

ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO HIPOCAMPAL EM CAMUNDONGOS C57BL/6 EXPOSTOS A DIETA REGIONAL BÁSICA E DIETA HIPERLIPÍDICA

Yatagan Moreira da Rocha

Juçara da Cruz Araújo

Lailton Oliveira da Silva

Larissa Lara de Sousa Avelino

Cristhyane Costa Aquino

Centro Universitário Fametro - UNIFAMETRO

E-mail: yataganrocha@gmail.com

Título da Sessão Temática: *Alimentos, Nutrição e Saúde*

Evento: VII Encontro de Monitoria e Iniciação Científica

RESUMO

Introdução: A existência da obesidade e de desnutrição atualmente são fatores de risco à saúde. Alterações fisiológicas (estresse oxidativo e inflamatório) e risco de comorbidades estão vinculados a esses distúrbios. As alterações promovidas pela excesso de peso ou mal nutrição são investigadas no tecido hipocampal, responsável pela memória, emoções, cognição, entre outros. **Objetivo:** Analisar o desempenho de dietas que induzem a obesidade e a desnutrição em camundongos C57BL/6, assim como verificar o estresse oxidativo no hipocampo desses animais. **Metodologia:** Trata-se de um estudo experimental em camundongos C57BL/6, durante 52 dias desde o nascimento dos animais. 3 grupos homogêneos alimentados com Dieta Hiperlipídica (DH) e Dieta Regional Básica (DRB) e controle. No 52º os animais foram eutanasiados para análise física e resultados do tecido hipocampal sobre estresse oxidativo. **Resultados e Discussão:** Ao fim do experimento, os animais foram pesados para verificação do ganho de peso desde o nascimento, o grupo DRB apresentou menor peso (200%), quando comparado ao controle (280%), enquanto o grupo DH apresentou índices de excesso de peso (625%). Em relação ao perfil oxidativo, foi observado maior produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) no grupos DH e DRB comparado ao controle, animais obesos tiveram superioridade na produção de EROs, assim como maior peroxidação lipídica. **Considerações Finais:** DH e DRB propiciam maior estresse oxidativo no hipocampo de camundongos C57BL/6, distúrbios que afetam a fisiologia desses animais, principalmente a obesidade estão correlacionadas com a maior presença de EROs hipocampal,

Palavras-chave: Estresse Oxidativo. Hipocampo. Obesidade. Desnutrição.

INTRODUÇÃO

A existência tanto de obesidade, como a de desnutrição coexistindo em comunidades atuais caracteriza a chamada “Transição Nutricional”, onde comorbidades vinculadas a esses dois distúrbios são apresentadas atualmente e são fatores de risco à saúde humana relacionados à grande consumo de alimentos ou ao baixo consumo, até mesmo a baixa nutrição de nutrientes essenciais (COUTINHO. GENTIL; TORAL, 2008).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade é caracterizada pelo acúmulo exacerbado de lipídeos, levando a alterações na pressão sanguínea, colesterol, triglicerídeos e resistência à insulina. O acúmulo de massa corporal pode gerar outras comorbidades, como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, acidente vascular encefálico, dislipidemias, entre outros (OMS, 2019).

A desnutrição refere-se a baixa ingestão ou desequilíbrios de nutrientes, existindo alguns tipos de desnutrição, na desnutrição o ser humano pode apresentar baixo desenvolvimento, assim como comprometimento imunológico e a perda de peso característica da comorbidade, o que deixa o organismo mais vulnerável a outras doenças, assim agravando o quadro do indivíduo (SAWAYA, 2006; OMS, 2018). Dados da OMS (2018) informam que mais de 400 milhões de adultos apresentam baixo peso, cerca de 45% das mortes entre crianças menores de 5 anos estão ligadas à desnutrição (OMS, 2018)

Esses dois distúrbios afetam a saúde humana de tal forma, que podem provocar respostas inflamatórias e aumento do estresse oxidativo. A hipertrofia e hiperplasia ocorridos em adipócitos (células de gordura) na obesidade, promovem a inflamação crônica sistêmica e a maior produção de citocinas (FRANCISQUETI; NASCIMENTO; CORRÊA, 2015). Portanto dietas hiperlipídicas, características da obesidade levam ao estresse oxidativo com a maior produção de radicais livres, podendo interferir na função mitocondrial de células (EFFTING *et al.*, 2019). A baixa ingesta calórica levando a desnutrição também é associado a maior perfil inflamatório e estresse oxidativo (GUSMÃO *et al.*, 2010), níveis de nutrientes antioxidantes que atuam prevenindo o estresse oxidativo são menores em pacientes desnutridos, assim promovendo maior agravamento a condição do indivíduo (GHONE, *et al.*, 2013).

Estudos em torno do hipocampo, estrutura localizada no cérebro, responsável pelas memórias, assim como regulação de emoções e cognição com a influência da obesidade e desnutrição têm sido conduzidos pelo mundo, onde em alguns resultados mostram alterações no desenvolvimento da estrutura e estresse oxidativo (CHERBUIN *et al.*, 2015; MORRISON, *et al.*, 2010).

Diante disso, o objetivo do atual estudo é analisar o desempenho de dietas que induzem a obesidade e a desnutrição em camundongos C57BL/6, assim como verificar o estresse oxidativo no hipocampo desses animais.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo experimental onde foram utilizados camundongos C57BL/6J, aclimatados no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, com livre acesso a água e comida. O Comitê de Ética do biotério da Faculdade de Medicina da UFC aprovou todos os protocolos experimentais. (Protocolo 2-2016).

Os camundongos foram acondicionados em gaiolas com no máximo 5 animais por gaiola com acesso livre a água e ração livre após o desmame. Para o experimento completo foram utilizados 46 animais. As carcaças após o descarte foram colocadas em freezer adequado e levadas ao incinerador. Para avaliar o ganho de peso, os camundongos foram pesados 3 vezes por semana, sempre no mesmo horário com o objetivo de mensurar as variações de peso que os grupos experimentais apresentavam de acordo com o protocolo adotado.

Delineamento Experimental

Camundongos recém-nascidos amamentados foram selecionados aleatoriamente para três grupos experimentais, com mães recebendo dieta regional básica (DRB) ou dieta hiperlipídica (DH), começando 10 dias após o parto. Os controles receberam a dieta padrão (CTL). No dia 21, os filhotes foram desmamados e continuaram com a dieta inicial até os 52 dias de idade.

Dietas

A DRB é moderadamente deficiente em proteínas e gorduras (82% de carboidratos, 6% de proteína, 2% de gordura), enquanto a DH é rica em lipídios (21% de carboidratos, 18% de proteínas, 60% de gordura).

Determinação de marcadores de estresse oxidativo

Os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) no hipocampo foram medidos pelo ensaio N,N-dietil-pera-fenilenodiamina (DEPPD). Foi pipetado 5 µL de hipocampo, em seguida foram adicionados a 140 µL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 4,8) a 37 ° C em uma placa de 96 poços. As amostras foram coletadas em triplicata e 100 µL da solução mista de DEPPD e sulfato ferroso na proporção de 1:25 foram adicionados a cada poço para iniciar a reação. A placa foi então incubada a 37° C, durante 5 min, e a absorbância foi medida por um leitor de placas de espectrofotometria (Biotek, Synergy HT), a 505 nm. Os níveis de EROs foram calculados a partir de uma curva de calibração e expressos como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) equivalente (1 unidade = 1,0 mg H₂O₂/L). A curva de calibração para solução padrão foi obtida calculando-se inclinações a partir de um gráfico de densidade óptica.

O ensaio de EROs ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) foi utilizado para avaliar os produtos da peroxidação lipídica, via malondialdeído (MDA). Resumidamente, 100 µL de sobrenadantes dos tecidos foram incubados à temperatura ambiente no escuro por 1 h em uma solução de TBA juntamente com butilhidroxitolueno (BHT; Sigma-Aldrich) e um catalisador (cloreto de ferro III; Sigma-Aldrich). Em seguida, as amostras foram incubadas a 95–100 °C por 60 minutos e seguidas por extração com butanol. Os sobrenadantes foram lidos em espectrofotômetro a 532 nm (Biotek, Synergy HT) e a concentração de MDA foi calculada em relação a uma curva de calibração utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Sigma-Aldrich) (intervalo: 0,1-83,5 µM). Os resultados foram expressos como M/mg de tecido hipocampal.

Estatística

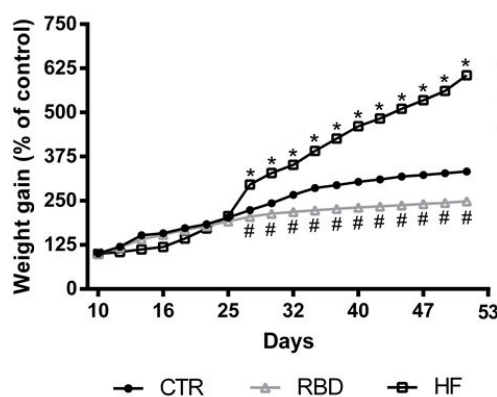
Os dados representam a média ± erro padrão da média (EPM), um mínimo de 6 animais por grupo. A análise estatística de ganho de peso e análise de Sholl foi realizada utilizando ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Dunnett. Em relação às demais abordagens experimentais, a análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn para comparações múltiplas. Todas as demandas estatísticas foram calculadas usando o GraphPad Prism 6.0. O nível de significância foi p<0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, até o 10º de vida, os filhotes começaram a receber a dieta por leite materno, após o período estabelecido, no 21º os filhotes foram colocados em desmame e retomaram a dieta inicial até o 52º dia do experimento.

Observou-se mudanças nos pesos dos animais a partir do 25º dia, onde o grupo alimentado com dieta DH apresentou maior ganho de peso (625%), em contrapartida, o grupo DRB apresentou pesagem mais baixa (200%) comparado ao grupo DH e ao controle (280%) do nascimento até o último dia de experimento (Figura 1).

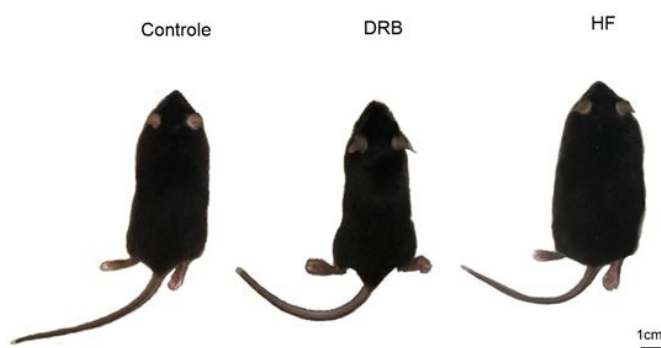
Figura 1 - Ganho de peso (%) dos camundongos após início da dieta até o sacrifício.



Fonte: Autores, 2019.

No 52º dia, houve a eutanásia dos animais e antes do procedimento, aconteceu a verificação do estado físico/nutricional, como mostrado na Figura 2. Animais expostos a dieta DRB apresentaram maiores índices de desnutrição energético proteica, onde esta alimentação apresenta baixa oferta de proteína e gorduras. O grupo submetido a DH manifestou maior concentração de adiposidade nos tecidos, consequentemente elevação do peso quando comparado ao controle.

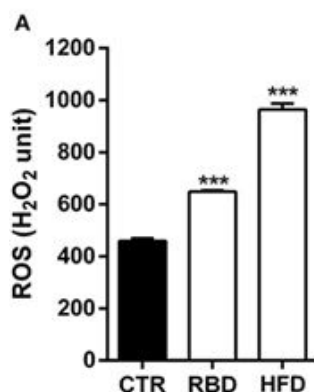
Figura 2 - Imagens da condição física em camundongos C57BL/6 após eutanásia.



Fonte: Autores, 2019.

Em relação aos parâmetros bioquímicos relacionados ao comportamento oxidativo. Houve maior produção de EROs hipocampal em animais alimentados com DH e DRB comparado ao controle. Os níveis mais altos ocorreram em camundongos obesos, reforçando a influência da comorbidade no estresse oxidativo. Todavia, animais induzidos a desnutrição também apresentam níveis elevados de EROs, maiores do que no controle, mas, menores do que DH (Figura 3).

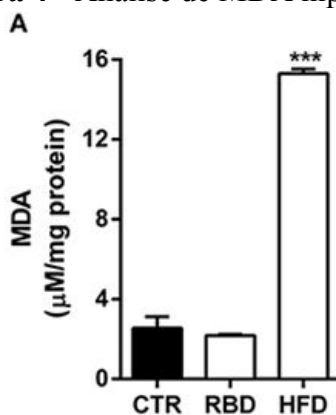
Figura 3 - Análise de EROs hipocampal.



Fonte: Autores, 2019

Acerca da peroxidação lipídica relacionada ao estresse oxidativo presente no tecido do hipocampo dos camundongos (Figura 4). Animais submetidos a DH apresentaram o maior nível de MDA e conseqüentemente maior lipoperoxidação, podendo haver danificação maior nas membranas celulares de células presente no hipocampo, ocorrendo lesões e alterações fisiológicas celulares. Em animais com DRB apresentou menor teor de MDA no hipocampo, a dieta inversamente a DH, apresenta níveis mais baixos de gordura, correlacionando o nutriente com a peroxidação lipídica em camundongos.

Figura 4 - Análise de MDA hipocampal.



Fonte: Autores, 2019

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O experimento reforça a influência da nutrição no tecido hipocampal, além da mudança da composição corporal. Dietas ricas em gorduras ou pobres em proteína propiciam maior estresse oxidativo no hipocampo de camundongos C57BL/6, distúrbios que afetam a fisiologia desses animais, principalmente a obesidade estão correlacionadas com a maior presença de EROs hipocampal, assim como maior peroxidação lipídica e dano a fisiologia celular.

REFERÊNCIAS

CHERBUIN, N., *et al.* Being overweight is associated with hippocampal atrophy: the PATH Through Life Study. **International Journal of Obesity**, v. 39, n. 10, p. 1509-1514, 2015.

COUTINHO, J. G.; GENTIL, P. C.; TORAL, N. A desnutrição e obesidade no Brasil: o enfrentamento com base na agenda única da nutrição. **Cadernos de Saúde Pública**, 24 Sup, p. 5332-5340, 2008.

EFFTING, P. S. *et al.* Exercício de resistência modula parâmetros de estresse oxidativo e conteúdo de TNF- α no coração de ratos com obesidade induzida por dieta. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 112, n.5, p. 545-532, 2019.

FRANCISQUETI, F. V.; NASCIMENTO, A. F.; CORRÊA, C. R. Obesidade, inflamação e complicações metabólicas. **Nutrire**. v. 40, n. 1, p. 81-89, 2015.

GHONE, R. A. *et al.* A Study of Oxidative Stress Biomarkers and Effect of Oral Antioxidant Supplementation in Severe Acute Malnutrition. **Journal Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 10, p. 2146-2148. 2013.

GUSMAO, M. H. L. *et al.* Desnutrição, inflamação e outros fatores de risco para doença cardiovascular em pacientes sob diálise peritoneal. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 3, p. 335-345, 2010.

MORRISON, C. D., *et al.* High fat diet increases hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in aged mice: implications for decreased Nrf2 signaling. **Journal of Neurochemistry**, v. 114, n. 6, p. 1581-1589, 2010

Organização Mundial da Saúde - OMS. **Malnutrition: Key facts**. 2018. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition>>

Organização Mundial da Saúde - OMS. **Global Health Observatory (GHO) data: Overweight and obesity**. Acessado em 1 de setembro de 2019. Disponível em <https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_text/en/>

SAWAYA, A. L. Desnutrição: conseqüências em longo prazo e efeitos da recuperação nutricional. **Estudos Avançados**, v. 20, n. 58, p. 147-158, 2006.