



MORFOLOGIA DO PÂNCREAS ENDÓCRINO DE RATOS WISTAR ADULTOS ALIMENTADOS COM UMA DIETA HIPERLIPÍDICA DURANTE A ADOLESCÊNCIA

Tayná Caroline Marques¹, Rodrigo Mello Gomes², Lucas Paulo Jacinto Saavedra³, Caroline Ribeiro Alves do Nascimento⁴, Paulo Cezar de Freitas Mathias⁵, Valéria Ferreira Garcez⁶

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 nos grupos HFD o desenvolvimento de obesidade, resistência à insulina e hipertrofia de ilhotas pancreáticas.

PALAVRAS-CHAVE: Dieta hiperlipídica, Obesidade, Diabetes, Síndrome Metabólica, ilhotas pancreáticas, Ratos Wistar

1 INTRODUÇÃO

É crescente a observação de que alterações perinatais, tais como sub ou supernutrição, têm consequências de curto e longo prazo no crescimento e metabolismo da prole, como indicam inúmeros dados epidemiológicos e experimentais. Com base nessas observações, podemos dizer que doenças metabólicas tais como o diabetes tipo 2, obesidade e hipertensão podem ser “programadas” durante estágios críticos de desenvolvimento, como gestação e lactação. Entretanto, os mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos na programação perinatal de doenças crônicas na vida adulta permanecem em grande parte ainda para serem descobertos e explicados.

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).

Essa programação do organismo está associada a alterações no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) (VAN DEN BERGH, 2011) e vem sendo ampliada após o período gestacional até outros momentos críticos do desenvolvimento como na adolescência (DE OLIVEIRA et al., 2013; WIDEN et al., 2012), uma vez que nesta fase o SNC ainda encontra-se em desenvolvimento (BLAKEMORE; CHOUDHURY, 2006; GODDINGS et al., 2013). 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 à insulina,

¹Acadêmica do Curso de Nutrição do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR. Maringá/PR. Bolsista PROBIC-UniCesumar. taynamarques.nutri@gmail.com

²Docente do Departamento de Ciências Fisiológicas – UEM. Maringá/PR. rodrigomello@gmail.com

³Acadêmico do Curso de Nutrição – UNICESUMAR. Maringá/PR. saavedralpj@gmail.com

⁴Acadêmica do Curso de Biotecnologia – UEM. Maringá/PR. Carol_arn@hotmail.com

⁵Laboratório de Biologia Celular da Secreção/DBC – UEM. Maringá/PR. pcfmathias@gmail.com

⁶Docente do Departamento de Ciências Biológicas – UNICESUMAR. Maringá/PR. Valeria.garcez@gmail.com



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).

De acordo com o exposto 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

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° C para posterior análises. Posteriormente, serão retirados e pesados os seguintes tecidos: gorduras periepídimal (EPI), retroperitoneal (RP), inguinal (ING) e mesentérica (MES) e fígado.



2.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E HORMONAIS DO SANGUE DA PROLE

As amostras de plasma serão usadas para quantificar a insulinemia plasmática por radioimunoensaio em contador gama (Wizard² Automatic Gamma Counter, TM-2470, PerkinElmer[®], Shelton, CT, USA). Sendo utilizado como padrão insulina humana, anticorpo anti-insulina de rato (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA) e insulina recombinante humana marcada com Iodo¹²⁵ (PerkinElmer[®], Shelton, CT, USA). O limite de detecção será de 0,006 ng/m (MIRANDA et al., 2014). A resistência à 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[®], 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[®] 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 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO PÂNCREAS ENDÓCRINO

Amostras de pâncreas de ratos com 120 dias de idade (n=6/grupo), serão fixadas em formol 10% desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina histológica (BIOTEC[®] Pinhais, Paraná, Brazil), os materiais serão seccionados em micrótomo LEICA RM2245 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) em cortes seriados de 5 μm de espessura. Posteriormente o material será desparafinado, reidratado e submetido ao bloqueio da enzima peroxidase endógena, com uma solução de 3% de H_2O_2 diluído em metanol 100% (3 mL / 97 mL; v/v). Em seguida os cortes serão lavados em tampão fosfato 0,01 M (PBS, pH 7,4) e incubados com solução de bloqueio contendo soro de cabra não imune 10% (Histostain-Plus[®], Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 10 min. Após o bloqueio os cortes serão incubados com o anticorpo primário anti-insulina (1:500) monoclonal produzido em camundongo (Sigma[®], St. Louis, MO, USA), por 1 h em temperatura ambiente.

Em seguida, serão realizadas 2 lavagens de 5 min em PBS e os cortes sendo incubados por 10 min com o anticorpo secundário biotilado (Histostain-Plus[®], Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), lavados por 5 min (2X) e incubados com o conjugado enzimático streptavidina-peroxidase por 10 min (Histostain-Plus[®], Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), lavados por 5 min (2X) e incubados com a solução cromógena de diaminobenzidina (DAB) por 15 min (Histostain-Plus[®], Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), lavados por 1 min (3X) e contra corados com hematoxilina por 15 seg.

Posteriormente será quantificado o número de ilhotas pancreáticas por área de pâncreas (n° de ilhotas/ cm^2), de cortes de pâncreas imunomarcados por insulina, de 2 cortes/animal de 6 animais/grupo. Será mensurada a área seccional de 40 ilhotas/animal/grupo. As imagens serão obtidas no formato TIFF (24-bit colour, 2560 x 1920 pixels) em microscópio óptico Olympus BX41 (Olympus, Tokyo, Japan) com objetiva de 4 e 40X, respectivamente, acoplado a uma câmera QColor 3 Olympus e as análises realizadas com o software *Image Pro Plus*[®] versão 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

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 grupos HFD o desenvolvimento de obesidade, resistência à insulina, aumento no número de células beta e ilhotas pancreáticas e hipertrofia das ilhotas das mesmas.

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.

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

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.

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.

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.

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.

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.