

AValiação dos EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL SOBRE A QUIMIOSENSIBILIDADE RESPIRATÓRIA EM RATOS NEONATOS

Luana D'Arc Silva de Andrade¹; João Henrique da Costa Silva²

¹Estudante do Curso de .Nutrição- CAV – UFPE; E-mail: luanita_dc@hotmail.com, ² João Henrique da Costa Silva/pesquisador do Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte – CAV – UFPE. E-mail: joao.hcsilva@ufpe.br

Sumário: Desnutrição promove alterações respiratórias que pode estar relacionado ao desenvolvimento de doenças crônicas. Entretanto, não é esclarecido a partir de qual momento iniciam-se essas alterações. Portanto, avaliou-se a atividade respiratória de animais neonatos provenientes de mães submetidas à desnutrição proteica perinatal. Para isso, foram utilizados ratos Wistar provenientes de mães que receberam dieta normoproteica ou hipoproteica durante período perinatal. No 1º, 5º, 7º, 14º, 21º e 30º dia de vida foi avaliado na prole a frequência respiratória (FR), volume corrente (VT) e volume minuto (VE). Para comparação entre os grupos foi utilizado teste t-Student não pareado e considerado $p < 0,05$. Os dados estão expressos em média±EPM. Todos os procedimentos foram aprovados pelo CEUA/UFPE. O peso e comprimento naso-anal dos hipoproteicos é menor. Em relação aos parâmetros ventilatórios, os animais hipoproteicos apresentaram uma diminuição na FR ao 7º dia, e um aumento no 30º dia. Com relação ao VE foi observado um aumento apenas no 14º dia. Em relação ao VT observou uma diminuição no parâmetro ventilatório no 1º dia e um aumento no 14º dia. Esses dados sugerem que ratos provenientes de mães submetidas a desnutrição proteica no período perinatal, apresentam alterações no ritmo respiratório desde os primeiros dias de vida.

Palavras-chave: desnutrição proteica; quimiorreceptores respiratórios; ventilação

INTRODUÇÃO

Estudos têm sugerido que alterações na geração e/ou modulação da função respiratória, bem como desordens no mecanismo de controle reflexo da respiração, como o quimiorreflexo, podem contribuir para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis na vida adulta, como a hipertensão arterial (ZOCCAL et al., 2009; COSTA-SILVA, ZOCCAL e MACHADO, 2010; ZOCCAL e MACHADO, 2011). Neste sentido, nosso laboratório tem verificado que animais jovens (30 dias de vida) provenientes de mães submetidas a desnutrição proteica perinatal (gestação e lactação) apresentam aumento de frequência respiratória e maior quimiossensibilidade ao O₂ e CO₂, e a partir dos 90 dias apresentam um aumento significativo nos níveis basais de pressão arterial. Desta forma, tem sido sugerido que estas alterações no início da vida podem ser um fator de risco para o desenvolvimento da hipertensão arterial encontrado na vida adulta e essas modificações têm sido atribuídas a alterações na sensibilização dos quimiorreceptores e consequentemente, a uma maior resposta cardiorrespiratória durante a sua estimulação. Entretanto, não se sabe a partir de qual momento da vida esses animais começam a apresentar alterações no ritmo respiratório e no controle reflexo da ventilação, bem como não está completamente esclarecido quais são os mecanismos pelos quais a desnutrição proteica perinatal promove essas alterações. Além disso, ainda não se sabe se as alterações ventilatórias evidenciadas ocorre em animais jovens ou já é algo programado durante a embriogênese da rede neural respiratória. Sabe-se que os primeiros dias de vida

correspondem a um período crítico para maturação da rede neuronal respiratória e de sua quimiossensibilidade. . Neste sentido, torna-se relevante a compreensão dos efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre o padrão respiratório basal e a sensibilidade dos quimiorreceptores respiratórios na prole de ratos neonatos no presente trabalho, nos propomos avaliar a atividade respiratória de animais neonatos provenientes de mães submetidas à desnutrição proteica perinatal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) provenientes do biotério do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco. Todos os protocolos e procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) da UFPE (processo nº 23076.011002/2014-48).

Dietas

Para manipulação nutricional foram elaborados dois tipos de dietas: uma dieta nomeada de normoproteica (NP) contendo 17% de proteína e outra nomeada de hipoproteica (HP) contendo 8% de proteína. Ambas as dietas foram produzidas no Laboratório de Técnica Dietética do Centro Acadêmico de Vitória de acordo com American Institute of Nutrition - AIN-93 (REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993). As dietas confeccionadas são isocalóricas com alteração no conteúdo de proteína.

Indução da desnutrição proteica durante a gestação e lactação

Ratas *Wistar* com 90 dias de vida foram acasaladas com ratos na proporção de um macho para duas fêmeas. A observação da presença de espermatozoides no esfregaço vaginal foi usada para definir o 1º dia de prenhez. A partir desse momento, as ratas prenhes foram colocadas em gaiolas individuais e alocadas aleatoriamente em dois grupos: grupo normoproteico (NP, recebeu dieta contendo 17% de proteína) e grupo hipoproteico (HP, recebeu dieta com 8% de proteína) durante a gestação (21 dias) e lactação (21 dias). A prole proveniente destas fêmeas foi reduzida a oito ratos machos por ninhada após 48 horas do nascimento. Ao 22º dia de vida, ou seja, após o desmame da prole, todos os filhotes receberam dieta para animais de biotério (Labina, Purina Agribands, São Paulo, Brasil).

Medidas da ventilação pulmonar

As medidas de ventilação foram obtidas por pletismografia de corpo inteiro, em um sistema fechado (MALAN, 1973). Inicialmente, os animais foram adaptados a câmara registro por um período de 10 min, a qual era ventilada com ar ambiente neste período de aclimatação. Durante a realização de cada medida de ventilação, o fluxo de ar é interrompido e a câmara do animal permanece totalmente vedada por curtos períodos de tempo (~2 min). As oscilações causadas pela ventilação do animal são captadas por um dispositivo conectado à câmara que contém o transdutor diferencial de pressão e o amplificador de sinais (ML141 spirometer, PowerLab, ADInstruments). O sinal é então enviado para o sistema de aquisição e análise dos dados (LabChart™ Pro, PowerLab, ADInstruments). A calibração do volume é obtida durante cada experimento, injetando-se um volume conhecido de ar dentro da câmara do animal com o uso de uma seringa graduada. Sendo possível avaliar a frequência respiratória (FR), o volume corrente (VT) e a ventilação pulmonar (VE).

Ativação dos quimiorreceptores periféricos

Hipóxia hipóxica

O animal acordado e não restrito foi colocado na câmara pletismográfica inicialmente ventilada com ar atmosférico umedecido (21% O₂) para aclimatação (10 min) e logo após foram realizadas medidas de ventilação pulmonar controle. Em seguida, os animais foram

submetidos à hipóxia por 1 min e 30 segundos onde a câmara foi ventilada com uma mistura gasosa padrão umedecida contendo 7% de O₂ e as respostas respiratórias foram continuamente registradas. Após a exposição à hipóxia, a câmara foi ventilada novamente com ar atmosférico (21% O₂).

Inibição dos quimiorreceptores periféricos

Hiperóxia

O animal acordado e não restrito foi colocado na câmara pletismográfica inicialmente ventilada com ar atmosférico umedecido (21% O₂) para aclimatação (10 min) e logo após foram realizadas medidas de ventilação pulmonar controle. Em seguida, os animais foram submetidos à hiperóxia por 1 min e 30 segundos onde a câmara foi ventilada com uma mistura gasosa padrão umedecida contendo 100% de O₂ e as respostas respiratórias foram continuamente registradas. Após a exposição à hiperóxia, a câmara foi ventilada novamente com ar atmosférico (21% O₂).

Análise dos dados

Os resultados foram expressos como média ± epm (erro padrão da média). Inicialmente foi realizado o teste de normalidade e distribuição normal. Para os dados paramétricos, a comparação entre os dados do grupo NP e do grupo HP foi realizada pelo teste “*t*” de Student não pareado e para os não paramétricos foi utilizado o teste de *MannyWitney*. O nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Avaliando o peso e o comprimento corpóreo naso-anal da prole de ratos submetidos a desnutrição proteica perinatal, observamos que os animais do 1° ao 21° dia de vida apresentam um peso corpóreo baixo em relação ao grupo normoproteico. Além disso, foi visto também que no 1°, 14° e 30° dias de vida o grupo hipoproteico apresentam menor comprimento.

Em relação aos efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre a função respiratória (FR) basal, notou-se que a FR basal dos animais provenientes de mães que receberam a dieta hipoproteica, apresenta-se reduzida ao 7° dia de vida e aumentada no 30° dia, bem como uma diminuição de volume corrente (VT) no 1° dia de vida. No 14° dia, apresentam um aumento de VT associado a um aumento da ventilação pulmonar (VE) quando comparado ao grupo normoproteico.

Ao estimular os quimiorreceptores periféricos, com hipóxia, foi observado que houve uma diminuição da FR no 5° e no 7° dias de vida, porém os valores do VT foram similares em todas as idades, observou-se também uma diminuição do VE no 5° dia de vida.

Já ao inibir os quimiorreceptores periféricos, com hiperóxia, foi visto que no 30° dia de vida há uma diminuição da FR na prole que sofreu a desnutrição proteica. Associado com diminuição do VT ao 1° dia de vida e um aumento no 14° dia de vida, e diminuição do VE no 1° dia de vida.

DISCUSSÃO

Estudos do nosso laboratório relatam que a prole de ratos provenientes de mães submetidas a desnutrição proteica perinatal apresenta alterações ventilatórias aos 30 dias de vida. Sugere-se que essas alterações são capazes de promover aumento de atividade nervosa simpática (DE BRITO ALVES et al., 2014).

Neste sentido observamos que a prole de ratos provenientes de mães que receberam dieta normoproteica durante a gestação e lactação apresentam uma sincronia de FR, VT e VE. É possível observar que a partir do 14° dia de vida há uma diminuição dos parâmetros ventilatórios desses animais. Nesta fase de vida há um aumento intenso das sinapses inibitórias gabaérgicas e glicinérgicas, sugerindo que esse aumento acontece para diminuir

as predominantes sinapses glutamatérgicas, fortemente presentes durante o 1º e 7º dia de vida.

Entretanto, diferentemente do grupo normoproteico, o grupo hipoproteico a partir do 14º dia de vida apresenta um aumento do VT e do VE. Esses dados sugerem que a desnutrição é capaz de alterar a rede neuronal destes animais, possivelmente na cascata de alguns neurotransmissores e contribuir para o desenvolvimento de alterações ventilatórias observados ao longo da vida desses animais.

Em relação a estimulação e inibição dos quimiorreceptores periféricos, esses dados sugerem que ratos submetidos à desnutrição proteica durante a gestação e lactação apresentam desde a fase inicial da vida sensibilidade aos níveis de O_2 , provavelmente a desnutrição proteica altera os mecanismos periféricos envolvidos com a função respiratória.

CONCLUSÕES

Esses dados sugerem que a desnutrição proteica perinatal é capaz de alterar a maturação da rede respiratória e dos mecanismos de controle ventilatórios em ratos neonatos, afetando o padrão ventilatório destes animais desde os primeiros dias de vida.

AGRADECIMENTOS

Propesq e aos integrantes do Grupo de Pesquisa Controle Cardiorrespiratório e Plasticidade Fenotípica.

REFERÊNCIAS

COSTA-SILVA, J. H.; ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Glutamatergic antagonism in the NTS decreases post-inspiratory drive and changes phrenic and sympathetic coupling during chemoreflex activation. *J Neurophysiol*, v. 103, n. 4, p. 2095-106, Apr 2010.

DE BRITO ALVES, J. L. et al. Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O_2/CO_2 chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. *Br J Nutr*, v. 111, n. 4, p. 606-15, Feb 2014a.

MALAN A. Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. *Respir Physiol* 17, 32-44, 1973.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993.

ZOCCAL, D. B. et al. Sympathetic-mediated hypertension of awake juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia is not linked to baroreflex dysfunction. *Exp Physiol*, v. 94, n. 9, p. 972-83, Sep 2009.

ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Coupling between respiratory and sympathetic activities as a novel mechanism underpinning neurogenic hypertension. *Curr Hypertens Rep*, v. 13, n. 3, p. 229-36, Jun 2011.