



## EFEITOS HEPÁTICOS EM RATOS WISTAR ADULTOS ALIMENTADOS COM UMA DIETA HIPERLIPÍDICA DURANTE A ADOLESCÊNCIA

Lucas Paulo Jacinto Saavedra<sup>1</sup>, Rodrigo Mello Gomes<sup>2</sup>, Tayná Caroline Marques<sup>3</sup>, Caroline Ribeiro Alves do Nascimento<sup>4</sup>, Paulo Cezar de Freitas Mathias<sup>5</sup>, Valéria Ferreira Garcez<sup>6</sup>

**RESUMO:** Estudos têm demonstrado que insultos nutricionais em fases cruciais da vida, como a gestação e/ou lactação, são importantes preditores do desenvolvimento da síndrome metabólica durante a vida adulta. Estes dados estão de acordo com o conceito DOHaD, o qual propõe que insultos nutricionais durante o período gestacional acarretam em mudanças permanentes no metabolismo na vida adulta. Tem sido mostrado que ratos alimentados com dieta hiperlipídica durante a infância e adolescência apresentam, aumento da glicemia e insulinemia de jejum, resistência à insulina, bem como aumento do peso corporal e depósitos de gordura. Dessa forma, o objetivo desta pesquisa é avaliar a influência de uma dieta hiperlipídica durante a adolescência sobre as alterações metabólicas na idade adulta, bem como investigar o possível surgimento de alterações morfofuncionais, endócrinas e metabólicas que comprometam o fígado e o metabolismo lipídico. Ratos Wistar machos serão divididos em dois grupos experimentais: controle (CO) alimentados com dieta normolipídica, e grupo tratado com uma dieta hiperlipídica (HFD). O protocolo experimental consiste no tratamento com as respectivas dietas dos 30 aos 60 dias de idade. Depois deste período até os 120 dias de idade ambos os grupos receberão a dieta padrão. Durante todo o período experimental os animais receberão ração e água *ad libitum*. O peso corporal e a ingestão alimentar serão acompanhados semanalmente durante todo período. Amostras de sangue e tecidos serão coletadas para análises. Os resultados serão expressos como a média  $\pm$  o erro padrão da média (EPM). Para a comparação das diferenças entre os grupos experimentais será utilizado o teste t de Student não pareado. O nível de significância será fixado em  $p < 0,05$ . Esperamos obter resultados que sustentem nossa hipótese de que a adolescência é um período de programação metabólica. Dessa forma, espera-se constatar no grupo HFD o desenvolvimento de obesidade, resistência à insulina, dislipidemia, esteatose hepática.

**PALAVRAS-CHAVE:** Dieta hiperlipídica, Obesidade, Diabetes, Síndrome Metabólica, esteatose hepática, Ratos Wistar

### 1 INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica pode ser compreendida como um conjunto interligado de desordens tanto fisiológicas, quanto bioquímicas e metabólicas que possui como comorbidades desordens como o diabetes mellitus tipo 2, obesidade, dislipidemia e hipertensão. Segundo Kaur (2014), a prevalência desta síndrome pode chegar a até 85% dependendo da região, ambiente, sexo, idade e etnia da população estudada. Os fatores causadores da síndrome metabólica e suas comorbidades ainda estão a ser esclarecidos, dentre os já conhecidos e estabelecidos temos as drásticas alterações no estilo de vida do mundo moderno que levam ao estresse, sedentarismo e mudanças no hábito alimentar (BUIJS; FELIX, 2006). No entanto a perspectiva de que estas doenças são resultados apenas de fatores como mudanças no estilo de vida e predisposição genética não oferece bases sólidas para a prevenção destas comorbidades.

Estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que insultos nutricionais em fases cruciais da vida, como a gestação e/ou lactação, são importantes preditores do desenvolvimento da síndrome metabólica durante a vida adulta (DE MOURA; PASSOS, 2005; LOPEZ-JARAMILLO; LAHERA; LOPEZ-LOPEZ, 2011). Estes dados contribuem para a consolidação do conceito DOHaD, cunhado por Barker e colaboradores, o qual propõe como hipótese que insultos sobretudo nutricionais durante o período gestacional acarretam em mudanças permanentes na estrutura corporal, função e metabolismo, aumentando assim o risco de mortalidade cardiovascular na vida adulta (BARKER, 1990). Achados recentes demonstram que ratos expostos a uma dieta rica em gordura durante a infância e adolescência apresentam, na vida adulta, um aumento da glicemia e insulinemia de jejum, resistência a insulina, elevada secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, bem como aumento do peso corporal e depósitos de gordura, os quais parecem depender de um aumento na atividade do sistema nervoso parassimpático (BARELLA et al., 2012; GOMES et al., 2013).

<sup>1</sup>Acadêmico do Curso de Nutrição do UNICESUMAR, Maringá-PR. Bolsista PROBIC. saavedralpj@gmail.com

<sup>2</sup>Docente do Departamento de Ciências Fisiológicas da UEM, Maringá-PR. rodrigomello@gmail.com

<sup>3</sup>Acadêmica do Curso de Nutrição do UNICESUMAR, Maringá-PR. taynamarques.nutri@gmail.com

<sup>4</sup>Acadêmica do Curso de Biotecnologia da UEM, Maringá-PR. carol\_arn@hotmail.com

<sup>5</sup>Laboratório de Biologia Celular da Secreção/DBC – UEM, Maringá-PR. pcfmathias@gmail.com

<sup>6</sup>Orientadora e Docente do Curso de Ciências Biológicas do UNICESUMAR, Maringá-PR. valeria.garcez@gmail.com



Sendo assim, o objetivo do presente estudo é avaliar a influência de uma dieta hiperlipídica durante a adolescência sobre as alterações metabólicas na idade adulta, bem como investigar o possível surgimento de alterações morfofuncionais, endócrinas e metabólicas que comprometam o fígado e o metabolismo lipídico.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

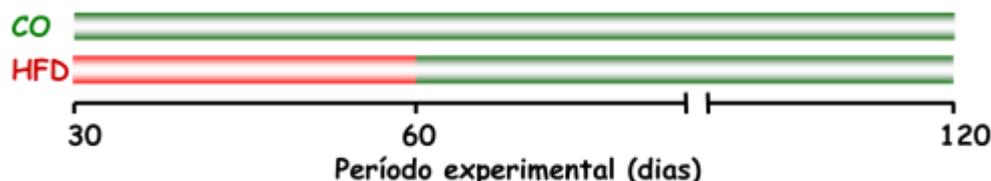
As condutas laboratoriais na manutenção e eutanásia dos animais serão realizadas de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), e aprovadas pelo Comitê de Conduta Ética no uso de Animais em Experimentação do UniCesumar.

### 2.1 ANIMAIS E DIETA

Ratos machos da linhagem Wistar com 25 dias de idade provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá serão acomodados no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Biologia celular. Após 5 dias de adaptação os animais serão divididos em dois grupos experimentais: grupo controle (CO) alimentados com ração normolipídica (4,3 kcal / g), e grupo tratado com uma dieta hiperlipídica (5,9 kcal / g) contendo 35% de gordura de porco (HFD). A composição das duas dietas está listada na Tabela 1. O protocolo experimental consiste no tratamento com as respectivas dietas dos 30 aos 60 dias de idade, depois deste período até os 120 dias de idade ambos os grupos receberão a dieta padrão (Figura 1). Durante todo o período experimental os animais receberão ração e água *ad libitum*, e serão acomodados em caixas de polipropileno (45 cm /30 cm /15 cm) sendo mantidos 3 animais por caixa, em condições controladas de luminosidade [12h claro-escuro (06:00-18:00 h)] e temperatura (22,0±2 °C). O peso corporal e a ingestão alimentar serão acompanhados semanalmente durante todo período.

**Tabela 1:** Componentes das dietas normolipídica e hiperlipídica

Ingredientes (g/kg da dieta)	Dieta normo-lipídica	Dieta hiper-lipídica
Caseína	200	200
Sucrose	100	100
Amido de milho	427.5	115.5
Amido destrinado	132	132
Gordura de porco	-	312
Óleo de Soja	40	40
Cellulose50 50	50	50
Mistura mineral (AIN-93)	35	35
Mistura de vitaminas (AIN-93)	10	10
L -cistina	3	3
Colina bitartarato	2.5	2.5



**Figura 1:** Protocolo experimental

### 2.2 AVALIAÇÃO DA OBESIDADE E COLETA DE AMOSTRAS

Com 120 dias de idade e após jejum de 12 horas, uma parte dos animais serão pesados e anestesiados por meio de aplicação intraperitoneal (i.p.) de Tiopental sódico (45mg/kg/peso corporal). Em seguida será realizada laparotomia mediana para coleta de amostras sanguíneas através da veia cava inferior e com seringas descartáveis previamente heparinizadas. A eutanásia ocorrerá por choque hipovolêmico. As amostras de sangue serão depositadas em tubos de ensaio armazenados em gelo para posterior centrifugação e coleta do plasma



(3000 rpm ou 120 g por 15 min), o plasma será armazenado a  $-20^{\circ}$  C para posterior análises. Posteriormente, serão retirados e pesados os seguintes tecidos: gorduras periepídídima (EPI), retroperitônio (RP), inguinal (ING) e mesentérica (MES) e fígado.

### 2.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E HORMONAIS DO SANGUE DA PROLE

As amostras de plasma será usado para dosagem de colesterol total, colesterol HDL; os colesterol LDL e VLDL serão calculados de acordo com as equações de Friedwald:  $VLDL = \text{triglicérides} / 5$  e  $LDL = CT - (HDL + VLDL)$  (FRIEDELWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972).

A insulinemia plasmática será quantificada por radioimunoensaio em contador gama (Wizard<sup>2</sup> Automatic Gamma Counter, TM-2470, PerkinElmer<sup>®</sup>, Shelton, CT, USA). Sendo utilizado como padrão insulina humana, anticorpo anti-insulina de rato (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA) e insulina recombinante humana marcada com iodo<sup>125</sup> (PerkinElmer<sup>®</sup>, Shelton, CT, USA). O limite de detecção será de 0,006 ng/m (MIRANDA et al., 2014). A resistência á insulina será avaliada pelo método indireto de avaliação da homeostase glicêmica ou índice HOMA, para isto utilizaremos a seguinte fórmula:  $HOMA = \text{insulina (ng/mL)} \times \text{glicose (mg/dL)} / 22,5$  (PACINI; MARI, 2003).

### 2.4 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (IPITT)

Outros animais dos grupos CO (n=10) e HFD (n=10), com 120 dias de idade, serão submetidos ao teste de tolerância a insulina (2 U/kg de peso corporal, i.p.; 2 mL/kg de peso corporal) com insulina recombinante humana (Eli Lilly<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil), 2% v/v (2mL/100mL), diluída em solução fisiológica (salina 10%). Amostras de sangue serão coletadas através de um pequeno corte na ponta da cauda e a glicemia mensurada usando um glicômetro (ACCU-CHEK<sup>®</sup> Advantage, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), nos tempos 0 minuto (basal); 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos depois da injeção de insulina. Posteriormente, a constante da taxa de decaimento da glicose sanguínea ( $k_{itt}$ ) será calculada usando a fórmula  $0,693 / (t_{1/2})$ . O  $t_{1/2}$  da glicemia será calculado a partir da análise do ângulo da inclinação da reta das concentrações de glicose no plasma durante a fase linear de declínio da glicemia (CALEGARI et al., 2011).

### 2.5 Teste De Tolerância Ao Piruvato (Ipttp)

Outro grupo de animais (CO; n=10 e HFD; n=10), com 120 dias de idade, serão submetidos a um jejum prévio de 16 horas e posteriormente ao iptTP, que consiste na injeção intraperitônio de uma solução de piruvato 2g/kg de peso corporal (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA), diluída 25% (1g/2mL, 4mL/kg de peso corporal) em solução fisiológica (salina 10%). Amostras de sangue serão coletadas nos tempos 0 min (antes da injeção de piruvato), 15, 30, 60, 90 e 120 min após a injeção. As amostras de sangue serão coletadas através de um pequeno corte na ponta da cauda e a glicemia mensurada usando um glicômetro (ACCU-CHEK<sup>®</sup> Advantage, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) (MILANSKI et al., 2012).

### 2.6 AVALIAÇÃO HISTOQUÍMICA DE INCLUSÕES LIPÍDICAS NO FÍGADO

Amostras de fígado de ratos com 120 dias de idade (n=6) por grupo, serão fixadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer  $-80^{\circ}$  C. Posteriormente, estas amostras serão embebidas em OCT (Optimum coting temperature, Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), cortadas com 10  $\mu$ m de espessura em criostato (Leica<sup>®</sup> CM1850, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) e coradas com Sudam III (*Oil Red*). O percentual de inclusões lipídicas será determinado pela razão entre a área total das imagens e a área marcada com Sudam III  $\times 100$  (% de inclusões = área total / área marcada  $\times 100$ ). As medidas serão feitas em 40 imagens /animal/grupo. As imagens serão obtidas no formato TIFF (24-bit colour, 2048  $\times$  1536 pixels) em microscópio óptico Olympus BX41 (Olympus, Tokyo, Japan) com objetiva de 40X, acoplado a uma câmera QColor 3 Olympus e as análises realizadas com o software *Image Pro Plus*<sup>®</sup> versão 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

As análises estatísticas dos dados e a construção dos gráficos serão realizadas com o software *GraphPad Prism*<sup>®</sup> versão 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Os resultados serão expressos como a média  $\pm$  o erro padrão da média (EPM). Para a comparação das diferenças entre os grupos experimentais será utilizado o teste *t* de Student não pareado. O nível de significância será fixado em  $p < 0,05$ .

## 3 RESULTADOS ESPERADOS

Esperamos com esta pesquisa obter resultados que sustentem nossa hipótese de que a adolescência é um período que também pode ser considerado uma janela de programação assim como os períodos de gestação e lactação. Dessa forma, espera-se constatar nos grupo HFD o desenvolvimento de obesidade, resistência á insulina, dislipidemia, esteatose hepática.



## REFERÊNCIAS

BARELLA, L. F. et al. Early exposure to a high-fat diet has more drastic consequences on metabolism compared with exposure during adulthood in rats. *Horm Metab Res*, v. 44, n. 6, p. 458-64, Jun 2012.

BARKER, D. J. The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ*, v. 301, n. 6761, p. 1111, Nov 17 1990.

BUIJS, R. M.; FELIX, K. The Metabolic Syndrome: A Brain Disease? *Neuroendocrinology Briefings*, 26, p. 715-716, 2006.

CALEGARI, V. C. et al. Endurance training activates AMP-activated protein kinase, increases expression of uncoupling protein 2 and reduces insulin secretion from rat pancreatic islets. *The Journal of endocrinology*, v. 208, n. 3, p. 257-64, Mar 2011.

DE MOURA, E. G.; PASSOS, M. C. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep*, v. 25, n. 3-4, p. 251-69, Jun-Aug 2005.

GOMES, R. M. et al. Moderate exercise restores pancreatic Beta-cell function and autonomic nervous system activity in obese rats induced by high-fat diet. *Cell Physiol Biochem*, v. 32, n. 2, p. 310-21, 2013.

KAUR, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract*, v. 2014, p. 943162, 2014.

LOPEZ-JARAMILLO, P.; LAHERA, V.; LOPEZ-LOPEZ, J. Epidemic of cardiometabolic diseases: a Latin American point of view. *Ther Adv Cardiovasc Dis*, v. 5, n. 2, p. 119-31, Apr 2011.

PACINI, G.; MARI, A. Methods for clinical assessment of insulin sensitivity and beta-cell function. Best practice & research. *Clinical endocrinology & metabolism*, v. 17, n. 3, p. 305-22, Sep 2003.