



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

HECTOR GALDINO RODRIGUES

ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A  
DIFERENTES PERÍODOS DE JEJUM

FORTALEZA

2012

HECTOR GALDINO RODRIGUES

ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A  
DIFERENTES PERÍODOS DE JEJUM

Monografia submetida à Coordenação do  
Curso de Graduação em Farmácia da  
Universidade Federal do Ceará, como parte  
dos requisitos necessários para a obtenção do  
título de Farmacêutico.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Goretti  
Rodrigues de Queiroz

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

---

R613a      Rodrigues, Hector Galdino.  
            Análise dos parâmetros bioquímicos de camundongos submetidos a diferentes períodos de jejum/ Hector Galdino Rodrigues. – 2012.  
            39 f. : il.

            Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, 2012.  
            Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz.

            1. Jejum. 2. Camundongos. 3. Parâmetros bioquímicos. I. Título.

---

CDD 610.73

HECTOR GALDINO RODRIGUES

ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A  
DIFERENTES PERÍODOS DE JEJUM

Monografia submetida à Coordenação do  
Curso de Graduação em Farmácia da  
Universidade Federal do Ceará, como parte  
dos requisitos necessários para a obtenção do  
título de Farmacêutico.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/2012.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Jamile Magalhães Ferreira

Universidade Federal do Ceará (UFC)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida;

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz, por auxiliar na realização desse projeto em muitas de suas etapas;

Aos meus pais, Leônidas e Cleuma, e meu irmão, Remo, pelo apoio, formação de caráter e carinho durante todos esses anos;

A Anamaria, pela paciência nos momentos de ausência;

A Karol Oliveira, Renato Holanda, Richard Rarison, Diego Valentim, Kamilla Sousa, Giovanna Palieraqui, Nayane Sales, Aline Parente, Jamile Magalhães e Viviane Araújo, integrantes e companheiros do Laboratório de Pesquisa de Bioquímica Clínica, pela ajuda nas dosagens, manutenção dos animais e suporte durante os experimentos que levaram à concretização desse trabalho;

A Thamires Fontenele, Mariana Dantas e Daniel Freire, pela orientação durante a escrita desse trabalho, e sua constante revisão;

Aos meus amigos, pelos momentos de descontração e alegria proporcionados durante nossa convivência durante a graduação.

## RESUMO

O tempo de jejum que precede a maioria dos exames bioquímicos visa à obtenção de um resultado mais fidedigno, minimizando as chances de se dosar um analito em concentrações que não representam os valores fisiologicamente encontrados no plasma ou soro do animal. O objetivo do presente estudo foi analisar as concentrações plasmáticas dos parâmetros bioquímicos em camundongos submetidos a diferentes períodos de jejum. Dividiu-se aleatoriamente 30 camundongos machos Swiss em 5 grupos (n=6): J4, J8, J12, J19, J24 (relativo ao jejum de 4, 8, 12, 19 e 24 horas, respectivamente). Após o tempo de jejum específico de cada grupo, os animais foram anestesiados e realizou-se coleta sanguínea pelo plexo infra orbital. Depois de centrifugado, o plasma foi obtido e procederam-se às dosagens bioquímicas de glicose, colesterol total, triglicerídeos, albumina, proteínas totais, ureia, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Os resultados obtidos foram tabulados no software GraphPad Prism 5.0 e analisados estatisticamente segundo teste de ANOVA, com pós-teste de Tukey. O protocolo foi submetido ao comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) com o número 061/12. A análise dos resultados demonstrou redução significativa dos níveis de glicose em todos os grupos em relação a J4, sendo maior (54,25%) em J19; os níveis de colesterol aumentaram em relação a J4, no qual foi visto aumento de 15,64% em J24; ocorreu aumento significativo do nível de triglicerídeos em todos os grupos, em relação a J4, a partir de J12, sendo maior (532,4%) em J24; houve acréscimo de 100% nos níveis de AST em J19, comparado a J4; os níveis de ALT aumentaram 114,44% em relação a J4. O jejum prolongado depleta os níveis de glicose plasmática, e a partir daí o organismo passa a utilizar de suas reservas energéticas lipídicas para suprir o déficit glicêmico. Concomitantemente ocorre o processo de gliconeogênese no fígado, em parte pelas reações de transaminação dos aminoácidos provenientes da musculatura esquelética pelas transaminases. Dessa forma, o tempo de jejum influi de forma variável nos níveis dos parâmetros bioquímicos analisados nesses camundongos, e o período ideal deve ser o menor possível para evitar estresse aos animais.

**Palavras-chave:** jejum, camundongos, parâmetros bioquímicos.

## ABSTRACT

The fasting time preceding most biochemical assays aims to obtain a more reliable result, minimizing the chances of dosing an analyte at concentrations that do not represent the physiological values found in animal's plasma or serum. The objective of this study was to analyze the plasma concentrations of various biochemical parameters in mice under different fasting periods. The experiment was done by dividing 30 Swiss male mice into 5 groups (n = 6), J4, J8, J12, J19, J24 (relative to fast for 4, 8, 12, 19 and 24 hours respectively). After the fasting period specified to each group, the animals were anesthetized and blood collection was performed by infra orbital plexus. After centrifugation, plasma was obtained and proceeded to the biochemical measurement of glucose, total cholesterol, triglycerides, albumin, total protein, urea, AST, ALT. The results were plotted in GraphPad Prism 5.0 software and analyzed statistically according to ANOVA test followed by Tukey post-test. The protocol was submitted to the Ethics Committee for Animal Research (CEPA) with the number 061/12. The results showed significant reduction in glucose levels in all groups compared to J4, it was higher (54.25%) in J19; cholesterol levels increased slightly in comparison to J4, which increase was 15,64% in J24; a significant increase of triglyceride levels in all groups from J12, which was higher (532.4%) in J24, and there was 100% increase in AST levels in J19 compared to J4; ALT levels have increased 114.44% in relation to J4. Prolonged fasting depletes the levels of plasma glucose, and then the body starts to use its lipid energy reserves to cover the deficit glucose. Concomitantly, the process of gluconeogenesis occurs in the liver, in part by transamination reactions of amino acids from skeletal muscle by ALT and AST. Thus, the fasting time affects variably the levels of biochemical parameters in mice, and optimal fasting time should be as short as possible to avoid suffering to animals.

**Keywords:** fasting, mice, biochemical parameters.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
	1.1 Glicose.....	8
	1.2 Triglicerídeos.....	10
	1.3 Colesterol total.....	11
	1.4 Albumina.....	11
	1.5 Proteínas totais.....	12
	1.6 Ureia.....	13
	1.7 Aminotransferases hepáticas.....	14
	1.7.1 Aspartato aminotransferase (AST).....	15
	1.7.2 Alanina aminotransferase (ALT).....	15
<b>2</b>	<b>EXPERIMENTAÇÃO EM ANIMAIS: IMPORTÂNCIA.....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
	4.1 Objetivos gerais.....	19
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
	5.1 Animais.....	20
	5.2 Aspectos éticos.....	20
	5.3 Delineamento experimental.....	20
	5.4 Análise dos parâmetros bioquímicos.....	21
	5.5 Análise estatística.....	21
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
	6.1 Avaliação do perfil glicêmico dos camundongos nos diferentes tempos de jejum.....	22
	6.2 Avaliação da concentração de triglicerídeos dos camundongos nos diferentes tempos de jejum.....	23
	6.3 Avaliação da concentração de colesterol total dos camundongos nos diferentes tempos de jejum.....	24
	6.4 Avaliação da concentração de albumina dos camundongos nos diferentes tempos de jejum.....	25
	6.5 Avaliação da concentração de proteínas totais dos camundongos nos diferentes tempos de jejum.....	26

6.6	Avaliação da concentração de ureia dos camundongos nos diferentes tempos de jejum.....	27
6.7	Avaliação da atividade plasmática de AST dos camundongos nos diferentes tempos de jejum.....	28
6.8	Avaliação da atividade plasmática de ALT dos camundongos nos diferentes tempos de jejum.....	29
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>35</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>36</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As análises bioquímicas compreendem as dosagens de vários analitos, dentre eles enzimas, metabólitos e minerais sendo importantes ferramentas para auxiliar no diagnóstico e acompanhamento de diversas doenças. Como o resultado da maioria dos exames sofrem alteração devido à alimentação, sendo os exemplos mais comuns a glicemia plasmática e a dosagem de triglicerídeos, preconiza-se um período de jejum antes da coleta de sangue. O tempo é variável de acordo com o analito que se deseje quantificar e torna-se imprescindível tanto em exames laboratoriais na prática clínica quanto em protocolos experimentais desenvolvidos em pesquisa com animais.

No Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará são desenvolvidos estudos pré-clínicos em camundongos em protocolos de diabetes, dislipidemias e obesidade, além de realizar parcerias interlaboratoriais na dosagem de parâmetros bioquímicos de animais. Dentre os mais utilizados na prática clínica e que são dosados em protocolos experimentais, alguns serão exemplificados a seguir quanto a seu valor clínico, valores de referência em humanos e protocolos experimentais em animais em que o analito é dosado.

### 1.1 Glicose

Um dos parâmetros laboratoriais mais requisitados pelos médicos, de acordo com alguns estudos (CAPILHEIRA; SANTOS, 2006; BRANGER *et al.*, 1995), é o de glicemia plasmática. Este exame bioquímico pode diagnosticar o diabetes melitus, distúrbio metabólico que resulta de defeitos na secreção e na ação da insulina, sendo que a patogênese de ambos está relacionada a fatores genéticos e ambientais (BATISTA *et al.*, 2005).

São três os exames que podem ser utilizados para diagnóstico de diabetes: a glicemia de jejum (GJ), o teste oral de tolerância a glicose (TOTG) e a glicemia pós-prandial (GPP). A GJ é a mais utilizada na avaliação do controle glicêmico: reflete os valores mais baixos do dia, mas, sofre a menor variabilidade, sendo considerado método pouco sensível para avaliar o perfil da glicose plasmática durante o dia (GROSS; FERREIRA; OLIVEIRA, 2003). De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2011), o valor de referência desse teste

considera que entre 70 e 99 mg/dL o indivíduo esteja normoglicêmico; entre 100 e 125 mg/dL, haja glicemia de jejum alterada; e que acima de 126 mg/dL, desde que repetido o exame em dia diferente com resultado elevado, o diagnóstico de diabetes pode ser confirmado.

A glicemia 2 horas pós-sobrecarga e a GPP medem os picos atingidos em resposta ao teste com 75g (quantidade essa administrada em adultos não gestantes) de glicose administrado por via oral (TOTG) ou à refeição, respectivamente, e têm sido consideradas equivalentes no que diz respeito ao seu significado fisiopatológico (GROSS; FERREIRA; OLIVEIRA, 2003). Os valores considerados normais para o TOTG duas horas após o teste (SBD, 2011) são níveis abaixo de 140 mg/dL, no qual diz-se que o indivíduo é normoglicêmico; entre 140 e 200 mg/dL, considera-se uma condição de tolerância diminuída à glicose e acima de 200 mg/dL, como critério diagnóstico para diabetes.

A dosagem da glicose no sangue não constitui parâmetro eficiente para avaliação do controle da glicemia durante um intervalo de tempo prolongado. Nesse sentido, a dosagem da hemoglobina glicada (HbA1c) tem papel fundamental na monitorização do controle glicêmico em pacientes diabéticos, pois fornece informações acerca do índice retrospectivo da glicose plasmática. A grande vantagem da HbA1c está no fato de não sofrer grandes flutuações, como na dosagem da glicose plasmática, bem como estar diretamente relacionada ao risco de complicações em pacientes com DM (diabetes melitus) tipos 1 e 2 (BEM; KUNDE, 2006). Considera-se que o valor de HbA1c abaixo de 6,5% esteja dentro dos valores de referência para indivíduos normoglicêmicos (SBD, 2011).

Em relação aos protocolos laboratoriais, a diabetes é, em geral, induzida por aloxano, ferramenta farmacológica que causa destruição seletiva das células  $\beta$ -pancreáticas quando administrado em doses adequadas. O protocolo em que utiliza-se tal substância é descrito com detalhes por Dias *et al.* (2011), e envolve, em sua metodologia, a submissão dos animais a jejum de 8 a 24 horas, seguido de coleta sanguínea e dosagem da glicemia para confirmação da indução de diabetes. A estreptozotocina é agente quimioterápico que inibe a síntese de DNA das células  $\beta$ -pancreáticas, bloqueando a produção de insulina irreversivelmente (CARVALHO; CARVALHO; FERREIRA, 2003). Dessa forma, também é usada em protocolos de indução da diabetes. Quanto ao tempo de inanição, a submissão desses animais

a longos períodos de jejum pode acarretar sofrimento, quando períodos menores estressariam menos os camundongos, e os resultados não seriam comprometidos dentro desse protocolo.

## 1.2 Triglicerídeos

A dosagem de triglicerídeos é importante devido a sua relação com doenças cardiovasculares. Esse parâmetro tem utilidade clínica, contudo, as variações pré-analíticas, principalmente aquelas que dizem respeito ao paciente, como estilo de vida (obesidade, idade, consumo de álcool, estresse, sedentarismo, tabagismo, entre outros), uso de medicação (drogas hipolipemientes), doenças associadas (diabetes, hipotireoidismo, entre outras), características biológicas (intraindividual, idade, sexo e raça) são os principais responsáveis pela variabilidade dos resultados (SCHIAVO *et al.*, 2003).

Normalmente, a dosagem de triglicerídeos em animais se faz nos protocolos em que há necessidade de saber se determinada substância ou alimento possui efeito hipolipemiante. A hiperlipidemia pode ser induzida administrando-se, via intraperitoneal, Poloxamer p-407<sup>®</sup> ou Triton WR 1339, os quais promovem uma elevação significativa tanto de colesterol total quanto de triglicerídeos. Além desses agentes hiperlipemiantes, tem-se ainda alimentação com acréscimo de colesterol, cujo objetivo é elevar esse parâmetro. Um exemplo de trabalho inserido nesse contexto é o de Gonçalves *et al.* (2006), que relaciona os benefícios da berinjela na redução de triglicerídeos em animais. O trabalho de Vaydia *et al.* (2009) e o de Xie *et al.* (2006) executaram um protocolo utilizando o Poloxamer e o Triton, a fim de testar substâncias com poder hipolipemiante. No trabalho de Melo *et al.* (2009) é fornecida ração hipercalórica aos animais, para que se tornem obesos, e reflitam essa morbidade a nível bioquímico, com aumento dos níveis de triglicérides, colesterol total, glicose, dentre outros.

Em todos esses protocolos faz-se necessário a submissão dos animais a um período de jejum para melhor refletir esses parâmetros bioquímicos em níveis basais. Entretanto, a literatura científica não define com exatidão qual é o melhor período de jejum a ser seguido.

### 1.3 Colesterol

O colesterol também figura como parâmetro bioquímico importante, pois, assim como o excesso de triglicerídeos séricos, possui estreita relação com doenças de ordem cardiovascular. Transportados em lipoproteínas, estas são divididas de acordo com sua densidade: VLDL (*very low density lipoprotein*), LDL (*low density lipoprotein*), IDL (*intermediate density lipoprotein*) e HDL (*high density lipoprotein*), estando esta última responsável pelo transporte reverso de colesterol, que o leva dos tecidos para o fígado, e, dessa forma, ajuda a proteger o indivíduo contra o desenvolvimento da aterosclerose (DE BIASE *et al.*, 2007) . Há ainda os quilomícrons, estruturas responsáveis pelo transporte dos triglicerídeos oriundos da dieta ao fígado.

O colesterol corresponde ao principal componente da LDL, enquanto encontra-se em menor quantidade no VLDL e no HDL, sendo o conteúdo de VLDL majoritariamente triglicerídeos. É desejável ter baixos níveis de colesterol total e LDL na circulação sanguínea, associado a uma concentração tão alta quanto possível do colesterol na forma de HDL (SCHIAVO *et al.*, 2003).

De maneira similar, os protocolos que se utilizam da dosagem de colesterol total (ou suas frações) tem como objetivo averiguar a alteração resultante da administração de droga em animais tornados hipercolesterolêmicos por substâncias que aumentem seus níveis (Poloxamer P-407<sup>®</sup>, Triton WR-1339), e mesmo em outros protocolos relacionados, como o de diabetes, por exemplo. Os trabalhos e protocolos de Vaydia *et al.* (2009), Xie *et al.* (2006) e Melo *et al.* (2009) se aplicam a esse contexto.

### 1.4 Albumina

A albumina é sintetizada no fígado e representa 60% das proteínas presentes no plasma humano. A albumina humana é uma substância utilizada há mais de 50 anos em diferentes contextos clínicos. Esta solução coloidal é usada em pacientes graves como reposição volêmica (FALCÃO; JAPIASSU, 2011). A principal função da albumina é a manutenção da pressão osmótica coloidal tanto nos espaços vasculares como nos

extravasculares. Ela também transporta e se liga a um grande número de compostos, incluindo ácidos graxos livres, fosfolípidios, íons metálicos, aminoácidos, drogas, hormônios e bilirrubina (TIETZ *et al*, 2008).

Segundo Motta (2009), normalmente, as condições clínicas relacionadas a albumina são encontradas quando há uma baixa da concentração desse analito, condição conhecida como hipoalbuminemia, podendo ser encontrada na enfermidade hepática severa, hepatite crônica e cirrose, resultando na incapacidade dos hepatócitos em sintetizar albumina; desnutrição ou diminuição da ingestão proteica; perda através da urina (síndrome nefrótica, por exemplo) ou pela pele (queimaduras), dentre outras. Normalmente encontra-se hiperalbuminemia (altas concentrações plasmáticas de albumina) em casos de desidratação aguda.

Dosa-se albumina em protocolos que visam à observação de danos hepáticos e de sua cronicidade, pois a sua produção ocorre no fígado, e a diminuição dos seus níveis plasmáticos se deve ao declínio da função hepática.

### **1.5 Proteínas totais**

Muitas das proteínas plasmáticas apresentam papéis bioquímicos específicos sendo que suas concentrações podem ser afetadas por processos patológicos e, portanto, são determinadas na investigação de várias doenças. As mais dosadas são as presentes no sangue, urina, líquido cefalorraquidiano (LCR), líquido amniótico, peritônio ou pleural, saliva e fezes. As funções das proteínas plasmáticas consistem em transporte, manutenção da pressão oncótica, tamponamento de alterações do pH, imunidade humoral, atividade enzimática, coagulação e resposta de fase aguda (MOTTA, 2009).

Como outros parâmetros bioquímicos, a alteração na sua concentração sérica pode indicar estado patológico. Em diversas condições clínicas, encontra-se hiperproteinemia (aumento da concentração sanguínea de proteínas totais), sendo as principais a desidratação e enfermidades monoclonais, como mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenström, tumores linfoides e doença da cadeia pesada. Evidencia-se hipoproteinemia (baixa concentração plasmática de proteínas) no aumento do volume plasmático (hemodiluição,

como na cirrose, quando a ascite está presente); perda renal devido a síndrome nefrótica ou glomerulonefrite crônica, com proteinúria glomerular ou tubular, dentre outras causas (TIETZ, 2008).

Proteínas totais são dosadas em diversos protocolos animais, apesar de sua inespecificidade diagnóstica. Tal empecilho pode ser driblado dosando-se as frações proteicas específicas, a fim de se saber a qual delas se deve a alteração da concentração sérica de proteínas.

## 1.6 Ureia

Esse composto é produzido no fígado a partir da amônia resultante do metabolismo proteico, contribuindo para mais de 75% do nitrogênio não proteico eventualmente excretado. Durante o processo de catabolismo da proteína, o nitrogênio do aminoácido é convertido para ureia no fígado através pela ação das chamadas enzimas do ciclo da ureia. (TIETZ, 2008).

Segundo Motta (2009), a hiperuremia (altas concentrações plasmáticas de ureia) pode ser dividida em três causas, de acordo com o processo patológico atuante:

- Uremia pré-renal: ocorre em casos de decréscimo do fluxo sanguíneo renal, alterações no metabolismo proteico (estresse, dieta rica em proteínas) e insuficiência cardíaca. Com relação a esta última, o aumento da uréia e da creatinina sérica parece ser fator de pior prognóstico na insuficiência cardíaca; entretanto, a dosagem de uréia plasmática mostrou-se forte preditor de mortalidade (AREOSA *et al.*, 2007);
- Uremia renal: resultante da diminuição da taxa de filtração glomerular de ureia, podendo ser causada por glomerulonefrites, necrose tubular aguda, nefrite intersticial aguda, dentre outros;
- Uremia pós-renal: normalmente causada pela obstrução do trato urinário, devido a oclusão ureteral (devido a cálculos renais, por exemplo) e oclusão na saída da bexiga.

A hipouremia está relacionada, normalmente, a presença de hepatopatia grave, e, não havendo a conversão de amônia em ureia, pode haver o acúmulo da primeira no sistema nervoso central, causando encefalopatia hepática.

Apesar de ser um fraco preditor da taxa de filtração glomerular renal, devido a alta taxa de reabsorção, que pode chegar a 70%, e às variações decorrentes de dieta rica em proteínas (SODRÉ *et al.*, 2007), muitos protocolos experimentais realizados em animais quantificam esse analito em conjunto com a creatinina, a fim de averiguar a função renal. A ureia é útil, ainda, na avaliação da função hepática em conjunto com outros parâmetros bioquímicos específicos para o fígado, como as enzimas AST e ALT.

### **1.7 Aminotransferases hepáticas**

As transaminases (aminotransferases) correspondem a um importante grupo de enzimas que catalisam a transferência de um grupo amino de um aminoácido para um cetoácido. Alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase são as transaminases mais importantes no diagnóstico clínico de diversas alterações metabólicas. Possuem ampla distribuição em tecidos, especialmente cérebro, coração, rim e fígado. Neste último órgão, essas enzimas desempenham um importante papel no metabolismo de aminoácidos (BARBOSA *et al.*, 2010).

As reações catalisadas pelas aminotransferases (transaminases) exercem papéis centrais tanto na síntese como na degradação de aminoácidos. Além disso, como estas reações envolvem a interconversão dos aminoácidos a piruvato ou ácidos dicarboxílicos, atuam como uma ponte entre o metabolismo dos aminoácidos e carboidratos (MOTTA, 2009).

A dosagem dessas enzimas é realizada em protocolos animais que visam à averiguação da função hepática. Normalmente, outras enzimas, como a gama glutamil transferase (GGT) e

fosfatase alcalina (FA), e parâmetros como albumina, tempo de protrombina (TP) e bilirrubina (total, direta e indireta) ajudam a determinar a gravidade e cronicidade da lesão existente.

### 1.7.1 Aspartato aminotransferase (AST)

A AST, que catalisa a transaminação de L-aspartato e alfa-cetoglutarato em oxalacetato e glutamato, é encontrada em quase todos os tecidos (muscular esquelético cardíaco, hepático, etc.). Logo, a atividade sérica de AST não é específica para nenhum tecido, mas o músculo e o fígado podem ser considerados as maiores fontes (CÂMARA; DIAS; SOTO-BLANCO, 2007). Como a enzima está presente no interior das hemácias, amostras hemolisadas podem acusar um valor falsamente elevado desse analito, levando a falsas interpretações clínicas.

Segundo Tietz (2008), alterações na atividade plasmática dessa enzima estão relacionados, principalmente, a desordens hepáticas (na cirrose, hepatite alcoólica e em neoplasias hepáticas, observa-se a relação AST/ALT é maior que 1), cardíacas (infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva) e musculares (lesões por esmagamento, distrofia muscular progressiva).

### 1.7.2 Alanina aminotransferase (ALT)

A ALT está relacionada com a transaminação do aminoácido alanina em piruvato, que assim como a AST, é necessária para o metabolismo hepático do nitrogênio e carboidratos. A ALT é encontrada principalmente no citoplasma, e sua atividade sérica avalia melhor doença hepática que a AST (BAYNES, 2007).

Segundo Motta (2009), devido ao fato de a ALT ser encontrada no citoplasma do hepatócito e a AST ser majoritariamente mitocondrial (em torno de 80%), permite-se

conhecer diagnósticos e prognósticos de enfermidades hepáticas. Em dano hepatocelular leve a forma predominante no soro é citoplasmática, enquanto em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT.

## 2 EXPERIMENTAÇÃO EM ANIMAIS: IMPORTÂNCIA

A experimentação animal se reveste de uma importância incalculável nas pesquisas científicas, contribuindo sobremaneira para o desenvolvimento da ciência e tecnologia. Sua vasta contribuição nos diferentes campos científicos vem promovendo ao longo dos anos a descoberta de medidas profiláticas e tratamentos de inúmeras enfermidades que acometem os seres vivos (SALGADO *et al.*, 2007). A utilização de animais de laboratório em pesquisa científica tem sido de fundamental importância, não só pelos avanços que permite ao conhecimento dos mecanismos dos processos vitais, mas também ao aperfeiçoamento dos métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças tanto na medicina humana como na própria medicina veterinária (ALMEIDA *et al.*, 2008).

Linhagens de animais de experimentação, quando padronizadas, atuam como ferramentas capazes de simular as complexas interações de órgãos e sistemas, possibilitando a compreensão *in vivo* dos eventos relacionados ao desenvolvimento da doença (MELO *et al.*, 2012). Baseado nessa premissa, diversos modelos experimentais são realizados em animais, principalmente em roedores como o rato e o camundongo. Quanto a esse último, sua introdução como animal de laboratório deve-se principalmente ao fato de ser pequeno, muito prolífero, ter período de gestação curto, ser de fácil domesticação e manutenção. Logo, tornou-se o mamífero mais usado na experimentação animal (SALGADO *et al.*, 2007).

### 3 JUSTIFICATIVA

Da mesma forma que o encurtamento do tempo de jejum pode ser uma causa de erro pré-analítico, o seu prolongamento pode causar falha na análise bioquímica, principalmente na interpretação laboratorial. Ainda, a inanição prolongada costuma desencadear efeitos no animal ou paciente, tais como hipoglicemia, estresse, desidratação, acidose metabólica, fome, sede e desconforto (GUIMARAES *et al.*, 2007).

Em boa parte dos protocolos desenvolvidos em animais, no qual há dosagem de um ou vários analitos bioquímicos, respeita-se um tempo de jejum que pode variar entre 4 e 24 horas, segundo diversos autores. Sendo o jejum um dos fatores pré-analíticos mais importantes para a verificação dos valores corretos nas análises bioquímicas, a margem de erro decorrente do seu não cumprimento deve ser estabelecida. Assim, evitam-se interpretações errôneas e gastos adicionais com determinações laboratoriais, quando o procedimento não deveria ser realizado, ou ainda deveria ser realizado respeitando-se um tempo de jejum menor. Tal redução garante que o estresse causado no animal seja mínimo e o analito a ser dosado esteja em concentrações equivalentes ao tempo de inanição mais adequado.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Avaliar a influência dos tempos de 4, 8, 12, 19 e 24 horas de jejum na variação dos valores bioquímicos de glicose, colesterol total, triglicerídeos, albumina, proteínas totais, ureia, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em camundongos.

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Animais**

Foram utilizados 30 camundongos machos da espécie Swiss, de massa corporal entre 30-40 gramas, oriundos do biotério central da Universidade Federal do Ceará. Esses animais foram acondicionados em gaiolas contendo uma tela de arame quadriculado (para evitar que os animais tenham contato com suas fezes e pratiquem coprofagia durante o jejum, alterando os resultados do experimento) e mantidos sob temperatura média de  $24^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ , em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, recebendo ração padrão e água à vontade antes da execução do experimento.

### **5.2 Aspectos éticos**

O formulário contendo o delineamento experimental foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, e foi aceito sob o número de protocolo 061/12.

### **5.3 Delineamento experimental**

Os animais foram divididos em 5 grupos de 6 animais, de acordo com o período de inanição a que foram submetidos: jejum de 4 horas (J4), jejum de 8 horas (J8), jejum de 12 horas (J12), jejum de 19 horas (J19) e jejum de 24 horas (J24). No momento em que os grupos atingiram o tempo de jejum determinado, foi realizada a coleta de sangue de cada um em eppendorfs contendo heparina diluída, com o auxílio de capilar heparinizado via plexo orbital. Após a coleta, os animais foram sacrificados, e foram realizadas as dosagens bioquímicas.

#### **5.4 Análise dos parâmetros bioquímicos**

Os parâmetros bioquímicos avaliados foram: glicose, colesterol total, triglicerídeos, albumina, proteínas totais, ureia, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

Para a determinação dessas variáveis, a coleta foi realizada em microtubos do tipo Ependorff<sup>®</sup> contendo 20 µL de heparina sódica (5000 UI/mL) diluída de 1:10 em soro fisiológico. Decorrido meia hora da coleta, as amostras foram centrifugadas a 3500 RPM durante 15 minutos. Em seguida, foi retirado o plasma (sobrenadante) e congelado a -20°C para posteriores dosagens, respeitando-se a estabilidade para cada um dos analitos avaliados.

Dessa forma, os parâmetros bioquímicos foram quantificados através de kits enzimáticos colorimétricos da empresa Labtest<sup>®</sup> e Bioclin<sup>®</sup>. Para tanto, seguiu-se as recomendações dos fabricantes, utilizando espectrofotômetro semi-automático Labquest<sup>®</sup> para medida da absorbância dos produtos formados entre os reagentes e as amostras utilizadas.

Todas as análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

#### **5.5 Análise estatística**

A comparação entre as médias dos parâmetros estudados foram realizadas com a utilização do software GraphPad Prism 5.0, aplicando-se o teste t ou a análise de variância (ANOVA) e pós teste de Tukey, cujo critério de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

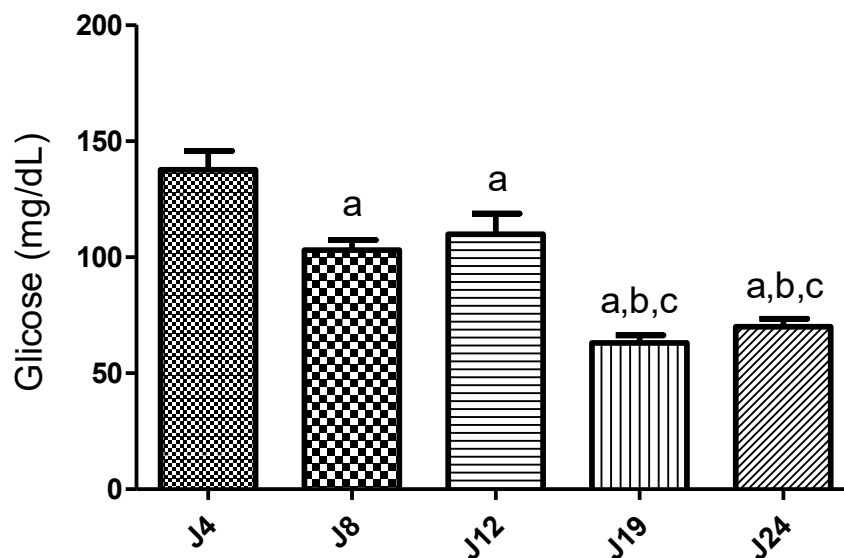
## 6 RESULTADOS

Após a determinação da concentração plasmática e atividade enzimática dos parâmetros bioquímicos e de sua análise estatística, os valores foram plotados em gráficos, e serão demonstrados a seguir.

### 6.1 Avaliação do perfil glicêmico dos camundongos nos diferentes tempos de jejum.

Os resultados mostram que há diminuição dos níveis glicêmicos conforme aumenta o tempo de jejum, sendo essa queda mais acentuada a partir da décima segunda hora de abstinência alimentar. A redução da glicose plasmática foi significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos em relação a J4. Os grupos J19 ( $63,0 \pm 8,25$ ) e J24 ( $80,0 \pm 8,44$ ) tiveram seus níveis glicêmicos menores do que os dos grupos J8 ( $103 \pm 10,73$ ) e J12 ( $109,8 \pm 21,89$ ). Os valores expressos indicam a concentração média de glicose nos grupos, em miligramas por decilitro (mg/dL) (Gráfico 1).

**Gráfico 1. Concentração plasmática de glicose nos grupos experimentais.**

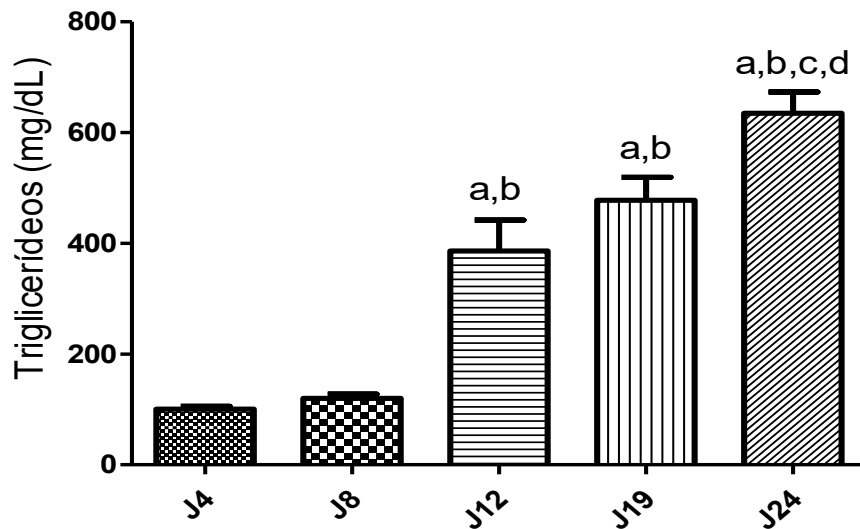


Concentração plasmática de glicose expressa em miligramas por decilitro (mg/dL) nos grupos submetidos a jejum de 4 horas (J4), 8 horas (J8), 12 horas (J12), 19 horas (J19) e 24 horas (J24). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, onde a =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J4; b =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J8; c =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J12. Teste estatístico: ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey.

## 6.2 Avaliação da concentração de triglicerídeos dos camundongos nos diferentes tempos de jejum

Os valores encontrados evidenciam aumento gradual da concentração sérica de triglicerídeos conforme aumenta o tempo de jejum. Nota-se que os níveis lipídicos aumentam exorbitantemente a partir da décima segunda hora de jejum, e, em vinte e quatro horas, chegam a ser sete vezes maiores que nas primeiras quatro horas. J12 ( $386 \pm 137,0$ ), J19 ( $477,7 \pm 101,9$ ) e J24 ( $634,8 \pm 94,03$ ) tiveram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em relação a J4 ( $100,5 \pm 12,74$ ) e J8 ( $120,0 \pm 19,37$ ). J24 teve aumento significativo em relação a J12 e J19. Os valores expressos indicam a concentração média de triglicerídeos nos grupos, em miligramas por decilitro (mg/dL) (Gráfico 2).

**Gráfico 2. Concentração plasmática de triglicérides nos grupos experimentais.**

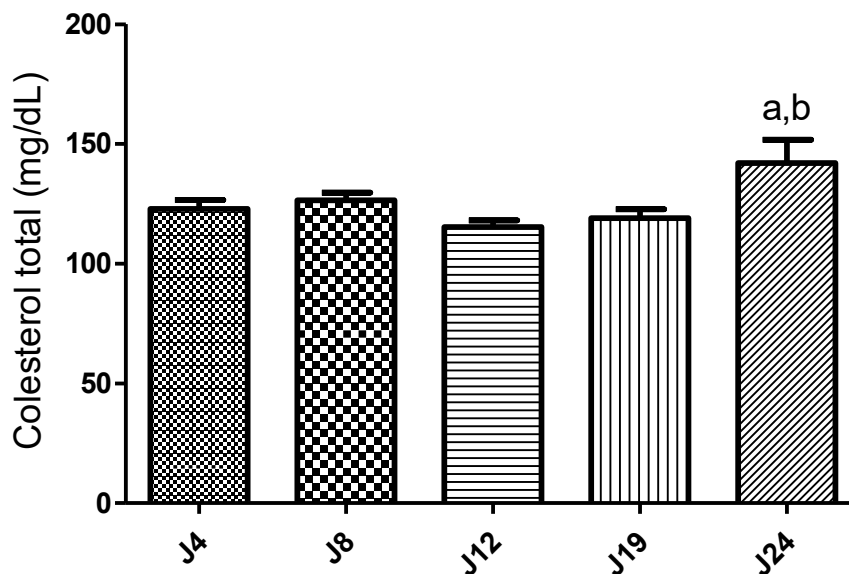


Concentração plasmática de triglicérides expressa em miligramas por decilitro (mg/dL) nos grupos submetidos a jejum de 4 horas (J4), 8 horas (J8), 12 horas (J12), 19 horas (J19) e 24 horas (J24). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. a =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J4; b =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J8; c =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J12; d =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J19. Teste estatístico: ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey.

### 6.3 Avaliação da concentração de colesterol total dos camundongos nos diferentes tempos de jejum

A concentração plasmática de colesterol foi pouco influenciada pelo tempo de jejum, sendo quase constante durante as primeiras dezenove horas de abstinência alimentar, excetuando-se pelo período mais prolongado desse experimento, o de vinte e quatro horas, em que houve aumento de sua concentração. O grupo J24 ( $142,00 \pm 43,24$ ) mostrou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos J12 ( $115,30 \pm 6,71$ ) e J19 ( $119,00 \pm 9,21$ ), enquanto os grupos J4 ( $122,80 \pm 9,39$ ) e J8 ( $126,50 \pm 7,71$ ) tiveram variação insignificante quando comparado a J24. Os valores expressos indicam a concentração média de colesterol total nos grupos, em miligramas por decilitro (mg/dL) (Gráfico 3).

**Gráfico 3. Concentração plasmática de colesterol nos grupos experimentais.**



Concentração plasmática de colesterol total expressa em miligramas por decilitro (mg/dL) nos grupos submetidos a jejum de 4 horas (J4), 8 horas (J8), 12 horas (J12), 19 horas (J19) e 24 horas (J24). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. a =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J12; b =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J19. Teste estatístico: ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey.

#### 6.4 Avaliação da concentração de albumina dos camundongos nos diferentes períodos de jejum

As médias das concentrações plasmáticas encontradas nos grupos experimentais J4 ( $3,25 \pm 0,09$ ), J8 ( $3,30 \pm 0,06$ ), J12 ( $3,18 \pm 0,06$ ), J19 ( $3,22 \pm 0,09$ ) e J24 ( $3,20 \pm 0,1$ ) foram muito próximas e a análise estatística não mostrou alteração significativa entre nenhum dos grupos. Os valores expressos indicam a concentração média de albumina nos grupos, em gramas por decilitro (g/dL) (Gráfico 4).

Gráfico 4. Concentração plasmática de albumina nos grupos experimentais.

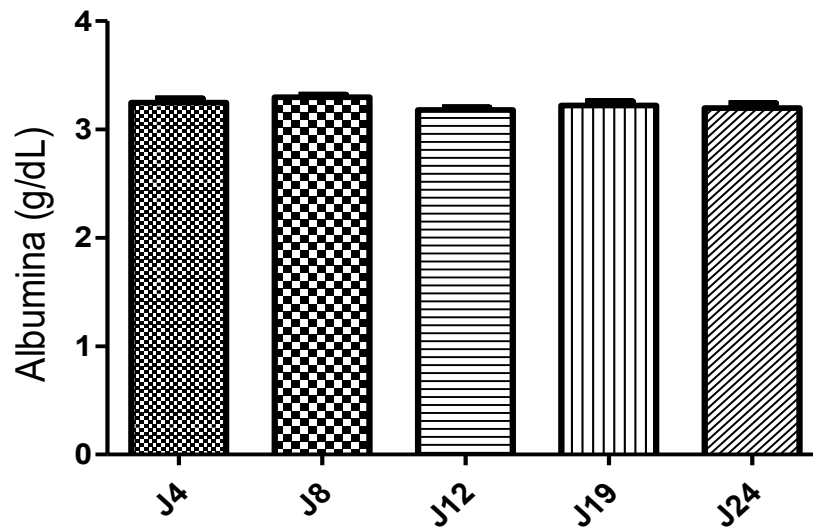
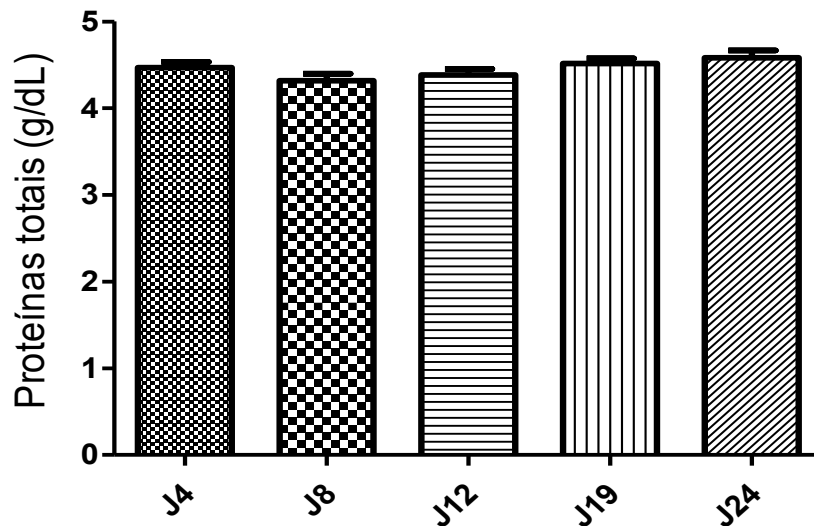


Gráfico 4. Concentração plasmática de albumina expressa em gramas por decilitro (g/dL) nos grupos submetidos a jejum de 4 horas (J4), 8 horas (J8), 12 horas (J12), 19 horas (J19) e 24 horas (J24). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. Teste estatístico: ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey.

### 6.5 Avaliação da concentração plasmática de proteínas totais nos camundongos de diferentes períodos de jejum

As médias dos valores encontrados nos grupos experimentais J4 ( $4,47 \pm 0,16$ ), J8 ( $4,32 \pm 0,20$ ), J12 ( $4,38 \pm 0,17$ ), J19 ( $4,52 \pm 0,14$ ) e J24 ( $4,58 \pm 0,20$ ) foram muito próximas, e a análise estatística não mostrou alteração significativa entre nenhum dos grupos. Os valores expressos indicam a concentração média de proteínas totais nos grupos, em gramas por decilitro (g/dL) (Gráfico 5).

**Gráfico 5. Concentração plasmática de proteínas totais nos grupos experimentais.**

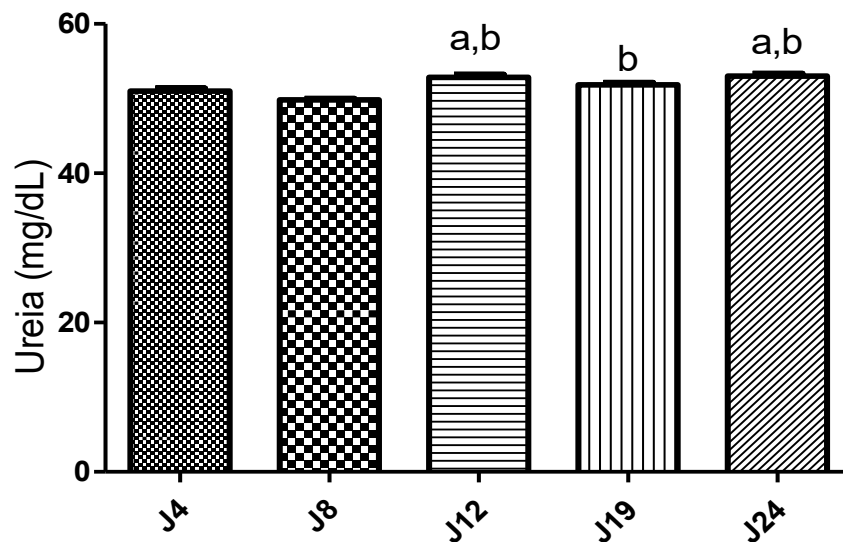


Concentração plasmática de proteínas totais expressa em gramas por decilitro (g/dL) nos grupos submetidos a jejum de 4 horas (J4), 8 horas (J8), 12 horas (J12), 19 horas (J19) e 24 horas (J24). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. Teste estatístico: ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey.

### 6.6 Análise da concentração plasmática de ureia nos camundongos em diferentes períodos de jejum

A concentração de ureia plasmática teve significativo aumento ( $p < 0,05$ ) nos grupos submetidos a jejum de doze ou mais horas, quando comparados a J4 ou J8. Os grupos J12 e J24 tiveram os níveis de ureia aumentados significativamente em relação a J4 ( $51,00 \pm 0,89$ ), e os grupos J12 ( $52,83 \pm 0,98$ ), J19 ( $51,83 \pm 0,75$ ) e J24 ( $53,00 \pm 0,89$ ) aumentaram de forma significativa em relação ao grupo J8 ( $49,83 \pm 0,40$ ). Os valores expressos indicam a concentração média de ureia nos grupos, em miligramas por decilitro (mg/dL) (Gráfico 6).

**Gráfico 6. Concentração plasmática de ureia nos grupos experimentais.**

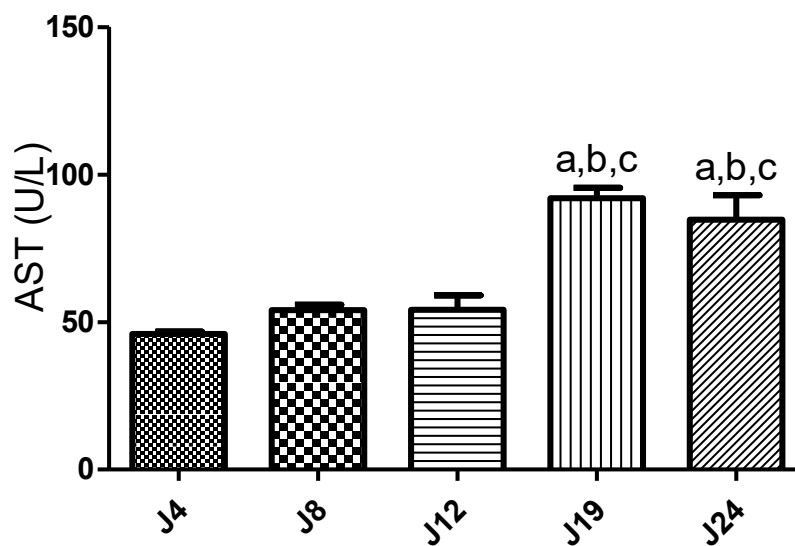


Concentração plasmática de ureia expressa em miligramas por decilitro (mg/dL) nos grupos submetidos a jejum de 4 horas (J4), 8 horas (J8), 12 horas (J12), 19 horas (J19) e 24 horas (J24). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. a =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J4; b =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J8. Teste estatístico: ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey.

### 6.7 Avaliação da atividade plasmática da aspartato aminotransferase (AST) dos camundongos nos diferentes períodos de jejum.

Houve aumento significativo da atividade dessa enzima, em relação a J4 ( $46,00 \pm 1,79$ ), J8 ( $54,00 \pm 4,69$ ) e J12 ( $54,17 \pm 11,96$ ), ( $p < 0,05$ ) nos grupos J19 ( $92,00 \pm 8,70$ ) e J24 ( $84,67 \pm 20,27$ ), sendo esse acréscimo maior no primeiro, seguido de leve diminuição no último. Nos grupos J4, J8 e J12 não foram observadas grandes alterações na atividade de AST. Os valores expressos indicam a atividade média da AST nos grupos, em unidades por litro (U/L) (Gráfico 7).

**Gráfico 7. Atividade plasmática de AST nos grupos experimentais.**



Atividade plasmática de AST (aspartato aminotransferase) expressa em unidades por litro (U/L) nos grupos submetidos a jejum de 4 horas (J4), 8 horas (J8), 12 horas (J12), 19 horas (J19) e 24 horas (J24). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. a =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J4; b =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J8; c =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J12. Teste estatístico: ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey.

### 6.8 Avaliação da atividade plasmática da alanina aminotransferase (ALT) dos camundongos nos diferentes períodos de jejum

A atividade dessa enzima permaneceu quase constante nos grupos J4 ( $24,17 \pm 3,60$ ), J8 ( $28,67 \pm 5,89$ ) e J12 ( $24,17 \pm 2,86$ ), mas aumentou consideravelmente conforme o tempo de abstinência alimentar avançava, chegando ao seu mais alto nível no grupo J24 ( $51,83 \pm 8,98$ ). O grupo J24 teve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos J4, J8, J12 e J19 ( $35,33 \pm 10,48$ ). Os valores expressos indicam a atividade média da ALT nos grupos, em unidades por litro (U/L) (Gráfico 8).

**Gráfico 8. Atividade plasmática de ALT nos grupos experimentais.**

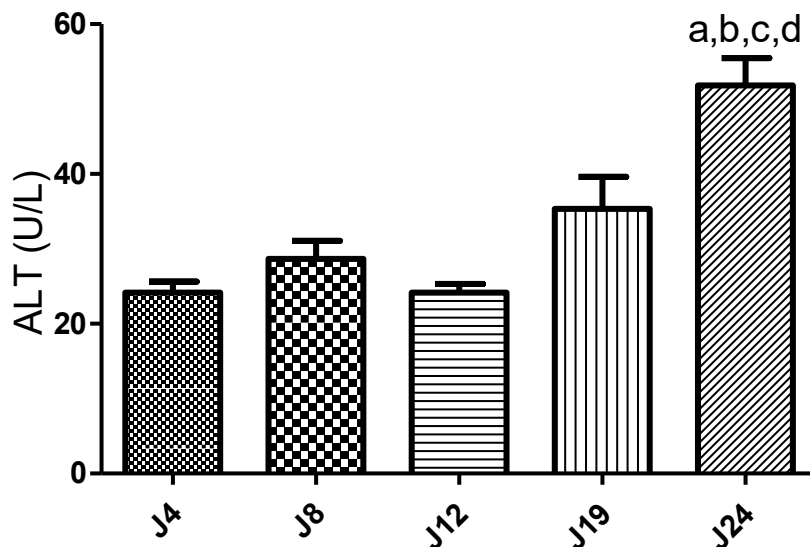


Gráfico 8. Atividade plasmática de ALT (alanina aminotransferase) expressa em unidades por litro (U/L) nos grupos submetidos a jejum de 4 horas (J4), 8 horas (J8), 12 horas (J12), 19 horas (J19) e 24 horas (J24). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. a =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J4; b =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J8; c =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J12; d =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J19. Teste estatístico: ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey.

## 7 DISCUSSÃO

Analisando os resultados obtidos, verificou-se que camundongos submetidos a diversos tempos de jejum apresentaram alterações em alguns parâmetros bioquímicos, principalmente naqueles relacionados ao metabolismo energético, refletindo as respostas fisiológicas à privação alimentar prolongada.

O tempo de jejum cumprido para a coleta sanguínea em animais nos diversos protocolos em que seja necessária a realização de dosagens bioquímicas é variável, e o tempo de jejum, de acordo com os experimentos executados por alguns autores, varia de 4 a 24 horas (XIE *et al.*, 2007; LINO, 2008; VAIDYA *et al.*, 2009; MELO *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2011).

É conhecido que ratos e camundongos podem exibir variações dos parâmetros bioquímicos relacionadas com sexo, linhagem e genótipo, podendo ser influenciados pela idade, pela dieta, pelo manuseio, pelo meio ambiente, entre outros fatores (ALMEIDA *et al.*, 2008). Baseado nessa afirmação, dependendo do protocolo experimental, dos analitos que se deseje determinar, do animal em questão (camundongo, rato, macaco, morcego, etc.), da linhagem do animal, dentre outros, o tempo de jejum deve ser diferenciado para cada situação. Alguns estudos relacionam essas variações com alterações bioquímicas: Almeida (2008) determinou os valores de referência em duas linhagens de camundongos (BALB/c e C57BL6) provenientes do biotério da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), mostrando que diferentes linhagens possuem valores de referência diferentes entre si. Orlandini (2012) aborda a alteração nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar expostos à amônia, proveniente da decomposição da ureia presente em sua urina, por inalação, reforçando o fato de que o ambiente e os compostos nele presentes podem alterar o perfil bioquímico dos animais.

Outro fato importante a se comentar é que o sofrimento aos animais deve ser minimizado ao máximo; sendo o jejum um fator estressante, eles devem ser expostos apenas o tempo mínimo necessário para a execução do experimento.

A diminuição dos níveis glicêmicos dos animais de todos os grupos, em relação a J4, se deve à captação da glicose plasmática pelas células e tecidos dos camundongos no período de inanição. Nota-se que os níveis glicêmicos dos grupos experimentais J8 e J12, são maiores quando comparados aos dos grupos J19 e J24. Isso se deve ao processo de glicogenólise, que ocorre no fígado (BAYNES, 2007), e é mediado pelo hormônio glucagon, produzido por células alfa das ilhotas de Langerhans do pâncreas. Esse processo estimula a hidrólise do glicogênio hepático como meio de manter a glicose sanguínea em níveis adequados. Em J19 e J24, os níveis mais baixos de glicose se devem ao seu consumo no sangue, e também, possivelmente, devido à depleção do glicogênio hepático, que, segundo Lehninger (2006), pode ser exaurido em 12 a 24 horas, e condizem com os valores encontrados nesses últimos dois grupos experimentais.

Os níveis de triglicerídeos dos animais aumentaram significativamente conforme aumentava o tempo de jejum, chegando o grupo J24 a atingir quase sete vezes os valores plasmáticos desse analito se comparado a J4. A insulina, o glucagon, a epinefrina e o cortisol controlam o metabolismo da glicose e do glicogênio. Durante o jejum e a inanição, a glicogenólise hepática é ativada pelo glucagon, que acontece concomitantemente, dentre outros processos, com a degradação dos triglicerídeos e a liberação de ácidos graxos do tecido adiposo (BAYNES, 2007), que serão utilizados para suprir energeticamente as células e tecidos do organismo. O processo de lipólise ocorre no tecido adiposo, e se trata da mobilização de triacilgliceróis para o sangue em caso de déficit calórico, fato que ocorre no jejum prolongado. Se a reposição calórica não ocorre, o processo de degradação dos triacilgliceróis a ácidos graxos livres e glicerol livre, realizada pela ativação da enzima lipase hormônio-sensível (HSL) mediada pelo aumento do glucagon plasmático, continua ocorrendo, até que haja aumento dos níveis glicêmicos no sangue (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2007).

Os níveis plasmáticos de colesterol total permaneceram muito próximos nos grupos J4, J8, J12 e J19, tendo sido significativamente maior em J24, quando comparado a J4 e J8. Nota-se diminuição (mesmo que não significante) entre os níveis colesterolêmicos nos grupos J8 e J12, e esse resultado é semelhante àquele encontrado no trabalho desenvolvido por Ferreira *et al.* (2011), que relata a diminuição do colesterol total em cães submetidos a jejum de 3, 6, 9 e 12 horas. Os dados corroboram com a afirmativa de Nigam (2011) e Baynes (2007) de que os níveis de lipoproteínas e apolipoproteínas não são muito diferentes em jejum ou em um estado

aleatório sem inanição. Isso demonstra, portanto, que os níveis de colesterol total pouco mudam durante o ciclo jejum-alimentação. Quanto aos níveis colesterolêmicos mais altos encontrados em J24, é possível que seja resultante do aumento da atividade da hidroxil-3-metil-glutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), enzima responsável pela etapa limitante da síntese de colesterol, pois, segundo Baynes (2007), a síntese dessa substância é estimulada pelo jejum prolongado.

Os níveis plasmáticos de albumina permaneceram muito próximos em todos os grupos experimentais. Já é conhecido na prática clínica que esse analito é forte indicador de má nutrição e cronificação de lesão hepática, e alguns autores relacionam hipoalbuminemia e desnutrição (MOTTA, 2003; COUTO *et al.*, 2008; SAKA *et al.*, 2011). Contudo, mesmo o maior tempo de jejum observado nesse experimento, que foi de 24 horas, é muito pequeno para tornar os animais desnutridos, e os camundongos não foram expostos a parasitas, substâncias ou procedimentos que causassem lesão ao fígado. Logo, os níveis de albumina encontrados condizem com o curto período de inanição executado nesse protocolo.

De maneira similar à albumina, os níveis de proteínas totais não sofreram alterações significativas durante os períodos de jejum realizados no presente estudo. Esse parâmetro tem seus níveis diminuídos por má nutrição e algumas enfermidades monoclonais e hepáticas também alteram seus níveis (SAKA *et al.*, 2011). Sendo assim, as semelhantes concentrações plasmáticas de proteínas totais encontradas corroboram com o curto período de inanição executado nesse protocolo.

Os níveis plasmáticos de ureia apresentaram aumento significativo em J12, J19 e J24. Tal elevação se deve, principalmente, ao prolongamento do tempo de jejum, que tem como consequência a ativação da via da gliconeogênese. Nessa via metabólica ocorre utilização do esqueleto de carbono dos aminoácidos provenientes do tecido muscular esquelético como fonte de energia. O processo de transaminação acontece no fígado e é intermediado por enzimas (as mais conhecidas clinicamente são a AST e ALT), gerando compostos que entram no ciclo de Krebs e fornecem energia, armazenada na forma de ATP. Os resíduos nitrogenados dessa reação (íons amônio) são convertidos em ureia através do ciclo da ureia, em que a amônia e íons bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) sofrem reações nos hepatócitos para formar ureia, que é então liberada na corrente sanguínea e posteriormente filtrada pelos rins para ser excretada na urina (LEHNINGER, 2006). Como a gliconeogênese continua ocorrendo com o

decorrer do jejum, mais aminoácidos serão desaminados para fornecer energia, refletindo nos níveis de ureia aumentados.

Os níveis da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) sofreram aumento de suas atividades no decorrer do tempo em que os grupos experimentais foram submetidos ao jejum. Ambas as enzimas catalisam a reação de transaminação dos aminoácidos ácido aspártico e alanina, respectivamente, e consiste na transferência do grupo  $\alpha$ -amino para o carbono alfa do  $\alpha$ -cetoglutarato (composto intermediário do ciclo de Krebs, também chamado ciclo do ácido tricarboxílico), formando L-glutamato e um  $\alpha$ -cetoácido correspondente (BAYNES, 2007). O L-glutamato funciona como um doador do grupamento amino para vias bioquímicas sintéticas ou para vias de excreção, que levam a eliminação de produtos nitrogenados (LEHNINGER, 2006).

Acerca da natureza do esqueleto de carbono do aminoácido, este pode ser classificado, de acordo com o ponto em que entram no metabolismo energético, de três maneiras (BAYNES, 2007):

- Aminoácidos glicogênicos: seus esqueletos de carbono podem ser usados ao nível de ciclo de Krebs como  $\alpha$ -cetoglutarato ou oxaloacetato, ou podem formar piruvato e originarem glicose via gliconeogênese;
- Aminoácidos cetogênicos: seus esqueletos de carbono são usados para fornecer acetil-CoA ou acetoacetil-CoA;
- Aminoácidos tanto glicogênicos como cetogênicos: possuem esqueleto de carbono estruturalmente mais complexo, e podem gerar tanto fragmentos glicogênicos quanto cetogênicos.

Alanina e ácido aspártico são considerados, nessa classificação, como glicogênicos, sendo o primeiro convertido a piruvato, e o segundo, a oxaloacetato, após a remoção do seu grupo  $\alpha$ -amino via transaminação. Dessa forma, na ausência da glicose como fonte energética pela depleção dos seus níveis sanguíneos e pela utilização das reservas hepáticas de glicogênio, em decorrência do período de jejum, os aminoácidos podem suprir a demanda glicêmica via gliconeogênese. Os níveis elevados de AST e ALT nos grupos submetidos a maiores períodos de jejum condizem com o processo de gliconeogênese descrito por

Lehninger e Baynes, em que essas enzimas aumentam a sua atividade em prol da manutenção energética dos camundongos.

## 8 CONCLUSÃO

O jejum prévio é necessário para a execução de protocolos experimentais em que haja a dosagem de analitos bioquímicos. Demonstrou-se, nesse trabalho, que o prolongamento ou redução do tempo de jejum pode levar a modificações nesses parâmetros, alterando os resultados do experimento como um todo.

Os resultados mostraram o seguinte: verificou-se que albumina e proteínas totais não sofreram influência quanto ao tempo de jejum. Os níveis de glicose diminuíram proporcionalmente com o tempo de privação alimentar, chegando aos níveis mais baixos a partir no tempo de 19h de jejum, e maior período de inanição apenas causaria sofrimento ao animal, sem alterar significativamente sua glicemia. Os níveis de triglicerídeos sofreram forte influência no período de jejum, sendo sua concentração inversamente proporcional ao declínio da glicemia plasmática, aumentando com o decorrer das horas. O colesterol total demonstrou pouca modificação em relação ao tempo de jejum, aumentando somente após 24 horas sem alimentação. Os níveis de ureia mantiveram-se quase constantes até as primeiras 8 horas de jejum, sofrendo elevação a partir de 12 horas de jejum. A atividade de ambas as transaminases hepáticas (AST e ALT) aumentaram significativamente em 24 horas de jejum.

Considerando-se o período ideal de jejum aquele que não houve alterações significantes nos níveis ou atividade dos parâmetros bioquímicos, sendo esse tempo o menor possível, para evitar estresse aos animais levando em consideração os tempos e os analitos bioquímicos aqui estudados, é de 8 horas.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. S. *et al.* Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 44, n. 6, p. 429-432, 2008.
- ANSON, R. M. *et al.* Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, n. 10, p. 6216-6220, May 2003.
- AREOSA, C. M. N. *et al.* Avaliação de fatores prognósticos da insuficiência cardíaca em pacientes encaminhados para avaliação de transplante cardíaco. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 88, n. 6, jun. 2007.
- BARBOSA, A. A. *et al.* Perfil da aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase e biometria do fígado de codornas japonesas. **R. Bras. Zootec.**, Viçosa, v. 39, n. 2, fev. 2010.
- BATISTA, M. C. R. *et al.* Avaliação dos Resultados da Atenção Multiprofissional Sobre o Controle Glicêmico, Perfil Lipídico e Estado Nutricional de Diabéticos Atendidos em Nível Primário. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.18, n.2, mar./abr. 2005.
- BAYNES, J. W. **Bioquímica médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- BEM, A. F.; KUNDE, J. A importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento das complicações crônicas do diabetes mellitus. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n. 3, p. 185-191, jun. 2006.
- BRANGER, P. J. *et al.* Laboratory services utilization: a survey of repeat in investigations in ambulatory care. **Neth. J. Med.**, v. 47, n. 5, p. 208-213, 1995.
- CÂMARA E SILVA, I. A.; DIAS, R. V. C.; SOTO-BLANCO, B. Determinação das atividades séricas de creatina quinase, lactato desidrogenase e aspartato aminotransferase em equinos de diferentes categorias de atividade. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 59, n. 1, fev. 2007.
- CAPILHEIRA, M. F.; SANTOS, I. S. Epidemiologia da solicitação de exame complementar em consultas médicas. **Rev. Saúde Pública**, v. 40, n. 2, p. 289-297, 2006.
- CARVALHO, E. N.; CARVALHO, N. A. S.; FERREIRA, L. M. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. **Acta Cir. Bras.** v. 18, p. 60-64. 2003
- COUTO, J. L. A. *et al.* Alterações da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 4, p. 390-393, ago. 2008.
- DE BIASE, S. G. *et al.* Dieta vegetariana e níveis de colesterol e triglicérides. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 88, n. 1, p. 35-39, 2007.
- DIAS, T. A. *et al.* Protocolo para indução experimental de diabetes mellitus por aloxana em ratas: resultados preliminares. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO,

8., 2011. Disponível em: <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/conpeex/mestrado/trabalhos-mestrado/mestrado-tais-andrade.pdf>>. Acesso em: 2 set. 2012.

FALCÃO, H.; JAPIASSÚ, A. M. Uso de albumina humana em pacientes graves: controvérsias e recomendações. **Rev. Bras. Terap. Intens.**, v. 23, n. 1, p. 87-95, 2011.

FERREIRA, P. A. *et al.* Glicemia e metabolismo lipídico em cães: efeitos do jejum e da alimentação. In: ENCONTRO DA PÓS-GRADUAÇÃO (ENPOS) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 13., 2011, Pelotas. **Trabalho submetido para apresentação no...** Pelotas, 2011.

FONSECA-ALANIZ, M. H. *et al.* Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **J. Pediatr.**, v. 83, n. 5, Supl., 2007.

FREIRE, L. M. D. *et al.* Controle de qualidade laboratorial pré-analítico: avaliação de solicitações médicas de exames bioquímicos no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Anal. Clín.**, v. 40, n. 2, p. 143-145, 2008.

GONÇALVES, M. C. R. *et al.* Berinjela (*Solanum melongena* L.) – mito ou realidade no combate as dislipidemias? **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, n. 2, p. 252-257, jun. 2006.

GROSS, J. L.; FERREIRA, S. R. G.; OLIVEIRA, J. E. Glicemia Pós-Prandial. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 47, n. 6, p. 728-738, 2003.

GUIMARAES, S. M. *et al.* Correlação de diferentes períodos de jejum com níveis séricos de cortisol, glicemia plasmática, estado clínico e equilíbrio ácido-base em cães submetidos à anestesia geral inalatória. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 44, supl., p. 96-102, 2007.

LEE, I. S. *et al.* Hepatoprotective Activity of Scutellariae Radix Extract in Mice Fed a High Fat Diet with Chronic Alcohol Exposure. **Phytother. Res.**, 2011.

LEHNINGER, A. L. **Lehninger: princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LINO, C. S. **Efeitos antidiabético, antioxidante, analgésico e anti-inflamatório da fração solúvel em metanol e tiramina isolados de *Cissus verticillata***. 190f. il. Tese (doutorado em Farmacologia)-Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

MELO, C. L. *et al.* Betulinic Acid, a Natural Pentacyclic Triterpenoid Prevents Abdominal Fat Accumulation in Mice Fed a High-Fat Diet. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 8776-8781, 2009.

MELO, M. G. D. *et al.* Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v.8, n. 4, 2012.

MOTTA, W. T. **Bioquímica clínica para laboratório: princípios e interpretações**. 5. ed. Porto Alegre: Editora Medbook, 2009.

NIGAM, P. K. Serum lipid profile: fasting or non-fasting? **Indian J. Clin. Biochem.**, v. 26, p. 96- 97, mar. 2011.

ORLANDINI, L. F. **Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos Wistar expostos à amônia por inalação**. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

SAKA, B. *et al.* Nutritional risks in hospitalized patients: impact on nutritional status on serum prealbumin. **Rev. Nutrição**, v. 24, n. 1, p. 89-98, 2011.

SALGADO, H. R. N. *et al.* Animais de laboratório: o camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Aplicada**, v. 28, n.1, p.11-23, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Consenso Brasileiro sobre Diabetes. **Algoritmo para o tratamento do diabetes tipo 2**. São Paulo, 2011.

SODRÉ, F. L. *et al.* Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n.5; p. 329-337, out. 2007.

TIETZ, N. W. **Fundamentos de química clínica**. 6° ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2008.

VAIDYA, H. *et al.* Antihyperlipidaemic activity of swertiamarin, a secoiridoid glycoside in poloxamer-407-induced hyperlipidaemic rats. **J. Nat. Med.**, v. 63, p. 437–442, 2009.

XIE, W. *et al.* Hypolipidemic Mechanisms of Ananas comosus L. Leaves in Mice: Different From Fibrates but Similar to Statins. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 103, p. 267-274, 2007.

ZHU, X. *et al.* Hypolipidaemic and hepatoprotective effects of ethanolic and aqueous extracts from *Asparagus officinalis* L. by-products in mice fed a high-fat diet. **J. Agric. Food Chem.**, v. 90, p. 1129-1135, 2010.

**APÊNDICE A- Representação dos resultados em tabela, segundo alteração e significância.**

	<b>J4</b>	<b>J8</b>	<b>J12</b>	<b>J19</b>	<b>J24</b>
<b>Glicose (mg/dL)</b>	–	↓ a	↓ a	↓ a,b,c	↓ a,b,c
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	–	–	–	–	↑ a,b
<b>Triglicérides (mg/dL)</b>	–	–	↑ a,b	↑ a,b	↑ a,b,c,d
<b>Albumina (g/dL)</b>	–	–	–	–	–
<b>Proteínas totais (g/dL)</b>	–	–	–	–	–
<b>Ureia (mg/dL)</b>	–	–	↑ a,b	↑ b	↑ a,b
<b>Aspartato aminotransferase (AST) (U/L)</b>	–	–	–	↑ a,b,c	↑ a,b,c
<b>Alanina aminotransferase (ALT) (U/L)</b>	–	–	–	–	↑ a,b,c,d

Tabela contendo a alteração e a significância estatística dos parâmetros bioquímicos estudados nos grupos experimentais submetidos a diferentes períodos de jejum. a =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J4; b =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J8; c =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J12; d =  $p < 0,05$  em relação ao grupo J19. Teste estatístico: ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey.