

# AValiação DO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA EM RATOS WISTAR ALIMENTANDO COM DIETA HIPERLIPÍDICA DURANTE A ADOLESCÊNCIA

*Maria Victória Lima Waquim<sup>1</sup>, Beatriz Guerreiro Otoboni<sup>2</sup>, Rodrigo Vargas<sup>3</sup>*

<sup>1,2</sup>Acadêmicas do Curso de Medicina, Campus Maringá/PR, Universidade Cesumar – UNICESUMAR.

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC<sup>MED</sup>/ICETI-UniCesumar. ra-19127149-2@alunos.unicesumar.edu.br, ra-19128127-2@alunos.unicesumar.edu.br

<sup>3</sup>Orientador, Mestre, Departamento de Medicina, UNICESUMAR. Pesquisador do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação - ICETI. rodrigo.vargas@docentes.unicesumar.edu.br

## RESUMO

O trabalho tem como objetivo a avaliação dos efeitos da ingestão da dieta hiperlipídica na adolescência sobre o desenvolvimento da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) na vida adulta de ratos Wistar machos. Portanto, serão utilizados 30 ratos Wistar machos com 25 dias que serão divididos em dois grupos experimentais: NP, animais que receberão dieta controle (Nuvital®, Curitiba, Brasil) durante toda a vida e HF, animais que receberão dieta hiperlipídica (35% de gordura, Tabela 1) dos 30 aos 60 dias de vida (adolescência). Dos 60 aos 90 dias os animais do grupo HF receberão dieta controle. Os animais terão acesso à água e a ração à vontade durante todos os estágios do protocolo e serão mantidos em sala ambientada com fotoperíodo (07h00min – 19h00min) e temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) controlados. Após isso, serão utilizados: parâmetros biométricos; teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT); teste de tolerância à glicose intravenoso (ivGTT); dosagem de glicose e insulina; perfil lipídico; extração lipídica do fígado, na qual aproximadamente 500 mg do fígado de cada animal serão removidos e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior extração lipídica cuja quantidade de gordura extraída será determinada gravimetricamente. Por fim, verificar a evolução histológica do fígado com base em um escore para DHGNA e EHNA. Para isso, será utilizado o software para as análises estatísticas: o GraphPad Prism versão 6.00 para Windows (GraphPad Software®), no qual os resultados serão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

**PALAVRAS-CHAVE:** Alimentação; DHGNA; Programação Metabólica.

## 1 INTRODUÇÃO

Como uma das principais causas de disfunções hepáticas a Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) pode ser definida como uma doença crônica, caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura no tecido hepático, maior que 5% nos hepatócitos, na abstenção do consumo de álcool. Esse quadro pode evoluir com inflamação hepática e fibrose. Dessa forma, encontramos clinicamente a manifestação de DHGNA de forma sistêmica, associada a fatores de risco para disfunção metabólica, como resistência à insulina, dislipidemias, doenças cardiovasculares e obesidade (TEMPLE, 2016), com diagnóstico clínico conciso.

O diagnóstico é feito por: exclusão de doenças hepáticas causadas pelo alcoolismo, hepatites B e C, doenças autoimunes, uso abusivo de fármacos, presença de doenças metabólicas, como a doença de Wilson; presença, no exame clínico, de fadiga de forma silenciosa, hepatomegalia, hipertensão arterial sistêmica, obesidade observada pela alteração da antropometria e a circunferência abdominal, e, no exame laboratorial pelos altos níveis de ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase) e GGT típico (Gama Glutamil-Transferase) (SANYAL, 2015; CUZMAR, 2020).

Estudos recentes demonstraram que o desenvolvimento biológico ocorre como uma interação entre o ser humano e o ambiente em que vive. Nesse sentido, caso haja modificações na nutrição, temperatura ou estresse, as características biológicas poderão sofrer alterações, determinando o surgimento de fenótipos específicos a partir da adaptação sofrida, evento esse chamado de programação metabólica (MOURA et al., 2007).

Em períodos específicos do desenvolvimento, mais precisamente entre o período de pré-concepção até a adolescência, o organismo do indivíduo está em processo de desenvolvimento, principalmente do sistema nervoso e hormonal, além do amadurecimento

de alguns órgãos, como o fígado (MOURA et al., 2007). Nesse intervalo de tempo, chamado de janela metabólica, estímulos externos podem influenciar o curso desse desenvolvimento. Ademais, a presença excessiva ou ausência de nutrientes em períodos críticos desta janela metabólica, podem alterar, de forma permanente, o funcionamento e o metabolismo dos órgãos envolvidos, acarretando na predisposição ao desenvolvimento de comorbidades na vida adulta (VILLARES, 2016).

Diante desse panorama, ressalta-se que a dieta hiperlipídica possui alto teor calórico e é comprovadamente um dos fatores que induzem a obesidade, resistência à insulina e diabetes (FRANCO, 2007), fatores de risco para o desenvolvimento da DHGNA. Atualmente a dieta hiperlipídica é muito utilizada em modelos laboratoriais pela semelhança ao estilo de vida moderno, o qual é marcado pela escassez de tempo para o consumo dos alimentos saudáveis, dando destaque para a ingestão de comida do tipo fast food, ricas em lipídios (FRANÇA, 2012). Os adolescentes são os maiores consumidores destas refeições rápidas, sendo alvos importantes para o desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de lipídios (MAIA et al., 2018).

Nessa perspectiva, o período da adolescência é uma importante janela metabólica onde estímulos externos podem influenciar diretamente no desenvolvimento orgânico sendo, portanto, alvos de estudos extremamente relevantes. Assim, hipotetizamos que a oferta de dietas hiperlipídicas durante a adolescência pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica durante a vida adulta.

## 2 MATERIAIS E MÉTODO

Esta pesquisa contempla novas técnicas experimentais as quais serão desenvolvidas a partir de coletas de amostras biológicas conforme propostas no projeto de doutorado do orientador desta pesquisa, desenvolvido de acordo com as normas do Comitê de Ética para Uso e Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá, aprovado sobre número 3723280918.

### 2.1 ANIMAIS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Ratos Wistar machos (n=30) de 25 dias serão obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá e serão alojados no Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Celular da Secreção (LBCS) na Universidade Estadual de Maringá. Após um período de adaptação de 5 dias, os animais serão divididos em dois grupos experimentais: NP, animais que receberão dieta controle (Nuvtal®, Curitiba, Brasil) durante toda a vida e HF, animais que receberão dieta hiperlipídica (35% de gordura, Tabela 1) dos 30 aos 60 dias de vida (adolescência). Dos 60 aos 90 dias os animais do grupo HF receberão dieta controle.

Os animais terão acesso à água e a ração à vontade durante todos os estágios do protocolo e serão mantidos em sala ambientada com fotoperíodo (07h00min – 19h00min) e temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) controlados.

### 2.2 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS

Durante todo o período experimental será registrado semanalmente a evolução ponderal e o consumo alimentar dos animais. Após todos os procedimentos experimentais, os ratos serão eutanasiados por overdose anestésica (Tiopental 120mg/kg de massa corpórea, via intraperitoneal) para retirada dos principais estoques de gordura corporal: retroperitoneal, periepídidimal e mesentérica e do fígado. O peso das gorduras e do fígado será expresso em relação ao peso corporal do animal (g/100g de peso corporal).

### 2.3 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA INTRAPERITONEAL (ipITT)

Aos 90 dias, após jejum de 6 horas, os animais de todos os grupos receberão uma injeção intraperitoneal de insulina (1U/kg PC). Amostras de sangue (75 uL) serão obtidas via caudal antes da injeção (tempo 0') e 15, 30, 45 e 60 minutos após a administração de insulina, por meio de tubo capilar (75mm de comprimento, 1,5 mm de diâmetro externo) heparinizado. Os níveis de glicose sanguínea durante o teste serão avaliados pelo método enzimático-colorimétrico (GoldAnalisa®; Belo Horizonte, Brasil).

### 2.4 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE INTRAVENOSO (ivGTT)

Após 48 horas da realização do ipITT, os animais serão anestesiados (Cetamina-Xilazina; 75mg + 15mg/kg de peso corporal). Em seguida, serão submetidos a uma cirurgia para implante de uma cânula de silicone na veia jugular externa direita. Por meio de uma incisão na região cervical anterior, ocorrerá a dissecação dos tecidos até a visualização da veia. Em seguida, uma cânula de silicone será inserida dentro da veia e fixada ao músculo peitoral maior através de uma sutura simples. A cânula será preenchida com solução de heparina a 10% (Liquemine®) diluída em salina (0,9% de NaCl) para evitar a entrada de sangue e a consequente formação de coágulos no seu interior. O ivGTT será realizado 24 horas depois da cirurgia e com os ratos submetidos a jejum de 12 horas.

No momento da realização do teste, amostras sanguíneas (400 µL) serão retiradas (tempo 0') antes da aplicação de uma carga de glicose intravenosa (1g/kg de peso corporal) para avaliação dos níveis basais de glicose e insulina. Após a administração de glicose, amostras sanguíneas serão retiradas nos tempos 5', 15', 30' e 45' para posterior dosagem de glicose e insulina. Após cada retirada de sangue, será aplicado salina 0.9% no mesmo volume. As amostras de sangue serão centrifugadas a 13.000 RPM/5min. O plasma será recolhido e armazenado a -20 °C para dosagens posteriores.

### 2.5 DOSAGEM DE GLICOSE E INSULINA

A dosagem de glicose do plasma será realizada através do método da glicose oxidase por espectrofotometria (Analisador bioquímico semiautomático, BIO 200FL, Bio Plus®, São Paulo/SP, Brasil), utilizando kit comercial (GoldAnalisa®; Belo Horizonte, Brasil). Os níveis plasmáticos de insulina serão determinados pela técnica do radioimunoensaio (RIA) através de um contador de emissão de partículas gama (Wizard2 Automatic Gamma Counter, TM-2470, PerkinElmer®, Shelton/CT, USA), sendo utilizado como padrão insulina de rato, anticorpo anti-insulina de rato (Sigma-Aldrich®, St Louis/MO, USA) e insulina humana recombinante marcada com 125I (PerkinElmer®, Shelton/CT, USA).

### 2.6 PERFIL LIPÍDICO

O plasma obtido no tempo 0' do ivGTT será utilizado também para dosagem de colesterol total, triglicerídeos e HDL-C por meio de kit comercial para testes laboratoriais Linha BIOLiquid®15. Os valores de colesterol LDL e VLDL serão calculados por meio do cálculo de Friedewald:

$$\text{LDL (mg/dL)} = \text{Colesterol total} - (\text{Triglicerídeos} / 5) - \text{HDL}$$

$$\text{VLDL (mg/dL)} = \text{Triglicerídeos} / 5.$$

## 2.7 EXTRAÇÃO LIPÍDICA DO FÍGADO

Aproximadamente 500 mg do fígado de cada animal serão removidos e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior extração lipídica. O tecido será descongelado e macerado com Politrón. Em seguida, será adicionado 20x o peso do tecido de solução clorofórmio/metanol (solução de Folch) na proporção de 2:1. Os tubos serão deixados em repouso overnight à temperatura ambiente, para extração dos lipídeos. No dia seguinte, o extrato será filtrado em papel filtro em frascos previamente pesados os quais serão secados sob uma atmosfera de  $\text{N}_2$ . A quantidade de gordura extraída será determinada gravimetricamente (FOLCH; LEES; SLOANE-STANLEY, 1957). Após, será adicionado 250  $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico, homogeneizado e guardado para posterior dosagem de TG e COL hepáticos.

## 2.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Aproximadamente 500 mg do fígado serão coletados e fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas. Após fixação, o tecido será lavado, em água corrente, por 24 horas e desidratado em concentrações ascendentes de álcool, diafanizado em xilol e em seguida, embebido em parafina histológica. Então, serão realizados cortes de 5  $\mu\text{m}$  e os mesmos serão corados pela técnica convencional de Hematoxilina e Eosina para verificar a evolução histológica do fígado com base em um escore para DHGNA e EHNA (KLEINER et al., 2003).

## 2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados serão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Para avaliação estatística entre os grupos será utilizado o teste T de Student, seguido do pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado será de  $p < 0,05$ . O software utilizado para as análises estatísticas será o GraphPad Prism versão 6.00 para Windows (GraphPad Software©).

## 3 RESULTADOS ESPERADOS

Esta pesquisa tem por objetivo contribuir para a ampliação do conhecimento deste assunto no meio científico, analisando as possíveis causas das modificações metabólicas, relacionadas a programação metabólica na adolescência, que podem tornar o adulto suscetível ao desenvolvimento da DHGNA. Outrossim, a partir das conclusões obtidas, outros estudos relacionados poderão ser desenvolvidos, amplificando ainda mais o conhecimento da programação metabólica na adolescência, assunto ainda pouco explorado.

## REFERÊNCIAS

TEMPLE, Jonathan; CORDERO, Paul; LI, Jiawei; NGUYEN, VI; OBEN, Jude. **A Guide to Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Childhood and Adolescence**. International Journal Of Molecular Sciences, [S.L.], v. 17, n. 6, p. 947, 15 jun. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17060947>.

CUZMAR, Valeria; ALBERTI, Gigliola; UAUY, Ricardo. **Early Obesity: risk factor for fatty liver disease**. Journal Of Pediatric Gastroenterology & Nutrition, [S.L.], v. 70, n. 1, p. 93-98, jan. 2020. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/mpg.0000000000002523>.

SANYAL, D.; MUKHERJEE, P.; RAYCHAUDHURI, M. **Profile of liver enzymes in non-alcoholic fatty liver disease in patients with impaired glucose tolerance and newly detected untreated type 2 diabetes.** Indian Journal Of Endocrinology And Metabolism, [S.L.], v. 19, n. 5, p. 597-9, 2015. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/2230-8210.163172>.

MOURA, A.S. **Janelas críticas para programação metabólica e epigênese transgeracional.** In: KAC, G., SICHIERI, R., and GIGANTE, DP., orgs. Epidemiologia nutricional [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ/Atheneu, 2007, pp. 543-551. ISBN 978-85-7541-320-3. Available from SciELO Books .

FRANCO, Larissa Dantas Pereira. **Dieta hiperlipídica e exercício físico: consequências sobre o metabolismo e a peroxidação lipídica- estudo modelo animal.** Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2007.

FRANÇA, F.C.O.; MENDES, A.C.R.; ANDRADE, I.S.; RIBEIRO, G.S.; PINHEIRO, I.B. **Mudanças dos hábitos alimentares provocados pela industrialização e o impacto sobre a saúde do brasileiro.** I Seminário Alimentação e Cultura na Bahia. Feira de Santana, 2012.

MAIA, Emanuella Gomes et al. **Padrões alimentares, características sociodemográficas e comportamentais entre adolescentes brasileiros.** Rev. bras. epidemiol., São Paulo, v. 21, supl. 1, e180009, 2018.

VILLARES, José Manuel Moreno. **Los mil primeros días de vida y la prevención de la enfermedad en el adulto.** Nutr Hosp 2016;33(Supl. 4):8-11  
DOI:<http://dx.doi.org/10.20960/nh.337>