Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal
Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanity
ISSN: 1981-2965

Artigo

Efeito do consumo de nitrito na morfologia dos órgãos genitais e na bioquímica do sangue de rato macho *Wistar*

Nitrite consumption effect on the morphology of the genital system organs and blood biochemistry in the Wistar male rat

Everton Cruz de Azevedo[1], Mayra F. Pavani[2], Paulo Damasceno[2], Felipe Chaimsohn Gonçalves da Silva[1], Glaucia Martins de Campos[1], Fernanda Raghiante[1], Otávio Augusto Martins[1*]

[1]Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,

[2] Universidade Estadual Paulista (UNESP), *Campus* de Botucatu, São Paulo, Brasil. [*]E-mail: oamartins@fmvz.unesp.br.

[2]Faculdades Integradas Regionais de Avaré, Fundação Regional Educacional de Avaré, São Paulo, Brasil.

Resumo: O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do consumo de íon nitrito na morfologia dos órgãos genitais e na bioquímica do sangue dos ratos machos da linhagem *Wistar*. Os ratos foram divididos em dois grupos: controle (CO) e nitrito de sódio (NI). Os ratos do grupo NI receberam uma dieta líquida de solução de nitrito de sódio a 200 $mg.L^{-1}$. As análises morfológicas do sistema genital dos ratos foram próstata, glândula seminal, epidídimo direito e testículo direito. As análises bioquímicas do sangue dos ratos foram glicemia, colesterol total, proteína total e albumina. O antígeno prostático específico (PSA) foi determinado pelo método rápido imunocromatográfico. Os principais resultados mostraram que os ratos do grupo NI apresentaram massas da próstata e do epidídimo maior e menor, respectivamente, comparados com os ratos do grupo CO. Não apresentaram diferenças significativas na glicemia, colesterol total, proteína total, albumina e PSA nos grupos CO e NI. Concluímos que o consumo de íon nitrito alterou a massa da próstata e do epidídimo dos ratos da linhagem *Wistar*.

Palavras-chave: Bioquímica, Morfologia, Nitrito, PSA.

Abstract: This study aimed to evaluate the effect of nitrite ion consumption in the morphology of the genital organs and the biochemistry of the blood of male Wistar rats. The rats were divided into two groups: control (CO) and sodium nitrite (NI). Rats NI group received a liquid diet sodium nitrite solution to 200 $mg.L^{-1}$. Morphological analysis of the genital system of rats were prostate, seminal gland, right epididymis and right testicle. The blood biochemistries analysis of the rats were glucose, total cholesterol, total protein and albumin. The prostate specific antigen (PSA) was determined by rapid immunochromatographic method. The main results showed that the NI group rats showed masses prostate

and epididymis higher and lower, respectively, compared with the CO group rats. No showed significant differences in the glucose, total cholesterol, total protein, albumin and PSA in the CO and NI groups. We conclude that the nitrite ion consumption changed the mass of the prostate and epididymis of *Wistar* rats.

Keywords: Biochemistry, Morphology, Nitrate, PSA.

Autor para correspondencia. *E-mail: * oamartins@fmvz.unesp.br
Recebido em 12.05.2016. Aceito em 28.12.2016
http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20160054

Introdução

Muitos alimentos perecíveis necessitam do emprego de substâncias químicas que possibilitam um aumento no tempo de conservação. Atualmente, o uso dessas substâncias é permitido seguindo uma série de padrões tecnológicos e legais (OLIVEIRA; ARAÚJO; BORGO, 2005). Dentre as substâncias, o nitrito e o nitrato podem ser encontrados em diferentes tipos de embutidos. O uso de nitrito e/ou de nitrato tem por objetivos a fixação de cor e preservação de suas características como agente antibacteriano (YUAN et al., 2010). Brasil (1998) preconiza um valor máximo de 150 $mg.kg^{-1}$ de nitrito de sódio. No processo de produção de embutidos cárneos são utilizados diferentes condimentos dentre eles açúcares e sais. Os sais dos íons de nitrito e nitrato conferem características sensoriais desejáveis e tem como função a inibição do crescimento de *Clostridium botulinum*. O nitrito reage com as aminas e as amidas originando as nitrosaminas e as nitrosamidas que são substâncias com propriedades carcinogênica, mutagênica e teratogênica (SHAHIDI; PEGG, 1994; OLIVEIRA; ARAÚJO; BORGO, 2005; DUTRA et al., 2007).

Bahadoran et al. (2015) relataram que o consumo de nitrito e de nitrato em ratos ocasionou alterações na tireóide indicando características cancerígenas. Esse experimento mostrou que os ratos tratados com nitrato de sódio apresentaram alterações hematológicas, mais especificamente em células vermelhas, modificando a estrutura e função dos eritrócitos (IVANOV et al., 2014). Onyesom e Okoh (2006) relataram que a formação das nitrosaminas está diretamente relacionada com casos de câncer devido ao efeito carcinogênico em diferentes espécies animais, inclusive ao homem.

Dellavalle et al. (2013) verificaram que o consumo de carnes e embutidos, que contem os íons nitrito e nitrato em sua composição, durante um período de nove anos aumentou o número de casos de carcinoma renal. Aschebrook-Kilfoy et al. (2012) afirmaram que mulheres que consumiam uma dieta rica de nitrito e nitrato apresentaram uma maior incidência de casos de câncer durante o período de 3 anos num hospital nos Estados Unidos OMS (2015) apontou que o consumo de carne processada, como o bacon, salsicha e presunto, aumenta as chances de desenvolvimento de câncer. Os aditivos (nitrito e nitrato) contidos nesses tipos de alimentos são

apontados como responsáveis pelo aumento do risco de câncer colorretal (OMS, 2015).

Um marcador que é utilizado comumente em câncer de próstata é o antígeno prostático específico (*prostate specific antigen*, PSA). O PSA é utilizado como ferramenta para um diagnóstico mais precoce dessa enfermidade (LINDBLOM; LILJEGREN, 2000; SUCKOW; WHEELER; YAN, 2009)

Com base nessas informações, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do consumo de íon nitrito na morfologia dos órgãos genitais e na bioquímica do sangue dos ratos machos da linhagem *Wistar*.

Material e métodos

Animais

Foi utilizado quatorze ratos machos da linhagem *Wistar* com vinte e um dias de idade. Os ratos foram adquiridos no Biotério Central da Administração Geral da Universidade Estadual Paulista – *Campus* Botucatu. O experimento ocorreu no biotério das Faculdades Integradas Regionais de Avaré, São Paulo.

Cada rato foi alojado em caixa individual com maravalha estéril em ritmo diário de 12 h de escuro e 12 h de claro. Os animais foram divididos em dois grupos: controle (CO) e nitrito (NI). O grupo CO recebeu uma dieta de água potável e ração sólida Nuvital® e o grupo NI recebeu uma solução de nitrito de sódio a 200 $mg.L^{-1}$ e a mesma ração sólida. As dietas líquida e sólida foram *ad libitum*. As mensurações da massa corpórea do rato (g), dieta líquida (mL) e dieta sólida (g) foram realizadas periodicamente a cada três dias até cento e vinte dias de idade.

Os ratos sofreram eutanásia com 120 dias de idade por decapitação. O protocolo experimental seguiu os princípios éticos e o bem estar animal em pesquisa adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (Lei n.º 11.794, de 08 de outubro de 2008). Todo o experimento seguiu os princípios de biossegurança.

Massas da próstata, glândula seminal, testículo e epidídimo

As massas (g) da próstata, glândula seminal, epidídimo direito e testículo direito dos animais foram mensurados em balança analítica Shimadzu® após a eutanásia.

Análise bioquímica

O sangue de cada rato foi coletado em tubo de ensaio limpo e estéril com heparina após a eutanásia. Os ensaios bioquímicos foram glicemia, colesterol total, proteína total, albumina e PSA. As determinações de glicemia, colesterol total, proteína total e albumina seguiram o método de espectrofotometria estabelecido pelo kit Laborlab®. O PSA seguiu o método rápido imunocromatográfico através do kit Wama®.

Análise estatística

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. A análise estatística foi completada para comparação entre as médias (Anova). Todas as conclusões foram realizadas no nível de 5% de

significância, detalhe da metodologia empregada pode ser encontrado em Montgomery (1991).

Resultados e Discussão

Os ratos do grupo NI apresentaram 10,05 %, 13,10 % e 13,26 % de massa corpórea final, ganho de massa corpórea e consumo de ração por dia, respectivamente, maiores que os ratos do grupo CO. A massa corpórea final, o ganho de massa corpóreo absoluto e o consumo de ração por dia nos ratos machos da linhagem *Wistar* apresentaram diferenças significativas (p<0,05) nos grupos CO e NI (Tabela 1).

Tabela 01. Massa corpórea inicial, massa corpórea final, ganho de massa corpóreo absoluto e consumo de ração por dia nos ratos machos da linhagem *Wistar* nos grupos CO e NI.

Parâmetros	CO	NI
Massa corpórea inicial (g)	93,33 ± 0,25 a	93,33 ± 0,25 a
Massa corpórea final (g)	401,33 ± 1,43 a[1]	441,67 ± 1,74 b
Ganho de massa corpóreo absoluto (g)	308 ± 0,31 a	348,35 ± 0,34 b
Consumo de ração por dia (g.dia^{-1})	25,82 ± 0,17 a	29,25 ± 0,19 b

[1] Teste Kramer-Tukey (p<0,05).

Na Tabela 2 mostra que o consumo de líquido final por dia, o ganho de consumo de líquido e consumo médio de líquido em ratos machos da linhagem *Wistar* no grupo NI teve um aumento de 12,65 %, 40,10 % e 10,52 %, respectivamente, comparados com o grupo CO. O consumo de líquido inicial por dia, de líquido final por dia, ganho de consumo de líquido absoluto e consumo médio de líquido em ratos machos da linhagem *Wistar* nos grupos CO e NI apresentaram diferenças significativas (p<0,05).

Tabela 02. Consumo de líquido inicial por dia, de líquido final por dia e ganho de consumo de líquido absoluto e consumo médio de líquido em ratos machos da linhagem *Wistar* nos grupos CO e NI.

Parâmetros	CO	NI
Consumo de líquido inicial (mL.dia^{-1})	49,83 ± 0,21 b[1]	33,67 ± 0,27 a
Consumo de líquido final (mL.dia^{-1})	131,67 ± 0,18 a	148,33 ± 0,26 b
Ganho de consumo de líquido absoluto (mL)	81,84 ± 0,07 a	114,66 ± 0,10 b
Consumo médio de líquido (mL.dia^{-1})	36,78 ± 0,06 a	40,65 ± 0,09 b

[1] Teste Kramer-Tukey (p<0,05).

Os valores de glicemia, colesterol total, proteína total e albumina nos sangues dos ratos machos da linhagem *Wistar* não apresentaram diferenças significativas (p>0,05) nos grupos CO e NI. O teste de PSA foi negativo para os grupos CO e NI apesar de que ocorreu um aumento significativo (p<0,05) na massa da próstata no grupo NI (Tabelas 3 e 4).

Tabela 03. Média ± desvio padrão de glicemia, colesterol total, proteína total, albumina e PSA nos grupos CO e NI. Análise estatística (Anova) complementada com o teste Kramer-Tukey (p<0,05).

Ensaios	Grupos	
	CO	NI
Glicemia (mg.dL^{-1})	146,40 ± 10,54 a[1]	117,70 ± 46,16 a
Colesterol total (mg.dL^{-1})	58,40 ± 7,10 a	60,20 ± 8,30 a
Proteína total (mg.dL^{-1})	4,48 ± 0,95 a	5,90 ± 0,43 a
Albumina (mg.dL^{-1})	3,44 ± 0,94 a	3,80 ± 0,22 a
PSA	Negativo	Negativo

[1]Teste Kramer-Tukey (p>0,05).

A Tabela 04 mostra que as massas da glândula seminal (CO: 1,873 g ± 0,11 g e NI: 1,763 g ± 0,09 g) e do testículo direito (CO: 1,761 g ± 0,11 g e NI: 1,437 g ± 0,09 g) não apresentam diferenças significativas (p>0,05) entre os grupos CO e NI. Entretanto, as massas de epidídimo direito (CO: 1,550 g ± 0,08 g e NI: 1,078 g ± 0,08 g) e da próstata (CO: 0,758 g ± 0,05 g e NI: 1,237 g ± 0,08 g) apresentam diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos CO e NI. A massa da próstata foi significativamente maior no grupo NI e a massa do epidídimo direito foi significativamente maior no grupo CO.

Tabela 04. Média ± desvio padrão da massa (g) do epidídimo direito, glândula seminal, próstata e testículo direito de ratos da linhagem *Wistar* nos grupos CO e NI. As linhas no histograma retratam as diferenças estatísticas entre os grupos (p<0,05).

Estrutura anatômica	Grupos	
	CO	NI
Glândula seminal	1,873 g ± 0,11 g a[1]	1,763 g ± 0,09 g a
Testículo direito	1,761 g ± 0,11 g a	1,437 g ± 0,09 g a
Epidídimo direito	1,550 g ± 0,08 g b	1,078 g ± 0,08 g a
Próstata	0,758 g ± 0,05 a	1,237 g ± 0,08 g b

[1]Teste Kramer-Tukey (p<0,05).

Novelli (2005) relata que não foram observadas variações significativas na massa corpórea inicial, na massa corpórea final e no ganho de massa corpóreo absoluto dos ratos nos diferentes tratamentos que utilizaram glutamato de sódio suplementada com fibras (BAGGER et al., 1996). No nosso experimento, a massa corpórea final e o ganho de massa corpóreo absoluto dos ratos machos *Wistar* apresentaram diferenças significativas no grupo NI. O aumento significativo dessas massas pode estar associado como o aumento significativo do consumo de ração por dia no grupo. Novelli (2005) cita também que uma dieta hipercalórica pode ocasionar o aumento significativo na massa corpórea inicial, na massa corpórea final e no ganho de massa corpóreo absoluto. Ressaltamos que a dieta sólida foi idêntica nos grupos (CO e NI) e que o grupo NI recebeu uma dieta líquida de solução de nitrito de sódio. Acreditamos em algumas hipóteses pelo ganho de massa nos ratos machos *Wistar* que receberam uma dieta líquida de solução de nitrito de sódio, que podem ser (a) a retenção de líquidos, (b) o desenvolvimento da

obesidade, e ou, (c) o início de um quadro de síndrome metabólica.

O consumo de líquido inicial por dia foi maior no grupo CO. Mas no decorrer do experimento, os ratos do grupo NI tiverem o consumo de líquido final por dia, o ganho de consumo de líquido absoluto e o consumo médio de líquido maiores do que o grupo CO. Esse aumento pode estar associado na necessidade de consumir mais líquido para suprir a necessidade de sede nos animais do grupo NI.

Martins (2006) verificou que o rato macho *Wistar* controle não apresentou diferença significativa nos teores de glicemia, proteína, colesterol, triglicérides, HDL, LDL e VLDL comparado com o rato macho que recebeu uma dieta suplementada com α-tocoferol. O mesmo foi observado no nosso experimento com os ratos que receberam uma dieta líquida de solução de nitrito de sódio. Esses dados podem indicar que o consumo da concentração de íon nitrito no experimento não interfere nos valores bioquímicos do sangue. Essa ausência de alterações bioquímicas também foi observada nos testes de albumina e de PSA. Essa ausência de modificações bioquímicas pode ser atribuída pela dosagem utilizada no experimento que não foi capaz de causar essas alterações. Ressaltamos que existem poucos trabalhos na comunidade científica que relatam os efeitos dos íons nitrito e nitrato em estudo experimental na forma de administração intraperitoneal ou via oral.

Na avaliação das alterações dos órgãos reprodutivos visto no presente trabalho, a próstata foi o único órgão anatômico que apresentou aumento na massa. Sabemos que existe uma correlação entre a o tamanho da próstata e a produção de PSA relacionado a casos de câncer (SUCKOW; WHEELER; YAN, 2009). No presente trabalho não detectamos a produção de PSA no grupo que recebeu a dieta de nitrito. O teste de PSA apresenta-se sensibilidade em sangue de humanos (2,5 mg/mL) e o nosso experimento utilizou sangue de ratos de linhagem *Wistar*. Esse pode ser o motivo da ausência da eficiência robusta do teste de PSA em ratos (CATALONA, 2000; CHRISTENS, 2000; LODDING, 1998; WANG, 1979). Apesar de não ser possível afirmarmos que a alteração prostática seja devido a uma alteração cancerígena, essa hipótese não pode ser descartada devido aos fatores limitantes do teste utilizado como já citado acima, bem como as alterações prostáticas estarem possivelmente numa fase inicial onde os limites de detecção possivelmente se encontrarem baixos. Observamos no experimento que a massa do epidídimo diminui com o consumo de íon nitrito. Com base nesses resultados, ressaltamos que pesquisas futuras com testes moleculares nos tecidos da próstata e do epidídimo são necessárias para confirmar essa hipótese científica.

O nosso experimento poderá oferece subsídios para experimentos futuros em modelo experimental com roedores, uma vez que na literatura científica existem poucos estudos realizados sobre os possíveis danos que o nitrito e o nitrato podem oferecer no organismo e sua relação com o câncer prostático e do epidídimo.

Conclusão

De acordo com a análise dos resultados obtidos pelo presente estudo, conclui-se que:

- O consumo de íon nitrito aumentou a massa corpórea dos ratos machos da linhagem *Wistar* que poderá ocasionar uma síndrome metabólica, mas para confirmar tal hipótese, deverá ser realizados mais estudos sobre o tema.
- A concentração de íon nitrito, consumido durante o experimento pelos ratos machos da linhagem *Wistar*, não alterou o perfil bioquímico do sangue.
- O consumo de íon nitrito alterou a massa da próstata e do epidídimo direito dos ratos da linhagem *Wistar*. Esta conclusão reforça a necessidade de experimentos futuros sobre o tema.

Agradecimentos

Ao Biotério e ao Laboratório de Química e Bioquímica das Faculdades Integradas Regionais de Avaré da Fundação Regional Educacional de Avaré.

Referências

1.ASCHEBROOK-KILFOY, B.; WARD, M.H.; DAVE, B.J.; SMITH, S.M.; WEISENBURGER, D. D.; CHIU, B.C.H. Dietary nitrate and nitrite intake and risk of non-Hodgkin lymphoma. **Leukemia & Lymphoma**, v. 54, n. 5, p. 1–6, 2012.

2. BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; GHASEMI, A.; KABIR, A.; AZIZI, F.; HADAEGH, F. Is dietary nitrate/nitrite exposure a risk factor for development of thyroid abnormality? A systematic review and meta-analysis. **Nitric Oxide**, v. 47, n. 24, p. 65–76, 2015.

3. BAGGER, M.; ANDERSON, O.; NIELSON, J. Dietary fibers reduce blood pressure, serum total cholesterol, and platelet aggregation in rats. **Br. J. Nutr.**, v. 75, p. 483-493, 1996.

4. CATALONA, W.J.; SOUTHURICK, P.C.; SLAWIN, K.M.; PARTIN, A. W.; BRAWER, M. K.; FLANIGAN, R.C.; PATEL, A.; RICHIE, J.P.; WALSH, P.C.; SCARDINO, P.T.; LANGE, P.H.; GASIOR, G.H.; LOVELAND, K.G.; BRAY, K.R. Comparison of percent free PSA, PSAdensity and age-specific PS Acut-offs for prostate cancer detection and staiging. **Urology**, v. 1, n. 56(2), p. 255-60, 2000.

5. CHRISTENS, A.; LAURELL, C.B.; LIJA, H. Enzymatic activity of prostate – specific antigen and its reaction with extracellular serine proteinase inhibitors. **Eur. J. Biochen.**, v. 194, p. 755-763, 2000.

6. DELLAVALLE, C.T.; DANIEL, C.R.; ASCHEBROOK-KILFOY, B.; HOLLENBECK, A. R.; CROSS, A.J.; SINHA, R.; WARD, M.H. Dietary intake of nitrate and nitrite and risk of renal cell carcinoma in the NIH-AARP Diet and Health Study. **British Journal of Cancer**, v. 108, n. 1, p. 205–12, 2013.

7. DUTRA, C.B.; RATH, S.; GUILLERMO, F.; REYES, R. Nitrosaminas voláteis em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 1, p. 111–120, 2007.

8. IVANOV, I.; GLUHCHEVA, Y.; PETROVA, E.; ANTONOVA, N. Hemorheological changes and hematometric erythrocyte characteristics in rats after sodium nitrite intoxication. **Korea-Australia Rheology Journal**, v. 26, n. 2, p. 225–228, 2014.

9, LINDBLOM, A; LILJEGREN, A. Regular review: tumour markers in malignancies. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 320, n. 7232, p. 424–7, 2000.

10. LODDING, P.; AUS, G.; BERGDAHL, S.; FROSING, R.; LILJA, H; PILH, C.G.; HUGOSSON, J. Characteristics of screening detected prostate cancer in men 50 of 66 years old with 3 to 4ng/mL prostate specific antigen. **Journal of Urology**, v. 159, n. 3, p. 899-903, 1998.

11. MARTINS, O.A. **Estresse, alcoolismo e vitamina E: avaliação de parâmetros bioquímicos e morfofisiologia prostática**. 2006. 100f. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

12. NOVELLI, E.L.B. **Nutrição e vida saudável**. Estresse oxidativo e metabolismo energético. Ribeirão Preto: Tecmedd. 2005.

13. OLIVEIRA, M.J.; ARAÚJO, W.M.C.; BORGO, L. A. Quantificação de nitrato e nitrito em lingüiças do tipo frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 736–742, 2005.

14. OMS. Organização Mundial da Saúde. **OMS alerta que consumo de embutidos pode causar câncer**. Publicado: 27 de outubro de 2015. Disponível em: <https://www.proteste.org.br/alimentacao/carne/noticia/oms-alerta-que-consumo-de-embutidos-pode-causar-cancer>. Acesso em: 29 ago. 2016.

15. ONYESOM, I.; OKOH, P.N. Quantitative analysis of nitrate and nitrite contents in vegetables commonly consumed in Delta State, Nigeria. **British Journal of Nutrition**, v. 96, n. 5, p. 902–905, 2006.

16. SHAHIDI, F.; PEGG, R.B. Absence of Volatile N-Nitrosamines in Cooked Nitrite-free Cured Muscle Foods. **Meat Sci.**, v. 37, p. 327–336, 1994.

17. SUCKOW, M.A.; WHEELER, J.; YAN, M. PAIII prostate tumors express prostate specific antigen (PSA) in Lobund-Wistar rats. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 1, p. 39–41, 2009.

18. WANG, M.C.; VALENZUELA, L.A.; MURPHY, G.P.; CHU, T.M. Purification of human prostate specific antigen. **Invest. Urol.**, v. 17, p. 159-163, 1979.

19. YUAN, Y.; ZHANG, T.; ZHUANG, H.; WANG, K.; ZHENG, Y.; ZHANG, H.; ZHOU, B.; LIU, J. Survey of nitrite content in foods from north-east China. **Food Additives and Contaminants: Part B**, v. 3, n. 1, p. 39–44, 2010.