

EFEITO DA IDADE SOBRE A EXPRESSÃO DOS GENES ANTIOXIDANTES SUPERÓXIDO DISMUTASE 1, CATALASE E GLUTATIONA PEROXIDASE 1 NO SANGUE TOTAL DE CÃES

Ismael Berti Ferreira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Angélica de Souza Khatlab, Beatriz Ribeiro Souza Gomes, Eliane Gasparino (Orientadora), Ricardo Souza Vasconcellos (Coorientador). E-mail: egasparino@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento conforme tabela do [CNPq/CAPES](#): Zootecnia/Genética e Melhoramento dos Animais Domésticos

Palavras-chave: animais de companhia; expressão gênica relativa; senescência

RESUMO

Nosso objetivo foi avaliar o efeito da idade dos cães sobre o peso corporal, a temperatura corporal interna, a frequência cardíaca e a expressão dos genes relacionadas a defesa antioxidante superóxido dismutase 1 (*SOD1*), catalase (*CAT*) e glutathione peroxidase 1 (*GPX1*) avaliada no sangue total. Para isso, dez cães (*Canis lupus familiaris*), com estilos de vida semelhantes, machos e fêmeas, de pequeno porte e raças diferentes com peso entre 5 e 6 kg, não aparentados, foram divididos em dois tratamentos: animais jovens ($n=5$; idade média = 4 anos), e animais idosos ($n=5$, idade média = 12 anos). Os animais foram pesados em balança veterinária e em seguida a temperatura corporal interna via retal e a frequência cardíaca foram mensuradas. Logo após, 1 mL de sangue da veia jugular foi coletado com seringa e transferido para o tubo criogênico que foi congelado em nitrogênio líquido e, armazenado em freezer a -80°C até o momento da análise de expressão gênica. Os dados foram avaliados por meio da ANOVA e, as médias foram comparadas pelo teste t de Student ($p<0,05$). Não houve efeito da idade sobre o peso corporal, a temperatura corporal interna e a frequência cardíaca dos cães jovens e idosos. Porém, os cães idosos apresentaram menor expressão dos genes *SOD1*, *CAT* e *GPX1*. Os resultados demonstram existir alterações moleculares relevantes no sistema de defesa antioxidante de cães idosos, possivelmente como consequência do envelhecimento.

INTRODUÇÃO

Os cães ocupam importante lugar na sociedade como animais de companhia e, também são considerados como importante modelo animal para pesquisas científicas, que avançaram tanto na saúde humana quanto animal. Segundo RUPLE *et al.* (2022), os cães são potenciais modelos para a identificação de fatores genéticos e ambientais, que influenciam o envelhecimento, bem como os mecanismos subjacentes que moldam a comorbidade e a mortalidade específicas da idade. Essa potencialidade do cão doméstico ser utilizado como modelo animal, está

relacionada a algumas características que incluem, o fato desta espécie ter a maior diversidade fenotípica, por compartilhar o mesmo ambiente do ser humano, ou seja, o cão é exposto aos mesmos fatores de estresse ambiental e, de estilo de vida do ser humano. Também por ter acesso a cuidados sofisticados relacionados a saúde e, por serem propensos a desenvolverem diversas alterações no organismo relacionadas a idade de forma semelhante as alterações observadas nos seres humanos, porém, em cães essas alterações relacionadas a idade ocorrem em um período de vida muito mais curto (RUPLE *et al.*, 2022).

De modo geral, o envelhecimento é definido, como a manifestação progressiva do dano celular acumulado com a idade e, é determinado por fatores ambientais e genéticos, e quase todos os aspectos do fenótipo do indivíduo sofrem modificações (ALEXANDER *et al.*, 2018). A disfunção mitocondrial é considerada como um dos principais fatores que contribuem para o envelhecimento e, o declínio funcional do organismo (MALDONADO *et al.*, 2023). Isso porque a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela mitocôndria, aumenta durante o envelhecimento, enquanto a capacidade de defesa antioxidante, principalmente aquela mediada por enzimas (exemplo: superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) torna-se reduzida com a idade, contribuindo para a manifestação do estresse oxidativo (MALDONADO *et al.*, 2023), que prejudica significativamente a função dos órgãos e, está envolvido na etiologia e patogênese de diversas doenças (ALEXANDER *et al.*, 2018). Nesse contexto, este estudo foi conduzido para avaliar se cães jovens e idosos apresentam diferenças na expressão de genes relacionados com a resposta antioxidante (superóxido dismutase 1, catalase e glutathione peroxidase 1) avaliada no sangue total.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) (processo nº 2719031023). Antes dos animais entrarem no estudo, o termo de participação consentida pelo responsável do animal, foi assinado pelos tutores dos animais. Dez cães domésticos (*Canis lupus familiaris*), com estilos de vida semelhantes, machos e fêmeas, de pequeno porte e raças diferentes com peso entre 5 e 6 kg, não aparentados foram divididos em dois tratamentos referentes a idade: jovens que incluiu cães de 2 a 4 anos de idade (n = 5, idade média 4 anos), e idosos que incluiu cães de 10 a 14 anos de idade (n = 5, idade média 12 anos). Os cães não receberam terapia medicamentosa, vacinação ou suplementação com vitaminas e, antioxidantes durante o período de duas semanas antes da coleta do sangue total.

Os animais foram pesados em balança veterinária digital, em seguida um termômetro digital para cães (Generic, BR) higienizado foi introduzido no ânus dos cães para determinar a temperatura corporal interna (TCI). A frequência cardíaca (FC) foi mensurada utilizando estetoscópio (Littmann classic III) posicionado na região torácica esquerda do animal, atrás do cotovelo. Após o posicionamento do estetoscópio no animal, foi feita a auscultação e, a contagem das batidas do coração por 60 segundos. Logo após, foi feita a assepsia no pescoço do animal com álcool 70% e, em seguida, 1 mL de sangue total foi coletado da veia jugular com seringa e imediatamente transferido para um tubo criogênico, que foi congelado em nitrogênio

líquido e armazenado posteriormente em freezer a -80°C até o momento da extração do RNA.

O RNA total foi extraído do sangue total com TRIzol (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante. O RNA total, foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrod 2000-c (Thermo Fisher Scientific), no comprimento de onda de 260 nm. A pureza e a integridade do RNA total foram determinadas por meio da razão 260/280 nm obtida no espectrofotômetro NanoDrop 2000-c. Para evitar contaminação das amostras com DNA genômico, 1 µg de RNA total foi tratado com o kit DNase I amplification grade (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, a síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada, utilizando o kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen Corporation, Brazil), seguindo as instruções do fabricante. As reações em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), foram realizadas conforme as recomendações do reagente PowerUP SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Vilnius, Lithuania) no termociclador StepOne Real Time PCR System versão 2.3 (Applied Biosystems). Os genes alvos específicos para a espécie *Canis lupus familiaris*: superóxido dismutase 1 (*SOD1*, nº de acesso: NM_001003035.1), catalase (*CAT*, nº de acesso: NM_001002984.1) e glutathione peroxidase 1 (*GPX1*, nº de acesso: NM_001115119.1) e o gene endógeno β-actina (nº de acesso: AF021873.2) também específico para esta espécie, foram desenhados com base nas sequências dos genes depositadas no National Center for Biotechnology Information. O método $2^{-\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) foi utilizado para a análise de quantificação relativa de expressão dos genes.

Os dados foram avaliados por meio da ANOVA one-way e as médias foram comparadas pelo teste t de Student ($p < 0,05$) (SAS, 2002, Inst. Inc., Cary, NC).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve efeito significativo da idade sobre o peso corporal ($p = 0,7017$), a TCI ($p = 0,1127$) e a FC ($p = 0,4561$). A idade influenciou a expressão dos genes *SOD1* ($p < 0,0001$), *CAT* ($p = 0,0129$) e *GPX1* ($p = 0,0002$) no sangue total dos cães. Os cães idosos apresentaram menor expressão desses genes do que os cães jovens (*SOD1*, 0,037 vs. 0,098 unidade arbitrária, UA, respectivamente) (*CAT*, 0,022 vs. 0,060 UA, respectivamente) e (*GPX1*, 0,155 vs. 0,653 UA, respectivamente). O mecanismo pelo qual a eficiência da resposta antioxidante dos animais idosos reduz não está totalmente elucidada. Contudo, existe a suposição de que as lesões oxidativas no DNA nuclear e mitocondrial podem modificar o padrão de expressão gênica e promover falhas na síntese de proteínas e, consequentemente alterar a função ideal do organismo o que possivelmente causa um mecanismo de feedback positivo na geração de níveis extensivos de ROS (MALDONADO *et al.*, 2023). Ainda, ZHANG; DAVIES; FORMAN (2015) sugerem que o declínio na resposta das enzimas antioxidantes, seja causado pelo declínio da eficiência da via de sinalização do fator de transcrição nuclear eritroide 2 que controla a expressão basal e indutível de centenas de enzimas antioxidantes e desintoxicantes. Embora, exista ampla diversidade no efeito da idade sobre a expressão basal de enzimas antioxidantes, existe um consenso que a capacidade de induzir estas enzimas pelos eletrófilos diminui com a idade (ZHANG; DAVIES; FORMAN, 2015).

CONCLUSÕES

A idade influencia a expressão de genes envolvidos na defesa antioxidante e, as alterações moleculares observadas no sistema de defesa antioxidante de cães idosos, possivelmente seja uma consequência normal do processo de envelhecimento. Essas alterações moleculares nos cães idosos, são frequentemente referidas como envelhecimento, e um aspecto importante desse processo biológico é o aumento do dano oxidativo.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo, a Universidade Estadual de Maringá e ao Departamento de Zootecnia pelo apoio técnico (DZO).

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, J. E.; COLYER, A.; HAYDOCK, R. M.; HAYEK, M. G.; PARK, J. Understanding how dogs age: longitudinal analysis of markers of inflammation, immune function, and oxidative stress. **J Gerontol a Biol Sci Med Sci**, v. 73, n. 6, p. 720-728, mai. 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/biomedgerontology/article-abstract/73/6/720/4555010?redirectedFrom=fulltext&login=false>. Acesso em: 10 maio 2024.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, dez. 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1046202301912629?via%3Di> hub. Acesso em: 10 maio 2024.

MALDONADO, E.; MORALES-PISON, S.; URBINA, F.; SOLARI, A. Aging hallmarks and the role of oxidative stress. **Antioxidants**, v. 12, n. 3, p. 1-37, mar. 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3921/12/3/651>. Acesso em: 10 maio 2024.

RUPLE, A.; MACLEAN, E.; SNYDER-MACKLER, N.; CREEVY, K. E.; PROMISLOW, D. Dog models of aging. **Annu Rev Anim Biosci**, v. 10, p. 419-439, out. 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8962603/>. Acesso em: 10 maio 2024.

ZHANG, H.; DAVIES, K. J. A.; FORMAN, H. J. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. **Free Radic Biol Med**, v. 88, n. Pt B, p. 314-336, jun. 2015. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4628850/>. Acesso em: 10 maio 2024.

34º Encontro Anual de Iniciação Científica
14º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



12 e 13 de novembro de 2025