



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

**EFEITO DO CONSUMO MATERNO DE ETANOL DURANTE
A LACTAÇÃO NO ESTRESSE OXIDATIVO DA PROLE
DE RATOS WISTAR NAS FASES DE LACTAÇÃO,
JOVEM E ADULTA**

MAIARA BRUSCO DE FREITAS

FLORIANÓPOLIS

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

Maiara Brusco de Freitas

**EFEITO DO CONSUMO MATERNO DE ETANOL DURANTE
A LACTAÇÃO NO ESTRESSE OXIDATIVO DA PROLE
DE RATOS WISTAR NAS FASES DE LACTAÇÃO,
JOVEM E ADULTA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Nutrição.

Orientadora: Prof^a. Emilia Addison Machado Moreira.

Florianópolis

2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Brusco de Freitas, Maiara

Efeito do Consumo Materno de Etanol Durante a Lactação no Estresse Oxidativo da Prole de Ratos Wistar nas Fases de Lactação, Jovem e Adulta [dissertação] / Maiara Brusco de Freitas ; orientadora, Emília Addison Machado Moreira - Florianópolis, SC, 2012.

102 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição.

Inclui referências

1. Nutrição. 2. Etanol. 3. Lactação. 4. Antioxidantes. I. Addison Machado Moreira, Emília. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. III. Título.

Maiara Brusco de Freitas

**EFEITO DO CONSUMO MATERNO DE ETANOL DURANTE
A LACTAÇÃO NO ESTRESSE OXIDATIVO DA PROLE
DE RATOS WISTAR NAS FASES DE LACTAÇÃO,
JOVEM E ADULTA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Nutrição”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florinaópolis, 14 de junho de 2012.

Prof^ª. Dr^ª. Rossana Pacheco da Costa
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Emilia Addison Machado Moreira
Orientadora
Departamento de Nutrição/UFSC/SC - Presidente

Prof. Dr. Hélio Vannucchi
Departamento de Clínica Médica/FMUSP/RP - Membro

Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho
Departamento de Ecologia e Zoologia /UFSC/SC - Membro

Prof. Dr. Everson Araujo Nunes
Departamento de Nutrição/UFSC/SC - Membro

Dedico esta dissertação aos meus pais Pedro e Maria, que são exemplos de vida, profissionais corretos e competentes e sempre me apoiaram em minhas decisões.

*Obrigada por todo o aponho, carinho, compreensão e por serem fonte de inspiração.
Amo vocês.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço

À **Deus**, por me dar perseverança e força para lutar.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Nutrição**, por proporcionar um ensino de qualidade em nutrição.

Ao **Programa Plano de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (Reuni)**, pela concessão de uma bolsa de estudo, permitindo que houvesse dedicação exclusiva ao mestrado.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. **Emilia Addison Machado Moreira**, o meu agradecimento pelas contribuições, pelo crescimento, pela atenção e seus valiosos conhecimentos transmitidos e dedicados a mim durante todo este período. Agradeço a oportunidade de ser sua orientanda durante o mestrado.

Aos professores **Dr. Danilo Wilhelm Filho** e **Dr. Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade**, pelos constantes ensinamentos que ajudaram na construção deste trabalho.

Aos professores **Dr. Hélio Vannucchi**, **Dr. Danilo Wilhelm Filho** e **Dr. Everson Araújo Nunes**, pela disponibilidade em participar da banca de defesa desta dissertação e pelas valiosas contribuições advindas dessa participação.

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação**, pelos constantes ensinamentos que me fizeram crescer.

Às minhas amigas e colegas de mestrado, **Leticia Cristina Radin Pereira**, **Francieli Cembranel**, **Renata da Cruz Gonçalves** e **Monique Ferreira Garcia**. Obrigada por todos os conselhos e momentos de descontração.

À minha **turma de mestrado**, pelos momentos que passamos juntos, de ajuda e de descontração em nossas viagens a congressos, festas juninas, amigos secretos e chás de bebês.

Aos meus pais, **Pedro Ferreira de Freitas e Maria Justina Brusco de Freitas**, pelo apoio incondicional, incentivo e por sempre acreditarem no meu potencial.

Ao meu irmão, **Mateus Brusco de Freitas**, pelo seu apoio, exemplo e pelos anos de convivência não só na nossa cidade natal, Palotina - PR, mas também em Florianópolis-SC.

À minha tia, **Lídia Marina Brusco**, por todo apoio e incentivo dado, não só durante o mestrado, mas em toda a minha vida.

Às minhas amigas, **Taimara Carla Bernardi e Aline Thaísa Bortolozzo**, que mesmo a distância, me apoiaram e confortaram.

A todos que me ajudaram durante o mestrado.

Muito Obrigada!

*“A alegria que se tem em pensar e aprender
faz-nos pensar e aprender ainda mais”.*

Aristóteles

*“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos,
mas sim em levantarmo-nos sempre depois de cada queda”.*

Confúcio

FREITAS, Maiara Brusco. **Efeito do Consumo Materno de Etanol Durante a Lactação no Estresse Oxidativo da Prole de Ratos Wistar nas Fases de Lactação, Jovem e Adulta.** Florianópolis, 2012. 102f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

RESUMO

Introdução: A prole é vulnerável às agressões associadas ao consumo de etanol durante a lactação. Este pode estar relacionado à redução de antioxidantes, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e a peroxidação lipídica. **Objetivo:** Avaliar o efeito do consumo de etanol por ratas lactantes no estresse oxidativo da prole nas diferentes fases do desenvolvimento. **Método:** Ratas adultas *Wistar* foram randomizadas em Grupo Controle (GC) (n= 3) e Grupo Experimental (GE) (n= 3). As respectivas proles (n= 36) foram randomizadas em 6 sub-grupos: grupo controle lactação (GCL), grupo controle jovem (GCJ), grupo controle adulto (GCA) e grupo experimental lactação (GEL), grupo experimental jovem (GEJ), grupo experimental adulto (GEA). Durante o estudo ambos os grupos receberam dieta comercial e água “*ad libitum*”. GE recebeu água com 20% de etanol até o 12º dia de lactação. O desenvolvimento foi avaliado pelo peso. Avaliou-se a atividade hepática e sanguínea da superóxido dismutase (SOD), glutatona S-transferase (GST), glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT), e a concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma. Pelo teste “*t*” de Student ($p < 0,05$) observou-se as diferenças entre os grupos. **Resultados:** No dia 8 (GEL: 0,17 g; GCL: 0,19 g; $p < 0,001$) e no dia 12 (GEL: 0,19 g; GCL: 0,22 g; $p < 0,001$) o ganho de peso do GEL foi menor em relação ao GCL. No grupo GEL ($1,15 \pm 0,01$; $p < 0,001$) e GEJ ($1,82 \pm 0,03$; $p = 0,001$) o ganho de peso foi significativamente inferior em relação ao GCL ($1,30 \pm 0,01$) e GCJ ($1,96 \pm 0,02$). A atividade sanguínea da SOD foi menor no GEJ (GEJ: $2,04 \pm 0,05$; GCJ: $2,23 \pm 0,04$; $p = 0,018$) e GEA (GEA: $2,11 \pm 0,03$; GCA: $2,32 \pm 0,02$; $p < 0,001$), não havendo alteração significativa a nível hepático. A atividade sérica da GST foi significativamente menor apenas no GEJ em relação ao GCJ (GEJ: $1,20 \pm 0,01$; GCJ: $2,31 \pm 0,04$; $p < 0,001$). Com relação à atividade hepática da GST, foi significativamente menor em relação ao controle nas fases jovens (GCJ: $1,62 \pm 0,02$; GEJ: $1,60 \pm 0,01$; $p = 0,008$) e adulta (GCA: $1,71 \pm 0,01$; GEA: $1,50 \pm 0,03$; $p < 0,001$). A atividade da GPx hepática foi

significativamente menor em relação ao controle nas fases jovens (GCJ: $1,06 \pm 0,02$; GEJ: $0,91 \pm 0,04$; $p= 0,008$) e adulta (GCA: $0,98 \pm 0,06$; GEA: $0,81 \pm 0,03$; $p= 0,017$), sem diferença a nível sanguíneo. A atividade da CAT foi significativamente menor em relação ao controle apenas a nível hepático nos grupos jovem (GCJ: $0,99 \pm 0,02$; GEJ: $0,90 \pm 0,05$; $p= 0,035$) e adulto (GCA: $1,70 \pm 0,01$; GEA: $0,94 \pm 0,05$; $p= 0,053$). Com relação ao TBARS, foi significativamente menor apenas durante a lactação a nível hepático (GCL: $1,70 \pm 0,03$; GEL: $1,60 \pm 0,01$; $p= 0,019$). **Conclusão:** O consumo de etanol por ratas lactantes causou menor ganho de peso da prole durante as fases lactação e jovem, além de diminuir a atividade das enzimas SOD no sangue e das enzimas, GST, GPx e CAT, no fígado, nas fases, jovem e adulta.

Palavras chave: Etanol; Lactação; Estresse oxidativo; Antioxidantes; Prole.

FREITAS, Maiara Brusco. **Effect of Maternal Consumption of Ethanol During Lactation on the Oxidative Stress in the Offspring of Rats in Phases of Lactation, Young and Adult.** Florianópolis, 2012. 102p. Dissertation (Master in Nutrition) – Graduate Program in Nutrition, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

ABSTRACT

Background: The offsprings is vulnerable to and insults by ethanol during lactation. This may be related to the depletion of antioxidants, increased production of oxygen reactive species and lipid peroxidation.

Aims: To evaluate the effect of ethanol consumption by lactating rats on oxidative stress in the offspring in different stages of development.

Methods: Adult Wistar rats were randomized into control group (CG) (n= 3) and Experimental Group (EG) (n= 3). Their offspring (n= 36) were randomized into six sub-groups: lactation control group (LCG), young control group (YCG), adult control group (ACG) and lactation experimental group (LEG), young experimental group (YEG), adult experimental group (AEG). During the study both groups received a commercial diet and water "*ad libitum*". GE received water with 20% ethanol until the 12th day of lactation. The growth was evaluated by weight gain. There were evaluated blood and hepatic activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione S -transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), and the concentrations of thiobarbituric acid reactive substances in plasma (TBARS). By using the "t" Student test ($p < 0.05$) differences between the groups were measured.

Results: On 8th day (LEG: 0.17 g; LCG 0.19 g; $p < 0.001$) and day 12th (LEG: 0.19 g; LCG: 0.22 g; $p < 0.001$) weight gain of LEG was lower than in the LCG. In LEG (1.15 ± 0.01 ; $p < 0.001$) and YEG (1.82 ± 0.03 ; $p = 0.001$) weight gain were significantly lower in relation to LCG (1.30 ± 0.01), and YCG (1.96 ± 0.02). The activity of SOD in blood was lower in YEG (YEG: 2.04 ± 0.05 ; YCG: 2.23 ± 0.04 ; $p = 0.018$) and AEG (AEG: 2.11 ± 0.03 ; CGA: 2.32 ± 0.02 ; $p < 0.001$), with no significant change in the liver. The activity of blood GST was significantly lower only in YEG in relation to the YCG (YEG: 1.20 ± 0.01 ; YCG: 2.31 ± 0.04 ; $p < 0.001$). With respect to the activity of hepatic GST, it was significantly lower in the young stages (YEG: 1.60 ± 0.01 ; YCG: 1.62 ± 0.02 ; $p = 0.008$) and in adults (AEG: 1.50 ± 0.03 ; CGA: 1.71 ± 0.01 ; $p < 0.001$) in relation to the control. The activity of GPx hepatic was significantly lower in relation to controls in young stages

(YEG: 0.91 ± 0.04 ; YCG: 1.06 ± 0.02 ; $p= 0.008$) and in adults (AEG: 0.81 ± 0.03 ; ACG: 0.98 ± 0.06 ; $p=0.017$), with no difference in the blood. CAT activity was significantly lower compared to controls only in the liver in youngs (YEG: 0.90 ± 0.05 ; YCG: 0.99 ± 0.02 ; $p= 0.035$) and adults (AEG: 0.94 ± 0.05 ; ACG: 1.70 ± 0.01 ; $p= 0.053$). With respect to TBARS, it was significantly lower only in the liver during lactation (LEG: 1.60 ± 0.01 ; CGL: 1.70 ± 0.03 ; $p= 0.019$). **Conclusion:** Ethanol consumption by lactating rats caused less weight gain in offspring during lactation and young stages, and also decreased the activity of SOD in the blood, GST, GPx and CAT in the liver, in young and adult stages.

Keywords: Ethanol, Lactation, Oxidative stress, Antioxidants, Offspring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação geral das fases da peroxidação lipídica.	29
Figura 2 - Vias do metabolismo oxidativo do etanol.	32
Figura 3 - Alteração do equilíbrio celular no tratamento com etanol....	36
Figura 4 - Randomização das ratas e da prole.	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH	Álcool desidrogenase
ALDH	Aldeído desidrogenase
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
Ca ²⁺	Íon de cálcio
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
(CHOH) _n	Hidrocarboneto
CO ₂	Dióxido de carbono
CYP2E1	Citocromo P450 2E1
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Fe ³⁺	Ferro Férrico
Fe ²⁺	Ferro Ferroso
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GST	Glutationa S – transferase
H ⁺	Íon hidrogênio
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IL-1β	Interleucina 1beta
LH	Ácido graxo insaturado
L [•]	Radical alquil
LO [•]	Radical alcóxil
LOO [•]	Radical peróxil
LOOH	Hidroperóxido lipídico
MDA	Malonaldeído

MEOS	Sistema microssomal de oxidação de etanol
MPP	Metabolismo de primeira passagem
mGSH	Glutathiona reduzida mitocondrial
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado oxidado)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado reduzido)
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado oxidado)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)
NF-KB	Fator nuclear kappa B
[•] NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singlete
8-OH-Gua	8-hidroxi-guanina
[•] OH	Radical hidroxil
ONOO ⁻	Peróxido nitrito
Se-OH	Selenoles
SOD	Superóxido dismutase
SOD1	Superóxido dismutase 1
SOD2	Superóxido dismutase 2
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TPM	Transição da permeabilidade mitocondrial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1 SISTEMA OXIDANTE E ANTIOXIDANTE	25
2.2 EFEITO DA INGESTÃO DE ETANOL DURANTE A LACTAÇÃO NA PROLE	30
2.3 EFEITO DA INGESTÃO DE ETANOL NA PROLE SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO	34
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4 SUJEITOS E MÉTODOS	41
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL	41
4.2 ANIMAIS E TRATAMENTO	41
4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ETANOL SOBRE O DESENVOLVIMENTO DAS PROLES	43
4.4 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO	43
4.4.1 Catalase	44
4.4.2 Superóxido dismutase.....	44
4.4.3 Glutathione S-transferase	44
4.4.4 Glutathione Peroxidase.....	44
4.4.5 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	44
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	45
5 ARTIGO ORIGINAL.....	47
6 TRADUÇÃO DO ARTIGO ORIGINAL	67
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICE.....	99

1 INTRODUÇÃO

As estruturas e sistemas, como o endócrino, o nervoso entre outros, são vulneráveis a agressões durante as fases de gestação e lactação (OLIVEIRA, 2010; SYMONDS et al., 2001; SANTOS-MONTEIRO et al., 2002). Alterações das funções orgânicas podem ser resultado de modificações ambientais, estresse, doenças, dieta e consumo de etanol (FOWDEN; GIUSSANI; FORHEAD, 2006).

O consumo de etanol durante a lactação pode interferir nas características do leite materno como volume, sabor e composição química. Essas alterações do leite podem afetar o desenvolvimento do lactente (SPEAR; MOLINA, 2005; MOLINA et al., 2007).

O etanol, devido às suas características, tais como baixo peso molecular e solubilidade em água e lipídio, é facilmente absorvido por difusão passiva pelo estômago e intestino delgado. Com isso, o etanol chega às glândulas mamárias e ao leite materno (ARGOTE-ESPINOSA et al., 1992; NORBERG et al., 2003). Três estudos experimentais realizados com ratos mostraram que a exposição dos filhotes ao etanol pode interferir no desenvolvimento dos animais. Em um dos estudos, em que os animais foram expostos ao etanol no período pós-natal, verificou-se que o grupo exposto ao etanol teve déficit cognitivo (TIWARI; CHOPRA, 2011). E no outro estudo, os autores observaram que em ratos *Sprague-Dawley* o consumo de etanol aumenta a morte neuronal em várias regiões do cérebro (IKONOMIDOU et al., 2000). As regiões que são vulneráveis ao etanol estão relacionadas a déficits comportamentais, sendo elas o neocórtex, o hipocampo e o cerebelo (GUERRI, 2002). Além destes, um terceiro estudo mostrou que o crescimento cerebral e corporal também são afetados pela ingestão de etanol (OYAMA et al., 2000).

Ainda, como consequência da ingestão de etanol, ocorre no organismo o aumento do estado de estresse oxidativo (HOEK; PASTORINO, 2004; CHU et al., 2007), caracterizado pela produção elevada de espécies reativas e/ou uma deficiência de antioxidantes (VINCENT; TAYLOR, 2006; SOMOGYI et al., 2007). As espécies reativas, tanto de oxigênio como de nitrogênio, produtos normais do metabolismo celular, desempenham funções benéficas no organismo, mas em situações como de estresse oxidativo, tem função deletéria exacerbada (VALKO et al., 2006).

A toxicidade do etanol e a morte celular estão associadas com o aumento da disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e danos ao ácido

desoxirribonucléico (DNA) e cérebro (LEE et al., 2005; CHU et al., 2007). A inibição da enzima glutathiona peroxidase (GPx), constatada pela revisão de literatura com estudos com ratos que receberam etanol, pode ser consequência da entrada irregular de glutathiona citosólica no interior da mitocôndria (COHEN-KEREM; KOREN, 2003). Dado também observado em estudo com animais que receberam 20% de etanol durante a gestação e lactação (OJEDA et al., 2009). A diminuição da atividade da GPx e o aumento da atividade da glutathiona redutase (GR), tanto no soro como no fígado, verificado na prole, foi explicada pelos autores como uma adaptação celular ao estresse oxidativo. Mais especificamente, como uma tentativa do organismo de manter os níveis adequados de glutathiona reduzida (GSH), diminuindo o nível de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato no estado reduzido (NADPH), devido à intoxicação por etanol (OJEDA et al., 2009).

Observou-se ainda em outro estudo experimental, que a exposição crônica ao etanol durante a gestação provocava aborto, aumento do dano oxidativo ao DNA, peroxidação lipídica e disfunção mitocondrial (GUNDOGAN et al., 2010).

Nas regiões do córtex cerebral e hipocampo de ratos *Wistar* machos, observou-se um aumento dos níveis de peróxidos lipídicos, e uma depleção dos níveis da GSH, assim como da atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT), com o consumo de etanol durante o desenvolvimento cerebral. Esta observação sugere que o estresse oxidativo é mediado pela cascata neuroinflamatória e a sinalização apoptótica pode ser responsável pela apoptose neuronal e déficits comportamentais em ratos expostos ao etanol neste período (TIWARI; CHOPRA, 2011).

Ao contrário do que se tem observado em relação à gestação, o efeito do consumo materno de etanol durante a lactação sobre o estresse oxidativo no lactente ainda não está bem estabelecido. Entre as explicações apresentadas por alguns autores está a dificuldade em se medir, tanto o consumo de etanol, como a sua disponibilidade através do leite materno nos lactentes. Além destas variáveis, tem-se o consumo de etanol durante a gravidez (LITTLE et al., 2002). Considerando-se as poucas pesquisas realizadas sobre o consumo de etanol durante a lactação, este estudo foi direcionado para avaliar os efeitos da ingestão de etanol durante a lactação e suas consequências sobre o estresse oxidativo no lactente nas fases de lactação, jovem e adulta.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SISTEMA OXIDANTE E ANTIOXIDANTE

Os radicais livres são moléculas ou fragmentos moleculares que contêm um ou mais elétrons desemparelhados no último orbital molecular ou atômico, sendo altamente reativos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007a). As espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) são produtos normais do metabolismo celular, podendo desempenhar funções benéficas ou deletérias no organismo (VALKO et al., 2006).

Em torno de 98% do oxigênio envolvido no metabolismo aeróbico é reduzido em água, sendo que o restante transforma-se em ERO. As ERO, quando em concentrações normais, estão relacionadas, principalmente, à cadeia respiratória mitocondrial, metabolismo do ácido araquidônico, fagocitose, ovulação e fertilização (VINCENT; TAYLOR, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007d). Da mesma forma que as ERO, as ERN, em concentrações normais, atuam como moléculas sinalizadoras em vários processos fisiológicos como expressão e diferenciação celular, neurotransmissão, mecanismos de defesa, regulação da pressão sanguínea, imunorregulação e relaxamento do músculo liso (SOMOGYI et al., 2007).

Dentre as principais ERO fazem parte: radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e das ERN, óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) e peróxido nitrito (ONOO^-) (MANDELKER, 2008).

Altamente reativo, o $\cdot\text{OH}$, reage no local em que foi formado, atacando rapidamente as moléculas adjacentes (BOVERIS; OSHINO; CHANCE, 1972; PASTOR et al., 2000; VALKO et al., 2006). As ERO participam da reação de Fenton e de Haber-Weiss, ligando-se a metais e a outros radicais, tendo como consequência a destruição de membranas celulares, proteínas, lipídios, carboidratos e pode, até mesmo, causar mutações em ácidos nucleicos (VALKO; MORRIS; CRONIN, 2005; VALKO et al., 2007).

Através da reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), em que ocorre a dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ pela redução de dois elétrons na molécula de oxigênio (O_2), e ainda por diversas enzimas oxidases *in vivo*, o H_2O_2 é produzido principalmente nos peroxissomas. Esta molécula, apesar de ser um fraco agente oxidante, é capaz de reagir

com tióis, cobre reduzido, sais de ferro, proteínas heme e peroxidases, para dar início às reações radicalares e peroxidações lipídicas. Além disso, por ter vida longa e ser altamente difusível, é capaz de danificar a molécula de ácido desoxirribonucléico (DNA), através da reação de Fenton, gerando $\cdot\text{OH}$ (VALKO et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007).

Na cadeia respiratória mitocondrial, o $\text{O}_2^{\cdot-}$ é gerado continuamente e também durante a ativação de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos. Por ser pouco reativo, é denominada espécie reativa de oxigênio primária, sendo capaz de gerar espécies de oxigênio secundárias através da interação com outras moléculas, principalmente, por meio de processos catalisados por metais ou enzimas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007b; VALKO et al., 2007).

O $^1\text{O}_2$, forma excitada do oxigênio molecular é formado a partir de reações fotoquímicas ou por outras radiações. O mesmo possui a capacidade de reagir com várias moléculas biológicas entre elas, os lipídios das membranas, dando início ao processo de peroxidação (VASCONCELOS et al., 2007).

A meia vida do $\cdot\text{NO}$ é de apenas alguns segundos, sendo solúvel tanto em meio aquoso quanto lipídico. É formado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) através da metabolização da arginina em citrulina (GHAFOURIFAR; CADENAS, 2005). No organismo humano o $\cdot\text{NO}$ está presente de forma abundante, atuando como sinalizador molecular em processos fisiológicos como, por exemplo, na neurotransmissão, regulação do sistema imune e da pressão arterial e relaxamento da musculatura lisa. No sistema respiratório o $\cdot\text{NO}$ mantém a homeostase e atua na vasodilatação pulmonar e na broncodilatação (SUGIURA; ICHINOSE, 2011). O mesmo pode reagir com o $\text{O}_2^{\cdot-}$ gerando peróxinitrito (ONOO^-) (CARR; MCCALL; FREI, 2000).

Molécula ativa oxidante não radicalar, mas altamente difusível e reativa, o ONOO^- pode causar fragmentação do DNA e oxidação lipídica (CARR; MCCALL; FREI, 2000). Na reação com tecidos e fluidos humanos forma nitrotirosinas que podem estar relacionadas com doenças neurodegenerativas, pelo fato de os macrófagos e as células gliais gerarem óxido nítrico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007b).

Os organismos, como forma de se proteger dos danos que as espécies reativas causam, utilizam antioxidantes como mecanismo de defesa. Os antioxidantes são substâncias que retardam ou evitam significativamente a oxidação de substratos, mesmo estando em concentrações inferiores aos substratos oxidáveis (HALLIWELL;

GUTTERIDGE, 2007c). O sistema antioxidante pode ser dividido em não enzimático e enzimático. O não enzimático é composto principalmente por glutathione reduzida (GSH) e ácido úrico, e os nutricionais, como ascorbato (vitamina C), tocoferóis (vitamina E), carotenóides e flavonóides. Dos principais antioxidantes enzimáticos, fazem parte a SOD, a CAT, a GPx e a GST (MASELLA et al., 2005). A GSH, a qual faz parte do sistema antioxidante não enzimático endógeno, atua como antioxidante generalista e cofator de diversas enzimas desintoxicantes, entre elas a GPx e a GST (MASELLA et al., 2005). A vitamina C é um antioxidante solúvel em água capaz de neutralizar ERO antes do início da peroxidação lipídica. Já a vitamina E é um importante antioxidante lipossolúvel, com a capacidade de proteger da peroxidação lipídica os ácidos graxos da membrana. Da mesma forma, os carotenóides também protegem os tecidos ricos em lipídios. Os flavonóides, os quais são fitonutrientes ou fitoquímicos, tem capacidade de quelar metais, os quais participam do metabolismo do oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007c).

A SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet -}$ a H_2O_2 e O_2 , sendo uma das principais enzimas que participam de forma direta da eliminação de espécies reativas de oxigênio (SINGH; SHARAD; KAPUR, 2004; McCORD; FRIDOVICH, 1978).

A CAT participa especificamente da decomposição de H_2O_2 em O_2 e água (H_2O), sendo encontrada nos peroxissomas e nas mitocôndrias das células. O peroxissoma é a principal organela responsável pela detoxificação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, além de ser fonte de peróxidos orgânicos, de produtos carbonílicos e 1O_2 (VALKO et al., 2007).

A GPx atua na redução dos peróxidos através da adição de dois elétrons, resultando na formação de selenoles (Se-OH). Há duas formas da enzima glutathione peroxidase, a selênio independente e a dependente. A GPx atua em conjunto com a GSH, a qual é um tripeptídeo presente em altas concentrações nas células (VALKO et al., 2006).

A GST exerce efeito protetor, devido à sua capacidade de catalisar a conjugação da GSH com produtos finais da oxidação (MASELLA et al., 2005).

Quando há uma produção elevada de espécies reativas (por exemplo, no caso de inflamação crônica), e/ou uma deficiência de antioxidantes não enzimáticos ou enzimáticos (devido à mutação de enzimas antioxidantes, toxinas ou redução da ingestão de antioxidantes naturais), capazes de neutralizar os agentes pró-oxidantes, tem-se uma situação de estresse oxidativo (VINCENT; TAYLOR, 2006; SOMOGYI

et al., 2007). O aumento do metabolismo oxidativo celular pode ser consequência de fatores como exposição ao frio, a medicamentos, infecções, traumas, radiação, toxinas, excesso de atividade física, carências nutricionais, consumo de etanol, entre outros (GOTZ; KUNIG; REIDERER, 1994).

O estresse oxidativo vem sendo associado com diversas doenças crônicas, como câncer, diabetes *mellitus*, doenças cardiovasculares, distúrbios neurodegenerativos, obesidade e também com o processo de envelhecimento. Os danos causados por espécies reativas em excesso podem danificar carboidratos, DNA, proteínas e lipídios de membranas (VALKO et al., 2007).

A reação do $\cdot\text{OH}$ com hidrocarbonetos $(\text{CHOH})_n$ nos carboidratos resulta na quebra de moléculas importantes, como o ácido hialurônico. Compostos da molécula de DNA reagem com $\cdot\text{OH}$, danificando as bases purínicas e pirimídicas, assim como a estrutura da desoxirribose (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007d). Danifica preferencialmente a guanina, gerando 8-hidroxi-guanina (8-OH-Gua). Como consequência, ocorre na quebra da cadeia do DNA, ligação cruzada entre as fitas e também modificações nas bases nitrogenadas resultando em mutações e indução da apoptose (VASCONCELOS et al., 2007). Danos oxidativos permanentes ao material genético são o primeiro passo para o desenvolvimento da carcinogênese e envelhecimento (VALKO et al., 2007).

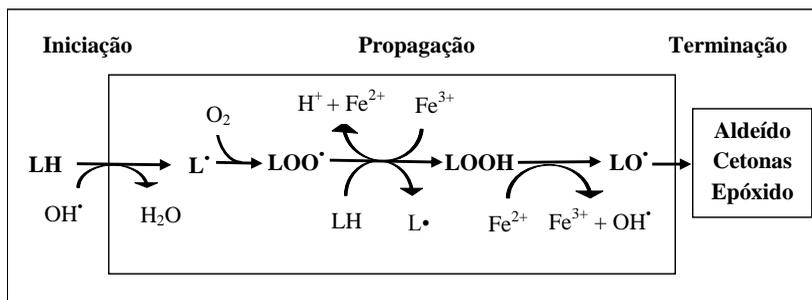
Os mecanismos que estão envolvidos na oxidação de proteínas por ERO, foram elucidados em estudos em que as proteínas, os peptídeos simples e os aminoácidos foram expostos a radiações ionizantes, em condições em que são formados radicais hidroxilas ou uma mistura de radicais hidroxilas e superóxido. Todas as cadeias laterais dos aminoácidos, em especial a cisteína e a metionina, são suscetíveis à oxidação pela ação das ERO/ERN (STADTMAN, 2004). Como resultado do estresse oxidativo, ocorre a fragmentação das cadeias e também a oxidação de aminoácidos, resultando na produção de compostos carbonilados (VASCONCELOS et al., 2007).

A peroxidação lipídica da membrana (Figura 1) é resultado da ação de espécies reativas, principalmente $\cdot\text{OH}$, os quais retiram um átomo de hidrogênio de um grupo metileno alílico, normalmente de um ácido graxo poliinsaturado (LH), deixando um elétron desemparelhado no carbono. Formando assim, um radical lipídico centrado no radical alquil ($\text{L}\cdot$), o que caracteriza a etapa de iniciação. O radical forma um dieno conjugado, sob condições aeróbicas, o qual reage com O_2 formando um radical peróxido ($\text{LOO}\cdot$). Este por sua vez, da continuidade

ao processo retirando um átomo de hidrogênio de moléculas de lipídios próximos, e assim sucessivamente, sendo esta a etapa de propagação. A combinação do radical peroxil com o hidrogênio abstraído gera o hidroperóxido lipídico (LOOH), o qual é instável na presença de metais de transição como o ferro e o cobre. A seguir, o LOOH sofre quebra formando aldeídos como o malonaldeído (MDA) e 4-hidroxinonenal. A última etapa é a da terminação, em que as espécies reativas são neutralizadas pela ação de antioxidantes ou pela reação de dois radicais lipídicos, formando produtos não radiculares (aldeídos, cetonas, epóxidos) (VASCONCELOS et al., 2007).

Os mecanismos responsáveis pela peroxidação lipídica podem ser enzimáticos (ciclooxigenases e peroxidases) ou não enzimáticos (auto-oxidação), participando da reação ERO, metais e outras espécies reativas. As alterações oxidativas podem modificar as propriedades físicas e químicas das membranas, causando alterações na fluidez e permeabilidade, com aumento do líquido intracelular e possível ruptura das membranas celulares e das organelas, resultando em morte celular, ou ainda, alterações de transporte de íons e inibição dos processos metabólicos (NIGAM; SCHEWE, 2000; VASCONCELOS et al., 2007).

Figura 1 - Representação geral das fases da peroxidação lipídica.



LH, ácido graxo poliinsaturado; OH^\bullet , radical hidroxila; L^\bullet , radical alquila; O_2 , oxigênio; LOO^\bullet , radical peroxila; H^+ , íon hidrogênio; Fe^{2+} , ferrosa; Fe^{3+} , férrica; LH, ácido graxo insaturado; L^\bullet , radical alquila; LOOH , hidroperóxido lipídico; LO^\bullet , radical alcóxil.

Fonte: Loureiro; Mascio; Medeiro, 2002.

O MDA, produzido na peroxidação lipídica, é mutagênico em células de mamíferos e de bactérias, além de ser cancerígeno em ratos.

O hidroxinonenal é fracamente mutagênico, no entanto, age sobre as vias de transdução de sinal, que por sua vez, têm grande efeito sobre os fenótipos das células (VALKO et al., 2006). A avaliação da peroxidação lipídica pode ser realizada por meio da detecção dos derivados de produtos da oxidação entre outros, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o MDA (OHKAWA; OHISI; YAGI, 1979; BIRD; DRAPER, 1984).

O equilíbrio existente no organismo entre os antioxidantes e oxidantes é alcançado por meio do mecanismo chamado de regulação redox, o qual mantém a homeostase do organismo (DRÖGE, 2002).

2.2 EFEITO DA INGESTÃO DE ETANOL DURANTE A LACTAÇÃO NA PROLE

O etanol, após a sua ingestão, é absorvido rapidamente por difusão passiva através da parede do estômago (em torno de 20%), enquanto 80% é absorvido no intestino delgado. Após a ingestão e absorção de doses inferiores a 0,3 g/kg, ocorre o metabolismo de primeira passagem (MPP), em que o fígado metaboliza o etanol, evitando que este chegue em grandes quantidades a outros órgãos. Em casos de ingestão de quantidades elevadas de etanol, o MPP pode não ser suficiente para o metabolismo do etanol. Quando na corrente sanguínea o etanol, por ser solúvel em água, é distribuído pelo corpo sem a necessidade de se ligar a proteínas plasmáticas, havendo assim, uma correlação entre o volume de etanol e a sua distribuição na água total do corpo (NORBERG et al., 2003).

A metabolização do etanol ocorre no estômago e no fígado, sendo que apenas de 2% a 10% são eliminados pelos rins e pulmões, o restante é oxidado principalmente no fígado (LIEBER, 1993).

As três principais vias para o metabolismo do etanol (Figura 2) são via CAT, álcool desidrogenase (ADH) e via sistema microsossomal de oxidação de etanol (MEOS) (LIEBER, 2004). A enzima CAT é encontrada principalmente nos peroxissomas e mitocôndrias e é capaz de oxidar *in vitro* o etanol na presença do sistema de geração de H₂O₂. No entanto, em condições fisiológicas desempenha um papel secundário no metabolismo do etanol, pois são produzidas pequenas quantidades de H₂O₂ (KEILIN; HARTREE, 1945; LIEBER, 2004).

A principal via do metabolismo do etanol envolve a ADH, a qual catalisa a conversão do etanol em acetaldeído. Existem múltiplas formas moleculares de ADH, sendo que as presentes no fígado possuem uma

maior afinidade com o etanol. As demais enzimas extrahepáticas, com exceção da ADH gástrica, tem participação insignificante no metabolismo do etanol (LIEBER, 1993).

O metabolismo do etanol pela ADH hepática classe I, o qual ocorre no citosol dos hepatócitos, produz o acetaldeído com a transferência do hidrogênio do etanol para o cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), sendo convertido à sua forma reduzida (NADH) por meio de uma reação reversível (GEMMA; VICHI; TESTAI, 2006). O acetaldeído novamente perde um hidrogênio e é convertido em acetato, sendo que na sua maioria, é liberado na corrente sanguínea (LIEBER, 1993).

A enzima ADH gástrica é responsável por uma parcela do metabolismo do etanol, tanto em ratos como em humanos, sendo que *in vivo* seu efeito é refletido pelo MPP (JULKUNEN; DIPADOVA; LIEBER, 1985; MIRMIRAN-YAZDY et al., 1995). A atividade da ADH gástrica é mais acentuada quando a concentração de etanol é elevada, ou seja, a quantidade de etanol no organismo influencia na magnitude do MPP, e conseqüentemente, na biodisponibilidade do etanol e sua potencial toxicidade (JULKUNEN; DIPADOVA; LIEBER, 1985).

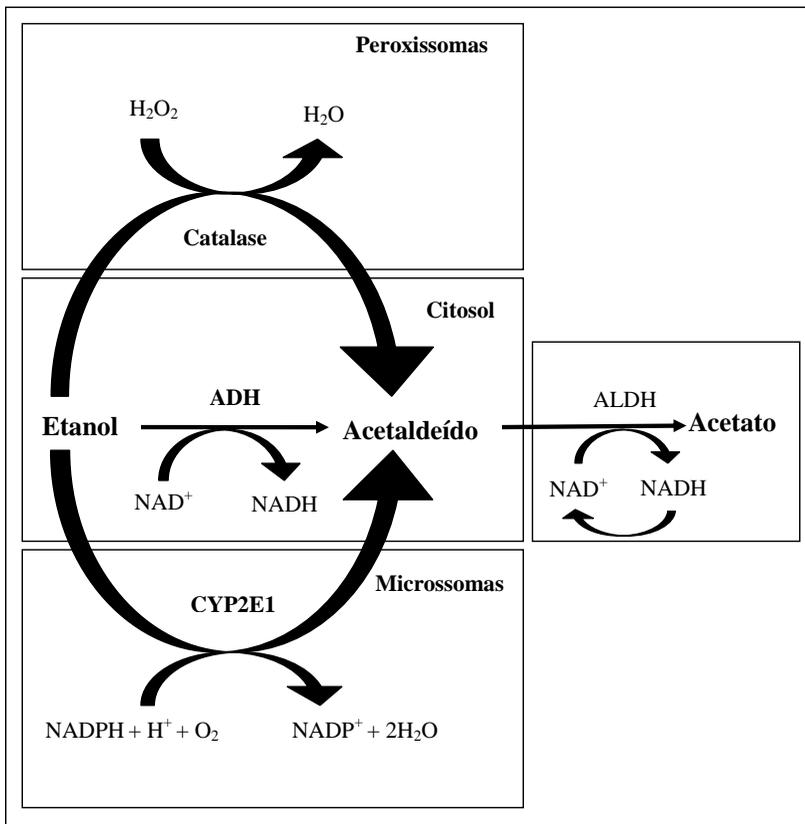
O consumo crônico de etanol induz o MEOS, resultando, tanto no aumento do citocromo P450 2E1 (CYP2E1) em 4 a 10 vezes, como na proliferação do retículo endoplasmático em animais experimentais e em humanos. Este aumento contribui para a indução de tolerância metabólica ao etanol, a qual ocorre comumente em alcoólatras (LIEBER; DECARLI, 1968; TSUTSUMI et al., 1989; SALMELA et al., 1998). A metabolização do etanol pelo MEOS, em casos de ingestão moderada, é de cerca de 10% (AGARWAL, 2001).

O produto da oxidação do etanol pelas três vias metabólicas citadas acima é o acetaldeído, o qual é oxidado no organismo pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH) em acetato. Esta é uma reação eficiente, devido à rápida metabolização do produto da oxidação do etanol (GEMMA; VICHI; TESTAI, 2006). A acetil CoA, forma ativada do acetato, pode ser metabolizada, formando corpos cetônicos, ácidos graxos, esteróides e aminoácidos não essenciais. Pode ainda ser oxidada no Ciclo de Krebs formando dióxido de carbono (CO₂), H₂O e energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) (AGARWAL, 2001; GEMMA; VICHI; TESTAI, 2006).

As enzimas ADH e ALDH utilizam como cofator NAD⁺, o qual, na oxidação de etanol, é reduzido a NADH. A relação NADH/NAD⁺ aumenta consideravelmente, alterando o estado celular redox,

desencadeando efeitos adversos (NORBERG et al., 2003). O que parece limitar o processo é a reoxidação hepática do NADH junto com a atividade da ALDH e da ADH, as quais regulam de forma equilibrada, a taxa de oxidação do etanol (AGARWAL, 2001; GEMMA; VICHI; TESTAI, 2006).

Figura 2 - Vias do metabolismo oxidativo do etanol.



ADH, álcool desidrogenase; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; H_2O , água; NAD^+ , nicotinamida adenina dinucleotídeo estado oxidado; NADH , nicotinamida adenina dinucleotídeo estado reduzido; CYP2E1, citocromo P450 2E1; NADPH nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato estado reduzido; H^+ , íon hidrogênio; O_2 , oxigênio; NADP^+ nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato estado oxidado; ALDH, aldeído desidrogenase.

Fonte: National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 2008.

O consumo crônico de etanol por ratos diminui a capacidade da ALDH mitocondrial em oxidar acetaldeído. Este fato associado à taxa de oxidação alterada ou até mesmo inalterada de etanol resulta em elevadas concentrações de acetaldeído no sangue venoso hepático. O mesmo é liberado pelo fígado no plasma e liga-se aos eritrócitos, podendo afetar tecidos extra-hepáticos, além do fígado (HASUMURA; TESCHKE; LIEBER, 1975; DI PADOVA et al., 1987; CABALLERLA; BARAONA; LIEBER, 1987; LIEBER, 1993).

O etanol, quando consumido durante os períodos de reprodução e lactação, está relacionado com inúmeros efeitos adversos, tendo influência sobre a secreção e função endócrina (HEIL; SUBRAMANIAN, 2000). Os períodos de gestação e lactação são considerados críticos, pois nestas fases ocorre o desenvolvimento dos sistemas endócrino e nervoso, ou seja, as estruturas e as funções dos sistemas em formação são vulneráveis a agressões (SYMONDS et al., 2001; SANTOS-MONTEIRO et al., 2002; OLIVEIRA, 2010).

Modificações nas funções orgânicas podem ser causadas por alterações ambientais, estresse, doenças, dieta e consumo de etanol (FOWDEN; GIUSSANI; FORHEAD, 2006). A exposição de lactantes ao etanol pode afetar negativamente a produção de leite, o sabor e a composição química e, conseqüentemente, o desenvolvimento do lactente (SPEAR; MOLINA, 2005; MOLINA et al., 2007). A ingestão de solução de água com 10% e 20% de etanol durante 12 dias por ratas lactantes, influenciou no ganho de peso das proles e do peso do fígado em relação ao grupo controle, o mesmo não ocorreu quando foi ofertada uma solução com 5% de etanol (OYAMA et al., 2000). Em relação ao efeito do etanol sobre o peso do cérebro, observou-se uma diminuição cerebral apenas nos filhotes das ratas que receberam 20% de etanol (OYAMA et al., 2000).

Pesquisas experimentais mostram que o etanol interfere no desenvolvimento do cérebro, sendo que algumas áreas são consideradas mais vulneráveis que outras (TIWARI; CHOPRA, 2011). São mais sensíveis ao etanol o neocórtex, o hipocampo e o cerebelo, estando associados com déficits comportamentais (GUERRI, 2002). Verificou-se que a exposição de roedores *Sprague-Dawley* com 7 dias de idade ao etanol (solução salina com 20% de etanol via subcutânea), em um único dia durante a primeira semana pós-natal, leva a um aumento da morte neuronal de várias regiões do cérebro por apoptose (IKONOMIDOU et al., 2000). Os autores mostraram ainda, que a manutenção acima de 200 mg/dL dos níveis de etanol no sangue, por quatro horas, causa

neurodegeneração apoptótica no cérebro de ratos em desenvolvimento (IKONOMIDOU et al., 2000).

Um incremento nos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 beta (IL-1 β) no córtex cerebral e hipocampo foi observado em ratos tratados com etanol, sendo este um indicativo de neuroinflamação. Também, observou-se que a exposição crônica ao etanol resulta em um maior dano aos tecidos por oxidação, devido ao aumento da peroxidação lipídica e diminuição da atividade de antioxidantes endógenos (GSH, SOD e CAT) no cortex cerebral e hipocampo (TIWARI; CHOPRA, 2011). Além disso, pode causar ainda a ativação da proteína quinase C e fator nuclear kappa b (NF-KB), resultando na fragmentação do DNA e aumento da morte neuronal por apoptose e, conseqüentemente, déficits de comportamento e demência (TIWARI; CHOPRA, 2011). Esses dados confirmam as observações anteriormente identificadas em um estudo de revisão (JUNG; GATCH; SIMPKINS, 2005).

2.3 EFEITO DA INGESTÃO DE ETANOL NA PROLE SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO

O etanol, quando ingerido durante o período de lactação, passa para o leite em concentrações variáveis. Entre os fatores que interferem na quantidade de etanol que chega ao leite, estão à velocidade de absorção e o volume de sua distribuição no organismo (JASON, 1991).

O etanol atravessa a membrana biológica dos órgãos e/ou tecidos por meio de difusão ou pinocitose. Desta forma, os efeitos da exposição do etanol no lactente dependem, tanto da farmacocinética do etanol, como da maturidade fisiológica do lactente (HOWARD; LAWRENCE, 1998). Na lactante, o etanol é encontrado em maior quantidade no plasma do que no leite, devido ao seu baixo peso molecular e a sua solubilidade em lipídios e na água. O tempo de depuração plasmática do etanol no lactente em relação ao materno é aproximadamente a metade, o que pode ser resultado de uma menor concentração das desidrogenases do etanol e do acetaldeído no fígado (HOWARD; LAWRENCE, 1998; ARGOTE-ESPINOSA et al., 1992). Com isso, o lactente torna-se mais suscetível ao efeito do etanol e aos produtos do seu metabolismo (TAVARES-DO- CARMO, 1996).

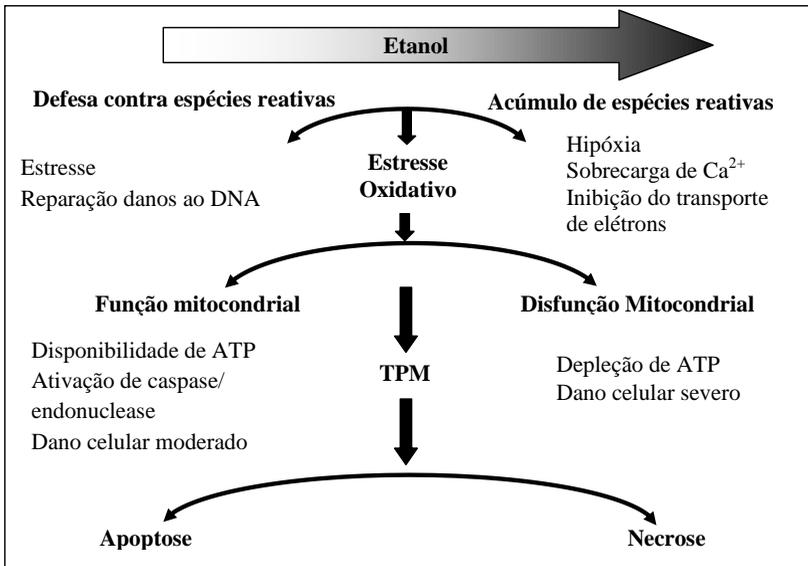
A ingestão materna de água com 20% de etanol resultou em diminuição de cerca de 20% de carboidratos no leite, o mesmo não foi observado em relação à proteína e lipídio (NEVES; FACCIN;

TAVARES-DO-CARMO, 1995). Observou-se ainda, um retardo de crescimento e desnutrição na prole em relação ao grupo controle (NEVES; FACCIN; TAVARES-DO-CARMO, 1995). Em outro estudo, concluíram que o efeito da ingestão de etanol materno sobre o desenvolvimento dos filhotes é dose-dependente somente nas concentrações de 10% e 20%, pois não houve comprometimento do crescimento dos filhotes na proporção de 5% (OYAMA et al., 2000). Em outro estudo semelhante, as ratas lactantes começaram o experimento recebendo 5% de etanol progredindo até 20% durante 21 dias, contados a partir do nascimento. O consumo estimado de leite pela prole, avaliado pela subtração do peso do rato após 30 minutos de sucção, foi significativamente reduzido. Este fato pode causar o menor ganho de peso e conseqüente retardado no crescimento da prole ao final da lactação (MURILLO-FUENTES et al., 2007).

O fígado é o principal alvo da toxicidade do etanol e por isso está envolvido na patogênese das doenças alcoólicas, nas deficiências nutricionais e no estresse oxidativo (OJEDA et al., 2009).

O consumo de etanol afeta a homeostase celular, pois esta é dependente da função mitocondrial, desempenhando um papel crítico na manutenção do equilíbrio entre a formação de espécies reativas e a defesa celular (Figura 3). O estresse oxidativo exerce efeito direto sobre os componentes da mitocôndria, o que pode gerar um ciclo vicioso. A resposta mitocondrial é controlada principalmente pelo equilíbrio de fatores pró e anti-apoptóticos, por meio da ativação ou supressão da transição da permeabilidade mitocondrial (TPM). O consumo de etanol, juntamente com a produção elevada de espécies reativas pode ter como conseqüências a apoptose ou necrose celular (HOEK; CAHILL; PASTORINO, 2002).

Figura 3 - Alteração do equilíbrio celular no tratamento com etanol.



DNA, ácido desoxirribonucléico; Ca^{2+} , íon de cálcio; TPM, transição da permeabilidade mitocondrial; ATP, adenosina trifosfato.

Fonte: Hoek; Cahill; Pastorino, 2002.

O estresse oxidativo induzido em mitocôndrias hepáticas isoladas observado em um estudo de revisão, parece estar relacionado com o colapso da membrana mitocondrial e com a TPM e, conseqüentemente, com o influxo de íons e H_2O , ocasionando o início da morte dos hepatócitos por necrose (HOEK; CAHILL; PASTORINO, 2002; ADACHI et al., 2004). Com o aumento da permeabilidade externa da membrana mitocondrial, ocorre a liberação do citocromo c e a indução da apoptose (GREEN; KROEMER, 2004). Na cultura *in vitro* de hepatócitos expostos ao etanol, ocorrem alterações apoptóticas, juntamente com a formação de ERO e TPM (ADACHI; ISHII, 2002). Em um estudo com ratos adultos, observou-se alterações nas características da membrana, plasmática de hepatócitos, como a fluidez e as microestruturas da membrana devido ao efeito em cascata causado pelo metabolismo do etanol, resultando na amplificação do estresse oxidativo (NOURISSAT et al., 2008).

O consumo agudo ou crônico de etanol pode causar depleção seletiva de glutatona reduzida mitocondrial (mGSH) e aumento da

susceptibilidade da organela ao dano oxidativo (FERNÁNDEZ-CHECA; KAPLOWITZ, 2005). A ação do etanol sobre a homeostase da mGSH pode desempenhar um papel no desenvolvimento da doença hepática alcoólica, por favorecer o dano oxidativo mitocondrial, diminuindo a tolerância das células ao TNF- α , que é uma citocina pró-inflamatória (FERNÁNDEZ-CHECA; KAPLOWITZ, 2005).

No estudo com camundongos *knockout* SOD1, que são deficientes na produção de SOD1, observou-se que o consumo moderado de etanol (10% das calorias totais) resultou em um aumento da peroxidação lipídica, acúmulo de nitrotirosina, necrose centrolobular extensa e inflamação (KESSOVA; HO; THUNG, 2003). Entretanto, outros autores em dois estudos, que ofertaram etanol via enteral na proporção de 12 e 14,5 g/kg de peso/dia respectivamente a ratos, que super-expressavam SOD1 ou SOD2, observaram que os animais foram protegidos contra a lesão hepática (WHEELER et al., 2001a, b).

As alterações redoxes no fígado são mediadas pela enzima ADH, apesar do estresse oxidativo ser gerado prioritariamente pelo MEOS, pela ação da enzima CYP2E1, da mesma forma que as demais isoformas do Citocromo P450 liberam ERO (LIEBER, 2004). A enzima CYP2E1 tem sido relacionada ao desenvolvimento de doenças hepáticas (BUTURA et al., 2009). No entanto, alguns autores tem relatado que a maioria das doenças hepáticas resultantes da exposição crônica ao etanol é independente do metabolismo do etanol (RONISA et al., 2010). Contudo, estudos têm mostrado que a formação de acetaldeído está associada ao desenvolvimento de estresse oxidativo (LIEBER, 2004; BUTURA et al., 2009; RONISA et al., 2010). O consumo excessivo de etanol resulta no aumento da CYP2E1 nos hepatócitos, que além de causar depleção de mGSH e gerar ERO tendo como catalizador o ferro e, conseqüentemente causar estresse oxidativo, também promove a peroxidação lipídica (FRANK et al., 2004). Esta favorece a formação de 4-hidroxinonenal, o qual reage com o DNA através da ligação com as bases dos ácidos nucléicos, formando adutos exocíclicos (FRANK et al., 2004).

No estudo realizado com ratos machos albinos da linhagem *Wistar* (16 a 18 semanas de idade), expostos a diferentes concentrações de etanol (0,8 g; 1,2 g e 1,6 g de etanol/kg de peso) durante 4 semanas. Observou-se que, além do menor ganho de peso corporal, também houve um aumento significativo do ácido tiobarbitúrico e diminuição da GSH no cérebro. Verificou-se ainda, uma inibição da SOD, CAT, GPx e GR, caracterizando-as como enzimas dose-dependentes. Apesar disso,

não houve nenhuma alteração fisiopatológica no cérebro (DAS *et al.*, 2007).

Em outro estudo, os autores avaliaram o efeito na prole da ingestão de 20% de etanol durante a gestação e lactação de ratas. Os mesmos observaram uma diminuição da atividade da GPx e um aumento da atividade da GR e da CAT no fígado, enquanto que, no soro, a atividade da GPx esteve aumentada (OJEDA *et al.*, 2009). A diminuição da entrada de GPx mitocondrial, poderia ser resultado da entrada irregular de glutatona citosólica no interior da mitocôndria (COHEN-KEREM; KOREN, 2003). Já o aumento da atividade da GR poderia ser consequência da resposta de adaptação celular ao estresse oxidativo, com o objetivo de manter o nível ideal de GSH, ou diminuir o nível de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato estado reduzido (NADPH), o qual participa da intoxicação por etanol (OJEDA *et al.*, 2009). O aumento da atividade da CAT em lactentes perinatais sugere que esta enzima tem um papel mais importante no metabolismo do etanol do que o sistema ADH (TRAN; WU; HILL, 2007). Os níveis aumentados de GPx no soro poderiam ser resultado do fato de que o etanol diminui a entrada do selênio no fígado. Desta forma, se mantém a atividade da GPx alta no soro, e esta atua como primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo provocado pelo etanol (OJEDA *et al.*, 2009). Ou ainda, o nível aumentado de GPx no soro poderia ser resultado da menor ingestão de leite materno como consequência da ingestão do etanol, o que provocaria desidratação (GARCIA-DELGADO *et al.*, 2004).

Estudos que avaliam a relação entre o estresse oxidativo na prole nas fases da vida e o consumo de etanol por ratas lactantes não foram encontrados até o presente momento. Um dos aspectos mais evidenciados pelos estudos que avaliam o efeito do consumo materno de etanol na prole é a alteração no crescimento e no desenvolvimento do mesmo (OYAMA *et al.*, 2000; MENNELLA, 2001; MURILLO-FUENTES *et al.*, 2007). Esses fatos motivaram a execução da presente proposta.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do consumo de etanol por ratas lactantes no estresse oxidativo da prole nas fases de lactação, jovem e adulta.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o desenvolvimento da prole por meio do ganho de peso nas fases de lactação, jovem e adulta da vida;
- Avaliar o estresse oxidativo na prole por meio da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S - transferase (GST) e catalase (CAT), no sangue e no fígado nas fases lactação, jovem e adulta;
- Avaliar o dano lipídico na prole por meio da peroxidação lipídica (TBARS) no plasma e fígado nas fases lactação, jovem e adulta.

4 SUJEITOS E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

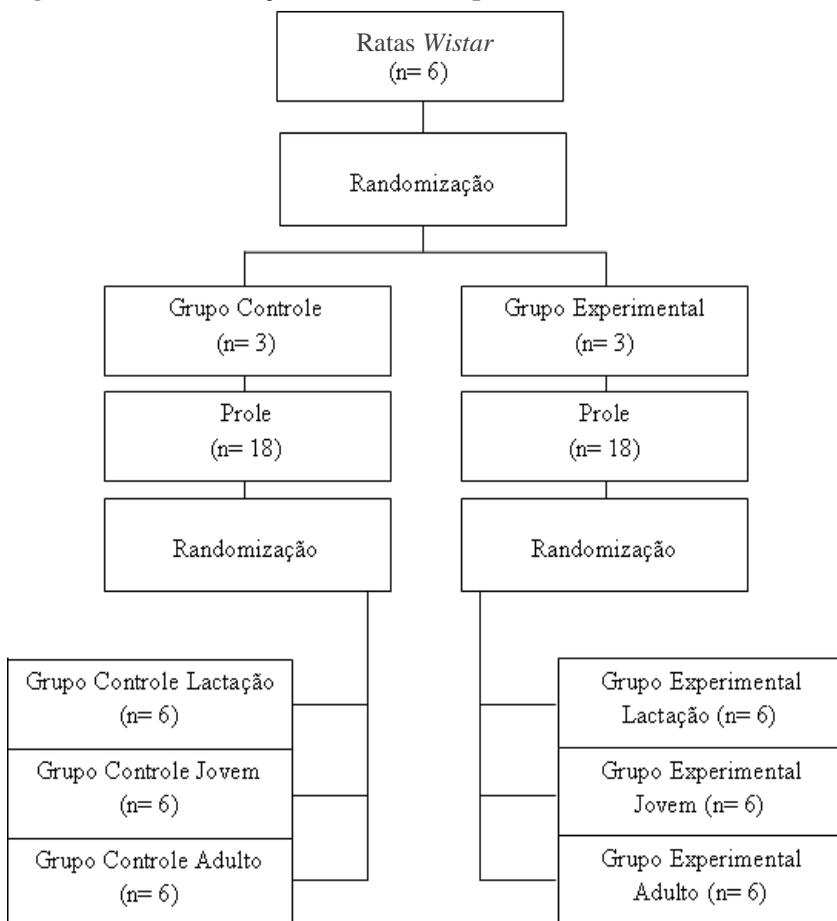
Estudo experimental controlado, desenvolvido no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), com ratas fêmeas da linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério Central da UFSC. O protocolo do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFSC (#103/CEUA) e está de acordo com o World Medical Association, Declaração de Helsinki (WMA, 2008).

4.2 ANIMAIS E TRATAMENTO

Participaram do estudo 6 ratas adultas (3 meses de idade), com peso inicial compreendido entre 150 - 200 g. Durante o experimento, os animais foram mantidos no biotério em gaiolas metabólicas individuais, com temperatura constante de aproximadamente $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, e ciclo claro/escuro de 12/12 horas. As ratas foram acasaladas e mantidas durante a gestação com água e dieta comercial balanceada “*ad libitum*” (Nuvilab CR-1[®], Colombo, PR, Brasil). No dia do nascimento das proles, considerado dia zero, as ratas foram distribuídas em 2 grupos com 3 ratas em cada: Grupo Controle (GC) e Grupo Experimental (GE). As proles (n= 18/cada), constituído de machos e fêmeas, de cada grupo de ratas (GC e GE) foram randomizadas (2 animais oriundos de cada rata) em 3 subgrupos de acordo com a idade: Fase de Lactação (12 dias): Grupo Controle Lactação (GCL) e Grupo Experimental Lactação (GEL). Na fase jovem (30 dias): Grupo Controle Jovem (GCJ) e Grupo Experimental Jovem (GEJ) e na adulta (90 dias): Grupo Controle Adulto (GCA) e Grupo Experimental Adulto (GEA) (Figura 1). As proles da fase lactação do grupo controle e experimental ingeriram apenas leite durante os 21 dias da lactação. As ratas do GC e as proles das fases jovens e adultas tanto controle como experimental, receberam dieta comercial e água “*ad libitum*” até o sacrifício. As ratas do GE (n= 3) receberam dieta comercial e água com 20% de etanol absoluto (EMSURE[®] ACS, ISSO, Reag. Ph Eur MERCK Brasil Jacarepaguá, RJ, Brasil) “*ad libitum*” como única fonte de líquido (TAVARES-DO-CARMO; NASCIMENTO-CURI, 1990). A partir do 12^o dia de lactação, foi retirado o etanol da água e as mães foram mantidas com

livre acesso à alimentação comercial balanceada e água até o sacrifício. O sacrifício das ratas e da prole foi realizado por deslocamento cervical com os animais em jejum e tendo sido utilizado éter etílico como anestésico.

Figura 4 - Randomização das ratas e da prole.



4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ETANOL SOBRE O DESENVOLVIMENTO DAS PROLES

O efeito do etanol sobre o desenvolvimento das proles foi avaliado por meio do ganho de peso. Os animais foram pesados em balança Weighing Balance PW 3015 com capacidade de 1.500 gramas e sensibilidade de 0,1 g (Coleman, Santo André - SP). Durante a lactação o peso foi aferido pelo “*pool*” de todos os filhotes nos dias 0, 4 e 8. No 12º dia e nos demais períodos (jovem e adulto), o peso foi aferido individualmente após o sacrifício.

4.4 MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

Após morte por deslocamento cervical, o fígado foi rapidamente removido, mantido no gelo, e perfundido em solução salina (0,9% NaCl) gelada, por 5 minutos. Do fígado foi retirado 100 mg e homogeneizado (1:9 w/v) em uma solução tampão 0,1% Triton X-100, 0,12M NaCl, 30mM Na₂PO₄, pH 7,4. A homogeneização foi realizada a 4°C em um homogeneizador tipo TISSUE TEAROR Variable Speed 5000 – 30000 RPM 1.2A (DREMEL, Biospec Products, INC. Bartlesville, Oklahoma, USA). A seguir, o homogenato foi centrifugado a 5.000g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram estocados em nitrogênio líquido até as análises. O sangue foi colhido por punção cardíaca, usando seringas heparinizadas (BEUTLER, 1975). Após a remoção do plasma, as células vermelhas foram lavadas três vezes em solução salina. O hemolisado foi obtido após a adição de três volumes de 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, e centrifugados a 3.000g por 5 minutos. O hemolisado foi posteriormente diluído 500 vezes.

As análises da atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona S-transferase (GST) e glutatona peroxidase (GPx) foram realizadas no hemolisado e no homogenato. A determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada no plasma e no homogenato.

Todos os parâmetros bioquímicos descritos acima foram medidos em duplicata, exceto a determinação de TBARS, que foi medido em triplicata. As substâncias químicas usadas foram provenientes da Sigma-Aldrich Co., Ohio, EUA.

4.4.1 Catalase

A atividade da CAT foi quantificada pela mensuração do decaimento de 10 mM de solução de peróxido de hidrogênio a 240 nm durante 60 segundos, pela enzima presente na amostra (AEBI, 1984). Foi utilizado espectrofotômetro GBC UV/VIS modelo 916 (Sidney-Nova Gales do Sul, Austrália). Os resultados foram expressos em mmol H₂O₂/ min/ml ou g de tecido.

4.4.2 Superóxido dismutase

A SOD foi medida pelo método do Adrenocromo a 480 nm, de acordo com Misra e Fridovich (1972) e modificado por Boveris e Cadenas (1982). Para a leitura foi utilizado o espectrofotômetro GBC UV/VIS modelo 916 (Sidney-Nova Gales do Sul, Austrália). Os resultados foram expressos em U SOD/ ml de sangue ou g de tecido.

4.4.3 Glutathione S-transferase

A atividade da GST foi determinada a 340 nm usando CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) como substrato e uma concentração de 0,15M de GSH (HABIG et al., 1976). Foi utilizado o espectrofotômetro GBC UV/VIS modelo 916 (Sidney-Nova Gales do Sul, Austrália). Os resultados foram expressos em µmol/min/ml de hemolisado ou g de tecido.

4.4.4 Glutathione Peroxidase

A GPx foi medida a 340 nm através do sistema redutor glutathione redutase/NADPH/glutathione oxidase, pela dismutação do *tert*-butilhidroperóxido (FLOHÉ; GUNZLER, 1984). Os resultados foram expressos em µmol/min/ml de hemolisado ou g de tecido.

4.4.5 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O TBARS foi determinado para avaliar a oxidação lipídica endógena no plasma e fígado de acordo com Ohkawa *et al.* (1979) e Bird e Draper (1984). Ao plasma foi adicionado ácido tricloroacético a 12% (1:4 v/v), e em seguida, centrifugado a 5000g por 3 minutos. Aos sobrenadantes foi adicionado o tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 7,0,

vortexeado por 20 segundos, e adicionado ácido tiobarbitúrico 0,67%, mantidos em água fervendo por 60 minutos e após em 5°C por 30 minutos. Após a retirada de porções do fígado, foram imediatamente adicionados 12% de ácido tricloroacético (1:4 v/v), e depois centrifugadas a 5000g por 3 minutos. Aos sobrenadantes foram adicionados 50 mM Tris-HCl, pH 7,0, agitado por 20s, adicionado 67% (w/v) de ácido 2-tiobarbitúrico, mantido em banho-maria por 60 minutos, em seguida resfriado a 5°C por 30 minutos, e posteriormente analisado a 535nm. A leitura foi realizada no espectrofotômetro GBC UV/VIS modelo 916 (Sidney-Nova Gales do Sul, Austrália). Resultados foram expressos em $\mu\text{mol/ml}$ de plasma ou g de tecido.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados coletados e anotados foram organizados com dupla entrada, em arquivos do programa *Excel 2007*, para a montagem do banco de dados. Na análise estatística inicialmente foi aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados foram normalizados pela transformação em log na base 10 e apresentados na forma de média e erro-padrão da média. Para diferenças entre as médias dos grupos foi utilizado o teste “*t*” de Student não pareado com nível de significância menor de 5% ($p < 0,05$). Os testes foram realizados utilizando o software estatístico *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* versão 16.0 para Windows.

5 ARTIGO ORIGINAL

ETHANOL IN LACTATION PROMOTES OXIDATIVE STRESS IN DIFFERENT PHASES OF RATOFFSPRING BRIEF TITLE: ETHANOL, LACTATION AND OXIDATIVE STRESS IN RATS

ABSTRACT

Background & aims: To evaluate the effect of ethanol on body weight and biomarkers catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the offspring.

Methods: The offspring (n= 36) of adult Wistar rats in the control group (CG) (n= 3) and Experimental Group (EG) (n= 3) were randomized in lactation, young and adult (n= 6 rats/group). Both groups received a commercial diet and water "ad libitum". EG received water with 20% ethanol during 12 days of lactation.

Results: EG compared to CG: Weight gain was lower in lactating and young (both $p < 0.001$). In young and adults, a decrease of SOD ($p = 0.018$, $p < 0.001$) and GST in blood only in youngs ($p < 0.001$), while the GST, GPx and CAT were decreased in the liver of youngs ($p = 0.008$, $p = 0.008$ and $p = 0.004$ respectively) and adults ($p < 0.001$, $p = 0.017$ and $p = 0.053$ respectively). TBARS was lower ($p = 0.019$) in liver of lactating.

Conclusions: The maternal consumption of ethanol during lactation caused lower body weight gain of offspring during the lactation and young stages, normalizing in the adult stage. However, there was a decrease in the enzymatic activity of SOD in blood, as well as in GST, GPx and CAT in liver during young and adult phases.

Keywords: Ethanol, Lactation, Oxidative stress, Antioxidants, Offspring.

1 BACKGROUND

Lactation is considered a critical stage of development of the offspring, because the functions and structures of the organs and systems are still in development, which makes them vulnerable to many insults.^{1,2} In addition, the changes in organ functions can be caused by changes in diet or by consumption of ethanol, causing oxidative stress and several diseases.^{3,4}

Through the milk, ethanol is easily distributed by passive diffusion to the lactating due to its low molecular weight and solubility in water and lipids.^{5,6} Doses of less than 0.3 g / kg of ethanol are metabolized in the liver, over this dose ethanol is distributed throughout the body through the bloodstream. Thus, a correlation between the distribution volume of ethanol and the amount of total water exists.⁶

In the liver, ethanol is metabolized in the cytosol of hepatocytes to acetaldehyde, mainly by alcohol dehydrogenase (ADH).⁷ Besides this, the catalase route (CAT) in peroxisomes and in mitochondria, also oxidizes ethanol into acetaldehyde in the presence of hydrogen peroxide (H₂O₂).^{8,9} When ethanol is consumed chronically, such metabolism occurs via the microsomal oxidation system of ethanol (MEOS), being the cytochrome enzyme P4502E1 (CYP2E1) responsible for ethanol transformation into acetaldehyde.^{10,11}

There are enough evidences that MEOS generates, reactive oxygen species (ROS), including superoxide anion (O₂^{•-}) and H₂O₂ together with a depletion of reduced glutathione (GSH) and lipid peroxidation, resulting in an increased oxidative stress.^{3,9,12-14} Antioxidants are substances that delay or prevent significantly the oxidation of substrates, even though at concentrations below their oxidizable substrates.¹⁵ Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione S-transferase (GST) are among the main of the enzymatic antioxidants.¹⁶

Ingestion of ethanol during lactation may cause growth and development. The evaluation of the water consumption with 10% of ethanol for 12 days of lactation showed a slower growth of the offspring compared to the control group.¹⁷ Similarly, the water consumption with 20% of ethanol by rats in the corresponding phases of induction (prior stage to reproduction), gestation and lactation resulted in a decrease of hepatic activity of GPx, Which was attributable to the illegal entry of cytosolic GSH within the mitochondria.¹⁸ Moreover, other studies have shown that ethanol consumption can cause depletion of antioxidants, which increase the susceptibility to oxidative stress by increased lipid

peroxidation, and also neuronal changes in the transition of mitochondrial permeability.¹⁸⁻²¹

The consequences of ethanol consumption during lactation stages,^{22, 23} in young and adult offspring have been little studied. Thus, this study evaluated the effect of ethanol consumption by lactating rats on oxidative stress in the offspring stages of life.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Experimental design and animals

Randomized controlled experimental study developed at the Laboratory of Experimental Nutrition of the Department of Nutrition at the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), with female rats of *Wistar* strain, coming from the Central Vivarium Laboratory of this university. The study protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Use of UFSC and in agreement with the *World Medical Association* Declaration of Helsinki.²⁴

The study included six adult rats (3 months of age), initially weighing between 150-200 g. During the experiment, the animals were kept in a vivarium in individual metabolic cages with constant temperature of approximately $22 \pm 2^\circ$ C and light / dark cycle of 12/12 hours. The rats were mated and maintained during pregnancy with water and with a balanced commercial diet "*ad libitum*" (Nuvilab CR-1[®], Colombo, PR, Brazil). On the birth day of the offspring, considered as zero day, rats were divided into 2 groups with 3 rats in each: Control Group (CG) and Experimental Group (EG). The offspring (n= 18), consisting of males and females in each group of rats (CG and EG) were randomized (two animals from each rat) in three groups according to the age, lactation stage (12 days): Lactation Control Group (LCG) and Lactation Experimental Group (LEG). In the young stage (30 days) Young Control Group (YCG) and Young Experimental Group (YEG), and in the adult stage (90 days): Adult Control Group (ACG) and Adult Experimental Group (AEG) (Figure 1).

The offspring of the lactation phase of the control and experimental group drank only milk during the 21 days of lactation. The rats of the CG and of the offspring of the young and adult stages from both, control and experimental group, received commercial diet and "*ad libitum*" water until the sacrifice. The rats of GE (n= 3) received a commercial diet and water with 20% of ethanol (EMSURE[®] ACS, ISO, Reag. Ph Eur MERCK Brazil Jacarepaguá, RJ, Brazil) "*ad libitum*"

as the only source of liquid.²⁵ From the 12th day of lactation, ethanol was removed from water and the mothers were maintained with free access to a balanced commercial diet and water until sacrifice. The sacrifice of the rats and of the offspring was performed by cervical dislocation in fasting state.

2.2 Effect of ethanol on offspring development

The effect of ethanol on the development of offspring was evaluated by body weight gain. The animals were weighed in a Weighing Balance PW 3015 with capacity of 1500 grams and a sensitivity of 0.1 g (Coleman, Santo André - SP). During the lactation stage, weight was measured by the "pool" of pups on the days 0, 4 and 8. Animals also were weighed on the 12th day at the end of the juvenile and adult stage, as well as before the sacrifice.

2.3 Markers of oxidative stress

After sacrifice the liver was quickly removed, kept on ice, and perfused with saline (0.9% NaCl) solution iced for 5 minutes. It was removed 100 mg of liver, placed in a buffer solution 0.1% Triton X-100, 0.12 M NaCl, 30 mM Na₂PO₄, pH 7.4 and homogenised (1:9 w / v) at 4° C in a homogenizer TISSUE TEAROR Variable Speed 5000-30000 RPM 1.2A (DREMEL[®], Biospec Products, INC. Bartlesville, Oklahoma, USA). The homogenate was centrifuged at 5000 g for 10 minutes. The supernatants were stored in liquid nitrogen until the analysis. Blood was collected by cardiac puncture, using heparinised syringes.²⁶ After the plasma removal, red cells were washed three times in saline solution. The hemolysates were obtained after addition of three volumes of 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, and centrifuged at 3000 g for 5 minutes, and then were diluted 500 times.²⁷ The analyzes of the activity of catalase enzymes (CAT)²⁷, superoxide dismutase (SOD),^{28,29} glutathione S-transferase (GST)³⁰ and glutathione peroxidase (GPx)³¹ were performed in hemolysate and in homogenate.

For determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) there were used the plasma and the homogenate. It was added 12% of trichloroacetic acid (1:4 v/v) to the plasma being subsequently centrifuged at 5000 g for 3 minutes. It was added the Tris-HCl 50 mM, pH 7.0 buffer to the supernatants, vortexed for 20 seconds and added 0.67% of thiobarbituric acid, kept in boiling water for 60 minutes and then at 5° C for 30 minutes. After removal of portions of the liver, It was

immediately added 12% of trichloroacetic acid (1:4 v/v) and then centrifuged at 5000 g for 3 minutes.

It was added 50 mM of Tris-HCl, pH 7.0 to the Supernatants, shaken for 20 seconds, added 67% (w/v) of 2-thiobarbituric acid, kept in a water bath for 60 minutes then cooled to 5° C for 30 minutes and subsequently analyzed at 535nm.^{32,33} For the readings, it was used the GBC UV/VIS spectrophotometer model 916 (Sydney, New South Wales, Australia). All described biochemical parameters were measured in duplicate, excepting for the determination of TBARS that was in triplicate. The used chemical substances in this study were purchased from Sigma-Aldrich Co., Ohio, USA

2.4 Statistical Analysis

Initially the test for normality of Kolmogorov-Smirnov was applied. The results were normalized by the processing into log in base 10 and presented as a mean form and standard error of the mean. For the differences between group means, it was used the test not paired Student "T" with a significance level lower than 5% ($p < 0.05$). The tests were performed using the statistical software Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 16.0 version for Windows.

3. RESULTS

3.1 Gain of body weight

The initial weight on the zero day (LEG: 0.13 and LCG: 0.13 g) and on day 4 (LEG: 0.16 and LCG: 0.16 g), measured by the "pool" of the animals until the 12th day of lactation, it was similar to LEG in relation to the LCG. However, on the 8th day (LEG: 0.17 g and LCG: 0.19 g) and on the 12th day of lactation (LEG: 0.19 g and LCG: 0.22 g), the LEG presented lower body weight gain when compared to LCG (Figure 2 a).

The mean body weight gain considering the phases of the study: lactation and young, it was significantly lower in GE (LEG: 1.15 ± 0.01 , $p < 0.001$; YEG: 1.82 ± 0.03 , $p = 0.001$) compared to GC (LCG: 1.30 ± 0.01 , YCG: 1.96 ± 0.02) until the young stage. In the adult stage, it was not observed any difference in the mean of body weight between AEG and ACG (AEG: 2.46 ± 0.02 , ACG: 2.45 ± 0.02 , $p = 0.728$) (Figure 2 b).

Figure 2a and b

3.2 Hemolysate antioxidant enzymes

The SOD activity was lower in all phases of the GE, being this difference significant for YEG (YEG: 2.04 ± 0.05 , YCG: 2.23 ± 0.04 , $p= 0.018$) and AEG (AEG: 2.11 ± 0.03 , ACG: 2.32 ± 0.02 , $p< 0.001$) compared to controls. The GST activity decreased only in young animals (YEG: 1.20 ± 0.01 , YCG: 2.31 ± 0.04 , $p< 0.001$). No differences in GPx and CAT activity but with no difference in the AEG compared to the ACG. For the CAT in the LEG (Table 1).

Table 1

3.3 Liver antioxidant enzymes

In EG, there was a decrease of the enzymatic activity of most of the antioxidants evaluated in relation to the CG in all three phases studied (lactation, young and adult). SOD showed no difference between the groups in any of the three phases. For GST the groups YEG (YEG: 1.60 ± 0.01 , YCG: 1.62 ± 0.02 , $p= 0.008$) and AEG (AEG: 1.50 ± 0.03 , GCA: 1.71 ± 0.01 , $p< 0.001$) presented significantly lower values compared to the control ones. There was a significant decrease of the activity also for the GPx both in the group of young stage (GEJ: 0.91 ± 0.04 , GCJ: 1.06 ± 0.02 , $p= 0.008$) as for the adult group (AEG: 0.81 ± 0.03 , ACG: 0.98 ± 0.06 , $p= 0.017$) compared to the corresponding control groups. With respect to CAT, the difference was significant only in YEG (YEG: 0.85 ± 0.05 , YCG: 0.99 ± 0.02 , $p= 0.035$) (Figure 3).

Figure 3

3.4 Assessment of lipid peroxidation

TBARS levels in plasma presented no difference in GE in the stages of lactation (GEL: 1.20 ± 0.01 , GCL: 1.13 ± 0.05 , $p= 0.249$) and adult (GEA: 1.48 ± 0.10 , GCA: 1.35 ± 0.04 , $p= 0.258$) (Figure 4a). However, in the liver occurred a decrease of lipid peroxides in the lactation phase (GEL: 1.60 ± 0.01 , GCL: 1.70 ± 0.03 , $p= 0.019$), which was not detected in the other phases compared to controls (Figure 4b).

Figure 4 a and b

4 DISCUSSION

Studies on rats have shown a significant relationship between ethanol intake and the development of oxidative stress during gestation and lactation.¹⁸⁻²¹ According to the literature, ethanol consumption in lactating rats may result, in a decreased body weight gain of the offspring.^{17,23,34,35} In the present study, rat offspring that were given ethanol for a period of 12 days (lactation stage), also revealed less weight gain. This result was similar to that observed in the offspring of lactating rats that reduced the weight after receiving water with 20% ethanol for 12 days.¹⁷ This lower weight gain may be related to maternal malnutrition caused by ethanol intake²³ Thus resulting in a lower milk production. Ethanol acts in the posterior pituitary thereby inhibiting suckling induced by oxytocin release, that is, the administration of ethanol during lactation affects milk consumption of the offspring.² In this present study, weight gain remained significantly lower until the young stage (30 days), whereas in the adult stage (90 days), the average body weight of the animals became similar to the adult control group. However, no studies yet have evaluated the effect of ethanol consumption during lactation until the adult age. Nevertheless, the related literature has show that malnutrition during prenatal and postnatal may result in a decrease in oxidative metabolism of lipids leading to the use of carbohydrates as a preferred source of energy. This fact would further contribute to a greater deposition of body fat and consequent obesity.³⁶

Rat offspring exposed to ethanol showed no changes in SOD activity during lactation both in hemolysates and the liver homogenates, results similar to that found in a related study.¹⁸ However in the young and adult stages, a significant decrease in SOD activity in the hemolysate was detected in the present study. Previous studies that evaluated the effect of water consumption with 20% of ethanol in young male rats (3 months) and aged (18 months), a decrease in the activity of hepatic SOD in both stages was detected, which can be related to the age of the animals.³⁷ This decrease SOD activity can consequently result in an increase of lipid peroxidation, nitrotyrosine accumulation, extensive centrilobular necrosis and inflammation.³⁸

The hepatic GST activity decreased in youngs and adults from the experimental groups whereas in the hemolysate its activity decreased only in youngs, a result contrary to these found in previous related studies.^{37,39} These authors attributed the increased activity of GST found, as an adaptive response to protect tissues against oxidative stress

induced by ethanol.^{37,39} However, in studies performed in rats, it has been observed that the ingestion of ethanol exacerbated ROS production in mitochondrial hepatocytes and depleted levels of antioxidants such as hepatic GSH,³⁹⁻⁴¹ and also GST activity.⁴² Beside GSH role to directly neutralize different kinds of ROS this represent endogenous tripeptide also serves as a substrate for the GST and GPX enzymes.¹⁶ Moreover, the general antioxidant activity is gradually decreased with the aging process.^{37,43} Thus, the decreased GST activity found in this present study, can be attributable either as consequence of ethanol consumption by depleting the GSH level in liver and blood, as a consequence of aging process.

GPx plays a prominent role by removing toxic hydroperoxides in cells.³⁷ In the present study, the activity of hepatic and erythrocytic GPx during lactation showed no significant changes. However, in other related study, GPx activity in the ethanol group compared to the corresponding control group has decreased in liver and also increased in serum during lactation.¹⁸ The increased GPx activity measured in serum may be result of ethanol ingestion allows less selenium to enter the liver in order to keep a high GPx activity in serum.¹⁸ Thus, the GPx in serum, might act as first line of defence against the oxidative stress caused by ethanol.¹⁸ On the contrary, the hepatic decrease of GPx may result from the irregular entry of cytosolic glutathione within the mitochondria, resulting in a decrease of the mitochondrial pool of GPx.⁴⁴ In young and adult stages the hepatic GPx activity, was significantly decreased while in the GPx hemolysate no significant changes were detected. In Other similar study, the hepatic activity of GPx was also decreased after chronic consumption of ethanol in young and aged rats.³⁷ This decrease in hepatic GPx activity might be due to the augmentation of ROS, while decreases the hepatic levels of GSH, an essential co-factor for GPx activity.^{40,41} As mentioned above this GPx decrease may also result from the decreased entry of selenium in liver due to the consumption of ethanol¹⁸ and / or from the aging process.⁴⁵ Accordingly, rats with advanced age are more susceptible to oxidative stress induced by ethanol consumption than younger animals.³⁷ This enhanced susceptibility may be a consequence of a slower metabolism of ethanol, excessive production of ROS and/or depletion of GSH^{43,46} on NADPH⁴⁶ levels.

CAT hepatic activity decreased only in the young stage, being while in the hemolysates it remained unchanged. However, increased CAT hepatic activity was observed in other related study,¹⁸ a reprise that may reflect its role in ethanol metabolism, especially in neonates, or

a reprise to enhanced cellular leads of H₂O₂ generation.^{18,47} In a study with young and aged rats, a decrease in CAT activity in both groups was observed, being higher in the elderly group.³⁷ The authors suggested that both aging and ethanol consumption may be responsible for the decreased activity of CAT.³⁷

During lactation and adult stages, no difference in plasma lipid peroxidation in the EG was observed, while in liver it was significantly decreased in the LEG. However, a similar study that also evaluated lipid peroxidation in liver through TBARS levels, found no significant changes.¹⁸

The maternal consumption of ethanol during lactation caused lower body weight gain of offspring during lactation and young stages, normalizing in the adult stage. However, there was a decrease in the enzymatic activity of erythrocytic SOD, and also in hepatic GST, GPx and CAT in the young and adult phases. It is suggested further studies on this subject, to observe the effect of ethanol consumption during lactation and through the life stages.

Declaration of the Authorship

MBF, EAMM and DWF participated in the protocol design, GLF and MBF, MBF developed the protocol and MBF, EAMM, RLMF and EBSMT analyzed and redirected the manuscript.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

The authors are grateful to FUNPESQUISA, Universidade Federal de Santa Catarina (FUNPESQUISA / UFSC). Post Graduate Program in Nutrition, Universidade Federal de Santa Catarina (PPGN / UFSC), Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI).

REFERENCES

1. Symonds ME, Budge H, Stephenson T, Mcmillen C. Fetal endocrinology and development – manipulation and adaptation to long-term nutritional and environmental challenges. *Reproduction* 2001;**12**:853-62.

2. Heil SH, Subramanian MG. Chronic alcohol exposure and lactation Extended observations. *Alcohol* 2000;**21**:127-32.
3. García-Rodríguez S, Argüelles S, Llopis R, Murillo ML, Machado A, Carreras O, Ayala A. Effect of prenatal exposure to ethanol on hepatic elongation factor-2 and proteome in 21-day-old rats: protective effect of folic acid. *Free Radic Biol Med* 2003;**35**:428-37.
4. Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiol* 2006;**21**:29-37.
5. Argote-Espinosa RM, Flores-Huerta S, Hernández-Montes H, Villalpando-Hernández S. Depuración plasmática de etanol y su excreción en la leche de mujeres rurales que consomen pulque. *Rev Invest Clin* 1992;**44**:31-36.
6. Norberg A, Jones AW, Hahn RG, Gabrielsson JL. Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: research and forensic applications. *Clin Pharmacokinet* 2003;**42**:1-31.
7. Lieber CS. Herman Award Lecture, 1993: A personal perspective on alcohol, nutrition, and the liver. *Am J Clin Nutr* 1993;**58**:430-42.
8. Keilin D, Hartree EF. Properties of catalase. Catalysis of coupled oxidation of alcohols. *Biochem J* 1945;**39**:293-301.
9. Lieber CS. Alcohol Metabolism: General Aspects. In: Victor R. Preedy and Ronald Ross Watson. *Comprehensive Handbook of Alcohol Related Pathology*. Elsevier Science Ltd.–Academic Press, 2004:1211-1222.
10. Dupont I, Lucas D, Clot P, Menez C, Albano E. Cytochrome P450E1 inducibility and hydroxyethyl radical formation among alcoholics. *J Hepatol* 1998;**28**:564-71.
11. Mckillop IH, Schrum LW. Alcohol and liver câncer. *Alcohol* 2005;**35**:195-203.
12. Rodríguez EMRC, Purata A, Cruz PH. Citocromo p450 biomarcador de exposición terapeútico-toxicológico –carcinogénico. *REB* 2010;**29**:39-52.
13. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes* 2006;**30**:400-

418.

14. Somogyi A, Rosta K, Pusztai P, Tulassay Z, Nagy G. Antioxidant measurements. *Physiol Meas* 2007;**28**:41-55.
15. Halliwell B, Gutteridge JMC. Antioxidant defences; Endogenous and Diet Derived. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4 ed. Oxford: University Press, 2007: 86-179.
16. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005;**16**:577-86
17. Oyama LM, Couto RC, Couto GEC, Daãmaso AR, Oller Do Nascimento CM. Ethanol intake during lactation II. Effects on pups' liver and brain metabolism. *Alcohol* 2000;**21**:201-06.
18. Ojeda ML, Nogales F, Vázquez B, Delgado MJ, Murillo ML, Carreras O. Alcohol, Gestation and Breastfeeding: selenium as an antioxidant therapy. *Alcohol Alcohol* 2009;**44**:272-77.
19. Lee RD, An SM, Kim S, Shee GS, Kwack SJ, Seok JH, Chae SY, Park CH, Choi YW, Kim HS et al. Neurotoxic effects of alcohol and acetaldehyde during embryonic development. *J Toxicol Environ Health* 2005;**68**:2147-62.
20. Chu J, Tong M, De La Monte SM. Chronic ethanol exposure causes mitochondrial dysfunction and oxidative stress in immature central nervous system neurons. *Acta Neuropathol* 2007;**113**:659-73.
21. Tiwari V, Chopra KJ. Resveratrol prevents alcohol-induced cognitive deficits and brain damage by blocking inflammatory signaling and cell death cascade in neonatal rat brain. *J Neurochem* 2011;**117**:678-90.
22. Mennella JA. Regulation of Milk Intake After Exposure to Alcohol in Mothers' Milk. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;**25**:590-93.
23. Murillo-Fuentes ML, Artillo R, Ojeda ML, Delgado MJ, Murillo ML, Carreras O. Effects of prenatal or postnatal ethanol consumption on zinc intestinal absorption and excretion in rats. *Alcohol Alcohol* 2007;**42**:3-10.
24. Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. World Medical Association, 2008.

(Acessado em 25 de janeiro de 2011, em <http://www.wma.net/e/press/2008-8.htm>).

25. Tavares-Do-Carmo MG, Nascimento-Curi CMO. Effect of ethanol intake during lactation on the metabolism of dams and on pup development. *Bras J Med Biol Res* 1990;**23**:1161-63.
26. Beutler E. Red cell metabolism: A manual of biochemical methods. New York: Grune & Stratton, 2 ed, 188p, 1975.
27. Aebi H. Catalase in vitro. In: Packer L. Methods Enzymol. Academic Press, 1984; **105**:121-126.
28. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;**247**:188-92.
29. Boveris A, Cadenas E. Production of superoxide dismutase radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In: Oberley LW. Superoxide dismutase. Boca Raton, CRC, 1982: 159-68.
30. Habig WH, Pasbst MJ, Jakoby WB. Glutathione-S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1976;**249**:7130-39.
31. Flohé L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. In: Packer L. Methods Enzimol. *Academic Press*, 1984;**105**:114-121.
32. Ohkawa H, Ohisi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reation. *Anal Biochem* 1979;**95**:351-58.
33. Bird RP, Draper AH. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. In: Packer L. Methods Enzimol. *Academic Press*, 1984;**105**:299-305, 1984.
34. García-Delgado M, Peral MJ, García-Benítez O, Carreras O, Ilundáin AA. Prolonged ethanol ingestion increases renal AQP2 and AQP3 expression in adult rats and in their offspring. *J Membr Biol* 2004;**198**:89-94.
35. Ojeda ML, Vázquez B, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Ethanol Consumption by Wistar Rat Dams Affects Selenium Bioavailability and Antioxidant Balance in Their Progeny. *Int J Environ Res Public Health* 2009;**6**:2139-49.

36. Frisanchi, AR. Reduced rate of fat oxidation: a metabolic pathway to obesity in the developing nations. *Am J Hum Biol* 2003;**15**:522-32.
37. Mallikarjuna K, Shanmugama KR, Nishanth K, Ming-Chieh Wu, Chien-Wen Houb, Chia-Hua Kuob, Sathyavelu Reddya K. Alcohol-induced deterioration in primary antioxidant and glutathione family enzymes reversed by exercise training in the liver of old rats. *Alcohol* 2010;**44**:523-29.
38. Kessova IG, Ho Y, Thung S, Cederbaum AI. Alcohol-induced liver injury in mice lacking Cu, Zn-superoxide dismutase. *Hepatology* 2003;**38**:1136-45.
39. Das SK, Vasudevan DM. Effect of ethanol on liver antioxidant defense system: A dose dependent study. *Ind J Clin Biochem* 2005;**20**:80-84.
40. Hirano T, Kaplowitz N, Tsukamoto H, Kamimura S, Fernandez-Checa JC. Hepatic mitochondrial glutathione depletion and progression of experimental alcoholic liver disease in rats. *Hepatology* 1992;**16**:1423-27.
41. Bailey SM, Patel VB, Young TA, Asayama K, Cunningham CC. Chronic ethanol consumption alters the glutathione/glutathione peroxidase-1 system and protein oxidation status in rat liver. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;**25**:726-33.
42. Jurczuk M, Moniuszko-Jakoniuk J, Rogalska J. Glutathione related enzyme activity in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Polish J Environ Stud* 2006;**15**:861-68.
43. Kumaran SV, Arulmathi K, Srividhya R, Kalaiselvi P. Depletion of antioxidant status by EGCG and retardation of oxidative damage induced macromolecular anomalies in aged rats. *Exp Gerontol* 2008;**43**:176-83.
44. Cohen-Kerem R, Koren G. Antioxidants and fetal protection against ethanol teratogenicity: I. Review of the experimental data and implications to humans. *Neurotoxicol Teratol* 2003;**25**:1-9.
45. Savarino L, Granchi D, Ciapetti G, Cenni E, Ravaglia G, Forti P,

Maiolib F, Mattioli R. Serum concentrations of zinc and selenium in elderly people: results in healthy nonagenarians/centenarians. *Exp Gerontol* 2001;**36**:327-39.

46. Chandra R, Aneja R, Rewal C, Konduri R, Das SK, Agarwal S. An opium alkaloid-papaverine ameliorates ethanol-induced hepatotoxicity: diminution of oxidative stress. *Ind J Clin Biochem* 2000;**15**:155-60.
47. Tran MN, Wu A, Hill DW. Alcohol dehydrogenase and catalase content in perinatal infant and adult livers: potential influence on neonatal alcohol metabolism. *Toxicol Lett* 2007;**169**:245-52.

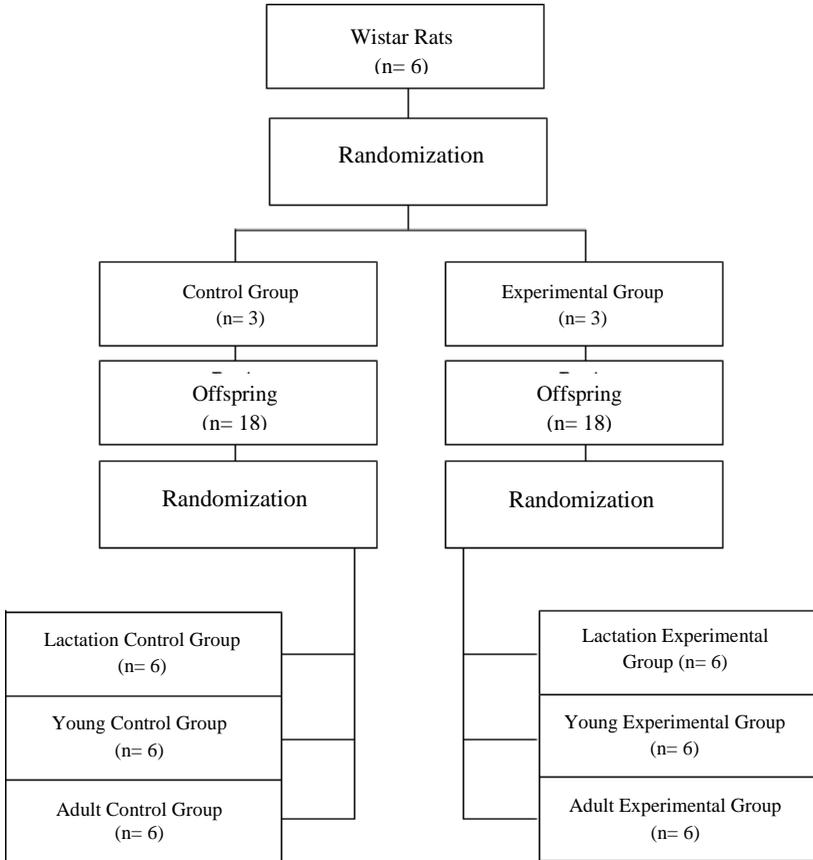


Figure 1 Randomization of rats and offspring.

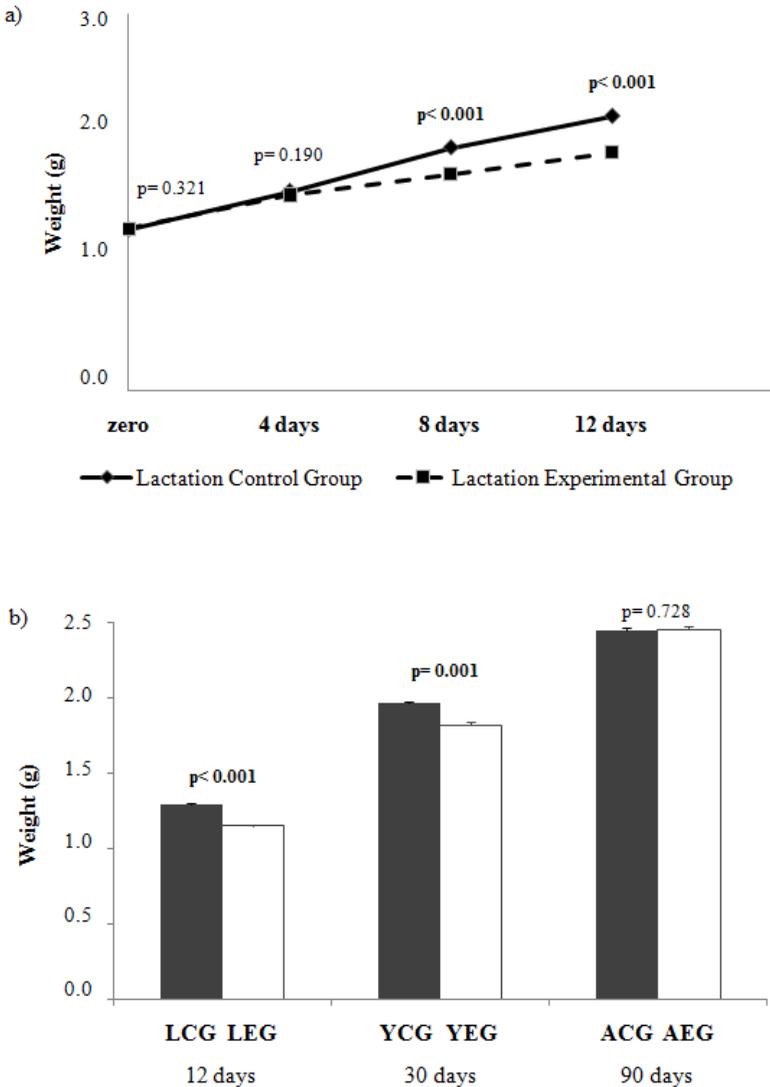


Figure 2 a and b (a) Offspring log body weight until the 12th day of life. (b) Offspring log body weight at the 12th, 30th and 90th day of life. LCG: Lactation Control Group; LEG: Lactation Experimental Group; YCG: Young Control Group; YEG: Young Experimental Group; ACG: Adult Control Group, AEG: Adult Experimental Group. Values were normalized by log₁₀ transformation and expressed as mean ± standard deviation, n= 6 animals per group. "t" Student test was used.

Tabela 1 Activity of enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxides (GPx) and catalase (CAT) in the hemolysates of the offspring of Wistar rats in the lactation, young and adult stages.

Variables	LCG	LEG	p	YCG	YEG	p	ACG	AEG	p
SOD	2,25 ±	2,22 ±		2,23 ±	2,04 ±		2,32 ±	2,11 ±	
USOD/ml	0,01	0,06	0,638	0,04	0,05	0,018	0,02	0,03	< 0,001
GST	2,41 ±	2,32 ±		2,31 ±	1,99 ±		2,24 ±	2,21 ±	
µmol/min/ml	0,12	0,03	0,458	0,04	0,01	< 0,001	0,05	0,06	0,411
GPx	0,89 ±	0,87 ±		0,41 ±	0,40 ±		0,53 ±	0,60 ±	
µmol/min/ml	0,06	0,03	0,255	0,03	0,05	0,781	0,02	0,03	0,064
CAT	0,83 ±	0,81 ±		1,08 ±	1,08 ±		1,09 ±	1,1 ±	
µmol/min/ml	0,05	0,05	0,853	0,01	0,01	0,874	0,01	0,02	0,695

LCG: Lactation Control Group; LEG: Lactation Experimental Group; YCG: Young Control Group; YEG: Young Experimental Group; ACG: Adult Control Group; AEG: Adult Experimental Group. Values were normalized by log₁₀ transformation and expressed as mean ± standard deviation, n= 6 animals per group. "t" Student test was used.

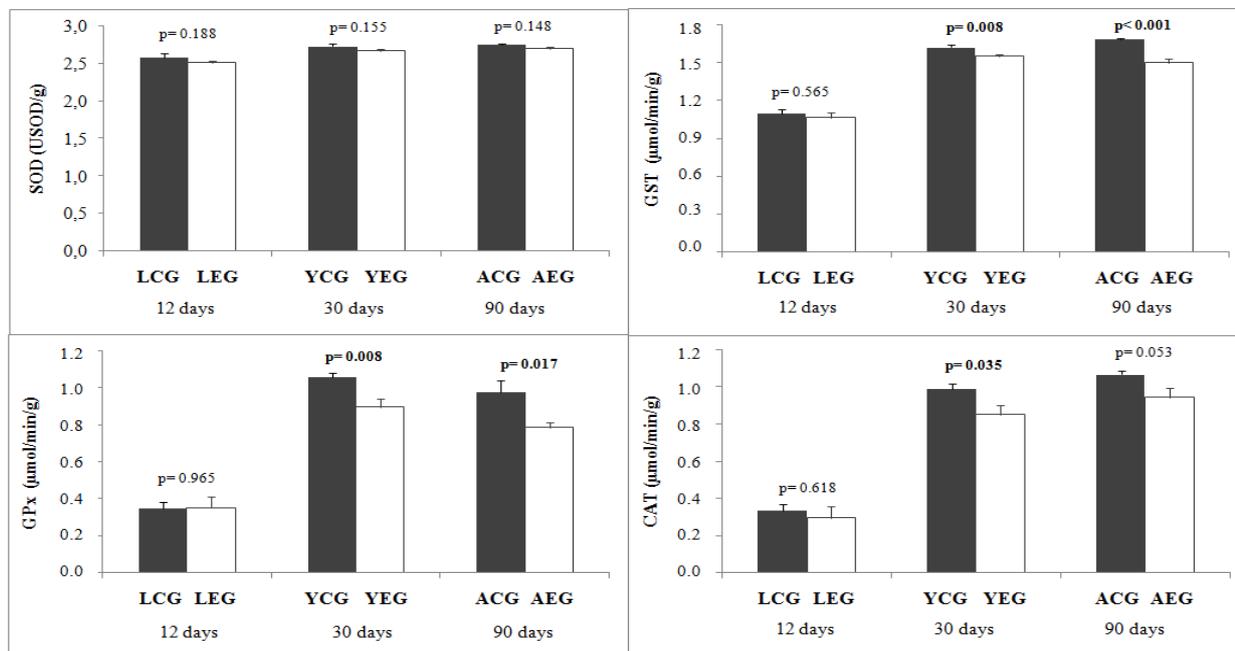


Figure 3 Activity of liver enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxides (GPx) and catalase (CAT) in the offspring of Wistar rats. LCG: Lactation Control Group; LEG: Lactation Experimental Group; YCG: Young Control Group; YEG: Young Experimental Group; ACG: Adult Control Group, AEG: Adult Experimental Group. Values were normalized by \log_{10} transformation and expressed as mean \pm standard deviation, $n=6$ animals per group. "t" Student test was used.

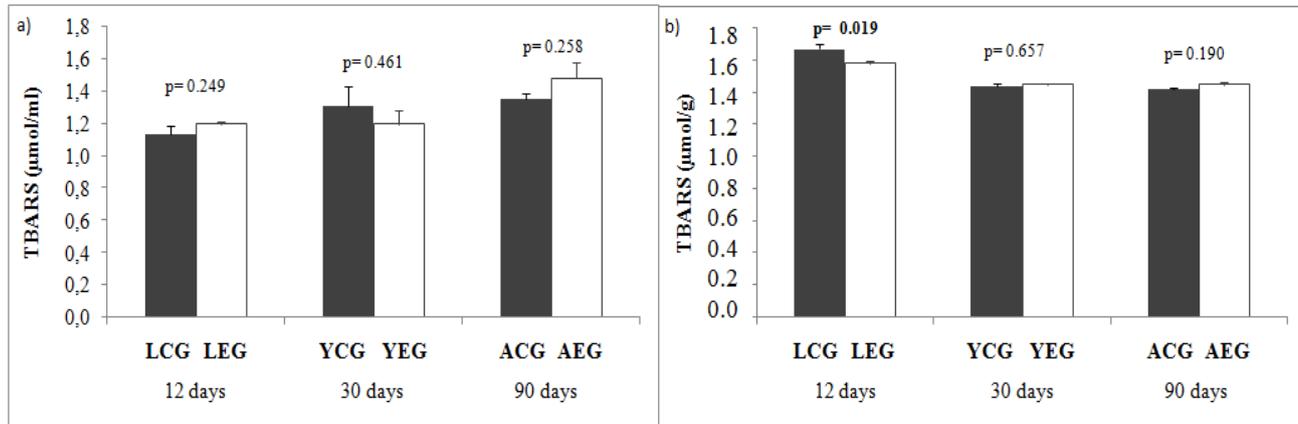


Figure 4 Plasma (a) and hepatic (b) levels of TBARS of the offspring of Wistar rats. TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Substances; LCG: Lactation Control Group; LEG: Lactation Experimental Group; YCG: Young Control Group; YEG: Young Experimental Group; ACG: Adult Control Group, AEG: Adult Experimental Group. Values were normalized by \log_{10} transformation of the log and expressed as mean \pm standard deviation, n= 6 animals per group. "t" Student test was used.

6 TRADUÇÃO DO ARTIGO ORIGINAL

ETANOL NA LACTAÇÃO PROMOVE ESTRESSE OXIDATIVO EM DIFERENTES FASES DA PROLE DE RATOS

Título resumido: Etanol, lactação e estresse oxidativo em ratos

RESUMO

Introdução & objetivo: Avaliar o efeito do etanol sobre o peso e os marcadores catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona S-transferase (GST), glutatona peroxidase (GPx) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na prole.

Métodos: A prole (n= 36) de ratas adultas *Wistar* do Grupo Controle (GC) (n= 3) e Grupo Experimental (GE) (n= 3) foram randomizadas em lactantes, jovens e adultos (n= 6 ratos/grupo). Os grupos receberam dieta comercial e água “*ad libitum*”. GE recebeu água com 20% de etanol até 12º dia de lactação.

Resultados: GE comparado ao GC: Ganho de peso foi menor nos lactentes e jovens (ambos $p < 0,001$). Nos jovens e adultos, ocorreu diminuição sérica da SOD ($p = 0,018$; $P < 0,001$) e na GST apenas nos jovens ($p < 0,001$). A GST, GPx e CAT hepáticas aumentaram nos jovens ($p = 0,008$; $p = 0,008$ e $p = 0,0035$ respectivamente) e adultos ($p < 0,001$; $p = 0,017$ e $p = 0,053$ respectivamente). TBARS foi maior ($p = 0,019$) nos lactentes.

Conclusão: O consumo materno de etanol durante a lactação causou menor ganho de peso corporal da prole durante as fases de lactação e jovem, normalizando na fase adulta. Entretanto, houve uma diminuição da atividade enzimática da SOD no sangue e da GST, GPx e CAT no fígado nas fases jovem e adulta.

Palavras chave: Etanol; Lactação; Estresse oxidativo; Antioxidantes; Prole.

1 INTRODUÇÃO

A lactação é considerada uma fase crítica do desenvolvimento da prole, pois as funções e as estruturas dos órgãos e sistemas estão em formação, o que os torna vulneráveis às agressões e insultos.^{1,2} Além disso, as modificações nas funções orgânicas podem ser causadas por alterações na dieta ou pelo consumo de etanol, ocasionando estresse oxidativo e doenças.^{3,4}

Pelo leite materno o etanol é distribuído facilmente por difusão passiva para o lactente devido ao seu baixo peso molecular e solubilidade em água e lipídio.^{5,6} Doses inferiores a 0,3 g/kg de etanol são metabolizados no fígado, acima desta dose o etanol é distribuído no corpo pela corrente sanguínea. Havendo assim, uma correlação entre o volume de distribuição do etanol e a quantidade de água total.⁶

No fígado o etanol é metabolizado no citosol dos hepatócitos à acetaldeído, principalmente pela via álcool desidrogenase (ADH).⁷ Além desta, tem-se a via catalase (CAT) nos peroxissomos e mitocôndrias, que também oxida o etanol à acetaldeído na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).^{8,9} Quando o etanol é consumido cronicamente, a metabolização ocorre via sistema microsomal de oxidação de etanol (MEOS), sendo a enzima citocromo P450E1 (CYP2E1), responsável pela transformação do etanol à acetaldeído.^{10,11} Há evidências de que pela via MEOS, são geradas espécies reativas entre elas o ânion superóxido (O₂^{•-}) e H₂O₂, além de ocorrer depleção da glutatona reduzida (GSH) e peroxidação lipídica, ou seja, tem-se uma produção elevada de espécies reativas e/ou uma deficiência de antioxidantes, resultando em um aumento do estresse oxidativo.^{3,9,12-14} Os antioxidantes são substâncias que retardam ou evitam significativamente a oxidação de substratos, mesmo estando em concentrações inferiores aos substratos oxidáveis.¹⁵ Dos antioxidantes enzimáticos fazem parte principalmente a superóxido dismutase (SOD), a CAT, a glutatona peroxidase (GPx) e a glutatona S-transferase (GST).¹⁶

A ingestão de etanol durante a lactação pode causar alterações de crescimento e desenvolvimento. A avaliação do consumo de água com 10% de etanol durante 12 dias de lactação mostrou um menor crescimento corporal da prole em relação ao grupo controle.¹⁷ Da mesma forma, que o consumo de água com 20% de etanol por ratas durante as fases correspondentes a indução (fase anterior a reprodução), gestação e lactação, ocasionou uma diminuição da atividade hepática da glutatona peroxidase (GPx). Os autores sugerem que esse processo é devido a entrada irregular de glutatona citosólica no interior da

mitocondria.¹⁸ Além disso, outros estudos tem mostrado, que o consumo de etanol pode causar a depleção de antioxidantes, o que aumentaria a susceptibilidade ao estresse oxidativo, pelo aumento da peroxidação lipídica, alterações neuronais e na transição da permeabilidade mitocondrial.¹⁸⁻²¹

As consequências do consumo de etanol durante a lactação nas fases da lactação,^{22,23} jovem e adulta na prole tem sido pouco estudado. Desta forma, o presente estudo avaliou o efeito do etanol sobre o peso e os marcadores catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona S-transferase (GST), glutatona peroxidase (GPx) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na prole.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Desenho experimental e animais

Estudo experimental randomizado controlado, desenvolvido no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), com ratas fêmeas da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da UFSC. O protocolo do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina e está de acordo com a *World Medical Association*, Declaração de Helsinki.²⁴

Participaram do estudo 6 ratas adultas (3 meses de idade), com peso inicial compreendido entre 150-200 g. Durante o experimento, os animais foram mantidos no biotério em gaiolas metabólicas individuais, com temperatura constante de aproximadamente $22 \pm 2^\circ\text{C}$, e ciclo claro/escuro de 12/12 horas. As ratas foram acasaladas e mantidas durante a gestação com água e dieta comercial balanceada “*ad libitum*” (Nuvilab CR-1[®], Colombo, PR, Brasil). No dia do nascimento das proles, considerado dia zero, as ratas foram distribuídas em 2 grupos com 3 ratas em cada: Grupo Controle (GC) e Grupo Experimental (GE). As proles (n= 18), constituído de machos e fêmeas, de cada grupo de ratas (GC e GE) foram randomizadas (2 animais oriundos de cada rata) em 3 grupos de acordo com a idade: Fase de Lactação (12 dias): Grupo Controle Lactação (GCL) e Grupo Experimental Lactação (GEL). Na fase jovem (30 dias): Grupo Controle Jovem (GCJ) e Grupo Experimental Jovem (GEJ) e na adulta (90 dias): Grupo Controle Adulto (GCA) e Grupo Experimental Adulto (GEA) (Figura 1).

As proles da fase lactação do grupo controle e experimental ingeriram apenas leite durante os 21 dias da lactação. As ratas do GC e as proles das fases jovem e adulta tanto controle como experimental, receberam dieta comercial e água “*ad libitum*” até o sacrifício. As ratas do GE (n= 3) receberam dieta comercial e água com 20% de etanol absoluto (EMSURE® ACS, ISSO, Reag. Ph Eur MERCK Brasil Jacarepaguá, RJ, Brasil) “*ad libitum*” como única fonte de líquido.²⁵ A partir do 12º dia de lactação, foi retirado o etanol da água e as mães foram mantidas com livre acesso a alimentação comercial balanceada e água até o sacrifício. O sacrifício das ratas e da prole foi realizado por deslocamento cervical com os animais em jejum.

2.2 Efeito do etanol no desenvolvimento da prole

O efeito do etanol sobre o desenvolvimento da prole foi avaliado por meio do ganho de peso do corporal. Os animais foram pesados em balança Weighing Balance PW 3015 com capacidade de 1.500 gramas e sensibilidade de 0,1 g (Coleman, Santo André - SP). Durante a fase lactação o peso foi aferido pelo “*pool*” dos filhotes nos dias 0, 4 e 8. Os animais também foram pesados no 12º dia, no final da fase jovem e da fase adulto, bem como antes do sacrifício.

2.3 Marcadores de estresse oxidativo

Após o sacrifício o fígado foi rapidamente removido, mantido no gelo, e perfundido com solução salina (0,9% NaCl) gelada, por 5 minutos. Foi retirada 100 mg de fígado, colocado em uma solução tampão 0,1% Triton X-100, 0,12M NaCl, 30 mM Na₂PO₄, pH 7,4 e homogeneizado (1:9 w/v) à 4°C em um homogeneizador TISSUE TEAROR Variable Speed 5000 - 30000 RPM 1.2A (DREMEL®, Biospec Products, INC. Bartlesville, Oklahoma, USA). O homogenato foi centrifugado a 5000 g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram estocados em nitrogênio líquido até as análises. O sangue foi coletado por punção cardíaca, utilizando seringas heparinizadas.²⁶ Após a remoção do plasma, as células vermelhas foram lavadas três vezes em solução salina. Os hemolisados foram obtidos após adição de três volumes de 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, e centrifugados a 3000 g por 5 minutos, e a seguir foram diluídos 500 vezes.²⁷ As análises da atividade das enzimas catalase (CAT)²⁷, superóxido dismutase (SOD),^{28,29} glutationa S-transferase (GST)³⁰ e glutationa peroxidase (GPx)³¹ foram

realizadas no hemolisado e no homogenato. Para a determinação das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram utilizado o plasma e o homogenato. Ao plasma foi adicionado ácido tricloroacético a 12% (1:4 v/v), sendo posteriormente centrifugado a 5000 g por 3 minutos. Aos sobrenadantes foi adicionado o tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 7,0, vortexado por 20 segundos, e adicionado ácido tiobarbitúrico 0,67%, mantidos em água fervendo por 60 minutos e após em 5°C por 30 minutos. Após a retirada de porções do fígado, foram imediatamente adicionados 12% de ácido tricloroacético (1:4 v/v), e depois centrifugadas a 5000 g por 3 minutos. Aos sobrenadantes foram adicionados 50 mM Tris-HCl, pH 7,0, agitado por 20s, adicionado 67% (w/v) de ácido 2-tiobarbitúrico, mantido em banho-maria por 60 minutos, em seguida resfriado a 5°C por 30 minutos, e posteriormente analisado a 535nm.^{32,33} Para as leituras foi utilizado o espectrofotômetro GBC UV/VIS modelo 916 (Sidney-Nova Gales do Sul, Austrália). Todos os parâmetros bioquímicos descritos foram medidos em duplicata, exceto a determinação de TBARS que foi em triplicata. As substâncias químicas usadas no presente estudo foram adquiridas da Sigma-Aldrich Co., Ohio, EUA.

2.4 Análise estatística

Na análise estatística inicialmente foi aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados foram normalizados pela transformação em log na base 10 e apresentados na forma de média e erro-padrão da média. Para diferenças entre as médias dos grupos foi utilizado o teste “t” Student não pareado com nível de significância menor de 5% ($p < 0,05$). Os testes foram realizados utilizando o software estatístico *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* versão 16.0 para Windows.

3 RESULTADOS

3.1 Ganho de Peso Corporal

O peso inicial no dia zero (GEL: 0,13 e GCL: 0,13 g, $p = 0,321$) e no dia 4 (GEL: 0,16 e GCL: 0,16 g, $p = 0,190$), avaliado pelo “pool” dos animais até o 12º dia de lactação, foi semelhante para o GEL em

relação ao GCL. No entanto, no 8º dia (GEL: 0,17 g e GCL: 0,19 g, $p < 0,001$) e 12º dia de lactação (GEL: 0,19 g e GCL: 0,22 g, $p < 0,001$), o GEL apresentou menor ganho de peso corporal, quando comparado ao GCL (Figura 2 a).

A média de ganho de peso corporal considerando as fases do estudo lactação e jovem foi significativamente menor no GE (GEL: $1,15 \pm 0,01$, $p < 0,001$; GEJ: $1,82 \pm 0,03$, $p = 0,001$) em relação ao GC (GCL: $1,30 \pm 0,01$, GCJ: $1,96 \pm 0,02$) até a fase jovem. Na fase adulta, não foi observado diferença na média de peso corporal entre GEA e GCA (GEA: $2,46 \pm 0,02$, GCA: $2,45 \pm 0,02$, $p = 0,728$) (Figura 2 b).

Figura 2 a e b

3.2 Enzimas antioxidantes no hemolisado

A atividade enzimática da SOD foi menor em todas as fases do GE (lactação, jovem e adulta), sendo esta diferença significativa para os GEJ (GEJ: $2,04 \pm 0,05$, GCJ: $2,23 \pm 0,04$, $p = 0,018$) e GEA (GEA: $2,11 \pm 0,03$, GCA: $2,32 \pm 0,02$, $p < 0,001$) em comparação aos respectivos controles. A atividade da GST diminuiu somente no GEJ (GEJ: $1,20 \pm 0,01$, GCJ: $2,31 \pm 0,04$, $p < 0,001$). Nenhuma diferença significativa foi encontrada na atividade da GPx e da CAT no GEL (Tabela 1).

Tabela 1

3.3 Enzimas antioxidantes hepáticas

No GE, houve uma diminuição da atividade enzimática para a maioria dos antioxidantes avaliados em relação ao GC nas três fases estudadas (lactação, jovem e adulta). A SOD não mostrou diferença entre os grupos estudados em nenhuma das três fases. Para a GST os grupos GEJ (GEJ: $1,60 \pm 0,01$, GCJ: $1,62 \pm 0,02$, $p = 0,008$) e GEA (GEA: $1,50 \pm 0,03$, GCA: $1,71 \pm 0,01$, $p < 0,001$) apresentaram valores significativamente menores em relação aos controles. Houve diminuição significativa da atividade também para a GPx, tanto no grupo da fase jovem (GEJ: $0,91 \pm 0,04$, GCJ: $1,06 \pm 0,02$, $p = 0,008$) como para o grupo da fase adulta (GEA: $0,81 \pm 0,03$, GCA: $0,98 \pm 0,06$, $p = 0,017$) em relação aos respectivos grupos controles. Com relação a CAT, a diferença foi significativa apenas no GEJ (GEJ: $0,85 \pm 0,05$, GCJ: $0,99 \pm 0,02$, $p = 0,035$) (Figura 3).

Figura 3

3.4 Avaliação da peroxidação lipídica

O biomarcador TBARS no plasma apresentou um aumento sem diferença no GE nas fases de lactação (GEL: $1,20 \pm 0,01$, GCL: $1,13 \pm 0,05$, $p= 0,249$) e adulta (GEA: $1,48 \pm 0,10$, GCA: $1,35 \pm 0,04$, $p= 0,258$) (Figura 4 a). Entretanto, no fígado, ocorreu uma diminuição dos peróxidos lipídicos na fase de lactação (GEL: $1,60 \pm 0,01$, GCL: $1,70 \pm 0,03$, $p= 0,019$), o mesmo não ocorreu nas demais fases em comparação aos controles (Figura 4 b).

Figura 4 a e b

4 DISCUSSÃO

Estudos com ratos têm mostrado uma relação importante entre o consumo de etanol e o desenvolvimento de estresse oxidativo durante a gestação e/ou lactação.¹⁸⁻²¹ O consumo de etanol por ratas lactantes pode resultar, de acordo com a literatura, em um menor ganho de peso corporal da prole.^{17,23,34,35} No presente estudo, as proles das ratas que receberam etanol pelo período de 12 dias (fase de lactação), tiveram um menor ganho de peso. Resultado esse, semelhante ao observado nas proles das ratas lactantes que reduziram o peso após receber água com 20% de etanol durante 12 dias.¹⁷ O menor ganho de peso pode estar relacionado à desnutrição materna causada pela ingestão de etanol.²³ Resultando assim, em uma menor produção de leite e conseqüente menor ganho de peso da prole. O etanol também age na hipófise posterior inibindo a sucção induzida pela liberação de ocitocina, ou seja, a administração de etanol durante a lactação pode afetar o consumo de leite.² Neste estudo observou-se ainda, que o ganho de peso permaneceu significativamente menor no grupo experimental até a fase jovem (30 dias), o que não ocorreu na fase adulta (90 dias), onde a média de peso corporal dos animais tornou-se semelhante ao grupo controle adulto. No entanto, não foram encontrados estudos que avaliem o efeito até a idade adulta do consumo de etanol durante a lactação. Contudo, encontrou-se na literatura que a exposição à desnutrição na gestação e no pós-natal, pode resultar em uma diminuição do metabolismo oxidativo de lipídios o que levaria a utilização de carboidratos como fonte preferencial de

energia. Este fato contribuiria para um maior depósito de gordura corporal e consequente obesidade.³⁶

As proles das ratas expostas ao etanol apresentaram alterações na atividade da enzima SOD na fase da lactação tanto no hemolisado quanto no fígado, resultado similar ao encontrado em outro estudo.¹⁸ No entanto, nas fases correspondentes a jovem e adulta, uma diminuição significativa na atividade da SOD no hemolisado foi encontrado no presente estudo. Da mesma forma que no estudo, que avaliou o efeito do consumo de água com 20% de etanol em ratos machos jovens (3 meses) e idosos (18 meses), observou uma diminuição da atividade da SOD hepática nestas fases, entretanto esta diminuição pode estar relacionada com a idade dos animais.³⁷ Podendo resultar em um aumento da peroxidação lipídica, acúmulo de nitrotirosina, necrose centrolobular extensa e inflamação.³⁸

A atividade da GST hepática foi diminuída no grupo experimental jovem e adulto e a no hemolisado apenas no grupo jovem, resultado este contrário ao encontrado em estudos anteriores.^{37,39} Estes autores justificaram o aumento da atividade da GST, como sendo uma resposta adaptativa para proteger os tecidos contra o estresse oxidativo induzido pelo etanol.^{37,39} No entanto, nos estudos realizados em ratos, tem-se observado que a ingestão de etanol exacerba a produção de ERO em hepatócitos mitocondriais e diminui os níveis de antioxidantes como a GSH hepática³⁹⁻⁴¹ e também a atividade da GST.⁴² Sendo que, a GSH além de reagir diretamente com ERO também serve como substrato para as enzimas GST e GPx.¹⁶ Além disso, a atividade antioxidante é gradativamente diminuída com a idade.^{37,43} Desta forma, a diminuição da atividade da GST encontrada neste estudo, pode ser tanto por consequência do consumo de etanol, por este inibir a GSH, como devido ao processo de envelhecimento.

A enzima GPx desempenha um papel proeminente na remoção de hidroperóxidos tóxicos das células.³⁷ No presente estudo, a atividade da GPx hepática e eritrocítica na fase lactação não tiveram alterações significativas. No entanto, dados observados em um estudo anterior, mostram alterações significativas tanto na diminuição da atividade da GPx hepática como no aumento da atividade GPx no soro na fase da lactação.¹⁸ Os níveis aumentados de GPx avaliado no soro pode ser resultado da diminuição da entrada de selênio para o fígado causado pela ingestão de etanol. Desta forma, a atividade da GPx no soro é aumentada, atuando como primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo provocado pelo etanol.¹⁸ Ou ainda, a redução hepática da GPx pode ser resultado da entrada irregular de glutatona citosólica no

interior da mitocôndria, resultando na diminuição do “pool” de GPx mitocondrial.⁴⁴ Nas fases jovem e adulta a atividade da GPx hepática foi significativamente diminuída, no entanto, no hemolisado não foram encontradas alterações significativas. Em outro estudo foi observado que a atividade hepática da GPx foi significativamente diminuída com o consumo crônico de etanol em ratos jovens e idosos.³⁷ Os autores justificam que a diminuição da atividade da GPx hepática pode ser consequência da produção elevada de ERO, a qual pode causar a diminuição dos níveis hepáticos de GSH, um co-fator essencial para a GPx.^{40,41} Essa diminuição na atividade da GSH também pode ser resultado da menor entrada de selênio no fígado devido ao consumo de etanol¹⁸ e/ou devido ao envelhecimento.⁴⁷ Ratos com idade avançada são mais susceptíveis ao estresse oxidativo induzido pelo consumo de etanol do que animais mais jovens.³⁷ O que pode ser resultado de um metabolismo do etanol mais lento, produção excessiva de ERO e/ou diminuição da GSH^{43,46} e NADPH.⁴⁶

A atividade da CAT hepática diminuiu apenas na fase jovem, sendo que a atividade da CAT no hemolisado praticamente não se alterou. Entretanto, o aumento da atividade da CAT hepática foi observado em outra pesquisa.¹⁸ Os autores sugeriram que o aumento da atividade da CAT, poderia estar relacionado ao seu papel no metabolismo do etanol em especial nos neonatos ou ainda, devido ao estresse oxidativo.^{18,47} Estudo com ratos jovens e idosos, observou-se uma diminuição da atividade da CAT em ambos os grupos, sendo maior no grupo dos idosos.³⁷ O autor sugere que tanto o envelhecimento, como o consumo de etanol podem ser responsáveis pela diminuição da atividade da CAT.³⁷

No plasma, nas fases lactação e adulta, houve um aumento da peroxidação lipídica nos GE, avaliado pelo TBARS, porém sem diferença significativa. A peroxidação lipídica avaliada no fígado foi significativamente diminuída no GEL. Estudo que avaliou a peroxidação lipídica no fígado por meio do biomarcador TBARS, não encontrou nenhuma alteração significativa.¹⁸

O consumo materno de etanol durante a lactação causou menor ganho de peso corporal da prole durante as fases de lactação e jovem, normalizando na fase adulta. Entretanto, houve uma diminuição da atividade eritrocítica da SOD e hepática da GST, GPx e CAT nas fases jovem e adulta. Sugere-se novos estudos com o objetivo de observar o efeito do consumo de etanol durante a lactação ao longo das fases da vida.

Declaração de autoria

MBF, EAMM e DWF participaram do desenho do protocolo, GLF e MBF, desenvolveram o protocolo e MBF, EAMM, RLMF e EBSMT analisaram e redigiram o manuscrito.

Conflito de interesse

Os autores não têm conflitos de interesse a declarar.

Agradecimentos

FUNPESQUISA, Universidade Federal de Santa Catarina (FUNPESQUISA/UFSC). Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina (PPGN/UFSC), Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (Reuni).

REFERÊNCIAS

1. Symonds ME, Budge H, Stephenson T, Mcmillen C. Fetal endocrinology and development – manipulation and adaptation to long-term nutritional and environmental challenges. *Reproduction* 2001;**12**:853-62.
2. Heil SH, Subramanian MG. Chronic alcohol exposure and lactation Extended observations. *Alcohol* 2000;**21**:127-32.
3. García-Rodríguez S, Argüelles S, Llopis R, Murillo ML, Machado A, Carreras O, Ayala A. Effect of prenatal exposure to ethanol on hepatic elongation factor-2 and proteome in 21-day-old rats: protective effect of folic acid. *Free Radic Biol Med* 2003;**35**:428-37.
4. Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiol* 2006;**21**:29-37.
5. Argote-Espinosa RM, Flores-Huerta S, Hernández-Montes H, Villalpando-Hernández S. Depuración plasmática de etanol y su excreción en la leche de mujeres rurales que consomen pulque. *Rev Invest Clín* 1992;**44**:31-36.
6. Norberg A, Jones AW, Hahn RG, Gabrielsson JL. Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: research and fo-

- rensic applications. *Clin Pharmacokinet* 2003;**42**:1-31.
7. Lieber CS. Herman Award Lecture, 1993: A personal perspective on alcohol, nutrition, and the liver. *Am J Clin Nutr* 1993;**58**:430-42.
 8. Keilin D, Hartree EF. Properties of catalase. Catalysis of coupled oxidation of alcohols. *Biochem J* 1945;**39**:293-301.
 9. Lieber CS. Alcohol Metabolism: General Aspects. In: Victor R. Preedy and Ronald Ross Watson. *Comprehensive Handbook of Alcohol Related Pathology*. Elsevier Science Ltd.–Academic Press, 2004:1211-1222.
 10. Dupont I, Lucas D, Clot P, Menez C, Albano E. Cytochrome P4502E1 inducibility and hydroxyethyl radical formation among alcoholics. *J Hepatol* 1998;**28**:564-71.
 11. Mckillop IH, Schrum LW. Alcohol and liver câncer. *Alcohol* 2005;**35**:195-203.
 12. Rodríguez EMRC, Purata A, Cruz PH. Citocromo p450 biomarcador de exposición terapéutico-toxicológico –carcinogénico. *REB* 2010;**29**:39-52.
 13. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes* 2006;**30**:400-418.
 14. Somogyi A, Rosta K, Pusztai P, Tulassay Z, Nagy G. Antioxidant measurements. *Physiol Meas* 2007;**28**:41-55.
 15. Halliwell B, Gutteridge JMC. Antioxidant defences; Endogenous and Diet Derived. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4 ed. Oxford: University Press, 2007: 86-179.
 16. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathionerelated enzymes. *J Nutr Biochem* 2005;**16**:577-86
 17. Oyama LM, Couto RC, Couto GEC, Dañmaso AR, Oller Do Nascimento CM. Ethanol intake during lactation II. Effects on pups' liver and brain metabolism. *Alcohol* 2000;**21**:201-06.
 18. Ojeda ML, Nogales F, Vázquez B, Delgado MJ, Murillo ML, Carreras O. Alcohol, Gestation and Breastfeeding: Selenium as an Antioxidant Therapy. *Alcohol Alcohol* 2009;**44**:272-77.

19. Lee RD, An SM, Kim S, Shee GS, Kwack SJ, Seok JH, Chae SY, Park CH, Choi YW, Kim HS et al. Neurotoxic effects of alcohol and acetaldehyde during embryonic development. *J Toxicol Environ Health* 2005;**68**:2147-62.
20. Chu J, Tong M, De La Monte SM. Chronic ethanol exposure causes mitochondrial dysfunction and oxidative stress in immature central nervous system neurons. *Acta Neuropathol* 2007;**113**:659-73.
21. Tiwari V, Chopra KJ. Resveratrol prevents alcohol-induced cognitive deficits and brain damage by blocking inflammatory signaling and cell death cascade in neonatal rat brain. *J Neurochem* 2011;**117**:678-90.
22. Mennella JA. Regulation of Milk Intake After Exposure to Alcohol in Mothers' Milk. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;**25**:590-93.
23. Murillo-Fuentes ML, Artillo R, Ojeda ML, Delgado MJ, Murillo ML, Carreras O. Effects of prenatal or postnatal ethanol consumption on zinc intestinal absorption and excretion in rats. *Alcohol Alcohol* 2007;**42**:3-10.
24. Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. World Medical Association, 2008. (Acessado em 25 de janeiro de 2011, em <http://www.wma.net/e/press/2008-8.htm>).
25. Tavares-Do-Carmo MG, Nascimento-Curi CMO. Effect of ethanol intake during lactation on the metabolism of dams and on pup development. *Bras J Med Biol Res* 1990;**23**:1161-63.
26. Beutler E. Red cell metabolism: A manual of biochemical methods. New York: Grune & Stratton, 2 ed, 188p, 1975.
27. Aebi H. Catalase in vitro. In: Packer L. Methods Enzymol. Academic Press, 1984; **105**:121-126.
28. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;**247**:188-92.
29. Boveris A, Cadenas E. Production of superoxide dismutase radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In: Oberley LW. Superoxide dismutase. Boca Raton, CRC, 1982: 159-68.

30. Habig WH, Pasbst MJ, Jakoby WB. Glutathione-S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1976;**249**:7130-39.
31. Flohé L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. In: Packer L. *Methods Enzimol. Academic Press*, 1984;**105**:114-121.
32. Ohkawa H, Ohisi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;**95**:351-58.
33. Bird RP, Draper AH. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. In: Packer L. *Methods Enzimol. Academic Press*, 1984;**105**:299-305, 1984.
34. García-Delgado M, Peral MJ, García-Benítez O, Carreras O, Ilundáin AA. Prolonged ethanol ingestion increases renal AQP2 and AQP3 expression in adult rats and in their offspring. *J Membr Biol* 2004;**198**:89-94.
35. Ojeda ML, Vázquez B, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Ethanol Consumption by Wistar Rat Dams Affects Selenium Bioavailability and Antioxidant Balance in Their Progeny. *Int J Environ Res Public Health* 2009;**6**:2139-49.
36. Frisancho, AR. Reduced rate of fat oxidation: a metabolic pathway to obesity in the developing nations. *Am J Hum Biol* 2003;**15**:522-32.
37. Mallikarjuna K, Shanmugama KR, Nishanth K, Ming-Chieh Wu, Chien-Wen Houb, Chia-Hua Kuob, Sathyavelu Reddy K. Alcohol-induced deterioration in primary antioxidant and glutathione family enzymes reversed by exercise training in the liver of old rats. *Alcohol* 2010;**44**:523-29.
38. Kessova IG, Ho Y, Thung S, Cederbaum AI. Alcohol-Induced Liver Injury in Mice Lacking Cu, Zn-Superoxide Dismutase. *Hepatology* 2003;**38**:1136-45.
39. Das SK, Vasudevan DM. Effect of ethanol on liver antioxidant defense system: A dose dependent study. *Ind J Clin Biochem* 2005;**20**:80-84.
40. Hirano T, Kaplowitz N, Tsukamoto H, Kamimura S, Fernandez-Checa JC. Hepatic mitochondrial glutathione depletion and progression of experimental alcoholic liver disease in rats. *Hepatology* 1992;**16**:1423-27.

41. Bailey SM, Patel VB, Young TA, Asayama K, Cunningham CC. Chronic ethanol consumption alters the glutathione/glutathione peroxidase-1 system and protein oxidation status in rat liver. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;**25**:726-33.
42. Jurczuk M, Moniuszko-Jakoniuk J, Rogalska J. Glutathione-related enzyme activity in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Polish J Environ Stud* 2006;**15**:861-68.
43. Kumaran SV, Arulmathi K, Srividhya R, Kalaiselvi P. Repletion of antioxidant status by EGCG and retardation of oxidative damage induced macromolecular anomalies in aged rats. *Exp Gerontol* 2008;**43**:176-83.
44. Cohen-Kerem R, Koren G. Antioxidants and fetal protection against ethanol teratogenicity: I. Review of the experimental data and implications to humans. *Neurotoxicol Teratol* 2003;**25**:1-9.
45. Savarino L, Granchi D, Ciapetti G, Cenni E, Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Mattioli R. Serum concentrations of zinc and selenium in elderly people: results in healthy nonagenarians/centenarians. *Exp Gerontol* 2001;**36**:327-39.
46. Chandra R, Aneja R, Rewal C, Konduri R, Das SK, Agarwal S. An opium alkaloid-papaverine ameliorates ethanol-induced hepatotoxicity: diminution of oxidative stress. *Ind J Clin Biochem* 2000;**15**:155-60.
47. Tran MN, Wu A, Hill DW. Alcohol dehydrogenase and catalase content in perinatal infant and adult livers: potential influence on neonatal alcohol metabolism. *Toxicol Lett* 2007;**169**:245-52.

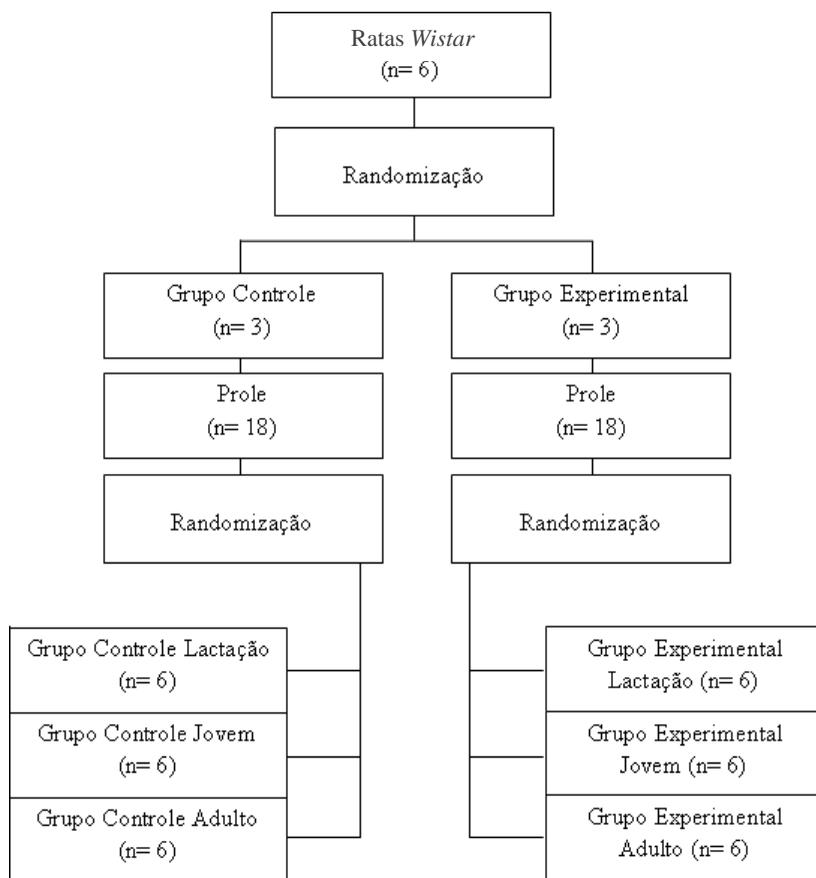


Figura 1 - Randomização das ratas e da prole.

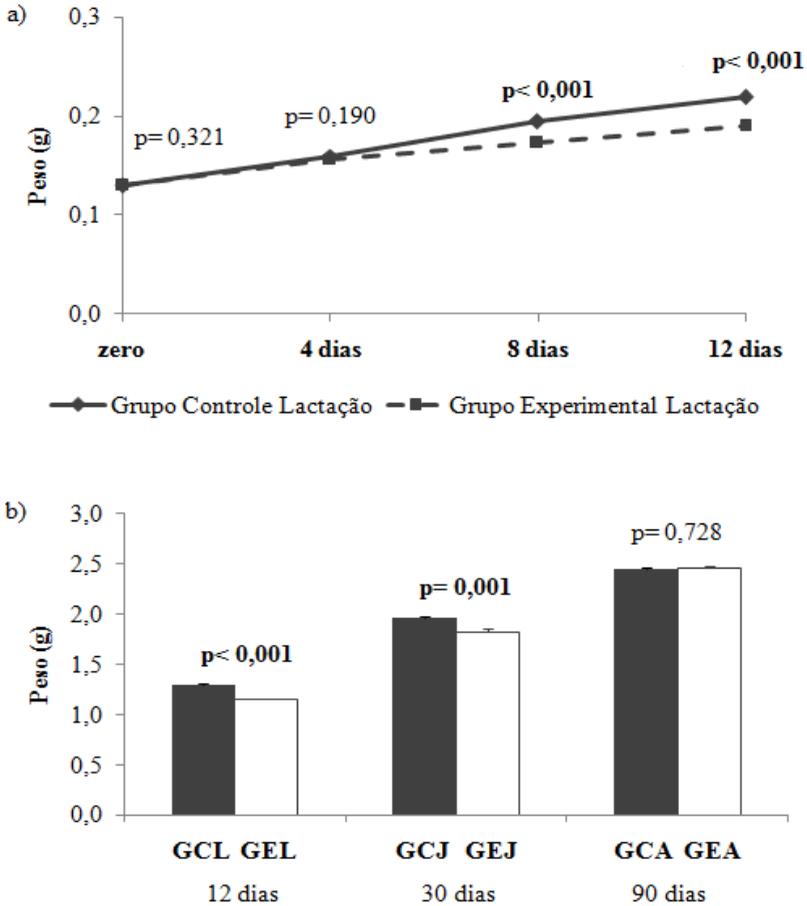


Figura 2 a e b - Peso da prole de ratos Wistar. GCL: Grupo Controle Lactação; GEL: Grupo Experimental Lactação; GCJ: Grupo Controle Jovem; GEJ: Grupo Experimental Jovem; GCA: Grupo Controle Adulto; GEA: Grupo Experimental Adulto. Valores foram normalizados pela transformação de log na base 10 e expressos em média \pm erro padrão da média, $n = 6$ animais por grupo. Utilizou-se o teste “*t*” Student.

Tabela 1 Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona S-transferase (GST), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) no hemolisado da prole de ratos Wistar nas fases de lactação, jovem e adulta.

Variáveis	GCL	GEL	p	G CJ	GEJ	p	GCA	GEA	p
SOD	2,25 ±	2,22 ±		2,23 ±	2,04 ±		2,32 ±	2,11 ±	
USOD/ml	0,01	0,06	0,638	0,04	0,05	0,018	0,02	0,03	< 0,001
GST	2,41 ±	2,32 ±		2,31 ±	1,99 ±		2,24 ±	2,21 ±	
µmol/min/ml	0,12	0,03	0,458	0,04	0,01	< 0,001	0,05	0,06	0,411
GPx	0,89 ±	0,87 ±		0,41 ±	0,40 ±		0,53 ±	0,60 ±	
µmol/min/ml	0,06	0,03	0,255	0,03	0,05	0,781	0,02	0,03	0,064
CAT	0,83 ±	0,81 ±		1,08 ±	1,08 ±		1,09 ±	1,1 ±	
µmol/min/ml	0,05	0,05	0,853	0,01	0,01	0,874	0,01	0,02	0,695

GCL: Grupo Controle Lactação; GEL: Grupo Experimental Lactação; G CJ: Grupo Controle Jovem; GEJ: Grupo Experimental Jovem; GCA: Grupo Controle Adulto; GEA: Grupo Experimental Adulto. Valores foram normalizados pela transformação de log na base 10 e expressos em média ± erro padrão da média, n= 6 animais por grupo. Utilizou-se o teste “t” Student.

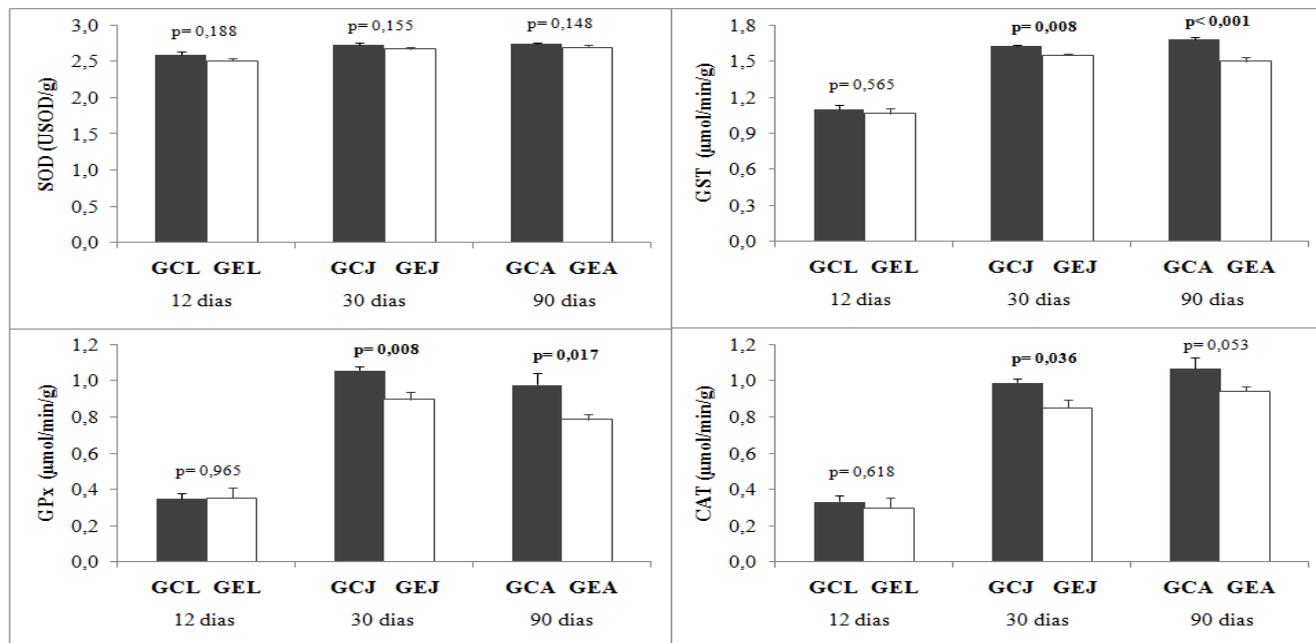


Figura 3 Atividade hepática das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona S-transferase (GST), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) na prole de ratos Wistar. GCL: Grupo Controle Lactação; GEL: Grupo Experimental Lactação; GCJ: Grupo Controle Jovem; GEJ: Grupo Experimental Jovem; GCA: Grupo Controle Adulto; GEA: Grupo Experimental Adulto. Valores foram normalizados pela transformação de log na base 10 e expressos em média \pm erro padrão da média, $n = 6$ animais por grupo. Utilizou-se o teste “*t*” Student.

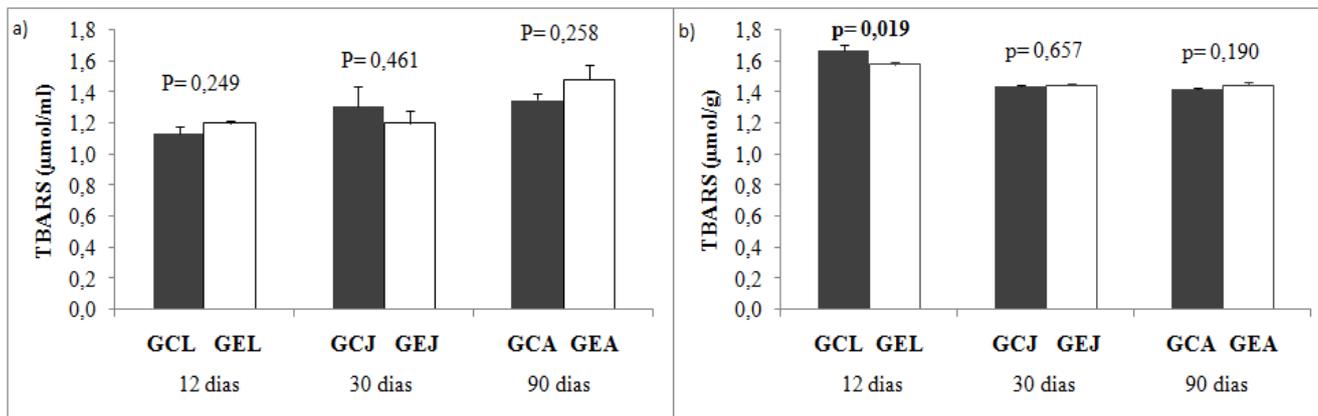


Figura 4 Níveis plasmáticos (a) e hepáticos (b) de TBARS da prole de ratos Wistar. TBARS: Substâncias Reativas ao ácido Tiobarbitúrico; GCL: Grupo Controle Lactação; GEL: Grupo Experimental Lactação; GCJ: Grupo Controle Jovem; GEJ: Grupo Experimental Jovem; GCA: Grupo Controle Adulto; GEA: Grupo Experimental Adulto. Valores foram normalizados pela transformação de log na base 10 e expressos em média \pm erro padrão da média, n= 6 animais por grupo. Utilizou-se o teste “t” Student.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente pesquisa com ratos mostrou que o consumo materno de etanol durante o período da lactação está relacionado com menor ganho de peso e com a diminuição das atividades de enzimas de marcadores de estresse oxidativo tanto na fase de lactação, quanto na jovem e na adulta.

- a) A prole do GE apresentou um menor ganho de peso durante a fase de lactação e jovem. Contudo, na fase adulta o peso igualou-se ao GC;
- b) A atividade sérica da enzima SOD da prole diminuiu nas fases jovem e adulta, enquanto que a enzima GST teve a atividade diminuída apenas na fase jovem com o consumo materno de etanol durante a lactação;
- c) A atividade hepática das enzimas GST e GPx da prole diminuíram nas fases jovem e adulta com o consumo materno de etanol durante a lactação. Com relação a CAT, a atividade hepática diminuiu apenas na fase jovem.

REFERÊNCIAS

ADACHI, M.; HIGUCHI, H.; MIURA, S.; AZUMA, T.; INOKUCHI, S.; SAITO, H.; KATO, S.; ISHII, H. Bax interacts with the voltage-dependent anion channel and mediates ethanol-induced apoptosis in rat hepatocytes. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 287, p. G695-G705, 2004.

ADACHI, M.; ISHII, H. Role of mitochondria in alcoholic liver injury. **Free Radic Biol Med**, v. 32, p. 487-491, 2002.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AGARWAL D.P. Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes. **Pathol Biol**, v. 49, p. 703-709, 2001.

ARGOTE-ESPINOSA, R. M.; FLORES-HUERTA, S.; HERNÁNDEZ-MONTES, H.; VILLALPANDO-HERNÁNDEZ, S. Depuración plasmática de etanol y su excreción en la leche de mujeres rurales que consomen pulque. **Rev Invest Clín**, v. 44, p. 31-36, 1992.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: A manual of biochemical methods**. New York: Grune & Stratton, 1975.

BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. **Methods Enzymol**, v. 90, p. 105-110, 1984.

BOVERIS, A.; OSHINO, N.; CHANCE, B. The cellular production of hydrogen peroxide. **Biochem J**, v. 128, p. 617-630, 1972.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Production of superoxide dismutase radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In: Oberley LW. **Superoxide dismutase**, CRC: Boca Raton, v. 2, 1982. p. 159-168.

BUTURA, A.; NILSSON, K.; MORGAN, K.; MORGAN, T.R.; FRENCH, S.W.; JOHANSSON, I.; SCHUPPE-KOISTINEN, I.; INGELMAN-SUNDBERG, M. The impact of CYP2E1 on the development of alcoholic liver disease as studied in a transgenic mouse model. **J Hepatol**, v. 50, p. 572-583, 2009.

CABALLERLA, J.; BARAONA, E.; LIEBER, C. S.. The contribution of the stomach to ethanol oxidation in the rat. **Life Sciences**, v.. 41, n. 8, p. 1021-1027, 1987.

CARR, A. C.; MCCALL, M. R.; FREI, B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, n. 7, p. 1716-1723, 2000.

CHU, J.; TONG, M.; DE LA MONTE, S. M. Chronic ethanol exposure causes mitochondrial dysfunction and oxidative stress in immature central nervous system neurons. **Acta Neuropathol**, v. 113, n. 6, p. 659-673, 2007.

COHEN-KEREM, R.; KOREN, G. Antioxidants and fetal protection against ethanol teratogenicity: I. Review of the experimental data and implications to humans. **Neurotoxicol Teratol**, v. 25, p. 1-9, 2003.

DAS, S. K.; HIRAN, K. R.; MUKHERJEE, S.; VASUDEVAN, D. M. Oxidative stress is the primary event: effects of ethanol consumption in brain. **Ind J Clin Biochem**, v. 22, ss. 1, p. 99-104, 2007.

Declaration of Helsinki. **Ethical principles for medical research involving human subjects**. World Medical Association, 2008. Acesso em: 25 jan 2011. Disponível em: <http://www.wma.net/e/press/2008-8.htm>.

DI PADOVA, C.; WORNER, T. M.; JULKUNEN, R. J. K.; LIEBER, C. S. Effects of fasting and chronic alcohol consumption on the first pass metabolism of ethanol. **Gastroenterology**, v. 92, ss. 1, p. 169-173, 1987.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, p. 47-95, 2002.

FERNANDEZ-CHECA, J. C.; KAPLOWITZ, N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 204, p. 263-273, 2005.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras*, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 114-121, 1984.

FOWDEN, A. L.; GIUSSANI, D. A.; FORHEAD, A. J. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. **Physiology**, v. 21, p. 29-37, 2006.

FRANK, A.; SEITZ, H.; BARTSCH, H.; FRANK, N.; NAIR, J. Immunohistochemical detection of 1, N6-ethenodeoxyadenosine in nuclei of human liver affected by diseases predisposing to hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 6, p. 1027-1031, 2004.

GARCÍA-DELGADO, M.; PERAL, M. J.; GARCÍA-BENÍTEZ, O.; CARRERAS, O.; ILUNDÁIN, A. A. Prolonged ethanol ingestion increases renal AQP2 and AQP3 expression in adult rats and in their offspring. **J Membr Biol**, v. 198, p. 89-94, 2004.

GEMMA, S.; VICHI, S.; TESTAI, E. Individual susceptibility and alcohol effects: biochemical and genetic aspects. **Ann Ist Super Sanità**, v. 42, n. 1, p. 8-16, 2006.

GHAFOURIFAR, P.; CADENAS, E. Mitochondrial nitric oxide synthase. **Trends Pharmacol Sci**, v. 26, p. 190-195, 2005.

GOTZ, M. E.; KUNIG, G.; REIDERER, Y. Oxidative stress: Free radical production in neural degeneration. **Pharmacol Ther**, v. 63, p. 37-122, 1994.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, p. 626, 2004.

GUERRI, C. Mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal ethanol exposure. **Neurotoxicol Teratol**, v. 4, p. 327-335, 2002.

GUNDOGAN, F.; ELWOOD, G.; MARK, P.; FEIJOO, A.; LONGATO, L.; TONG, M.; DE LA MONTE, S. M. Ethanol-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in rat placenta: Relevance to pregnancy loss. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 34. n. 3. p. 415-423, 2010.

HABIG, W. H.; PASBST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione-S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen is a toxic gas - an introduction to oxygen toxicity and reactive species. In: **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4 ed. Oxford: University Press, 2007a. Cap. 1, p. 1-20.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The chemistry of free radicals and related 'reactive species'. In: _____, **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4 ed. Oxford: University Press, 2007b. Cap. 2, p. 22-81.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Antioxidant defences; Endogenous and Diet Derived. In: _____, **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4 ed. Oxford: University Press, 2007c. Cap. 3, p. 86-179.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4 ed. Oxford: University Press, 2007d. Cap. 4, p. 188-266.

HAMBY, M. E.; GRAGNOLATI, A. R.; HEWETT, S. J.; HEWETT, J. A. TGF beta 1 and TNF alpha potentiate nitric oxide production in astrocyte cultures by recruiting distinct subpopulations of cells to express NOS-2. **Neurochem Int**, v. 52, p. 962-971, 2008.

HASUMURA, Y.; TESCHKE, R.; LIEBER, C. S. Acetaldehyde oxidation by hepatic mitochondria: its decrease after chronic ethanol consumption. **Science**, v. 189, p. 727-729, 1975.

HEIL, S. H.; SUBRAMANIAN, M. G. Chronic alcohol exposure and lactation Extended observations. **Alcohol**, v. 21, p. 127-132, 2000.

HOEK, J. B.; CAHILL, A.; PASTORINO, J. G. Alcohol and Mitochondria: A Dysfunctional Relationship. **Gastroenterology**, v. 122, p. 2049-2063, 2002.

HOEK, J. B.; PASTORINO, J. G. Cellular signaling mechanisms in alcohol induced liver damage. **Semin Liver Dis**, p. 257-272. 2004.

HOWARD, C. R.; LAWRENCE, R. A. Breast-feeding and drug exposure. **Obstet Gynecol Clin North Am**, Philadelphia, v. 25, n. 1, p. 195-217, 1998.

IKONOMIDOU, C.; BITTIGAU, P.; ISHIMARU, M. J.; WOZNIAK, D. F.; KOCH, C.; GENZ, K.; PRICE, M. T.; STEFOVSKA, V.; HÖSTER, F.; TENKOVA, T.; DIKRANIAN, K.; OLNEY, J. W. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. **Science**, v. 287, p. 1056-1060, 2000.

JASON, J. Breast-feeding in 1991. **N Engl J Med**, v. 325, n. 14, p. 1036-1038, 1991.

JULKUNEN, R. J. K.; DI PADOVA, C.; LIEBER, C. S. First-pass metabolism of ethanol: a gastrointestinal barrier against the systemic toxicity of ethanol. **Life Sci**, v. 37, p. 567-573, 1985.

JUNG, M. E.; GATCH, M. B.; SIMPKINS, J. W. Estrogen neuroprotection against the neurotoxic effects of ethanol withdrawal: potential mechanisms. **Exp Biol Med**, v. 230, p. 8-22, 2005.

KEILIN, D.; HARTREE, E. F. Properties of catalase. Catalysis of coupled oxidation of alcohols. **Biochem J**, v. 39, p. 293-301, 1945.

KESSOVA, I. G.; HO, Y.; THUNG, S.; CEDERBAUM, A. I. Alcohol-induced liver injury in mice lacking Cu, Zn-superoxide dismutase. **Hepatology**, v. 38, n. 5, p. 1136-1145, 2003.

LEE, R. D.; AN, S. M.; KIM, S.; SHEE, G. S.; KWACK, S. J.; SEOK, J. H.; CHAE, S. Y.; PARK, C. H.; CHOI, Y. W.; KIM, H. S.; CHO, H. Y.; LEE, B. M.; PARK, K. L. Neurotoxic effects of alcohol and acetaldehyde during embryonic development. **J Toxicol Environ Health**, v. 68, p. 2147-2162, 2005.

LIEBER, C. S. Alcohol Metabolism: General Aspects. In: Victor R. Preedy and Ronald Ross Watson. **Comprehensive handbook of alcohol related pathology**. Elsevier Science Ltd.–Academic Press, London, 2004. p. 1211-1222.

LIEBER, C. S.; DE CARLI, L. M. Ethanol oxidation by hepatic microsomes: adaptive increase after ethanol feeding. **Science**, v. 162, p. 917-918, 1968.

LIEBER, C. S. Herman Award Lecture, 1993: A personal perspective on alcohol, nutrition, and the liver. **Am J Clin Nutr**, v. 58, p. 430-442, 1993.

LITTLE, R. E.; NORTHSTONE, K.; GOLDING, J.; ALSPAC Study Team. Alcohol, breastfeeding, and development at 18 months. **Pediatrics**, v. 109, p. 1-6, 2002.

LOUREIRO, A. P. M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Quim Nova**, v. 25, n. 5, p. 777-793, 2002.

MANDELKER, L. Introduction to oxidative stress and mitochondrial dysfunction. **Vet Clin Small Anim**, v. 38, p. 1-30, 2008.

MASELLA, R.; DI BENEDETTO, R.; VARI, R.; FILESÌ, C.; GIOVANNINI, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione related enzymes. **J Nutr Biochem**, v. 16, p. 577-586, 2005.

MENNELLA, J. A. Regulation of milk intake after exposure to alcohol in mothers' milk. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, n. 4, p. 590-593, 2001.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **J Biol Chem**, v.244, p.6049-55, 1969.

MIRMIRAN-YAZDY, S. A.; HABER, P. S.; KORSTEN, M. A.; MAK, K. M.; GENTRY, R. T.; BATRA, S. C.; LIEBER, C. S. Metabolism of ethanol in rat gastric cells and its inhibition by cimetidine. **Gastroenterology**, v. 108, ss. 3, p. 737-742, 1995.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, p. 188-192, 1972.

MOLINA, J. C.; SPEAR, N. E.; SPEAR, L. P.; MENNELLA, J. A.; LEWIS, M. J. Alcohol and development: beyond fetal alcohol syndrome. **Develop Psychobiol**, v. 49. p. 227-242, 2007.

MURILLO-FUENTES, M. L.; ARTILLO, R.; OJEDA, M. L.; DELGADO, M. J.; MURILLO M. L.; CARRERAS, O. Effects of prenatal or postnatal ethanol consumption on zinc intestinal absorption and excretion in rats. **Alcohol Alcohol**, v. 42, n. 1, p. 3-10, 2007.

National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA). **Oxidative pathways of alcohol metabolism**. Dezembro, 2008. Disponível em: http://www.niaaa.nih.gov/Resources/GraphicsGallery/Metabolism/Pages/pathways_alcohol.aspx. Acesso em: 20 maio 2011.

NEVES, J.; FACCIN, G. L.; TAVARES-DO-CARMO, M. G. Efeito da ingestão de álcool durante a lactação sobre a produção e composição do leite materno e sobre o crescimento da prole: estudo em ratas. **Rev Nutr**, v. 8, n. 1, p. 65-82, 1995.

NIGAM, S.; SCHEWE, T. Phospholipase A2s and lipid peroxidation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1488, p. 167-181, 2000.

NORBERG, A.; JONES, A. W.; HAHN, R. G.; GABRIELSSON, J. L. Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: research and forensic applications. **Clin Pharmacokinet**, v. 42, p. 1-31, 2003.

NOURISSAT, P.; TRAVERT, M.; CHEVANNE, M.; TEKPLI, X.; REBILLARD, A.; ULLER, G. M.; RISSEL, M.; CILLARD, J.; DIMANCHE-BOITREL, M.; LAGADIC-GOSSMANN, D.; SERGENT, O. Ethanol induces oxidative stress in primary rat hepatocytes through the early involvement of lipid raft clustering. **Hepatology**, v. 47, n. 1, p. 59-70, 2008.

OHKAWA, H.; OHISI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OJEDA, M. L.; NOGALES, F.; VÁZQUEZ, B.; DELGADO, M. J.; MURILLO, M. L.; CARRERAS, O. Alcohol, gestation and breastfeeding: selenium as an antioxidant therapy. **Alcohol Alcohol**, v. 44, n. 3, p. 272-277, 2009.

OLIVEIRA T. W. S. **Dieta hiperlipídica na gestação e lactação: Efeitos sobre parâmetros metabólicos e do consumo alimentar de ratos adultos**. 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2010.

OYAMA, L. M.; COUTO, R. C.; COUTO, G. E. C.; DAÃMASO, A. R.; OLLER DO NASCIMENTO, C. M. Ethanol intake during lactation II. Effects on pups' liver and brain metabolism. **Alcohol**, v. 21, p. 201-206, 2000.

PASTOR, N.; WEINSTEIN, H.; JAMISON, E.; BRENOWITZ, M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. **J Mol Biol**, v. 304, p. 55-68, 2000.

RONISA, M. J. B.; KOROURIANC, S.; BLACKBURNB, M. L. D.; BADEAUX, J.; BADGER, T. M. The role of ethanol metabolism in development of alcoholic steatohepatitis in the rat. **Alcohol**, v. 44, p. 157-169, 2010.

SALMELA, K. S.; KESSOVA, I. G.; TSYRLOV, I. B.; LIEBER, C. S. Respective roles of human cytochrome P-450E1, 1A2, and 3A4 in the hepatic microsomal ethanol oxidizing system. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 22, p. 2125-2132, 1998.

SANTOS-MONTEIRO, J.; GUEDES, R. C. A.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; CABRAL FILHO, J. E. Estimulação psicossocial e plasticidade cerebral em desnutridos. **Rev Bras Saúde Mater Infant**, v. 2, n. 1, p. 15-22, 2002.

SINGH, R. P.; SHARAD, S.; KAPUR, S. Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: Relevance of dietary antioxidants. **JIAACM**, v. 5, n. 3, p. 218-225, 2004.

SOMOGYI, A.; ROSTA, K.; PUSZTAI, P.; TULASSAY, Z.; NAGY, G. Antioxidant measurements. **Physiol Meas**, v. 28, p. 41-55, 2007.

SPEAR, N. E.; MOLINA, J. C. Fetal or infantile exposure to ethanol promotes ethanol ingestion in adolescence and adulthood: a theoretical review. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 29, p. 909-929, 2005.

STADTMAN, E. R. Role of oxidant species in aging. **Curr Med Chem**, v. 11, p.1105-1112, 2004.

SUGIURA, H.; ICHINOSE, M. Nitrate stress in inflammatory lung diseases. **Nitric Oxide**, Article in Press, (2011), doi:10.1016/j.niox.2011.03.079.

SYMONDS, M. E.; BUDGE, H.; STEPHENSON, T.; MCMILLEN, C. Fetal endocrinology and development – manipulation and adaptation to long-term nutritional and environmental challenges. **Reproduction**, v. 121, p. 853-862, 2001.

TAVARES-DO-CARMO, M. G.; NASCIMENTO-CURI, C. M. O. Effect of ethanol intake during lactation on the metabolism of dams and on pup development. **Bras J Med Biol Res**, v. 23, p. 1161-1163, 1990.

TAVARES-DO-CARMO, M. G.; NASCIMENTO-CURI, C. M. O.; MARTIN-HIDALGO, A. ; HERRERA, E. Effects of ethanol intake on lipid metabolism in the lactating rat. **Alcohol**, v. 13, n. 5, p. 443-448, 1996.

TIWARI, V.; CHOPRA, K. J. Resveratrol prevents alcohol-induced cognitive deficits and brain damage by blocking inflammatory signaling and cell death cascade in neonatal rat brain. **J Neurochem**, v. 117, p. 678-690, 2011.

TRAN, M-N.; WU, A.; HILL, D. W. Alcohol dehydrogenase and catalase content in perinatal infant and adult livers: potential influence on neonatal alcohol metabolism. **Toxicol Lett**, v. 169, p. 245-252, 2007.

TSUTSUMI, M.; LASKER, J. M.; SHIMIZU, M.; ROSMAN, A. S.; LIEBER, C. S. The intralobular distribution of ethanol-inducible P450IIE1 in rat and human liver. **Hepatology**, v. 10, p. 437-446, 1989.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. **Curr Med Chem**, v. 12, p. 1161-1208, 2005.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VINCENT, H. K.; TAYLOR, A. G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. **Int J Obes**, v. 30, n. 3, p. 400-418, 2006.

WHEELER, M. D.; KONO, H.; YIN, M.; RUSYN, I.; FROH, M.; CONNOR, H. D.; MASON, R. P.; SAMULSKI, R. J.; THURMAN, R. G. Delivery of Cu/Zn-superoxide dismutase gene with adenovirus reduces early alcohol-induced liver injury in rats. **Gastroenterology**, v. 120, p. 1241-1250, 2001a.

WHEELER, M. D.; NAKAGAMI, M.; BRADFORD, B. U.; UESUGI, T.; MASON, R. P.; CONNOR, H. D.; DIKALOVA, A.; KADIISKA, M.; THURMAN, R. G. Overexpression of manganese superoxide dismutase prevents alcohol-induced liver injury in the rat. **J Biol Chem**, v. 276, p. 36664-36672, 2001b.

APÊNDICE

APÊNDICE - NOTA DE IMPRENSA

Pesquisa com animais mostra que o consumo de etanol materno durante a lactação afeta o ganho de peso da prole e diminui os antioxidantes em diferentes fases da vida

Estudo desenvolvido junto ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) por Maiara Brusco de Freitas com ratos reforça, que o consumo de etanol por ratas lactante afeta o ganho de peso da prole. Além disso, observou-se que está relacionado com a diminuição de antioxidantes em diferentes fases da vida.

Os antioxidantes fazem parte do mecanismo de defesa utilizado pelo organismo, como forma de se proteger dos danos que as espécies reativas podem causar. Os antioxidantes têm a capacidade de retardar ou evitar a oxidação de substratos mesmo estando em concentrações inferiores aos substratos oxidáveis.

Estudos com ratos têm mostrado a relação entre o consumo de etanol e o desenvolvimento de estresse oxidativo. Entre os resultados encontrados tem-se a depleção de antioxidantes, o que aumentaria a susceptibilidade ao estresse oxidativo, o aumento da peroxidação lipídica, alterações neuronais e na transição da permeabilidade mitocondrial.

No estudo, foi avaliado o efeito do consumo da solução de água com 20% de etanol por ratas Wistar lactantes na prole durante as fases de lactação, jovem e adulta por meio da avaliação do ganho de peso, da atividade das enzimas antioxidantes catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase e superóxido dismutase e da concentração de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico tanto no sangue quanto no fígado.

O estudo mostra que o consumo materno de etanol durante a lactação causou menor ganho de peso corporal da prole durante as fases de lactação e jovem, normalizando na fase adulta. Observou-se também, uma diminuição da atividade da enzima superóxido dismutase no sangue e das enzimas, glutathione S-transferase, glutathione peroxidase e catalase no fígado, nas fases jovem e adulta. Com base nos resultados, pode-se observar que as principais alterações enzimáticas ocorreram nas fases jovem e adulta.

Os estudos normalmente avaliam o efeito do consumo de etanol

pelas ratas na prole durante o período da gestação ou gestação e lactação, sendo assim, já se conhece alguns dos seus efeitos prejudiciais no crescimento e desenvolvimento intra-uterino da prole. Estudos que avaliem o efeito do consumo materno de etanol na prole durante a lactação são importantes, para se esclarecer quais são as consequências ao longo da vida causadas pelo consumo de etanol nesta fase.