8±9,701***	83,29±8075
HDL-c (mg/dL)	47,01±5,233	41,99±4,339	29,44±5,131*
LDL-c (mg/dL)	25,43±3,279	84,49±6,500***	37,37±4,010
Triacilgliceróis (mg/dL)	46,70±2,662	41,79±4,224	64,18±5,702*

Dados apresentados como Média ± Erro padrão da média. *($p < 0,05$), **($p < 0,001$), ***($p < 0,0001$) comparados ao grupo controle (C).

As análises realizadas para avaliação do estresse oxidativo no tecido hepático são exibidas na Figura 1. Verifica-se concentrações aumentadas de substâncias reativas ao TBARS e de hidroperóxido no grupo hiperalimentado e restrição alimentar, quando comparados ao grupo C (Figura 1A e 1B, respectivamente).

Já as concentrações da atividade da superóxido dismutase (Figura 1C), não apresentou diferença significativa entre os grupos. Enquanto as concentrações da atividade da catalase mostrou diminuída nos grupos H ($p < 0,01$) e S ($p < 0,05$), quando comparada ao grupo C (Figura 1D).

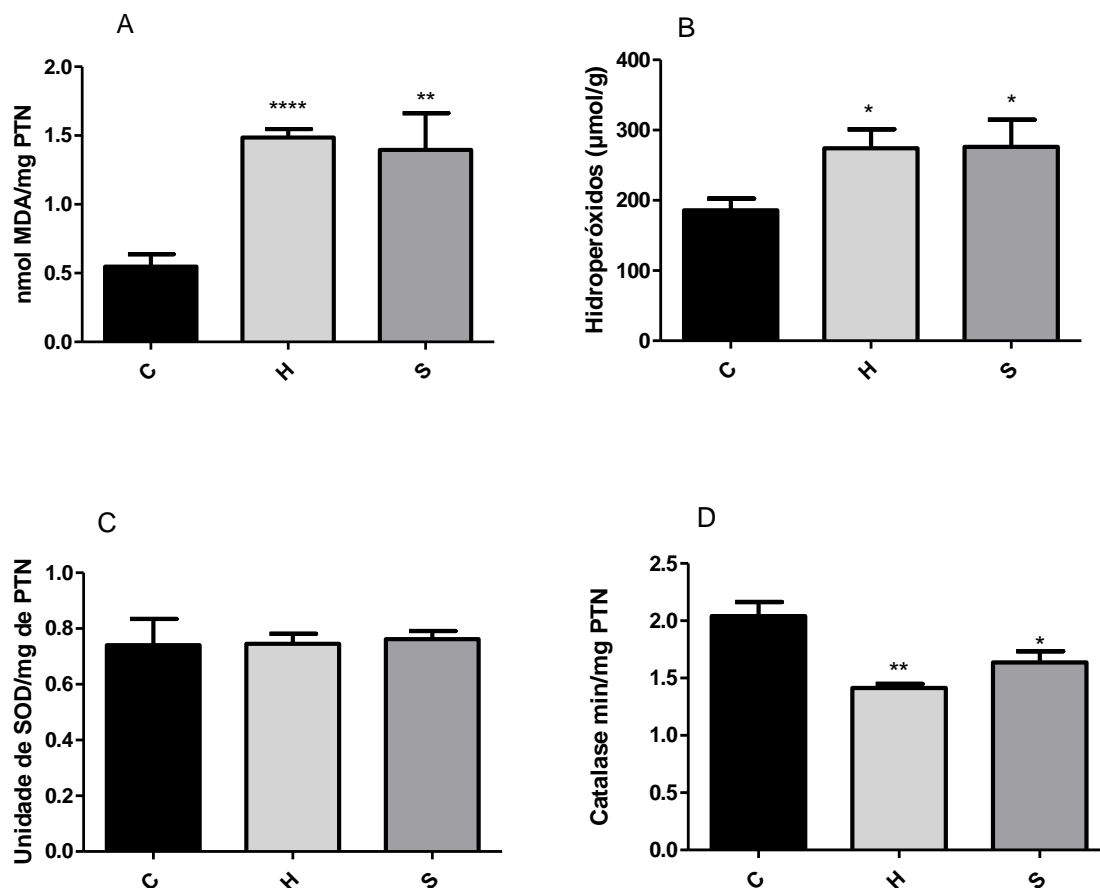


Figura 1: Avaliação de marcadores do estresse oxidativo no tecido hepático. (A) Teste da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) normalizado pela concentração proteica (nmol MDA/mg proteína); (B) Avaliação da dosagem de hidroperóxidos normalizada pela concentração proteica ($\mu\text{mol/g}$ de proteína); (C) Dosagem da concentração da Superóxido Dismutase (SOD) normalizada pela concentração proteica (U/mg de proteína); (D) Avaliação da concentração de Catalase normalizada pela concentração proteica ($\Delta\text{E}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína). Onde: * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), **** ($p<0,0001$)

4. DISCUSSÃO

No período pós-natal, a programação metabólica desempenha um papel modulador crucial, pois orienta a expressão do DNA. De fato, estímulos na fase crítica do desenvolvimento, modificam mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA ou acetilação das histonas, que resultam na modificação adaptativa do fenótipo ao ambiente em que é exposto, o que a longo prazo podem ser inadequadas e até deletérias. A alimentação é um dos fatores que estimula a programação metabólica, por sua vez se for

inadequada na primeira infância, irá impactar negativamente a saúde na fase adulta (HABBOUT et al., 2013; AGOSTI et al., 2017 JÚNIOR et al., 2019).

Durante a gravidez e nos primeiros anos de vida, relacionando-se ao hábito de vida materno e ao aleitamento, são fases vulneráveis ao desenvolvimento, predispondo o organismo às alterações endócrinas metabólicas e imunológicas. Este estado metabólico demonstra a base fisiopatológica para explicar as DCNT, podendo ser evidenciado nos países em desenvolvimento, devido novas condições ambientais e maior disponibilidade de alimentos, ocorrendo mudança dos hábitos alimentares, causando impactos na saúde pública (AGOSTI et al., 2017).

O presente estudo investigou a influência do modelo da hiperalimentação e da restrição alimentar pós-natal através do peso corporal, consumo alimentar, glicemia em jejum, lipidograma e marcadores de estresse oxidativo hepático.

Ao avaliar o efeito sobre peso corporal observou-se, que o grupo Restrição alimentar apresentou o peso diminuído após o desmame, pois, este grupo obteve aumento da ninhada o que leva à competição pelo leite materno, resultando assim, em um quadro de desnutrição. O resultado obtido foi inversamente proporcional entre a ninhada e o peso corporal, o que era esperado. Em vista disto, aos 120 dias, o grupo Restrição alimentar demonstrou o peso próximo ao grupo Controle, o que pode ser explicado por possíveis modificações no metabolismo dos camundongos como, o aumento da utilização das fontes de energéticas, já que apresentaram ganho de peso significativo sem o aumento da ingestão alimentar (VELKOVSKA et al., 2008; HABBOUT et al., 2013).

Os resultados do presente trabalho demonstraram que o grupo hiperalimentado obteve o peso corporal aumentado precocemente persistindo até a vida adulta. Esses modelos se mostram eficazes para melhor compreensão do que ocorre em indivíduos com excesso de peso, os quais são associados com o desenvolvimento de DCNT, como síndrome metabólica, obesidade visceral e alto risco de desenvolver doenças cardiovasculares na vida adulta (ROSINI et al., 2012; HABBOUT et al., 2013; FRANKENFELD et al., 2016).

Nery et al. (2011) utilizaram o modelo de hiperalimentação, por redução de ninhada em ratos Wistar machos, e não observaram alterações consideráveis na ingestão alimentar entre os grupos no decorrer do experimento. O vigente estudo foi similar ao de Nery et al. (2011), pois o resultado do consumo alimentar de todos os grupos animais apresentou-se indiferente.

Kumari e colaboradores (2019) encontraram em seu estudo que o aumento da glicemia no modelo de hiperalimentação possivelmente leva a resistência à insulina, e que está associada a alterações nos lipídios séricos, como aumento do colesterol total e LDL-c. De fato, a resistência à insulina estimula a oxidação dos ácidos graxos livres no soro, fornecendo assim substrato para a síntese de TAG no fígado e aumentando a liberação de LDL, rica em TAG, do fígado para o soro, assim, elevando seus níveis. Esses parâmetros lipídicos desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e na progressão das alterações metabólicas e, conseqüentemente, das DNCT (MEDEIROS et al., 2011).

Devido ao ambiente em que o indivíduo é exposto, como a hiperalimentação durante a lactação, pode ocorrer o desenvolvimento de DCNT como obesidade e diabetes mellitus tipo 2 na idade adulta, o que tende à disfunção das células betas, devido à hiperglicemia a longo prazo e o aumento dos ácidos graxos ter efeitos deletérios nestas células, com conseqüente quadro de resistência à insulina, (THOLE et al., 2012). Neste trabalho, o grupo hiperalimentado obteve a glicemia em jejum aumentada, esta alteração é diretamente relacionada ao ambiente exposto e ao excesso de peso. Na literatura a associação da glicemia em jejum com a resistência insulínica é bastante descrita, embora o presente estudo não tenha avaliado a concentração de insulina, é provável que tenha ocorrido alterações da mesma neste trabalho.

Alterações nas concentrações séricas de colesterol total, suas frações e de triacilglicerol, quando persistidas está diretamente associada ao aumento do risco de desenvolver doenças cardiovasculares, como a dislipidemia podendo contribuir para aterosclerose, uma doença bastante acometida entre os brasileiros. Além disto, a literatura evidencia que alterações de alguns hormônios moduladores do metabolismo são associadas ao aumento da adiposidade e alterações nos parâmetros lipídicos, o que tem sido um relevante marcador precoce da evolução de DCNT (RINALDI et al., 2012; SINGH et al., 2018).

O atual trabalho apresentou alterações no lipidograma tanto nos modelos de hiperalimentação, quanto nos modelos de restrição alimentar pós-natal. O modelo de hiperalimentação apresentou níveis aumentados do peso corporal, colesterol total e LDL-c, sugerindo que devido à maior disponibilidade de leite materno, ou seja, ao ambiente exposto na vida pós-natal estes modelos obtiveram um ganho excessivo de peso, subentendendo que houve maior distribuição de lipídeos no sangue, e ganho de tecido

adiposo, o qual pode acarretar nestas alterações metabólicas, e posteriormente, em DCNT.

O modelo de restrição alimentar obteve o HDL-c diminuído e o triacilglicerol aumentado, além de, como citado a cima, este modelo aos 120 dias obteve o peso corporal próximo ao grupo controle, apesar de iniciar aos 21 dias com peso estatisticamente menor. Este ganho de peso pode ser explicado através da modulação metabólica acarretada pela desnutrição no período pós-natal e um crescimento acelerado de forma compensatória, o que também se relaciona com aumento da incidência de DCNT na vida adulta. (RINALDI et al., 2012).

O estresse oxidativo (EO) é modulado por fatores ambientais, em especial, a alimentação. Estudos demonstram que na fase da lactação, devido a diminuição da competição por nutrientes, animais hiperalimentados tende ao ganho de peso excessivo, o qual tem relação com o aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio (EROS). Diante disto, a inflamação identificada devido ao excesso de gordura corporal é associada ao aumento de EROS e radicais livres, o que danifica as células do corpo humano. Se a produção dessas EROS for maior do que a ação das estruturas antioxidantes, elas concedem a oxidação de substâncias como os lipídeos, podendo lesionar as células (BARBOSA et al., 2010; FRANÇA et al., 2013).

O sistema de defesa antioxidante tem como função inibir e/ou reduzir danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas. Este fenômeno pode ocorrer através de diferentes mecanismos, os que impedem a formação de radicais livres ou os que favorecem o reparo e a reconstituição das células lesadas. O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT), as quais foram mensuradas neste estudo. Estas enzimas agem através de mecanismos de prevenção, impedindo ou controlando a formação de radicais livres, envolvidos com reações que culminam na propagação do processo e ocorrência de danos oxidativos (BARBOSA et al., 2010).

As técnicas utilizadas para identificar a peroxidação lipídica ocorrem através da mensuração de produtos resultantes da oxidação. Para detectar as EROS há uma inviabilidade devido à alta velocidade de suas reações e concentrações muito baixas. Os métodos para aferir a peroxidação lipídica podem ser primários (os hidroperóxidos lipídicos), ou secundários (derivados da β ruptura dos hidroperóxidos lipídicos da oxidação). Sendo assim, os metabólitos originados da oxidação das biomoléculas podem

ser identificados através de métodos experimentais, que auxiliam na compreensão a respeito do tema (FRANÇA et al., 2013).

A técnica de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), consiste em identificar substâncias resultantes da peroxidação lipídica que, quando adicionadas o ácido tiobarbitúrico (TBA) são reativas. O malondialdeído (MDA) é um biomarcador e produto secundário da peroxidação lipídica, pelo fato de ser reativo ao TBA tem fundamental relevância como indicador da peroxidação lipídica, e assim sendo do estresse oxidativo. O presente estudo demonstrou valores aumentados nos grupos hiperalimentado e subnutrido quanto ao teor de MDA ao utilizar o método de TBARS e na produção de hidroperóxidos, metodologias estas que evidenciam o aumento da peroxidação lipídica e consequente aumento do EO. Os radicais produzidos na peroxidação lipídica normalmente são aumentados durante a inflamação, o que, devido ao aumento do peso corporal e do perfil lipídico dos modelos animais deste experimento podem ser relacionados (RODRIGUES, 2007; BARBOSA et al., 2010; FRANÇA et al., 2013).

O método da avaliação da enzima superóxido dismutase, a qual é considerada a primeira linha de defesa contra os radicais superóxidos, por isto se houver a diminuição da SOD pode ocorrer um acúmulo do radical superóxido, o qual pode permitir formações de compostos extremamente reativos prejudicando os compostos antioxidantes (POWERS et al., 2008; CONCEIÇÃO et al., 2013; PEDROZA, 2015). Neste estudo, não foi observado diferença significativa entre os grupos experimentais, indicativo de que não ocorreu comprometimento da ação da SOD contra os radicais superóxidos ou a metodologia utilizada não tenha sido adequado para avaliação de outras mudanças.

Outra enzima mensurada foi a catalase, assim como, a SOD atua impedindo danos causados pelas EROS no sistema antioxidante. Sendo de fundamental importância no organismo humano pelo fato de ser inversamente proporcional a quantidade de tecido adiposo do organismo (POWERS et al., 2008; CONCEIÇÃO et al., 2013; PEDROZA, 2015). O presente trabalho obteve resultados diminuídos da atividade da enzima catalase em ambos modelos, o que pode ser explicado pelo ganho de peso destes animais, e consequentemente, pelo aumento da peroxidação lipídica. Assim, com a atividade diminuída da catalase pode haver um aumento da ação do peróxido de hidrogênio, gerando peroxidação lipídica. O resultado foi mais acentuado no grupo hiperalimentado, devido ao excesso de peso corporal semelhante ao exposto por Conceição et. al. (2013).

Diante destas considerações é possível compreender que os modelos submetidos a hiperalimentação e restrição alimentar pós-natal refletem na programação metabólica

inadequada ainda na primeira infância permanecendo até a vida adulta. Assim, é imprescindível uma nutrição adequada desde as fases iniciais da vida, já que neste trabalho os animais foram submetidos a modulações nutricionais apenas no período de lactação e após este período receberam uma dieta equilibrada para suas necessidades e na vida adulta apresentaram alterações metabólicas, corroborando uma necessidade da nutrição adequada no período crítico do desenvolvimento. Portanto, também é essencial novas investigações para melhor elucidar os mecanismos envolvidos na programação metabólica.

5. CONCLUSÃO

Em virtude do que foi mencionado pode se concluir que o modelo de hiperalimentação e restrição alimentar pós-natal foram eficazes ao induzir alterações metabólicas vistas através do peso, glicemia e perfil lipídico. Sendo o grupo H, o modelo que apresentou maior intensidade nos resultados, apresentando grande impacto na vida adulta. Os modelos animais também apresentaram eficácia na indução de alterações dos marcadores de estresse oxidativo no fígado. Nesse contexto, com o aumento das alterações metabólicas, e conseqüentemente, das DCNT, são necessárias investigações científicas que possam contribuir com estratégias de prevenção precoce das complicações causadas pela programação metabólica inadequada.

6. REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.
- AGOSTI, M. et al. Nutritional and metabolic programming during the first thousand days of life. **La Pediatria Medica e Chirurgica**, v.39, n.157, p. 58-61, 2017.
- ALMEIDA, J.M. et al. Apoio ao aleitamento materno pelos profissionais de saúde: revisão integrativa da literatura. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 33, n. 3, p. 355 – 362, 2015.
- BANERJEE, D. et al. Determination of absolut e hydrogen peroxid concentration by spectrophotometric method. **Current Science**, v.83, n.10, p.1193-1194, 2002.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytica biochemistry**, v. 72, n.2, p. 248-254, 1976.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v.52, p. 302-310, 1978.

CARON, E. et al. Alteration in neonatal nutrition causes perturbations in hypothalamic neural circuits controlling reproductive function. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 33, p. 11486-11494, 2012.

CONCEIÇÃO, E. P. S. et al. Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition-role of insulin resistance. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 81-87, 2013.

DIAS, P. C. et al. Obesidade e políticas públicas: concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro. **Cadernos de saúde pública**, v.33, n.7, p.1-12, 2017.

DIETERICH, S. et al. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end stage failing heart. **Circulation**, v.101, n.1, p. 33-39, 2000.

FERREIRA, A. L. A. et al. Síndrome metabólica: atualização de critérios diagnósticos e impacto do estresse oxidativo na patogênese. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 9, n. 1, p. 54-61, 2011.

FRANÇA, B. K. et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE jornal português de gastroenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199-206, 2013.

FRANCISQUETI, F. et al. O papel do estresse oxidativo na fisiopatologia da síndrome metabólica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 63, n.1, p.85-91, 2017.

FRANKENFELD, S. P. et al. Efeitos do treinamento em esteira em ratos adultos obesos programados pela superalimentação pós-natal. **Arquivos em movimento**, v.12, n.1, p.65-90, 2016.

GUILLOTEAU, P. et al. Adverse Effects Of Nutritional Programming During Prenatal And Early Postnatal Life, Some Aspects Of Regulation And Potential Prevention And Treatments. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 3, n. 60, p.17-35, 2009.

HABBOU, A. et al. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences. **The Journal of Nutrition**, v.143, n. 5, p. 553-562, 2013.

JUNIOR, M. D. F. et al. Postnatal early overfeeding induces cardiovascular dysfunction by oxidative stress in adult male Wistar rats. **Life sciences**, v. 226, p. 173-184, 2019.

KUMARI, R. et al. An update on metabolic syndrome: Metabolic risk markers and adipokines in the development of metabolic syndrome. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, n. 4, p.2409-2417, 2019.

MALTA, D. C. Probabilidade de morte prematura por doenças crônicas não transmissíveis, Brasil e regiões, projeções para 2025. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 22, n. 2, p. 1-13, 2019.

MARIATH, A. B. et al. Obesidade e fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis entre usuários de unidade de alimentação e nutrição. **Cadernos de saúde pública**, v.23 n.4, p.897-905, 2007.

MEDEIROS, C.C. et al. Insulin resistance and its association with metabolic syndrome components. **Arq. Bras. Cardiol**, v.97, n.5, p. 380-389, 2011.

NERY, C. S. et al. Medidas murinométricas e eficiência alimentar em ratos provenientes de ninhadas reduzidas na lactação e submetidos ou não ao exercício de natação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 1, p.49-55, 2011.

PEDROZA, A. A. S. Avaliação dos efeitos da supernutrição no período pós-natal sobre os níveis de estresse oxidativo no córtex renal de ratos jovens. Tese de Mestrado. Universidade do Extremo Sul Catarinense, p. 1-29, 2015.

PLAGEMANN, A. et al. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. **Brainresearch**, v. 836, n. 1-2, p. 146-155, 1992.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. **American Physiological Society**, v. 88, n. 4, p.1243-1276, 2008.

RINALDI, W. et al. Efeito da redução de ninhada sobre as respostas autonômicas e metabólicas de ratos Wistar. **Revista de Nutrição**, v. 25, n. 3, p.321-330, 2012.

RODRIGUES, N. R. D. Medidas de indicadores de estresse oxidativo e de remodelamento cardíaco em camundongos expostos à poluição atmosférica ambiental durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, p. 1-60, 2007.

ROSINI, T. C.; SILVA, A. S. R.; MORAES, C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 3, n. 58, p.383-387, 2012.

SINGH, A. et al. Adiponectin and Chemerin: Contrary Adipokines in Regulating Reproduction and Metabolic Disorders. **Reproductive Sciences**, v. 25, n. 10, p.1462-1473, 2018.

SOUZA, C. T. Involvement of the subclinical inflammation and oxidative stress in the obesity-associated insulin resistance. **HU Revista**, v. 44, n. 2, p.211-220, 2019.

THOLE, A. et al. Progenitor cells and TNF-alpha involvement during morphological changes in pancreatic islets of obese mice. **Tissue and Cell**, v.44, n. 4, p.238-248, 2012.

VELKOVSKA, E.; COLE, T. J.; DEAN, R. G.; BURRELL, L. M.; MORRIS, M. J. Early undernutrition leads to long-lasting reductions in body weight and adiposity whereas increased intake increases cardiac fibrosis in male rats. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 9, p. 1622- 1627, 2008.

XAVIER, J. L.P. et al. Programação Metabólica: causas e consequências. **Visão Acadêmica**, v, 16, n. 4, p.33-41, 2015.