

## ALTERAÇÕES MITOCONDRIAS DECORRENTES DA DIETA DE CAFETERIA: COMPARATIVO ENTRE MACHOS E FÊMEAS

Mariana Amâncio Daniel da Silva (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Tiago Tomio Yoshida, Juliana Moraes Mewes, Rodrigo Polimeni Constantin, Emy Luiza Ishii-Iwamoto, Jorgete Constantin (Orientadora), e-mail: jconstantin@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Biológicas/Maringá. PR.

**Ciências Biológicas. Sub-área: Bioquímica, Metabolismo e Bioenergética.**

**Palavras-chave:** esteatose hepática, mitocôndria, estresse oxidativo.

### Resumo

Há correlação entre a esteatose hepática e o estresse oxidativo, que se caracteriza pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e pelo decréscimo nos níveis de moléculas antioxidantes. As mitocôndrias são um importante sítio de produção de EROs, tornando-se um potencial alvo neste processo. Este trabalho avaliou, comparativamente, parâmetros não enzimáticos do estresse oxidativo em mitocôndrias hepáticas de camundongos obesos machos e fêmeas. A obesidade foi induzida exogenamente pela dieta de cafeteria que, uma vez instalada, diminuiu os níveis de glutathiona reduzida em machos (-41,5%) e fêmeas (-38%). Houve diferenças entre os sexos, o conteúdo de GSH foi maior no CtF (+45,91%) em comparação ao CtM e o CafF apresentou conteúdo de GSH superior (+54,76%) ao CafM. Foi observado uma quantidade superior de grupos tióis (—SH) proteicos no CtM em relação ao CafM (+77,27%). Nas fêmeas obesas, houve aumento nos níveis de tióis (+111,26%) em relação aos seus controles. Machos e fêmeas tratados com a dieta de cafeteria apresentaram níveis elevados de TBARS (+56,12% e +45,53%, respectivamente) em relação aos controles. O mesmo padrão de resposta foi obtido para proteínas carboniladas em machos e fêmeas, no qual o CafM apresentou quantidade superior ao CtM (+64,66%) e CafF apresentou quantidade superior ao CtF (+96,83%). Os resultados indicam que a obesidade instalada alterou os parâmetros não enzimáticos do estresse oxidativo mitocondrial, promovendo alterações nas proteínas e lipídios mitocondriais em machos e em fêmeas, o que pode alterar a estrutura mitocondrial, comprometendo o funcionamento normal da organela.

### Introdução

A obesidade é uma doença que se torna cada vez mais prevalente devido aos hábitos atuais da sociedade, e está associada ao acúmulo excessivo de lipídios no fígado e alterações metabólicas que podem levar ao desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD). O acúmulo de lipídios no fígado pode gerar estresse oxidativo mitocondrial e provocar danos nesta organela, comprometendo o metabolismo celular. Sabe-se que disfunções mitocondriais estão

relacionadas com a progressão da NAFLD (VIAL et al., 2011), sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar parâmetros não enzimáticos do estresse oxidativo em mitocôndrias hepáticas isoladas de fígados esteatóticos de camundongos obesos machos e fêmeas, tratados com dieta de cafeteria, por meio da determinação do conteúdo de glutathiona reduzida, níveis de tióis proteicos, determinação do conteúdo de proteínas carboniladas e níveis de lipoperoxidação de membranas.

## Materiais e métodos

Camundongos Swiss machos e fêmeas de 21 dias foram divididos em 4 grupos experimentais: cafeteria macho (CafM); cafeteria fêmea (CafF); controle macho (CtM) e controle fêmea (CtF). Durante 14 semanas, os animais foram alimentados *ad libitum* com dieta padrão (controle) ou cafeteria, a qual inclui: bolachas recheadas, chips, paçoca, salsicha, mortadela, marshmallow e refrigerante. Mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial em meio de manitol-sacarose (BRACHT et al., 2003). O conteúdo de GSH foi medido fluorimetricamente usando o-ftalaldeído. A determinação de tióis proteicos foi realizada utilizando-se 5,5'-Ditiobis(2-Ácido Nitrobenzóico). O conteúdo de proteínas carboniladas foi determinado pelo método da 2,4-dinitrofenilhidrazina. Os níveis de peroxidação lipídica foram avaliados por meio da detecção de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), predominantemente malondialdeído (MDA). Para testes estatísticos, foi utilizada análise de variância TWO-WAY Anova e pós-teste de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

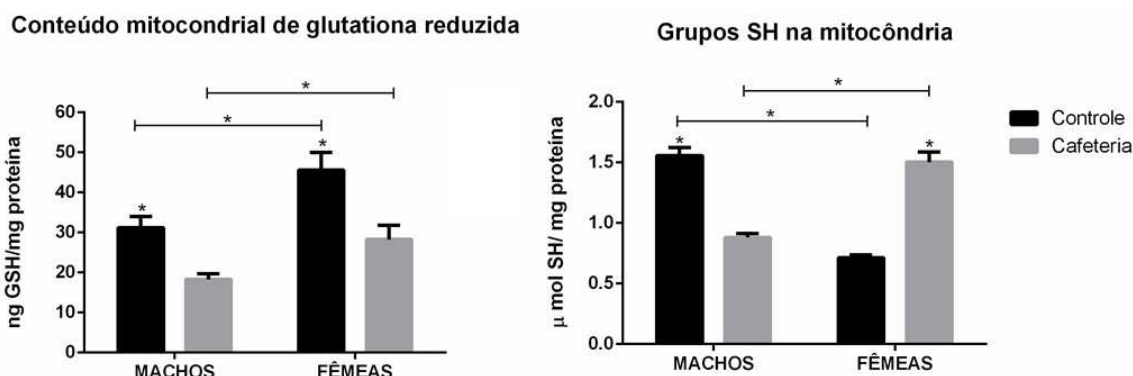
## Resultados e Discussão

A figura 1 mostra os resultados referentes ao conteúdo mitocondrial de glutathiona reduzida (GSH) e os níveis de tióis proteicos ( $-SH$ ). Observou-se uma redução no conteúdo de GSH nos grupos CafM (-41,5%) e CafF (-38%), quando comparados aos seus respectivos controles. Foram encontradas diferenças entre os sexos, já que o conteúdo de GSH foi maior no CtF (+45,91%) em comparação ao grupo CtM, sendo que a diferença aparece também nos animais tratados com a dieta de cafeteria, o CafF exibe conteúdo de GSH superior (+54,76%) ao CafM. O decréscimo no conteúdo de GSH nos animais obesos pode ser reflexo da sua maior utilização devido ao aumento na produção de EROs. O GSH é importante para o controle do estado redox celular, sua diminuição mitocondrial intensa favorece uma disfunção na organela e até promove a morte celular (FERNANDEZ-CHECA; KAPLOWITZ, 2005). Ainda na figura 1 observa-se que a obesidade promoveu alterações em grupos tióis ( $-SH$ ) proteicos, sendo que a quantidade de grupos tióis do CtM é superior ao do CafM (+77,27%). Por outro lado, nas fêmeas, a dieta de cafeteria provocou aumento nos níveis de tióis (+111,26%) em relação aos seus respectivos controles. Essa diferença entre os sexos sugere que o ambiente redox das mitocôndrias hepáticas das fêmeas obesas está diferente, já que os grupos  $-SH$  proteicos são importantes antioxidantes.

O resultado da quantificação de alterações em lipídios e proteínas mitocondriais está apresentado na figura 2. Quanto aos níveis de TBARS, o grupo CafM exibiu valores

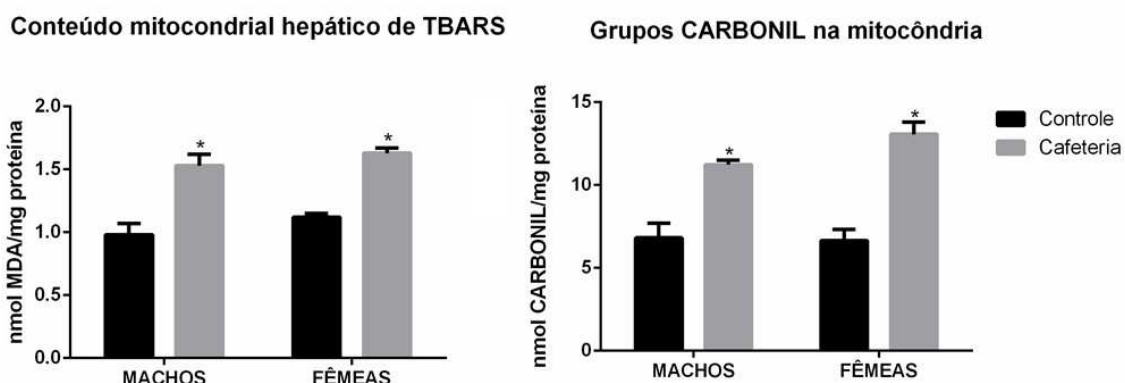
superiores (+56,12%) aos do CtM, assim como no grupo CafF, no qual os níveis de TBARS foram maiores (+45,53%) quando comparados ao CtF. Não foi observado diferenças entre os sexos.

O aumento nos níveis de TBARS correlaciona-se com uma maior disponibilidade de ácidos graxos, sendo, portanto, mais danoso nos fígados esteatóticos.



**Figura 1** – Conteúdo de glutatona reduzida (GSH) (n=9) e grupos SH (n=9), respectivamente. Os dados são apresentados como média ± erro padrão. Asteriscos (\*) indicam diferença significativas entre as dietas do mesmo sexo, enquanto as barras representam diferenças significativas entre os diferentes sexos. Teste de variância ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

Um importante problema relacionado ao aumento da lipoperoxidação diz respeito a seus produtos instáveis, que reagem com outros componentes celulares (CASTRO; GRUNE; SPECKMANN, 2016). Esses produtos podem lesionar as membranas mitocondriais alterando o metabolismo energético da organela e comprometendo suas funções. Ainda na figura 2, observou-se que o grupo CafM apresentou quantidade de proteínas carboniladas superior ao CtM (+64,66%), bem como o grupo CafF, que apresentou quantidade superior de proteínas carboniladas (+96,83%) comparado ao CtF. Não houve diferença entre os sexos.



**Figura 2** – Níveis de peroxidação lipídica (n = 10) e conteúdo de proteínas carboniladas (n = 8), respectivamente. Os dados são apresentados como média ± erro padrão. Asteriscos (\*) indicam diferença significativas entre as dietas do mesmo sexo, enquanto as barras representam diferenças significativas entre os diferentes sexos. Teste de variância ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

A carbonilação de proteínas, expressivamente superior nos animais submetidos à dieta de cafeteria, pode provocar alterações na função das mesmas, como por exemplo a perda na atividade de proteínas ligadas à resposta antioxidante (CURTIS et al., 2010), o que comprometeria a neutralização enzimática de espécies reativas de oxigênio.

## Conclusões

A obesidade causada pela dieta de cafeteria levou a alteração de diferentes parâmetros não enzimáticos do estresse oxidativo. O conteúdo superior de GSH e de grupos –SH proteicos nas fêmeas obesas, quando comparadas aos machos obesos, pode indicar um ambiente mais afetado pelo estresse oxidativo nesse sexo. Além disso, a obesidade também promoveu alterações nas proteínas mitocondriais e nos lipídios de membrana, tanto em machos quanto em fêmeas.

## Agradecimentos

CNPq, Capes e Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

## Referências

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C. L. Técnicas de centrifugação e de fracionamento celular. In: **Métodos de laboratório em bioquímica**. Manole Ltda São Paulo, p. 77-101, 2003.

CASTRO, J. P.; GRUNE, T.; SPECKMANN. The two faces of reactive oxygen species (ROS) in adipocyte function and dysfunction. **Biological Chemistry**, [s.l.], v. 397, n. 8, p.709-724, 2016.

CURTIS, J. M.; HAHN, W. S.; LONG, E. K.; BURRILL, J. S.; ARRIAGA, E. A.; BERNLOHR, D. A Protein carbonylation and metabolic control systems. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 23, n. 8, p.399-406, 2012.

FERNANDEZ-CHECA, J. C.; KAPLOWITZ, N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 204, n. 3, p. 263–273, 2005.

VIAL, G.; DUBOCHAUD, H.; COUTURIER, K.; COTTET-ROUSSELLE, C.; TALEUX, N.; ATHIAS, A.; GALINIER, A.; CASTEILLA, L.; LEVERVE, X. M. Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver. **Journal of Hepatology**, [s.l.], v. 54, n. 2, p.348-356, 2011.