



AVALIAÇÃO DE MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM FÍGADOS ESTEATÓTICOS DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS TRATADOS COM DIETA DE CAFETERIA

Fernando Boveto Masquetto¹, Fabiana Rodrigues Silva Gasparin², Juliana Moraes Mewes³, Emy Luiza Ishii-Iwamoto⁴, Jorgete Constantin⁵.

RESUMO: A obesidade é uma epidemia e o acúmulo de gordura no fígado dos obesos promove a esteatose hepática não alcoólica (NAFLD). O estresse oxidativo parece ser um dos fatores que contribui para a progressão da NAFLD. O objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros do estresse oxidativo em fígados esteatóticos de camundongos machos e fêmeas obesos. Os resultados apontaram para um aumento do estresse oxidativo primordialmente nas fêmeas, aparentemente mais vulneráveis às alterações no estado redox.

PALAVRAS-CHAVE: dieta de cafeteria; esteatose; estresse oxidativo.

1 INTRODUÇÃO

A obesidade acomete mais de 50% da população brasileira e é caracterizada pelo acúmulo de gordura em vários órgãos, incluindo o fígado. O acúmulo excessivo de lipídios no fígado (esteatose) e na ausência do consumo de quantidades significativas de álcool é definido como NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease). A NAFLD pode permanecer como uma condição benigna e reversível (MOORE, 2010), mas também pode progredir para quadros mais severos como a esteatohepatite, a fibrose hepática, a cirrose e até mesmo o carcinoma hepatocelular. Alguns estudos correlacionam achados clínicos e histológicos da NAFLD a parâmetros de estresse oxidativo plasmáticos e hepáticos. Sugerem que a deficiência na defesa antioxidante pode ser um fator importante na patogênese da doença (VIDELA *et al.*, 2004). Desta forma, as mitocôndrias, organelas com alta produção de EROS, espécies reativas de oxigênio, poderiam estar envolvidas na patogênese da NAFLD em fígados gordos. Considerando tais fatos, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar alterações em sistemas antioxidantes enzimáticos hepáticos e na geração de EROS em modelo de obesidade animal induzido por dieta hipercalórica em camundongos machos e fêmeas. A análise entre gêneros é justificada pelo limitado número de estudos envolvendo o gênero feminino. Os grupos receberam as dietas experimental e controle por 14 semanas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Seguindo regras do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Parecer no. 179/2014, os camundongos machos e fêmeas da linhagem Swiss, com 21 dias de idade, foram divididos em 4 grupos: cafeteria macho (CafM), controle macho (CtM), cafeteria fêmea (CafF) e controle fêmea (CtF).

Os grupos receberam as dietas experimental e controle por 14 semanas. A dieta experimental consistiu na oferta *ad libitum* de alimentos como chips, bolacha recheada, salsicha, mortadela, paçoca, marshmallow, água e refrigerante. Os animais do grupo controle receberam ração padrão (NUVITAL®) e água *ad libitum*. Avaliou-se a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) na fração citosólica de hepatócitos. Para isso, porções de fígado foram homogeneizados em meio de extração específico e o homogenato obtido foi centrifugado a 15.000 x g por 20 minutos. As atividades enzimáticas foram determinadas no sobrenadante. A atividade da CAT foi avaliada a partir da decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A atividade da GPx foi medida pelo consumo de NADPH na presença de H₂O₂. A atividade da SOD foi determinada pela inibição da oxidação do pirogalol. A produção de espécies reativas de oxigênio foi medida em mitocôndrias isoladas por centrifugação diferencial (BRACHT *et al.*, 2003) e quantificadas pela oxidação do 2,7-diclorofluoresceína-diacetato (SIQUEIRA *et al.*, 2005).

¹Acadêmico do curso de Farmácia da Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá-PR. Bolsista PIBIC/CNPq-UEM. fernandomasquetto@hotmail.com

²Professora do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá-PR. fabygasparin@hotmail.com

³Acadêmica de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá-PR. juliana.mewes@outlook.com

⁴Professora do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá-PR. eliiwamoto@uem.br

⁵Professora orientadora do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá-PR. jconstantin@uem.br



3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O estresse oxidativo foi avaliado por duas formas distintas: (a) pelo sistema enzimático (Tabela 1) e (b) por um sistema não enzimático (Tabela 2). No sistema enzimático, foram medidas as atividades de três enzimas que contribuem para o combate do estresse oxidativo, sendo elas, a catalase, a glutathiona peroxidase e a superóxido dismutase. No sistema não enzimático foi medido a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS). Na Tabela 1 consta a avaliação do sistema enzimático antioxidante dos fígados de camundongos machos e fêmeas que foram alimentados ou com a dieta padrão (controle) ou com a dieta de cafeteria. Observou-se que as atividades da catalase (CAT) e da glutathiona peroxidase (GPx) nos grupos controle foram menores nas fêmeas em comparação aos machos. Em termos numéricos, a atividade da catalase (CAT) e da glutathiona peroxidase (GPx) no grupo cafeteria foi, respectivamente, 78% e 66% menor nas fêmeas em comparação aos machos. A medida da atividade da superóxido dismutase (SOD) não mostrou diferença entre gênero ou dieta. Este comprometimento da catalase (CAT) e da glutathiona peroxidase (GPx) na neutralização de H_2O_2 pode resultar em uma maior disponibilidade de espécies reativas em fígados de fêmeas. Uma vez que a mitocôndria é a principal fonte celular de EROS, essa organela pode estar envolvida no estresse oxidativo hepático induzido pela dieta de cafeteria. A Tabela 2 mostra que os grupos cafeteria exibem maior capacidade de geração de EROS quando na ausência de inibidores da cadeia respiratória, condição na qual não foi encontrada diferença entre os sexos. Já na presença da rotenona, que estimula a produção mitocondrial de EROS, por funcionar como um inibidor da cadeia transportadora de elétrons (SALVI *et al.*, 2007), a produção de EROS foi maior em fêmeas do que em machos, tanto no grupo controle quanto no grupo cafeteria. Esses achados complementam o quadro de maior dano oxidativo celular apresentado pelas fêmeas.

Tabela 1: Atividade de enzimas antioxidantes em homogenato de fígado de camundongos machos e fêmeas alimentados com dieta padrão (controle) ou dieta de cafeteria. A atividade enzimática é expressa por mg de proteína do sobrenadante do homogenato (atividade específica). Valores expressos como média \pm EP de 6 animais por grupo. ANOVA ($P < 0,05$): G e D indicam gênero e dieta, respectivamente.

Parâmetros	Fêmea		Macho	
	Controle	Cafeteria	Controle	Cafeteria
Catalase ($\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prote\u00edna}^{-1}$)	163,4 \pm 6,08 ^G	117,4 \pm 2,9 ^G	665,2 \pm 30,28 ^G	547,7 \pm 23,6 ^{DG}
Glutathiona peroxidase ($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prote\u00edna}^{-1}$)	94,35 \pm 2,07 ^G	40,19 \pm 4,08 ^{GD}	208,1 \pm 13,42 ^G	118,8 \pm 8,2 ^{GD}
Superoxido dismutase ($\text{USOD} \times \text{mg prote\u00edna}^{-1}$)	1,72 \pm 0,128	1,80 \pm 0,20	1,607 \pm 0,18	1,817 \pm 0,20

Fonte: Elaborado pelos autores.

Tabela 2: Produção mitocondrial de EROS em fígados de camundongos machos e fêmeas alimentados com dieta padrão (controle) ou dieta de cafeteria. Rotenona (10 μM) foi adicionada para intensificar a produção de EROS. Valores expressos como média \pm EP de 6 animais por grupo. ANOVA ($P < 0,05$): G e D indicam gênero e dieta, respectivamente.

Parâmetros ($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prote\u00edna}^{-1}$)	Fêmea		Macho	
	Controle	Cafeteria	Controle	Cafeteria
Controle	0,262 \pm 0,05	0,373 \pm 0,03 ^D	0,233 \pm 0,01	0,306 \pm 0,05
Rotenona	0,313 \pm 0,02 ^G	0,419 \pm 0,02 ^{DG}	0,232 \pm 0,02 ^G	0,35 \pm 0,03 ^{DG}

4 CONCLUSÃO

A dieta de cafeteria, que é considerada hiperlipídica e altamente palatável, foi eficiente no desenvolvimento da esteatose hepática nos grupos experimentais avaliados, independente do gênero em questão. A esteatose hepática instalada a partir da obesidade induzida pela dieta de cafeteria altera, em maior proporção nas fêmeas, parâmetros de estresse oxidativo, evidenciado pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, provavelmente decorrente da diminuição da atividade do sistema enzimático antioxidante. Esses dados revelam maior vulnerabilidade dos animais fêmea na instalação da esteatose. Assim, medicamentos que combatem o



estresse oxidativo também poderiam, a princípio, contribuir para a limitação/prevenção da instalação e da progressão da esteatose hepática.

REFERÊNCIAS

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C.L. Técnica de centrifugação e fracionamento celular. In: BRACHT, A (Ed). **Métodos de Laboratório em Bioquímica**. São Paulo: Manole, 2003. p. 77-101.

MOORE, J. B. Non-alcoholic fatty liver disease: the hepatic consequence of obesity and the metabolic syndrome. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, n. 02, p. 211-220, 2010.

SALVI, M.; BATTAGLIA, V.; BRUNATI, A.M.; LA ROCCA, N.; TIBALDI, E.; PIETRANGELI, P.; MARCOCCI, L.; MONDOVI, B.; ROSSI, C.A.; TONINELLO, A. Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 33, p. 24407-24415, 2007.

SIQUEIRA, I.R.; FOCHESTATTO, C., TORRES, I.L.S.; DALMAZ, C.; NETTO, C.A. Aging affects oxidative state in hippocampus, hypothalamus and adrenal glands of Wistar rats. **Life Science**, v. 78, n. 3, p. 271-278, 2005.

VIDELA, L.A.; RODRIGO, R.; ORELLANA, M.; FERNANDEZ, V.; TAPIA, G.; QUIÑONES, L.; VARELA, N.; CONTRERAS, J.; LAZARTE, R.; CSENDES, A.; ROJAS, J.; MALUENDA, F.; BURDILES, P.; DIAZ, J.C.; SMOK, G.; THIELEMANN, L.; PONIACHIK, J. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. **Clinical Science**, v. 106, n. 3, p. 261-268, 2004.