

Dietas à base de arroz e feijão aumentam a atividade plasmática e hepática da gama-glutamyltranspeptidase em ratos jovens

Ida Maria Vianna de Oliveira, Elizabeth Fujimori, Luciana da Silva

Departamento de Enfermagem em Saúde Coletiva - Laboratório de Nutrição, Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, Brasil

RESUMO. O efeito de dietas à base de arroz-feijão sobre a atividade plasmática e hepática da gama-glutamyltranspeptidase-GGT foi avaliado em ratos jovens (*Experimento A*) e adultos (*Experimento B*). Os animais receberam dietas isocalóricas contendo três níveis de proteína de Arroz, Feijão, Arroz-Feijão ou Caseína, durante 28 dias. Com os menores níveis distintos de proteína dietética, a atividade plasmática e hepática da GGT mostrou-se significativamente elevada em relação ao grupo controle de Caseína a 25%, assemelhando-se àquela do grupo aprotéico. Essa elevação foi mais efetiva com dietas de Feijão e Arroz-feijão em ratos jovens, evidenciando que o efeito da restrição protéica é exacerbado pela baixa disponibilidade de aminoácidos sulfurados, além de um efeito diferencial com a idade. As alterações observadas sugerem uma adaptação metabólica da GGT aos níveis inadequados de proteína e sobretudo de aminoácidos sulfurados e subsidiam a hipótese de redução no nível de glutatión com dietas à base de leguminosas.

Palavras chave: gama-glutamyltranspeptidase; deficiência protéica; dietas de arroz-feijão; ratos jovens; ratos adultos.

SUMMARY. Rice and bean diets increase hepatic and plasmatic activity of gamma-glutamyltranspeptidase in growing rats. The effect of feeding rice and bean diets in both hepatic and plasmatic activity of gamma-glutamyltranspeptidase-(GGT-EC 2.3.2.2) activity was evaluated in growing-rats (*Experiment A*) and mature rats (*Experiment B*). During 28 days, the animals were fed with isocaloric-diets composed by tree levels of rice, bean or rice-and-bean protein. Similarly with the aprotéic group, a significant increase on both the hepatic and plasmatic GGT activity were showed with the lowest leves of protein, when compared with 25% casein control group. This rise was more effective in growing-rats fed on legume-based diets (as bean or rice-and-bean diets), making evident a differential effect of age and an exacerbated effect of the protein restriction with the lowest sulfur amino acids disposal. These alterations suggest a metabolic adaptation of GGT to both the inadequate protein and sulfur-amino acid levels, thus supporting the hypothesis that the Glutathione levels may be reduced by these legume-based diets.

Key words: Gamma-glutamyltranspeptidase; protein deficiency; rice-bean diets; growing-rats; mature rats.

INTRODUÇÃO

A gama-glutamyltranspeptidase ou gama-glutamyltransferase (EC 2.3.2.2 - GGT) é uma glico-proteína, ligada à membrana, encontrada em várias células epiteliais, tendo sido observada pela primeira vez em 1950, por Hanes et al. (1) em extratos de rins, pâncreas e glândulas mamárias de carneiro e purificada por Szewczuk & Baranowski (2), em 1963, a partir de homogenato de rim de boi.

Desde então, muito se tem discutido sobre a função fisiológica da GGT. Sabe-se que a enzima tem um papel crucial não só na absorção de aminoácidos de fluidos, como o filtrado glomerular, mas também no transporte intracelular de aminoácidos de fluidos extracelulares em geral (3, 4). Sua função está integrada à de outras enzimas, formando um ciclo de eventos químicos, que envolve todos os aminoácidos de proteínas, chamado por Meister et al (3) de "ciclo γ -glutamil".

A GGT cataliza a reação de grupos glutamil (que servem de carregadores), entre os quais o glutatión (γ glutamil-

cisteinil-glicina - GSH), com qualquer dos inúmeros aminoácidos, possibilitando seu transporte através da membrana celular (3, 5).

Está, ainda, envolvida na degradação de glutatión podendo torná-lo disponível como fonte de cisteína para a síntese protéica (3, 6) sobretudo de albumina (7).

Uma rápida diminuição do GSH hepático de ratos durante períodos de jejum e sua elevação após a realimentação, tem sido descritos (8). A alteração no nível de glutatión, usualmente precede a da atividade da GGT. Tateishi et al (8) relatam que na recuperação de ratos após jejum, o aumento do glutatión foi acompanhado por uma diminuição na atividade da GGT e o declínio por uma subsequente elevação na atividade enzimática.

Evidências do papel desempenhado pela GGT na mobilização de cisteína do "pool" lábil (de menor meia-vida) de glutatión no fígado foram obtidas por Tateishi et al (8, 9). Tais evidências justificam o significativo aumento na atividade de GGT plasmática e hepática de ratos em crescimento, submetidos à restrição protéica por nós

encontrado (10). As mudanças constatadas na atividade da enzima refletem sua participação em mecanismos fisiológicos de adaptação ao baixo suprimento exógeno de proteína, talvez mantendo os níveis de proteínas plasmáticas e prevenindo a hipoalbuminemia.

Resultados de Antener et al, também mostram maior atividade da GGT em crianças e adultos desnutridos em relação aos normais ou aos recuperados (11- 13).

Entretanto, o significado nutricional e o contexto metabólico do envolvimento da GGT, sobretudo em reações adaptativas do organismo à situações diversas, tal como desnutrição, não estão claramente estabelecidos.

Também se desconhece o grau de comprometimento na atividade da GGT em consequência da inadequação de consumo, sobretudo de dietas a base de leguminosas, como o feijão. Considerando que o arroz e o feijão constituem a alimentação básica do brasileiro (14), inclusive das crianças maiores de um ano, pretendeu-se através deste trabalho verificar em ratos albinos quais as alterações na atividade da GGT com a desnutrição calórico-protéica induzida por dietas a base de feijão e arroz durante o processo de crescimento e durante a maturidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e tratamento

Para os experimentos foram utilizados um total de 224 ratos (*Rattus Norvegicus* var. *albinus*, Rodentia, Mammalia), da linhagem Wistar, obtidos a partir de colônias mantidas no biotério do Laboratório de Nutrição, do Departamento de Enfermagem em Saúde Coletiva da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

Experimento A - Foram utilizados 112 animais desmamados com 21 dias de idade e pesando $42,8 \pm 1,93$ g no início da experiência.

Experimento B - Cerca de 130 animais recém-desmamados e de mesma idade foram mantidos durante 8 meses nas mesmas condições de dieta e ambientais até atingirem a faixa etária requerida à experimentação (80-100% de maturidade). No início da experiência o peso médio dos animais selecionados foi de $321,0 \pm 23,83$ g e a idade média foi de 275 dias (aproximadamente 9 meses).

Em cada experimento, os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco lotes correspondendo às diferentes dietas e constituindo um total de doze grupos experimentais e dois controles, com 8 ratos em cada, em função das diferentes concentrações protéicas na dieta: Arroz a 3%, 5% e 7%; Feijão a 5%, 7% e 9%; Arroz-Feijão a 3%, 5% e 7%; Caseína a 3%, 5% e 7% (para ratos jovens) e a 1%, 3% e 5% para os adultos e Controles incluindo dieta aprotéica mais dieta de Caseína a 25%.

Todos os animais foram alojados individualmente, em gaiolas metabólicas de zinco galvanizado, com acesso à água e alimento "ad libitum" em ambiente com umidade (60%) e temperatura (23-25°C) e ciclo claro-escuro (12h) controlados. Durante o período experimental, o consumo de ração foi determinado a cada dois dias, sendo o controle de peso de cada animal feito semanalmente.

Composição e preparo das dietas

As diferentes dietas experimentais utilizadas foram preparadas a partir de farinhas obtidas dos grãos após maceração (Arroz 1:2 P/V por 50min; Feijão 1:3 P/V por 16h), autoclavagem (121°C, a 1 atm, por 15min e 30min, respectivamente para o Arroz e o Feijão), secagem (60°C até peso constante) e moagem (tamiz 0,297mm de abertura). A mistura de Arroz e Feijão foi baseada na proporção usualmente consumida na região nordeste do Brasil, 45 e 55% respectivamente (14). Todas as farinhas foram analisadas quanto ao teor de nitrogênio. Na dieta Controle a proteína padrão usada foi a caseína.

As dietas isocalóricas foram preparadas a partir de uma dieta basal aprotéica cujos constituintes foram: 8% de lípides (óleo de soja); 4% de minerais (15); 1% de vitaminas (15); 1% de fibra; e glicídios, representados por 10% de sacarose e amido (q.sp). A adição de proteína em quantidade adequada para obtenção das concentrações planejadas, foi feita substituindo o amido na dieta.

As formulações granuladas foram conservadas em embalagem de polietileno a 3°C durante o decorrer do período experimental e submetidas à análise de nitrogênio.

Obtenção do material de ensaio

Decorridos 28 dias do início da experiência e após jejum de 12 horas, os animais foram sacrificados (entre 10:00-12:00 h.AM), por decapitação, sob suave anestesia com éter etílico. Imediatamente após o sacrifício, foi feita a remoção dos fígados seguida de lavagem em solução fisiológica, pesagem e transferência para nitrogênio líquido. A média de tempo, entre a laparotomia e o congelamento, foi de aproximadamente 2 minutos. O congelamento foi prolongado até as análises (temperatura média de -18°C).

O sangue foi coletado em tubos heparinizados, e centrifugado, sob refrigeração, por 20 minutos a 2.000 rpm. No plasma, mantido a 4°C, procedeu-se no prazo de 24 horas, às análises enzimáticas. Foi, posteriormente, armazenado a -18°C.

Análises bioquímicas

O total de proteína foi dosado, pelo método de Lowry et al (16), com soro-albumina de boi cristalizada como padrão, no plasma diluído (1v/v%) e no homogenato integral de

fígado (20 mg/ml de sacarose 0,3 M).

A determinação da albumina plasmática foi feita através da técnica sugerida por Debro et al (17).

A atividade da gama-glutamyltranspeptidase foi medida, diretamente no plasma e no homogenato de fígado, através da liberação de p-nitroanilina, na presença de glicilglicina como acceptor do grupo glutamyl, conforme o indicado por Szasz et al (18).

O plasma (0,1 ml) ou a solução de enzima (0,1 ml de homogenato a 1,7 ou 3,3 g%) foram adicionados à solução de substrato (1,0 ml) consistindo de: 50 nmol de tampão tris/ pH 8,25; 2 nmol de L- γ -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida; 50 nmol de glicilglicina na mistura de ensaio. Utilizou-se "Kits" Merck para obtenção do substrato nas condições referidas.

Para o plasma, a atividade foi dada em função da variação na absorvância por minuto (durante 5 minutos), após incubação por 2 minutos. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro acoplado à banho de incubação regulado à 37°C ($\lambda = 405$ nm). Os dados foram corrigidos considerando-se a hidrólise espontânea do substrato que foi 0,5 U/L no *Experimento A* e de 0,3 U/L no *Experimento B*.

Para as análises nos fígados a incubação foi feita a 37°C, durante 45 minutos, sendo o término da reação obtido pela adição de 4 ml de ácido acético 1,1 N. A mistura foi

centrifugada a 2.000 rpm por 10 minutos, determinando-se a quantidade de p-nitroanilina formada, espectrofotometricamente à 405 nm, de acordo com a metodologia proposta por Persijn et al (19).

Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA e Regressão Linear, sendo a significância dos Teste *F* e de *Tukey* verificada ao nível de 5%.

RESULTADOS

Conforme o esperado, a variação ponderal observada na Tabela 1, sobretudo para animais em crescimento, foi determinada por mudanças tanto qualitativas quanto quantitativas da proteína ingerida, uma vez que o peso inicial dos animais dos diferentes lotes e grupos se apresentou homogêneo ($P > 0,05$). O aumento do peso foi proporcional ao teor protéico da dieta para todos os grupos. No entanto, só se mostrou significativo, entre os 3 níveis de proteína utilizados, para animais em crescimento consumindo proteínas com maior eficiência de utilização (Caseína e Arroz). Para o grupo alimentado com Arroz-Feijão encontrou-se diferença significativa apenas entre níveis extremos de consumo, e para o alimentado com Feijão não houve diferença significativa entre os níveis.

TABELA 1
Variação ponderal e consumo de alimento e proteína de ratos jovens e adultos*

Dieta	%	Variação Ponderal (g/dia)†		Consumo (g/dia)			
		jovens	adultos	Alimento		Proteína	
				jovens	adultos	jovens	adultos
Arroz	3	-0,06 ± 0,06 ^{ef}	-0,18 ± 0,26 ^{bcd}	4,4 ± 0,9 ^{fg}	15,8 ± 1,0 ^a	0,15 ± 0,03 ^b	0,56 ± 0,07 ^b
	5	0,38 ± 0,04 ^d	0,26 ± 0,44 ^b	6,7 ± 0,2 ^{bcd}	14,7 ± 1,1 ^a	0,32 ± 0,01 ^c	0,73 ± 0,11 ^{bd}
	7	1,03 ± 0,12 ^c	0,44 ± 0,17 ^{bc}	8,2 ± 1,1 ^{ab}	15,0 ± 0,7 ^a	0,60 ± 0,08 ^d	1,05 ± 0,09 ^{cd}
Feijão	5	-0,14 ± 0,06 ^{ef}	-1,40 ± 0,57 ^{de}	4,7 ± 0,3 ^{fg}	12,9 ± 0,8 ^a	0,27 ± 0,02 ^c	0,70 ± 0,07 ^b
	7	0,06 ± 0,09 ^{de}	-0,36 ± 0,20 ^{bcd}	4,6 ± 1,2 ^{fg}	14,5 ± 1,2 ^a	0,37 ± 0,09 ^c	1,05 ± 1,17 ^{cd}
	9	0,23 ± 0,22 ^{de}	-0,28 ± 0,17 ^{bcd}	5,9 ± 1,2 ^{cdef}	13,3 ± 0,6 ^a	0,58 ± 0,11 ^d	1,24 ± 0,09 ^c
Arroz-Feijão	3	-0,16 ± 0,07 ^{ef}	-0,75 ± 0,22 ^{cde}	4,0 ± 0,3 ^{fg}	15,4 ± 2,2 ^a	0,15 ± 0,01 ^b	0,51 ± 0,12 ^{bf}
	5	0,14 ± 0,17 ^{de}	-0,12 ± 0,23 ^{bc}	5,4 ± 0,4 ^{defg}	15,2 ± 0,6 ^a	0,33 ± 0,02 ^c	0,93 ± 0,06 ^d
	7	1,01 ± 0,10 ^c	0,16 ± 0,14 ^{bc}	7,8 ± 0,6 ^{abc}	14,7 ± 0,9 ^a	0,66 ± 0,05 ^d	1,23 ± 0,13 ^c
Caseína	3/1	0,08 ± 0,07 ^{de}	-1,39 ± 0,12 ^{de}	5,2 ± 1,0 ^{efg}	11,9 ± 1,0 ^a	0,19 ± 0,04 ^b	0,21 ± 0,03 ^c
	5/3	0,90 ± 0,24 ^c	-0,61 ± 0,18 ^{bcd}	7,1 ± 0,8 ^{bcd}	14,0 ± 1,1 ^a	0,39 ± 0,04 ^c	0,50 ± 0,06 ^f
	7/5	1,84 ± 0,28 ^b	-0,10 ± 0,27 ^{bc}	8,5 ± 0,5 ^{ab}	14,3 ± 1,4 ^a	0,60 ± 0,04 ^d	0,64 ± 0,10 ^{bf}
Caseína Aprotéica	25	4,63 ± 0,39 ^a	1,76 ± 0,18 ^a	9,7 ± 0,8 ^a	14,3 ± 0,3 ^a	2,70 ± 0,24 ^a	4,00 ± 0,35 ^a
	-	-0,38 ± 0,07 ^f	-1,81 ± 0,18 ^c	3,8 ± 0,3 ^e	12,3 ± 1,3 ^a	0,05 ± 0,00 ^f	0,07 ± 0,01 ^e

* Média ± Desvio Padrão (n=8). Médias, na mesma coluna, seguidas de letras iguais, não diferem significativamente ($P > 0,05$).

† Peso inicial dos animais: jovens 42,8 ± 1,93 g/ adultos 321,0 ± 23,83 g.

Nos animais adultos, o efeito do teor protéico só foi significativo entre os grupos consumindo Caseína em níveis extremos.

O maior aumento ponderal foi obtido com o consumo de Caseína a 25%, que foi significativo em relação aos demais grupos, tanto para jovens como adultos. As maiores perdas de peso foram determinadas, principalmente, pelo consumo dos níveis mais baixos de dietas a base de Feijão (5% e 7%) e Arroz-Feijão (3%) apresentando-se semelhantes à perda ocasionada pela ingestão de dieta aprotéica. Também, os animais adultos submetidos a dietas de Caseína a 1% e a 3%, perderam tanto peso quanto os do grupo sem proteína, mas sem diferenças significativas ($P > 0,05$).

A ingestão de proteína, associada diretamente ao consumo de alimento, se mostrou, tanto quanto este, proporcional à concentração de proteína na dieta nos animais em crescimento ($r = 0,781 \pm 0,12$). Os animais adultos não apresentaram

diferenças no consumo de alimento mas apenas no consumo protéico.

Os resultados de proteína e albumina plasmáticas (Tabela 2) acompanharam os relatados para a variação ponderal ou seja, nos animais em crescimento a restrição protéica (níveis mais baixos de proteína) diminuiu significativamente esses parâmetros bioquímicos (50% e 90% respectivamente).

Entretanto, mesmo nos níveis mais altos de proteína a concentração foi de apenas 30-50% da albumina e 60-80% da proteína do grupo controle (Caseína 25%). Avaliando o efeito da qualidade protéica em níveis dietéticos em torno de 7%, observou-se teores significativamente mais elevados de albumina para a Caseína quando comparada às demais fontes. Verificou-se uma menor diferenciação qualitativa das proteínas conforme se reduziu a concentração na dieta, possivelmente em função da maior variabilidade das respostas nos níveis mais baixos.

TABELA 2
Proteína total, albumina e atividade da GGT no plasma de ratos jovens e adultos*

Dieta	%	Proteína total (mg/ml)†		Albumina (mg/ml)		GGT (mu/ml)	
		jovens	adultos	jovens	adultos	jovens	adultos
Arroz	3	48,55 ± 8,04 ^f	115,52 ± 11,77 ^{ghi}	1,39 ± 1,40 ^h	35,65 ± 9,38 ^{bc}	1,76 ± 0,67 ^{abcd}	1,78 ± 0,75 ^{abc}
	5	69,14 ± 17,20 ^{cdef}	119,97 ± 20,97 ^{fgh}	10,33 ± 3,41 ^{cde}	58,43 ± 9,26 ^a	1,40 ± 0,35 ^{cd}	1,52 ± 0,96 ^{bc}
	7	96,60 ± 32,41 ^{ab}	129,42 ± 16,71 ^{efgh}	13,12 ± 4,17 ^{cd}	61,29 ± 16,67 ^a	1,56 ± 0,72 ^{bcd}	2,06 ± 0,60 ^{abc}
Feijão	5	59,98 ± 12,19 ^{def}	164,42 ± 8,87 ^{cd}	3,24 ± 1,89 ^{gh}	33,03 ± 6,95 ^{bcd}	3,18 ± 1,40 ^{ab}	1,40 ± 0,68 ^{bc}
	7	68,48 ± 20,62 ^{cdef}	208,76 ± 13,74 ^a	11,38 ± 5,55 ^{cdef}	29,55 ± 7,20 ^{bcd}	3,15 ± 1,74 ^{ab}	2,30 ± 0,74 ^{abc}
	9	71,53 ± 7,71 ^{cdef}	195,69 ± 19,55 ^{ab}	13,35 ± 2,48 ^{cd}	32,63 ± 7,31 ^{bcd}	3,45 ± 1,16 ^a	1,81 ± 0,60 ^{abc}
Arroz-Feijão	3	55,03 ± 5,41 ^{ef}	143,71 ± 6,36 ^{cdef}	4,00 ± 1,85 ^{fgh}	16,53 ± 5,76 ^e	3,12 ± 0,99 ^{ab}	2,97 ± 0,74 ^a
	5	63,62 ± 9,87 ^{def}	169,96 ± 16,54 ^{bc}	5,12 ± 2,16 ^{efgh}	20,54 ± 7,34 ^{de}	2,85 ± 0,96 ^{abc}	2,21 ± 0,64 ^{abc}
	7	78,15 ± 7,46 ^{bcd}	138,99 ± 16,73 ^{defg}	8,34 ± 1,73 ^{defg}	22,27 ± 3,23 ^{cde}	1,83 ± 0,95 ^{abcd}	2,02 ± 0,88 ^{abc}
Caseína	3/1	59,87 ± 4,46 ^{def}	113,85 ± 8,87 ^{fghi}	8,22 ± 3,57 ^{defg}	29,93 ± 5,12 ^{bcd}	0,87 ± 0,64 ^d	1,01 ± 0,58 ^c
	5/3	75,47 ± 5,75 ^{bcd}	135,36 ± 19,38 ^{defg}	14,43 ± 1,48 ^c	37,18 ± 9,62 ^b	0,79 ± 0,67 ^d	1,89 ± 0,80 ^{abc}
	7/5	87,62 ± 16,00 ^{bc}	158,11 ± 14,88 ^{cde}	22,44 ± 4,03 ^b	39,32 ± 10,00 ^b	1,07 ± 0,67 ^d	2,37 ± 1,49 ^{ab}
Caseína Aprotéica	25	115,62 ± 9,45 ^a	84,03 ± 37,64 ⁱ	38,44 ± 6,98 ^a	27,84 ± 8,30 ^{bcd}	0,60 ± 0,50 ^d	1,76 ± 0,50 ^{abc}
	-	21,93 ± 2,85 ^g	103,63 ± 12,71 ^{hi}	2,24 ± 1,01 ^h	18,70 ± 4,54 ^{de}	2,83 ± 1,39 ^{abc}	2,90 ± 0,38 ^a

* Média ± Desvio Padrão (n=8). Médias, na mesma coluna, seguidas de letras iguais, não diferem significativamente ($P > 0,05$).

† mU/ml = μ moles de p-nitroanilina liberada/min/ml de plasma

Ratos adultos mostraram respostas menos acentuadas que os mais jovens, quando alimentados com as mesmas fontes protéicas. A concentração de albumina plasmática só se apresentou significativa entre os níveis extremos de proteína para os grupos que consumiram Arroz, que também mostraram os valores mais elevados, e juntamente com os grupos submetidos à Caseína a 3% e a 5%, diferiram do grupo aprotéico ($P < 0,05$).

Em relação à proteína hepática de ratos em crescimento (Tabela 3), embora tenha ocorrido reduções proporcionais aos níveis de ingestão protéica, elas não foram significativas. Nos animais adultos a concentração de

proteína hepática se apresentou significativamente reduzida em relação à Caseína 25% para os que se alimentaram com dietas de Arroz-Feijão a 3% e Caseína a 1%.

Nesse estudo, o efeito mais evidente da qualidade inferior de dietas deficientes em aminoácidos sulfurados, como aquelas à base de Feijão e Arroz-Feijão, foi observado na atividade da GGT de ratos em crescimento. Pelos resultados, se constata um aumento significativo na atividade da enzima, tanto no plasma (Tabela 2) como no fígado (Figura 1) de animais jovens alimentados com Feijão em relação às outras dietas. Todos os grupos de ratos jovens sob dieta de Feijão (5%, 7% e 9%) e os grupos consumindo Arroz-feijão a 3% e

TABELA 3
Peso e proteína total do fígado de ratos jovens e adultos*

Dieta	%	Peso total (g)		Proteína total (mg/g de fígado)	
		jovens	adultos	jovens	adultos
Arroz	3	2,36 ± 0,17 ^a	7,15 ± 0,28 ^{ab}	268,76 ± 24,44 ^{abc}	196,31 ± 18,54 ^{abc}
	5	2,22 ± 0,36 ^{ab}	8,18 ± 1,36 ^{ac}	276,96 ± 76,19 ^{abc}	201,88 ± 20,06 ^{abc}
	7	1,94 ± 0,45 ^{ab}	7,50 ± 0,26 ^a	282,30 ± 56,86 ^{abc}	222,82 ± 10,38 ^a
Feijão	5	1,64 ± 0,55 ^b	5,90 ± 0,96 ^b	336,52 ± 24,93 ^{ab}	217,70 ± 12,34 ^{ab}
	7	1,85 ± 0,50 ^b	7,18 ± 0,81 ^{ab}	314,68 ± 49,21 ^{abc}	231,79 ± 19,93 ^a
	9	2,25 ± 0,63 ^{ab}	6,35 ± 1,02 ^b	368,38 ± 37,78 ^a	232,65 ± 13,50 ^a
Arroz-Feijão	3	1,56 ± 0,16 ^b	6,12 ± 0,84 ^b	301,91 ± 31,26 ^{abc}	166,41 ± 14,93 ^{bc}
	5	1,98 ± 0,51 ^{ab}	6,69 ± 0,71 ^{ab}	292,00 ± 16,77 ^{abc}	203,16 ± 18,27 ^{abc}
	7	2,57 ± 0,49 ^a	8,09 ± 1,37 ^{ac}	326,39 ± 26,80 ^{ab}	215,55 ± 35,44 ^{ab}
Caseína	3/1	2,00 ± 0,30 ^{ab}	7,14 ± 1,62 ^{ab}	238,99 ± 41,89 ^{bc}	162,57 ± 24,04 ^c
	5/3	2,58 ± 0,34 ^a	6,93 ± 0,82 ^{ab}	247,97 ± 38,67 ^{bc}	213,85 ± 11,04 ^{abc}
	7/5	3,18 ± 0,39 ^c	6,97 ± 0,98 ^{abc}	253,56 ± 8,53 ^{bc}	233,93 ± 16,12 ^a
Caseína Aprotéica	25	5,77 ± 0,93 ^d	9,33 ± 1,40 ^c	323,94 ± 37,61 ^{abc}	243,76 ± 30,41 ^a
	-	0,93 ± 0,16 ^c	7,15 ± 0,77 ^{abc}	223,56 ± 55,95 ^c	158,18 ± 17,52 ^c

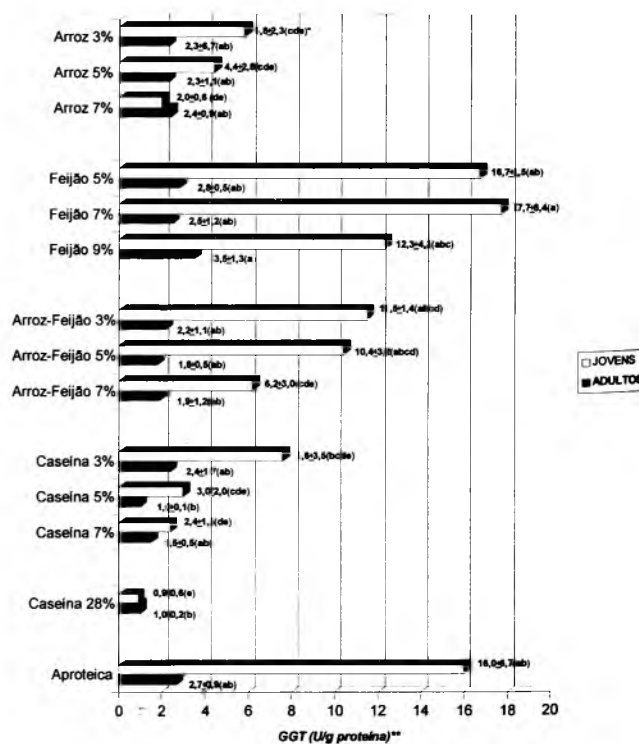
* Média ± Desvio Padrão (n=8). Médias, na mesma coluna, seguidas de letras iguais, não diferem significativamente ($P > 0,05$).

a 5% apresentaram significativa elevação na GGT em relação ao grupo controle ($P < 0,05$), se assemelhando ao grupo aprotéico. Foi, ainda, significativamente mais elevada em ratos consumindo Feijão 5% e 7% do que nos submetidos a Arroz em qualquer nível, a Caseína 5% e 7%, e até nos submetidos a dietas de Arroz-feijão 7%.

A atividade da GGT foi menos sensível a variações dietéticas nos grupos de ratos adultos notando-se diferença significativa da atividade enzimática apenas no fígado dos ratos que consumiram Feijão a 9% em relação àqueles que se alimentaram com Caseína 3% e 25% ($P < 0,05$). Nos animais adultos, submetidos a dietas com os menores níveis de proteína (Arroz-Feijão 3%, Caseína 1%, Arroz 5% ou mesmo Feijão 5%) a atividade plasmática da enzima - embora semelhante a dos animais que receberam dieta aprotéica - não diferiu significativamente da apresentada pelo grupo controle, alimentado com Caseína 25%. As alterações hepáticas mostraram que entre os animais adultos, somente o grupo alimentado com dieta de Feijão a 9% mostrou elevação significativa na GGT, similar a do grupo aprotéico e maior que a do grupo controle. Assim, em ratos adultos, o estresse da restrição protéica produziu menores alterações na atividade tanto plasmática quanto hepática da enzima.

Portanto, parece haver um efeito aditivo da baixa qualidade (representada pela limitação da proteína em aminoácidos sulfurados) e da restrição protéica, já que apenas a restrição protéica, representada pelo consumo de Arroz 3%, 5% e 7% e mesmo Caseína 3%, 5% e 7% não resultou em diferenças significativas na enzima em fígado de ratos jovens em relação à Caseína 25%.

FIGURA 1
Efeito da proteína na atividade hepática da gama-glutamiltanspeptidase em fígado de ratos jovens e adultos



*Considerando, separadamente, ratos jovens e adultos, médias seguidas de letras iguais, não diferem significativamente ($P > 0,05$).

** mU/ml = μ moles de p-nitroanilina liberada/min/ml de plasma.

DISCUSSÃO

Os resultados evidenciaram, assim, não só a capacidade de modulação da GGT ao responder a dietas limitantes em aminoácidos sulfurados, mas também o efeito diferencial dessas dietas sobre a atividade da enzima, em função da idade do animal.

As alterações observadas parecem justificar-se quando se considera o papel que a GGT desempenha no metabolismo do GSH, não só pelo seu envolvimento na síntese e degradação do tripeptídeo, mas sobretudo por ser a única enzima a torná-lo disponível como fonte de cisteína para a síntese protéica (6, 7, 20), sobretudo de albumina (7).

Os resultados obtidos por Tateishi et al (6-8) levaram os autores a pressupor que, tanto a quantidade como a qualidade da proteína, podem determinar o nível necessário de mobilização de cisteína, e assim a concentração de GSH e a atividade da GGT. Pode-se inferir desses resultados que proteínas nutricionalmente completas - não requerendo cisteína endógena para síntese protéica - manteriam os níveis normais de GSH e a atividade da GGT; a inadequação protéica quali e/ou quantitativa, ao contrário poderia induzir ao catabolismo do GSH pela GGT, para prover a cisteína adicional necessária.

Com a suplementação de aminoácidos sulfurados, os níveis hepáticos de GSH podem ser normalizados ou até mesmo superar os obtidos com dietas qualitativamente adequadas (caseína), conforme o constatado com ratos em jejum (6) ou submetidos a dietas à base de arroz-feijão (21).

Adicionalmente, tem-se demonstrado que a deficiência de sulfurados na dieta pode induzir à infiltração gordurosa no fígado (22) e aumentar os níveis de lípidos concomitantemente a alterações do GSH (23) ou, ainda, resultar em elevação na atividade hepática da gama-glutamyltranspeptidase (21).

Está estabelecido há décadas, que o padrão de síntese protéica no fígado (incluindo a síntese de albumina) e a extensão com que a disponibilidade de proteína e aminoácidos o afetam depende do estágio de desenvolvimento do animal (24), sendo os requisitos de aminoácidos uma função da idade (25). Tais desigualdades na síntese protéica, e portanto na necessidade de substrato, poderiam justificar o diferente comportamento da GGT verificado em ratos jovens e adultos e sugerem um efeito diferencial no conteúdo de GSH. Richie et al (26) observaram maiores aumentos (164%) nos níveis séricos de GSH, com simultânea redução no nível do tiol hepático, em ratos velhos submetidos à restrição crônica de metionina em relação a ratos maduros mais jovens (81%). Os autores consideraram esse aumento do GSH o responsável pela maior longevidade constatada nos animais.

A verdade é que, maximizando a concentração de GSH poder-se-ia aumentar a capacidade de defesa do organismo

contra muitas drogas e outros compostos estranhos ao organismo. A depleção do GSH com dietil maleato aumenta a toxicidade de vários xenobióticos (27,28), enquanto um pré-tratamento com metionina, N-acetilcisteína or cisteína, precursores para a síntese GSH, reduz sua toxicidade (29).

Uma menor alteração na atividade da GGT em animais mais velhos, como a observada no presente estudo, poderia ser uma das hipótese explicativas para a manutenção de níveis mais elevados de GSH em ratos velhos conforme os verificados por Richie et al (26). A maior disponibilidade de GSH, poderia resultar em menor susceptibilidade ao estresse oxidativo e aos danos a ele associados como peroxidação lipídica e toxicidade de xenobióticos, o que certamente se relaciona a aumento na vida média. Ao contrário, dietas restritas em sulfurados levando à depleção de GSH, poderiam determinar nos animais jovens, maior vulnerabilidade ao estresse oxidativo e ao desgaste representado por xenobióticos, processos inflamatórios (30), carcinogênicos e aterogênicos (31,32). Estas hipóteses, entretanto, necessitam ser testadas.

REFERÊNCIAS

1. Hanes CS, Hird FJR. Synthesis of peptides in enzymic reactions involving glutathione. *Nature* 1950;166:288-92.
2. Szweczuk A, Baranowski T. Purification and properties of γ -glutamyl transpeptidase from beef kidney. *Biochem J* 1963;338:317-29.
3. Meister A. On the enzymology of amino acid transport. *Science* 1973;180:33-9.
4. Griffith OW, Bridges RJ, Meister A. Transport of gamma-glutamyl amino acids: role of glutathione and gamma-glutamyltranspeptidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76(12):6319-22.
5. Viña J, Puertes IR, Estrela JM, Viña JR, Galbis JL. Involvement of gamma-glutamyltransferase in amino acid uptake by the lactating mammary gland of the rat. *Biochem J* 1981;194(1):99-102.
6. Higashi T, Tateishi N, Naruse A, Sakamoto Y. A novel physiological role of liver glutathione as reservoir of L-cysteine. *J Biochem* 1977;82(1):117-24.
7. Tateishi N, Higashi T, Naruse A, Nakashima K, Shiozaki H, Sakamoto Y. Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine. *J Nutr* 1977;107(1):51-60.
8. Tateishi N, Higashi T, Shinya S, Naruse A, Sakamoto Y. Studies on the regulation of glutathione level in rat liver. *J Biochem* 1974;75:93-103.
9. Tateishi N, Higashi T, Nakashima K, Sakamoto Y. Nutritional significance of increase in γ -glutamyl transferase in mouse liver before birth. *J Nutr* 1980;110(3):409-15.
10. Oliveira IMV, De Angelis R. Differential effects of protein restriction on gamma-glutamyltranspeptidase (EC 2.3.2.2) activity in young and mature rats. *Braz J Med Biol Res* 1996;29:213-7.

11. Antener I, Verwilghen AM, Van Geert C, Mauron J. Biochemical study of malnutrition - situation before treatment. *Acta Trop* 1977;34(4):331-54.
12. Antener I, Verwilghen AM, Van Geert C, Mauron J. Study on malnutrition III - Biochemical assessment of the dietary treatment and evolution of the illness. *Hev Paediatr Acta* 1978;33(6):543-62.
13. Antener I, Givel F, Mauron J, Verwilghen AM. Measurement of serum iso-enzymes of γ -glutamyl transpeptidase in malnutrition. *Acta Paediatr Belg* 1980;33(1):9-15.
14. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (FIBGE). Estudo Nacional da despesa familiar: consumo alimentar despesas das famílias. Rio de Janeiro: The Foundation, 1978.
15. Committee on Laboratory Animal Diet - Control of diets in laboratory animal experimentation. *Nutr Abstr Rev* 1979;49(11):413-9.
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
17. Debro JR, Taver H, Korner A. The determination of serum albumin and globulin by a new method. *J Lab Clin Med* 1957;50:728-32.
18. Szasz G. Gamma-glutamyltranspeptidase. In: BERGMAYER HV, editor. *Methods of enzymatic analysis*. New York, Academic Press, 1974:715-9.
19. Persijn JP, Van Der Slik W, Zwart WA. Colorimetric assay for γ -glutamyl transpeptidase. *Clin Chim Acta* 1971;35:239-40.
20. Meister A. New aspects of glutathione biochemistry and transport - selective alteration of glutathione metabolism. *Nutr Rev* 1984;42(12):397-409.
21. Oliveira IMV, Fujimori E, Pereira VG, Castro VD. DL-methionine supplementation of rice-and-bean diets affects liver gamma-glutamyltranspeptidase activity and glutathione content in livers of growing-rats. *Braz J Med Biol Res* 1999;32:483-488.
22. Speisky H, Shackel N, Varghese G, Wade D, Israel Y. Role of hepatic γ -glutamyltransferase in the degradation of circulating glutathione: studies in the intact guinea pig perfused liver. *Hepatology* 1990;11(5):843-9.
23. Henning SM, Zhang JZ, Mckee RW, Swendseid ME, Jacob RA. Glutathione blood levels and other oxidant defense indices in men fed diets low in vitamin C. *J Nutr* 1991;121(12):1969-75.
24. Waterlow JC, Stephen JM. Enzyme and the assessment of protein nutrition. *Proc Nutr Soc* 1969;28(2):234-42.
25. Hartsook EW, Mitchell HH. The effect of age on the protein and methionine requirement of rat. *J Nutr* 1956;60:173-95.
26. Richie JP, Leutzinger Y, Parthasarathy S, Malloy V, Orentreich N, Zimmerman JA. Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats. *FASEB* 1994;8:1302-6.
27. Maellaro E., Casini AF, Del Bello B, Comporti M. Lipid peroxidation and antioxidant systems in the liver injury produced by glutathione depletion agents. *Biochem Pharmacol* 1990;39(10):1513-21.
28. Comporti M, Maellaro E, Del Bello B, Casini AF. Glutathione depletion: its effect on other antioxidant systems and hepatocellular damage. *Xenobiotica* 1991;21(8):1067-76.
29. Pratt S, Ionnides C. Mechanism of the protective action of n-acetylcysteine and methionine against paracetamol toxicity in the hamster. *Arch Toxicol* 1985;57(3):173-7.
30. Jahoor F, Wykes LJ, Reeds, PL, Del Rosario, MP, Frazer, ME. Protein-deficient pigs cannot maintain reduced glutathione homeostasis when subjected to the stress of inflammation. *J Nutr* 1995;125(6):1462-72.
31. Farber E. Clonal adaptation during carcinogenesis. *Biochem Pharmacol* 1990;39(12):1837-46.
32. Stark AA, Zeiger E, Pagano, DA. Glutathione metabolism by γ -glutamyltranspeptidase leads to lipid peroxidation: characterization of the system and relevance to hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1993;14(2):183-9.

Recibido:12-09-1998

Aceptado:13-10-2000