



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

FACULDADE DE NUTRIÇÃO

Avaliação da recuperação nutricional com dieta à base de soja no nível da enzima glicogênio sintase em ratos desnutridos na vida intrauterina e na lactação

CAROLINE FEITOSA PEREIRA LEITE

Cuiabá-MT, Setembro de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO

Avaliação da recuperação nutricional com dieta à base de soja no nível da enzima glicogênio sintase em ratos desnutridos na vida intrauterina e na lactação

CAROLINE FEITOSA PEREIRA LEITE

Trabalho de Graduação apresentado ao Curso de Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Bacharel em Nutrição, sob orientação da professora Marise Auxiliadora de Barros Reis.

Cuiabá-MT, Setembro de 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

F311a Feitosa, Caroline.

Avaliação da recuperação nutricional com dieta à base de soja no nível da enzima glicogênio sintase em ratos desnutridos na vida intrauterina e na lactação / Caroline Feitosa. -- 2017

29 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Marise Auxiliadora de Barros Reis.

TCC (graduação em Nutrição) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Nutrição, Cuiabá, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Insulina. 2. Fígado. 3. Glicogênio sintase. 4. Glicogênio sintase fosforilada. 5. Soja. I. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO

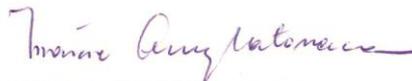
**Avaliação da recuperação nutricional com dieta à base de soja no
nível da enzima glicogênio sintase em ratos desnutridos na vida
intrauterina e na lactação**

CAROLINE FEITOSA PEREIRA LEITE

**Orientadora Profa: Marise
Auxiliadora de Barros Reis**

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA







Julgado em: 06/09/2017

RESUMO

Várias são as informações sobre os benefícios do consumo da proteína de soja que vem sendo utilizada como fonte alimentar alternativa. Entretanto, pode-se dizer que a soja reduz a ação de insulina, causa aumento da resistência a insulina e a genisteína, isoflavona presente na soja reduzir o conteúdo de glicogênio hepático e causar danos a esse órgão. Essas ações podem afetar a atividade da enzima glicogênio sintase. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a recuperação nutricional com dieta à base de farinha de soja, em ratos desnutridos na vida intrauterina, sobre os níveis proteico e de fosforilação da enzima glicogênio sintase e conteúdo de glicogênio. Para isso, foram utilizadas proles de mães alimentadas com 17% ou 6% de proteína durante a prenhez e a lactação, que foram mantidas com dietas à base de caseína (CC e RC) ou de soja (CS e RS), desde o desmame até os 90 dias de idade. As técnicas utilizadas no tecido hepático foram Coloração de PAS para determinação de glicogênio e Western Blotting para determinação da expressão proteica da enzima glicogênio sintase. Nossos resultados apontaram que a soja reduziu o peso relativo do fígado, sua síntese e alterou a distribuição do glicogênio hepático, além de reduzir a atividade da enzima glicogênio sintase. Concluímos que a redução da atividade da enzima glicogênio sintase pode estar relacionada com a redução do glicogênio hepático observado nos grupos alimentados com soja.

PALAVRAS CHAVES

Insulina; fígado; glicogênio sintase; glicogênio sintase fosforilada; soja.

ABSTRACT

Several are like information on the benefits of soy protein consumption that has been used as an alternative food source. There is a decrease in the action of insulin, an increased cause of insulin resistance and a genetic, isoflavone present in soy reduce the content of hepatic glycogen and cause damage to this organ. These actions may affect a glycogen synthase enzyme activity. On the other hand, the objective of the present study was to evaluate the nutritional recovery based on soybean meal, malnourished rats in intrauterine life, proteic and phosphorylation levels of the enzyme, content and glycogen content. Therefore, lengths of mothers fed 17% or 6% of protein during pregnancy and lactation, which have been maintained with diets based on casein (CC and RC) or soybean (CS and RS), since weaning until the 90s days of age. The techniques are not factories for the manufacture of documents for determination of histology and Western Blot for the determination of protein expression. A reduced soybean relative liver weight, a synthesis of glycogen and the distribution zones of hepatic glycogen and a phosphorylation of the enzyme glycogen synthase. Please make a comment in the literature, a soybean meal used here.

KEY WORDS

Insulin; liver; glycogen synthase; glycogen synthase phosphorylase; soy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	07
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	09
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 OBJETIVO GERAL.....	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	20
6. CONCLUSÃO	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

1. INTRODUÇÃO

O fígado, é o maior órgão sólido do organismo, representando em um adulto, em média 3,5% do peso corpóreo (1).

Anatomicamente, o fígado é dividido em dois lobos principais: o direito e o esquerdo, sendo o direito dividido nos segmentos anterior e posterior e o lobo esquerdo dividido em segmentos medial e lateral. O fígado é suprido com sangue de duas fontes: a artéria hepática e a veia porta (2).

As principais funções do fígado incluem o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeo, o armazenamento e a ativação das vitaminas e minerais, a formação e a excreção da bile, a conversão de amônia em ureia (2).

Crescentes evidências vêm indicando que o perfil enzimático e, implicitamente, a função metabólica das células dos parênquimas hepáticos são distribuídas de acordo com a sua localização no acinus (3).

A população proximal aos vasos aferentes (zona periportal) demonstrou conter maiores quantidades de enzimas gliconeogênicas, enquanto aquelas áreas adjacentes aos vasos eferentes contêm maiores quantidades de enzimas glicolíticas (3).

No tecido hepático ocorre a síntese e a degradação do glicogênio, que estão diretamente relacionadas à ação de duas enzimas, sendo a glicogênio sintetase (síntese no período alimentado) e a glicogênio fosforilase (degradação no período de jejum) (2).

As anormalidades do metabolismo da glicose nas doenças hepáticas estão ligadas a variados fatores, como resistência à insulina e hiperinsulinemia (4).

A insulina regula a homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a captação periférica de glicose. A insulina também aumenta a síntese de glicogênio e glicólise (5).

O aumento da produção hepática de glicose, resistência à insulina e redução da secreção da insulina, são três manifestações que podem ocorrer no diabetes mellitus tipo 2 (uma doença crônica não transmissível) (6). Sendo que a resistência à insulina e o diabetes melitos são características da síndrome metabólica (34).

A síndrome metabólica caracteriza-se pela resistência à insulina e pela presença de fatores de risco para doenças cardiovasculares e diabetes melito tipo 2 (uma doença crônica não transmissível) (34).

O termo “doenças crônicas” refere-se, em geral a diabetes nos seres humanos adultos. Os fatores nutricionais contribuem como fatores de risco para o desenvolvimento dessas

doenças, gerando incapacidade e morte prematura na população mundial (35). É uma consequência metabólica na vida adulta de uma má alimentação durante períodos críticos no início do desenvolvimento embrionário (34).

A Hipótese de Barker postula que determinadas estruturas dos órgãos e suas funções são programadas durante a vida embrionária e fetal. Esta programação determina o equilíbrio das respostas fisiológicas e metabólicas da vida adulta (34).

A desnutrição proteica se caracteriza como um problema de saúde pública, afetando grande parte da população mundial, principalmente em países em desenvolvimento (7).

A soja é um produto de grande interesse mundial graças à versatilidade de aplicação de seus produtos na alimentação humana e animal e ao seu valor econômico nos mercados nacional e internacional. A relação entre o consumo de soja e a saúde humana tem sido amplamente investigada pelas características nutricionais desse alimento, quer seja o elevado teor de proteína de qualidade nutricional adequada, o conteúdo significativo de minerais e fibras, ou ainda, a quantidade reduzida de gordura saturada e a ausência de colesterol (8).

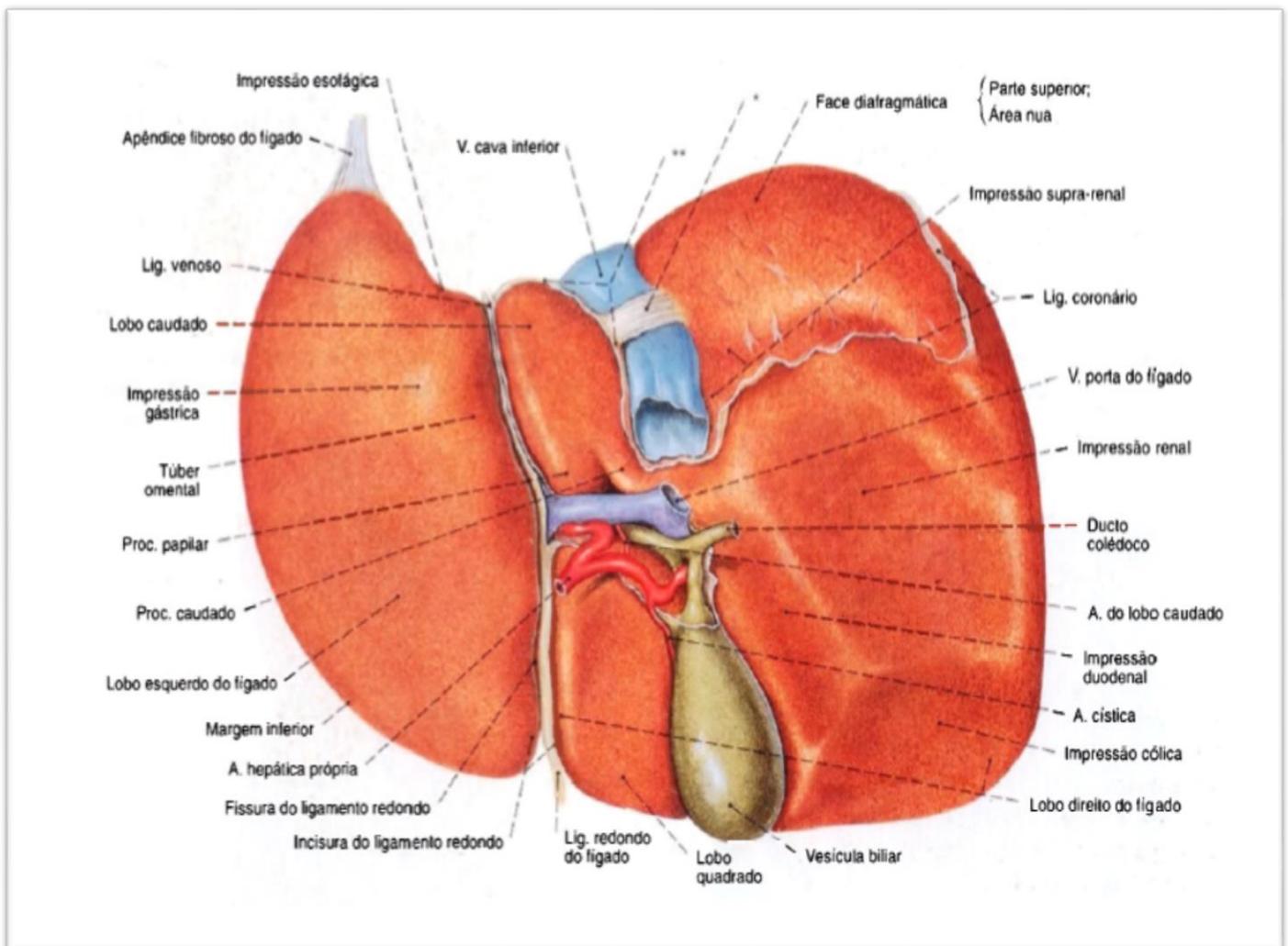
Portanto, por inúmeros benefícios da proteína de soja, ela tem sido indicada como uma alternativa alimentar para prevenir as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) e recuperar o estado nutricional de desnutridos. No entanto, o uso da farinha de soja para recuperação de animais desnutridos durante a vida uterina desencadeia resistência hepática à insulina e redução do conteúdo de glicogênio hepático. Assim, este estudo visa esclarecer o efeito da farinha de soja sobre as proteínas envolvidas na síntese de glicogênio no fígado.

3. REVISÃO DE LITERATURA

O tecido hepático apresenta uma estrutura aparentemente organizada, mas em determinados mamíferos, como humanos e roedores, apresenta-se metabolicamente heterogêneo (10).

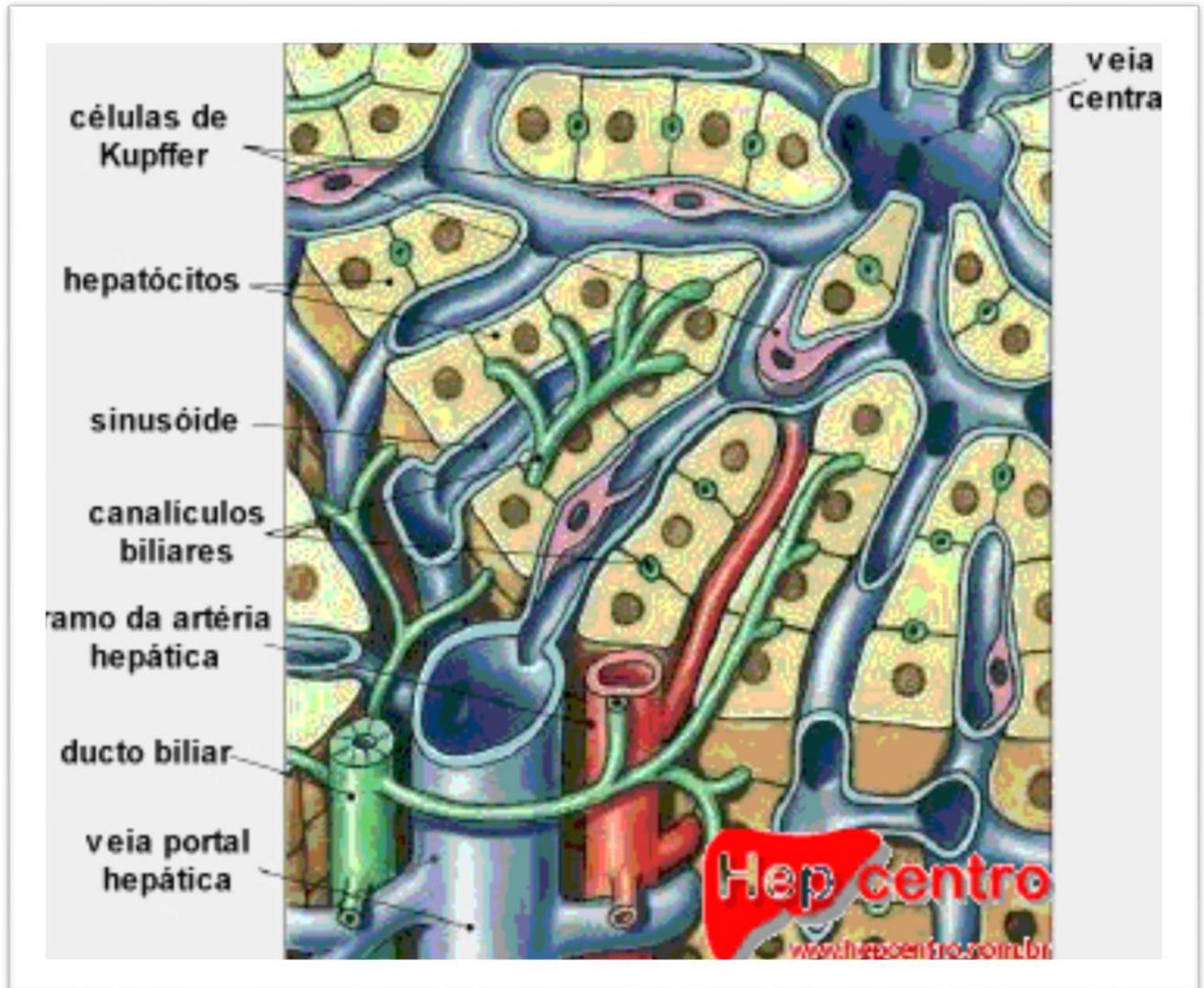
A anatomia do fígado assume características distintas, se considerados aspectos morfológicos ou funcionais. Morfologicamente, o fígado apresenta 4 lobos, sendo dois maiores e dois menores. Os dois lobos maiores, direito e esquerdo, são separados pela fissura umbilical na face inferior e pelo ligamento falciforme na face ântero-superior. Na face inferior do lobo direito, a fissura transversa ou hilar, região onde penetram no parênquima hepático os ramos da veia porta, da artéria hepática e os ductos biliares, delimita dois pequenos lobos, um anterior, conhecido como lobo quadrado e outro posterior, conhecido como lobo caudado (11) Figura 1.

Figura 1. Estrutura morfológica do tecido hepático



O lóbulo hepático é irrigado através da veia central que drena para as veias hepáticas que consequentemente drenam para a veia cava. O lóbulo hepático é composto por diversas placas celulares que se irradiam a partir da veia central. Cada placa celular hepática tem a espessura de duas células, onde nesse meio situam-se os canaliculos biliares, que drenam para os ductos biliares, que estão localizados nos septos fibrosos (12). Figura 2.

Figura 2. Lóbulo Hepático



Fonte: Sobotta – Atlas de anatomia, volume 2

As arteríolas hepáticas estão presentes nos septos fibrosos, que tem a função de fornecer sangue arterial para os tecidos septais e também drenam diretamente para os sinusoides hepáticos. Além dos hepatócitos, os sinusoides venosos são revestidos por dois outros tipos de células, as células endoteliais típicas e as células de kupffer, que são macrófagos residentes que revestem sinusoides e são capazes de fagocitar bactérias (12).

Evidências vem indicando que o perfil enzimático e, implicitamente, a função metabólica das células dos parênquimas hepáticos, é distribuída de acordo com a sua localização no ácino (3).

Histologicamente, o fígado está organizado em lóbulos e o ponto de vista fisiológico/funcional está organizado em ácinos com o fluxo sanguíneo portal e arterial a entrar nos ácinos pelas áreas portais e periportais. Os hepatócitos, que são as células destas áreas, constituem a zona 1 dos ácinos, sendo esta a zona mais irrigada e oxigenada, o que faz com que estes hepatócitos sejam mais resistentes, tenham maior capacidade de regeneração (13).

Os hepatócitos intermediários constituem a zona 2 dos ácinos e expressam um padrão enzimático misto entre os hepatócitos da zona 1 e 3. Finalmente os hepatócitos que se encontram adjacentes às veias centrais (pericentrais) constituem a zona 3 do ácino, sendo menos irrigados e portanto com menores concentrações de nutrientes e oxigênio, sendo também mais susceptíveis à lesão e tendo uma menor capacidade regenerativa (13).

No fígado, existem várias moléculas de glicose estocada como glicogênio e proteínas envolvidas no metabolismo, que podem ser modificadas de acordo com as diferentes dietas. O glicogênio pode ser transformado em glicose quando necessário (14). Quando o fígado chega perto da saturação de glicogênio, a glicose adicional é convertida em lipídios no fígado (12).

Entretanto, o hepatócito é a única célula que pode liberar glicose da célula para o sangue, a reação chamada de glicogenólise, que significa a ruptura do glicogênio armazenado para formar novamente glicose nas células (12). Tal fato é indispensável para suprir as necessidades energéticas de todas as células do organismo. Essa liberação só é possível graças à enzima glicose fosfatase, que conduz a glicogenólise para a geração de glicose livre e a manutenção desta no sangue (15).

O armazenamento do glicogênio permite ao fígado remover o excesso de glicose do sangue e armazenar para somente quando necessário devolver a glicose ao sangue, quando a concentração da glicose sanguínea começar a baixar, essa situação é denominada de função tampão da glicose do fígado (12).

Quando a função hepática está precária, a concentração da glicose sanguínea após uma refeição com carboidratos, pode aumentar duas vezes mais do que quando a função hepática está normal (12).

Para a conversão da glicose em glicogênio dentro do tecido hepático são necessárias algumas reações bioquímicas. Após a glicose entrar na célula, se liga com um radical fosfato e com o auxílio da enzima glicocinase converte em glicose-6-fosfato, que é convertida em

glicose 1- fosfato que por sua vez é convertida em uridinadifosfatoglicose, que é convertida de glicogênio (12).

O transporte de glicose ocorre por transportadores GLUT2, os quais de modo eficiente, mantêm a concentração de glicose no hepatócito na mesma proporção com que este nutriente existe na circulação sanguínea. No entanto, a glicose só poderá ser utilizada pelo tecido hepático após ser fosforilada (16).

A enzima responsável por essa reação, a glicocinase, possui baixa afinidade pela glicose, assim, o fígado só irá fosforilar e garantir a permanência da glicose dentro das células hepáticas, uma vez que haja concentração suficientemente alta de glicose na circulação. Apesar da insulina não influenciar a captação de glicose nas células hepáticas, influencia profundamente a utilização da glicose por estas células. A glicose só será utilizada pelo fígado como nutriente preferencial quando a razão insulina/glucagon for suficientemente alta para ativar a via glicolítica (16).

O hormônio glucagon ativa uma série de eventos intracelulares que leva a glicogenólise no fígado, esse mecanismo de controle que faz com que a glicose fique disponível para outros tecidos quando a concentração de glicose circulante for reduzida. As células musculares que não tem receptor para o glucagon e não podem responder diretamente ao hormônio se beneficiam indiretamente da glicose liberada pelo fígado (17).

Já a insulina é o hormônio anabólico essencial para a manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular. Esse hormônio é secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições (5).

Um dos efeitos de maior importância da insulina no tecido hepático, consiste em promover o armazenamento quase imediato no fígado da maior parte da glicose absorvida após uma refeição, sob forma de glicogênio (1).

A síntese e a degradação do glicogênio estão diretamente relacionadas à ação das enzimas glicogênio sintetase (síntese) e a glicogênio fosforilase (degradação) as quais estão sob a regulação dos hormônios insulina e glucagon. A síntese do glicogênio está relacionada com o período alimentado, que é caracterizado pela ativação da enzima glicogênio sintetase, a qual converte a glicose livre em glicogênio. Enquanto a degradação do glicogênio está relacionada com o período em jejum, o qual a enzima glicogênio fosforilase quebra o glicogênio armazenado no fígado em glicose liberando na corrente sanguínea (17).

O equilíbrio entre a síntese e a degradação do glicogênio e as velocidades desses processos dependem das atividades relativas do glicogênio sintase e da glicogênio fosforilase.

Em grande parte, as velocidades de fosforilação e desfosforilação dessas enzimas controlam a síntese e a degradação do glicogênio (17).

A glicogênio sintase é ativada pela glicose-6-fosfato (G6P), por isso, quando há uma alta demanda de AMP e baixa demanda de ATP e G6P, a glicogênio fosforilase é estimulada e a glicogênio sintase é inibida, o que favorece a degradação do glicogênio e quando tem uma alta demanda de ATP e G6P a glicogênio sintase é estimulada e a glicogênio fosforilase é inibida, favorecendo a síntese do glicogênio (17).

Esses processos são desencadeados pela ligação da insulina ao seu receptor de membrana que é altamente regulado e específico (18). O receptor de insulina (IR) é uma glicoproteína heterotetramérica, com atividade tirosina quinase intrínseca (17). A ligação da insulina induz uma alteração conformacional do receptor, que se torna capaz de autofosforilar ativando a fosforilação de resíduos em tirosina, denominados substratos do receptor de insulina (IRS) (15). O IRS-1 e o IRS-2, quando fosforilados em tirosina, se ligam e ativam proteínas, como a PI 3-quinase (PI3-K) (22).

Em passos distais da ativação do seu receptor, a insulina regula o grau de fosforilação em serina e treonina, paradoxalmente estimulando fosforilação de algumas proteínas e causando desfosforilação em outras (6). Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos protéicos em tirosina. Atualmente, alguns substratos do receptor de insulina já foram identificados. Quatro desses pertencem à família dos substratos do receptor de insulina, as proteínas IRS (5).

O receptor desse hormônio, além de ser fosforilado em tirosina, também pode ser fosforilado em serina, o que atenua a transmissão do sinal através da diminuição da capacidade do receptor em se fosforilar em tirosina após estímulo com insulina. Essas fosforilações inibitórias causam feedback negativo na sinalização insulínica e podem provocar resistência ao hormônio (5).

Como resultado ocorre fosforilação de uma serina quinase denominada Akt/PKB, que dentre outras funções, participa diretamente do transporte de glicose dependente de insulina (23,4). A Akt/PKB também catalisa a fosforilação em serina do glicogênio sintetase quinase 3 (GSK3), inativando-a e, conseqüentemente, ativando a glicogênio sintetase. O resultado dessas reações é o aumento da síntese de glicogênio (24).

A insulina estimula o acúmulo de glicogênio através do aumento do transporte de glicose no músculo e síntese de glicogênio em fígado e músculo. Este último efeito é obtido via desfosforilação da glicogênio-sintetase. Após estímulo com insulina a Akt fosforila e inativa a GSK-3, o que diminui a taxa de fosforilação da glicogênio-sintetase aumentando sua

atividade. A insulina também ativa a proteína fosfatase 1, por um processo dependente da PI 3-kinase, que desfosforila a glicogênio sintetase diretamente (5).

A restrição proteica em fases iniciais da vida produz efeitos distintos sobre o metabolismo da glicose e ação da insulina, incluindo alterações na regulação da produção de glicose hepática (21).

Os efeitos da desnutrição intra-uterina dependem da fase de desenvolvimento em que está o feto ou o órgão, sendo os efeitos tanto mais intensos e permanentes quanto mais precocemente ocorrer a desnutrição e mais tarde for iniciada a recuperação nutricional (25).

Estudos com animais mostram que a desnutrição em períodos diferentes da vida intrauterina pode resultar em recém-natos com tamanhos semelhantes, porém com alterações específicas sobre os órgãos (25).

Um conjunto de evidências sustentam que uma má nutrição desencadeia várias doenças crônicas não transmissíveis (25). Com isso a soja vem sendo utilizada como uma fonte alternativa para avaliar os seus benefícios e suas desvantagens em questão (26).

A relação entre o consumo de soja e a saúde humana tem sido amplamente investigada pelas características nutricionais desse alimento, quer seja o elevado teor de proteína de qualidade nutricional adequada, o conteúdo significativo de minerais e fibras, ou ainda, a quantidade reduzida de gordura saturada e a ausência de colesterol (26).

O valor nutritivo da soja varia de acordo com a composição de suas partes, onde 8% de seu peso correspondem à casca, sendo o restante composto por 40,2% de proteínas, 21,0% de lipídeos, 33,9% de carboidratos, 6 a 7% de fibras e 4,9% de cinzas. Observa-se que a proteína de soja contém maiores quantidades dos aminoácidos arginina e glicina, porém é deficiente em aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) quando comparada à proteína animal (8).

Em modelos de diabetes em animais e humanos, a proteína isolada da soja e seus fitoestrógenos têm demonstrado reduzir insulinemia sérica e a resistência insulínica. Em humanos obesos e animais, a soja, como fonte de proteína dietética, tem efeitos antiobesidade, (a melhora do perfil lipídico e controle glicêmico, por conseguinte favorecendo a redução ponderal) e hipocolesterolêmicos significantes (27).

A soja, considerada alimento funcional, fornece nutrientes ao organismo e benefícios para a saúde humana, sendo rica em proteínas, contém isoflavonas, fitatos, fitoesteróis, oligossacarídeos e ácidos graxos poli-insaturados, além de possuir boa quantidade de minerais como potássio, ferro, zinco cobre, magnésio e vitaminas do complexo B (9).

Portanto, visto os benefícios citados da utilização da farinha de soja, é necessário conhecer os efeitos da soja quando utilizada para recuperar ratos com desnutrição proteica intrauterina, pois estes animais podem apresentar resistência à insulina.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a recuperação nutricional com dieta à base de farinha de soja sobre o nível proteico e atividade de uma enzima relacionada a síntese de glicogênio hepático em ratos desnutridos na vida intrauterina.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar as diferenças do peso do tecido hepático entre os grupos;
- Determinar histologicamente o conteúdo de glicogênio hepático;
- Avaliar a ação da insulina sobre os níveis da proteína glicogênio sintase;
- Avaliar a ação da insulina sobre a fosforilação do glicogênio sintase.

4. MÉTODO

Este estudo foi realizado no Laboratório de Avaliação Biológica de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso.

Esse estudo foi certificado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) nº23108.123676/2015-62.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas adultas virgens, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade Albinos, ordem Rodentia Mammalia, família Muridae), com 90 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso. As ratas foram mantidas com machos da mesma linhagem, por uma noite (4 fêmeas e 1 macho), em gaiolas coletivas de polipropileno, medindo 37,0 x 31,0 x 16,0 cm, com tampa de material galvanizado. A prenhez foi confirmada pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal.

As fêmeas prenhes foram aleatoriamente divididas em 2 grupos: controle e desnutrido e receberam dietas isocalóricas à base de caseína com 17% de proteína (normoprotéica) e 6% de proteína (hipoprotéica) respectivamente, durante a prenhez e lactação. Após o nascimento, foi verificado o número de crias, o sexo e o peso corporal. No terceiro dia de vida, as ninhadas foram reduzidas a 8 filhotes, com a finalidade de padronizar as condições experimentais.

O desmame aconteceu aos 28 dias de vida e os machos recém desmamados foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos, e mantidos por mais 60 dias com as seguintes dietas:

- Grupo Controle (CC): prole de mães alimentadas com dieta normoprotéica (17%) durante a prenhez e a lactação e subsequentemente alimentada com a mesma dieta após o desmame.
- Grupo Controle-Soja (CS): prole de mães alimentadas com dieta normoprotéica durante a prenhez e a lactação e alimentada com dieta à base de farinha de soja com 17% de proteína, após o desmame.
- Grupo Recuperado com Caseína (RC): prole de mães alimentadas com dieta hipoprotéica (6%) durante a prenhez e a lactação, e recuperada com dieta normoprotéica (17%) à base de caseína após o desmame.
- Grupo Recuperado com Soja (RS): prole de mães alimentadas com dieta hipoproteica (6%) durante a prenhez e a lactação, e recuperada com dieta normoproteica (17%) à base de farinha de soja após o desmame.

Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos sob condições controladas de umidade, temperatura (24°C - 26°C), e ciclo de luz claro/escuro (12h/12h), tendo livre acesso à água e às respectivas dietas (19).

4.2 DIETAS

As dietas cujas composições encontram-se descritas no Quadro 1, foram utilizadas nas fases de prenhez, lactação e recuperação e foram preparadas no Laboratório de Avaliação Biológica de Alimentos.

O grupo controle (primeira fase) e CC e RC (segunda fase) receberam dieta à base de caseína, contendo 17% de proteína, adequada para alimentação de roedores nas fases de crescimento, prenhez e lactação, segundo as recomendações da AIN-93G (American Institute of Nutrition).

O grupo hipoprotéico foi alimentado com dieta hipoprotéica (6% de proteína), que teve a parte da caseína substituída por carboidratos, sendo mantidas as proporções de amido, amido dextrinizado e sacarose, bem como a de L-cistina em relação ao teor de caseína, e as concentrações dos demais nutrientes.

A dieta à base de farinha integral de soja seguiu as recomendações da AIN-93G, sendo a caseína, o óleo de soja e fibra, substituídos pela farinha integral de soja, e mantido em 17% o teor de proteína da dieta. Foram realizados ajustes na dieta à base de farinha integral de soja para compensar o teor de hidratos de carbono, lipídios e fibras presentes na farinha.

A farinha integral de soja micronizada e inativada foi obtida por processamento industrial (tratamento térmico, descascamento, pré-moagem e micronização), que resulta na redução do sistema enzimático e fator anti-tripsina, atingindo 80% do valor nutricional da caseína animal.

Todas as dietas foram elaboradas na forma de pó, sendo os ingredientes secos pesados em balança analítica, com precisão de 0,01 g, peneirados (malha 200) e homogeneizados. As dietas foram preparadas em quantidade suficiente para todo o estudo, acondicionadas em recipientes de polipropileno, hermeticamente fechados e armazenadas a 5 °C (19).

Quadro 1- Composição das dietas controle, hipoproteíca e à base de farinha de soja.

Ingredientes	Controle (17% proteína)	Hipoprotéica (6% proteína)	Farinha de soja (17% proteína)
Caseína (84% proteína)	202,0	71,5	-
Farinha Integral de soja	-	-	415,0
Amido de milho [§]	397,0	480,0	312,2
Amido de milho dextrinizado [§]	130,5	159,0	103,7
Sacarose	100,0	121,0	78,6
Óleo de soja	70,0	70,0	-
Fibras	50,0	50,0	40,0
Mistura mineral (AIN-93)G*	35,0	35,0	35,0
Mistura vitaminas (AIN-93)G*	10,0	10,0	10,0
L-cistina	3,0	1,0	3,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5

4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.3.1 EXTRAÇÃO DE TECIDOS PARA “IMUNOBLLOT”

Para imunoblot: Após laparotomia mediana, um fragmento do fígado foi retirado e imediatamente homogeneizado em tampão de extração para extrato total [100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 10 mmol/L EDTA, 100 mmol/L SDS 10%, 100 mmol/L pirofosfato de sódio, 100 mmol/L fluoreto de sódio e 10 mmol/L ortovanadato de sódio] usando “Polytron”. O material insolúvel foi removido e centrifugado a 11.000 rpm por 40 minutos a 4°C. A concentração de proteína foi determinada pelo método de *Bradford*.

Amostras contendo 125µg de proteína foram incubadas em tampão concentrado de Laemmli 4x e 15mg de DTT, e a corrida eletroforética, realizada em gel de policrilamida a 120 V por 30 minutos.

As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad) por 90 minutos a 120 V, em tampão contendo metanol e SDS. Para verificar a eficiência da transferência das proteínas, as membranas foram coradas com *Ponceau*. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% com solução Tris salina (10mmol Tris/l, 150 mmol NaCl/l, 0,5% Tween 20) por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação constante. Posteriormente, as membranas foram lavadas com solução Tris-salina em três sessões de 10 minutos e incubadas com anticorpos específicos (glicogênio sintase e glicogênio sintase fosforilase), sob agitação constante a 4°C “overnight”.

Novamente, as membranas foram lavadas com solução Tris-salina como descrito anteriormente e incubadas em solução contendo anticorpo secundário “anti-rabbit peroxidase” e “anti mouse” (diluição 1/5000) e 3% de albumina, por duas horas em temperatura ambiente. A detecção das proteínas foi feita por quimiluminescência (Super Signal West Pico, Pierce).

4.3.2 HISTOLOGIA DO FÍGADO

A técnica utilizada foi coloração de PAS (Ácido Periódico de Schiff) 1%. Primeiramente, foi necessário preparar o Reativo de Schiff, utilizando as seguintes soluções: H₂O destilada (192 ml), Ác. Clorídrico concentrado (8ml), Fucsina básica (0,5g), Metabissulfito de sódio (3,8g), Carvão ativado (0,5g). Seguindo o procedimento, foi dissolvida a fucsina na água adicionada de ácido clorídrico. Juntou-se o metabissulfito, agitou-se por 20 à 30 min até que a mistura estivesse límpida e de cor marrom avermelhado. O carvão ativado foi adicionado para descolorir e em seguida a solução ficou sob agitação por 2 min, passando em seguida por processo de filtração e foi armazenamento sob refrigeração.

Depois de preparado o Reativo de Schiff, a técnica de coloração foi realizada da seguinte maneira: desparafinaram e hidrataram os cortes, foram colocados no ácido periódico, durante 10 a 15 minutos em geladeira. Depois os cortes foram lavados por 5 minutos em água corrente e, em seguida em água destilada. Por fim, foi adicionado o Reativo de Schiff durante 1 hora, no escuro, à temperatura de 5-8°C e em seguida foram, lavados em água corrente por 5 a 10 minutos. Após montagem, as lâminas foram analisadas em microscópio.

4.4 ANÁLISES ESTÁTISTICAS

Os resultados foram apresentados em média e desvio padrão da média, com o número de animais indicados entre parênteses.

Ao comparar os grupos CC, CS, RC e RS, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) a dois fatores (estado nutricional e dieta). Quando necessário, essas análises foram complementadas por testes de comparações múltiplas de médias (LSD).

Todas essas análises foram precedidas do teste de Bartlett para verificar homogeneidade das variâncias. Os resultados com variâncias heterogêneas e sem distribuição normal foram inicialmente transformados (logarítmica – Log₁₀ ou Ln da variável) para correção da heterogeneidade ou anormalidade.

Em todos os casos foi estabelecido um nível de significância para a rejeição da hipótese de nulidade de 5% ($p < 0,05$).

Para análise dos resultados foi utilizado o programa “Statistica for Windows”, versão 4.3, 1993 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) (19).

5.RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram analisados dados do peso corporal absoluto, dos pesos absoluto e relativo do tecido hepático para identificar os efeitos que poderiam ser causados nos mesmos dependendo do tipo de dieta e do estado nutricional da prole (Tabela 1).

Tabela 1- Peso corporal absoluto, pesos absoluto e relativo do tecido hepático dos grupos controle caseína (CC), controle soja (CS), recuperado caseína (RC), recuperado soja (RS) de ratos com 90 dias de vida.

Variáveis	CC	CS	RC	RS
Peso corporal	293.89±73	323.88±17	325.35±15	303.62±36
Absoluto (g)	(3)	(4)	(4)	(4)
Peso absoluto do fígado (g)	17.02±0.77 ^a	12.69±0.99 ^{#c}	14.41±1.33 ^{*b}	12.35±0.88 ^{*#bc}
	(3)	(4)	(4)	(4)
Peso Relativo do fígado (%)	1.76±0.21	1.25±0.72 [#]	1.46±0.39 [*]	1.30±0.04 ^{*#}
	(3)	(4)	(4)	(4)

Os valores apresentados são a média ± desvio padrão, e o número de ratos são indicados nos parênteses. *Os valores médios foram significativamente diferentes nos ratos dos grupos controles (P<0,05, ANOVA duas vias). #Os valores médios foram significativamente diferentes dos ratos alimentados com uma dieta de caseína (P<0,05, ANOVA duas vias). Os valores médios em letras minúsculas indicam diferenças entre os grupos (P<0,05, teste LSD).

Em relação ao peso absoluto do fígado, foi observada uma interação entre a dieta e o estado nutricional, sendo que o grupo CC apresentou maior peso, o grupo RS foi semelhante ao RC e ao CS, porém o grupo RC não foi estatisticamente semelhante ao grupo CS.

Como demonstrado na tabela 1, em relação ao peso relativo, os grupos sofreram efeito do estado nutricional e da dieta, tendo os grupos alimentados com dieta à base de soja (CS e RS) o menor peso.

Estudos anteriores demonstram que a dieta de soja não apresentou acúmulo de gordura anormal em seu fígado, sendo reduzido o teor de gordura hepática, o que também poderia estar influenciando o peso desse órgão (31).

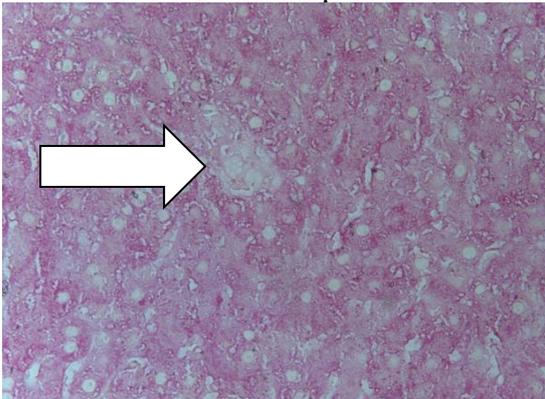
Com relação ao peso corporal absoluto, não foi observada diferença significativa entre os grupos apresentados. Tal achado também foi descrito por Gheim et al, (2009) e Reis et al, (2015).

Outro estudo apresenta uma controvérsia, que no final do período experimental os pesos corporais dos animais recuperados eram inferiores aos dos animais controles (32).

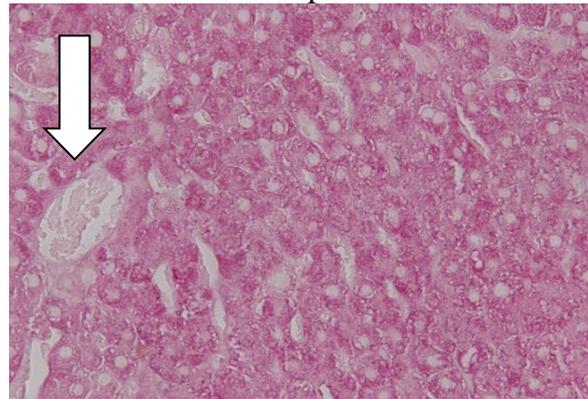
O estoque de glicogênio hepático também pode interferir no peso desse tecido, portando, avaliamos o conteúdo de glicogênio através da histologia hepática (28).

De acordo com a histologia hepática, o grupo CC (figura 3A) contém mais glicogênio, sendo que essa distribuição foi mais na zona portal. Seguindo o próximo grupo o RC (figura 3B) também apresentou mais glicogênio na zona portal, pois a lâmina apresentava mais corada na parte distante do centro lobular. Já grupo CS (figura 3C) contém um baixo conteúdo de glicogênio, sendo esses distribuídos na zona central, o mesmo aconteceu com o grupo RS (figura 3D), a concentração do glicogênio estava na zona central.

3A. Lâmina do tecido hepático CC.



3B. Lâmina do tecido hepático do RC



3C. Lâmina do tecido hepático CS



3D. Lâmina do tecido hepático RS



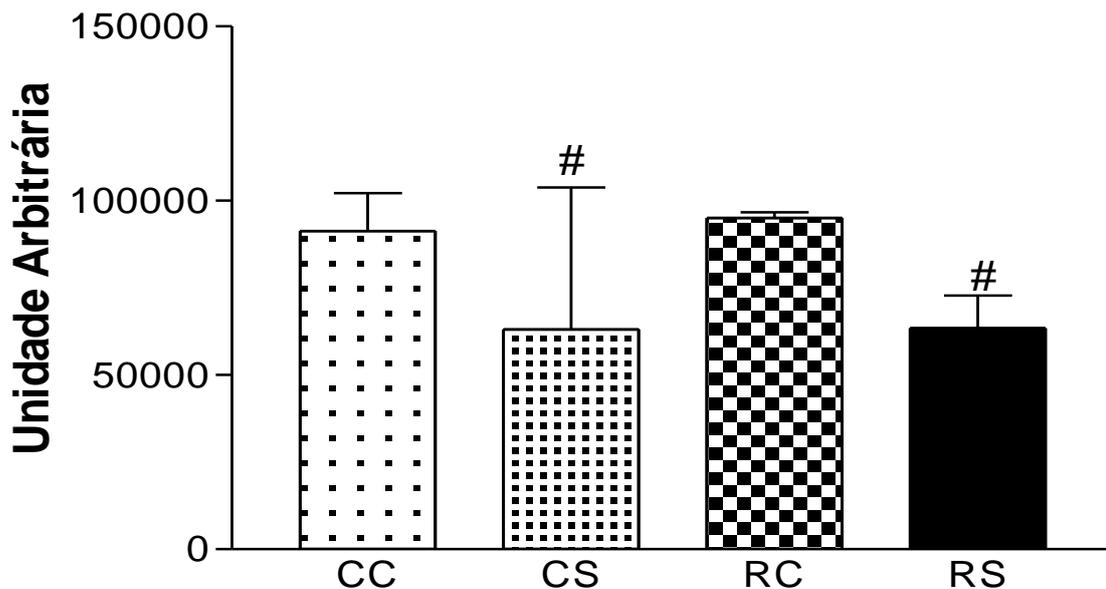
Estudos mostram que no fígado normal os hepatócitos mais intensamente corados para glicogênio estão concentrados na zona portal enquanto hepatócitos da zona central têm coloração menos intensiva. Os hepatócitos do lóbulo portal possuem uma maior também

atividade da glicose 6-fosfatase, maior nível de síntese de ureia, de ácido biliar e secreção de colesterol. Os hepatócitos da zona central são caracterizados principalmente por atuar no metabolismo do glicogênio, possuir alta atividade da glicose-6-fosfatase desidrogenase, altos níveis de glicólise, lipogênese e cetogênese (28).

Foi possível notar que os grupos CC e RC tiveram maior concentração de glicogênio que os grupos CS e RS. Portanto, os ratos que receberam na dieta como fonte proteica a caseína, estocaram maior quantidade de glicogênio do que os animais alimentados com soja, sugerindo que a soja altere a ação da enzima glicogênio sintase ou da glicogênio fosforilase.

De acordo com a técnica utilizada (Western Blotting), foi possível verificar que a expressão da glicogênio sintase sem a estimulação de insulina, foi menor nos grupos CS e RS em relação aos grupos CC e RC (Figura 4).

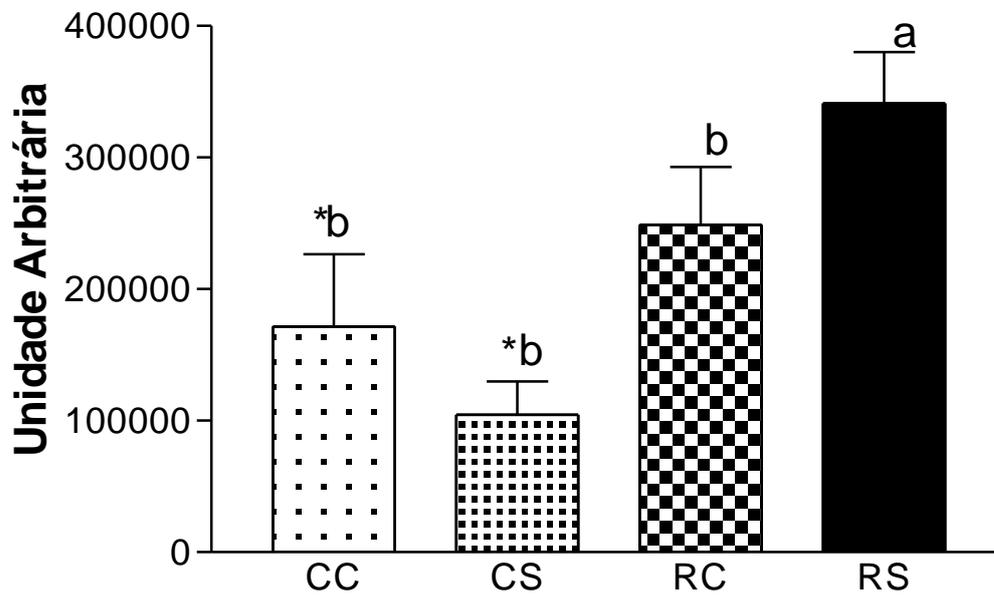
Figura 4: Expressão proteica da enzima glicogênio sintase, nos grupos CC, CS, RC, RS aos 90 dias de vida.



Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão. #Os valores médios foram significativamente diferentes dos ratos alimentados com uma dieta de caseína ($P < 0,05$, ANOVA duas vias).

Em relação a glicogênio sintase fosforilada (estimulada pela insulina), observou-se interação entre o estado nutricional e a dieta fornecida (Figura 5). Ocasionalmente um maior nível de fosforilação em RS em relação aos demais grupos. Nossos resultados mostraram a atuação da soja sobre a atividade da enzima glicogênio sintase. De acordo com a literatura, a genisteína, um componente da soja, ativa a enzima glicogênio fosforilase e inativa a enzima glicogênio sintase, ocasionando maior degradação e menor síntese de glicogênio (33).

Figura 5: Expressão proteica da enzima glicogênio sintase fosforilada, nos grupos CC, CS, RC, RS aos 90 dias de vida.



Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão. As letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$, teste LSD).

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados apontaram que a soja reduziu o peso relativo do fígado, sua síntese e alterou a distribuição do glicogênio hepático, além de reduzir a atividade da enzima glicogênio sintase. Concluimos que a redução da atividade da enzima glicogênio sintase pode estar relacionada com a redução do glicogênio hepático observado nos grupos alimentados com soja.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Zecchin HG; Carvalheira JBC, Saad MJA. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo 2004;4:574-89.
- 2-Mahan LK; Stump SE; Raymond JL. Krause, alimentos, nutrição e dietoterapia. 13ed. Elsevier editora: 2012a.
- 3- Kim SC; Joseph KATZ. Zonation of glycogen and glucose syntheses, but not glycolysis, in rat liver. Biochem J. 1988, 255: 99-104.
- 4-Zaina FE; Kowalski ELM; Lopes RW. Terapia nutricional das doenças hepáticas. 1ed. Bruma Editora: 2009a.
- 5-Carvalheira JBC; Zecchin HG; Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. Arq Bras Endocrinol Metab. 2002, 46(4): 419-425.
- 6- Luchs A. Transdução de sinal: um olhar sobre a insulina. Rev Inst Adolfo Lutz, 2006. 65(3): 157-164.
- 7- Voltarelli FA; Gobatto CA; Mello MAR. Determinação da transição metabólica através do teste do lactato mínimo em ratos desnutridos durante exercício de natação. Rev Ed Física. Maringá. 2007, 18 (1): 33-39.
- 8-Silva MS; Naves MMV; Oliveira RB; Leite OSM. Composição química e valor proteico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas. 2006, 26(3): 571-576.
- 9- Carvalho HVM. As evidências dos benefícios do consumo de isoflavonas da soja na saúde da mulher: revisão de literatura. Cienc biol Saúde. 2004, 16(4): 353-359.
- 10- Filho PJS; Carvalho ACG; Silva MAG. O mapeamento da unidade funcional hepática: uma ferramenta para diagnóstico e pesquisa. J Bras Patol Med Lab. Rio de Janeiro. 2012, 48(3): 203-2010.
- 11- Triviño T; Abib SCV. Anatomia cirúrgica do fígado. Acta Cirúrgica Brasileira. São Paulo. 2003, 18(5): 407-414.
- 12-Hall JE; Guyton. Tratado de fisiologia médica. 12ed. Elsevier editora: 2011. Rio de Janeiro.
- 13-Nunes PP; Moreira AL. Fisiologia Hepática. Porto. Portugal. 2006. 1(1) 1-26.
- 14- Hipólito M; Filho POR, Bach EE. Aspecto bioquímico em fígados de Rana catesbeiana (SHAW. 1802) submetida a diferentes dietas. Conscientiae Saúde. 2007, 6(1): 49,56.
- 15- Vieira R. Fundamentos de bioquímica: textos didáticos. 1ed. 2013a.

- 16- Malheiros SVP. Integração metabólica nos períodos pós-prandial e de jejum: um resumo. *Rev brasileira de ensino de bioquímica e biologia molecular*. 2006. 1 (c).
- 17-Voet D; Voet JG; Pratt CW. *Fundamentos de bioquímica: a vida em um nível molecular*. 2ed. Artmed editora: 2008a. Porto Alegre.
- 18- Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*. 2000 Jul; 106.
- 19- Manual para Técnicos em Laboratórios. Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), 2a ed. 1996.
- 20- Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, W. H. Freeman and Company, New York. 1995; 392-50.
- 21- Moraes AAC, Silva AL. *Soja e suas aplicações*. 3ed. Medsi Editora Médica e Científica Ltda: 2000a.
- 22- Backer JM, Myers MG Jr, Shoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, *et al*. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *Embo J*. 1992; 11:3469-79.
- 23-Mattos SS. Programação intrauterina para doenças da vida adulta. *Rev. Associação médica brasileira*. 2006, 52 (4): 187-201.
- 24- Saltiel A & Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001 Dec; 414: 799-806.
- 25-Gurmini J; Cecílio WAC; Schuler SL; Olandoski M; Noronha L. Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação. *J Bras Patol Med Lab*. 2005, 42(4): 271-278.
- 26- Silva MS; Naves MMV; Oliveira RB; Leite OSM. Composição química e valor proteico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. *Rev Cienc Tecnol Aliment*. 2006, 26(3): 571-576.
- 27- Peixoto JC; Feijó AP; Santana AB. Benefícios da soja no controle da obesidade. *Rev eletrônica novo enfoque*. 2011, 12 (12): 47-67.
- 28- Kudryavtseva MV; Sakuta GA; Skorina AD; Stein GI; Emelyanov AV; Kurdryavtsev BN. Quantitative analysis of glycogen content in hepatocytes of portal and central lobule zones of normal human liver and in patients with chronic hepatitis of different etiology. *Tissue & Cell*. 1996, 28 (3): 279-285.
- 29- Pilling J; Garside H; Ainscow E. Development of a quantitative 96-well method to image glycogen storage in primary rat hepatocytes. *Mol Cell Biochem*. 2010, 34 (1): 73-78.

- 30- Gheim LMG; Oliveira EA; Arantes VC; Veloso RV; Reis MAB; Silva MHGG; Carneiro EM; Boschero AC; Latorraca MQ. Effect of nutritional recovery with soybean flour diet on body composition, energy balance and serum leptin concentration in adult rats. *Nutrition & Metabolism*. 2009, 34 (6).
- 31- Reis SRL; Feres NH; Souza LMI; Veloso RV; Arantes VC; Reis MAB; Latorraca MQ; Botosso BL; Kawashita NH; Colodel EM. Nutritional Recovery with a Soybean Diet after Weaning Reduces Lipogenesis but Induces Inflammation in the Liver in Adult Rats Exposed to Protein Restriction during Intrauterine Life and Lactation. *Mediators Inflamm*. 2015, 2015 (1): 1-12.
- 32- Feres NH; Reis SRL; Veloso RV; Arantes VC; Souza LMI; Carneiro EM; Boschero AC; Reis MAB; Latorraca MQ. Soybean diet alters the insulin-signaling pathway in the liver of rats recovering from early-life malnutrition. *Basic Nutrition Investigation*. 2010, 26 (4): 441-448.
- 33- Keppens S. Effect of genistein on both basal and glucagon-induced levels of cAMP in rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*. 1995, 50(8): 1303-1304.
- 34-Lottenberg SA; Glezer A; Turatti LA. Síndrome metabólica: identificando fatores de risco. *Jornal de pediatria*. 2007, 83 (5): 2004-2008.
- 35- Mann J; Truswell. *Nutrição humana: volume1*. 3ed. Guanabara Koogan editor: 2009