



## 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>, Valéria Ferreira Garcez<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO

<sup>3</sup> Orientadora, Doutora, Docente do Curso de Medicina, UNICESUMAR

### RESUMO

Estudos demonstram que insultos nutricionais e/ou hormonais em fases específicas chamadas de janelas de programação, como a gestação, lactação, e adolescência, são importantes para o desenvolvimento da síndrome metabólica durante a vida adulta. Desta forma o presente estudo buscou avaliar a influência de uma dieta hiperlipídica durante a adolescência sobre alterações metabólicas na idade adulta, bem como investigar o possível surgimento de alterações morfofuncionais que comprometam a fisiologia hepática. Ratos Wistar machos foram divididos em dois grupos: controle (CO), alimentados com dieta normolipídica, e grupo tratado com uma dieta hiperlipídica (HFD). Os animais do grupo HFD receberam a dieta hiperlipídica dos 30 aos 60 dias de idade, depois deste período e até os 120 dias de idade receberam uma dieta padrão e água *ad libitum*. Os animais HFD apresentaram sobrepeso (+10%,  $p < 0,05$ ) e hiperfagia (+12%,  $p < 0,05$ ). A adiposidade dos animais HFD aumentou significativamente, sendo inguinal (+75%,  $p < 0,05$ ), retroperitoneal (+40%,  $p < 0,05$ ) e periepididimal (+27%,  $p < 0,05$ ). O fígado de animais do grupo HFD apresentou aumento do peso absoluto (+15%,  $p < 0,05$ ). Análises morfométricas indicam o aumento de 10 vezes ( $p < 0,0001$ ) no percentual de inclusões lipídicas no fígado, caracterizando esteatose hepática. Conclui-se que a dieta HFD durante a adolescência promove alterações no metabolismo lipídico, associado com a esteatose hepática.

**PALAVRAS-CHAVE:** Dieta rica em gordura; Obesidade; Diabetes; Síndrome metabólica, Doença do fígado gorduroso não alcoólica; Ratos Wistar.

## 1 INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (SM) consiste em um conjunto interligado de desordens tanto fisiológicas quanto bioquímicas. Dentre estas, destacam-se a dislipidemia aterogênica, aumento da pressão sanguínea, disfunção do metabolismo glicídico, estado pró-trombótico e pró-inflamatório (GRUNDY, 2015). Estas disfunções por sua vez, estão associadas a condições fisiopatológicas como o diabetes mellitus tipo 2, doença cardíaca coronariana, esteatose hepática não alcoólica, obesidade central, síndrome do ovário policístico e hipertensão arterial (HAN; LEAN, 2015). Segundo Kaur (2014), a prevalência da SM pode chegar a até 85% da população estudada, dependendo da região, ambiente, sexo, idade e etnia. Dentre estas mudanças cabe-se ressaltar as alterações dos hábitos alimentares e o aumento da disponibilidade e predominância de alimentos com alta densidade energética como lipídeos e carboidratos simples (ARMITAGE; POSTON; TAYLOR, 2008). No entanto, a perspectiva de que estas doenças sejam 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 e/ou hormonais em fases específicas da vida são importantes preditores do



desenvolvimento da síndrome metabólica durante a vida adulta. Essas fases são chamadas de janelas de programação e dentre elas estão as fases perinatais como a gestação e lactação e também a adolescência (De Moura e Passos, 2005; Lopez-Jaramillo *et al.*, 2011). Estes trabalhos contribuem para a consolidação do conceito DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease), estabelecido por Barker e colaboradores, os quais propõem 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 por doenças cardiovasculares na vida adulta (Barker, 1990).

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 a lactação e a adolescência (WIDEN *et al.*, 2012; DE OLIVEIRA *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 ação da 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 da atividade do sistema nervoso parassimpático (BARELLA *et al.*, 2012; GOMES *et al.* 2013).

Desta forma, o presente estudo procura investigar se uma dieta rica em gordura animal durante o período da adolescência é capaz de programar o indivíduo a uma maior susceptibilidade a síndrome metabólica durante a vida adulta.

## 2 OBJETIVOS

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 glicídico.

## 3 METODOLOGIA

As condutas laboratoriais na manutenção e eutanásia dos animais foram 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 da Universidade Estadual de Maringá – UEM (protocolo nº 1527130815). Ratos Wistar machos com 25 dias de idade provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá foram acomodados no Biotério Setorial do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular. Após 5 dias de adaptação os animais foram divididos em dois grupos experimentais: grupo controle (CO) alimentados com ração normolipídica (4,3 kcal/g), e grupo tratado (HFD) com uma dieta hiperlipídica (5,9 kcal/g) contendo 35% de gordura de saturada. O protocolo experimental consiste no tratamento com as respectivas dietas dos 30 aos 60 dias de idade. Após este período e até os 120 dias de idade ambos os grupos receberam a dieta padrão. Durante todo o período experimental os animais receberam ração e água *ad libitum*, e foram acomodados em caixas de polipropileno (45 cm /30 cm /15 cm) sendo mantidos 3 animais por caixa, em condições controladas de luminosidade com ciclo claro-escuro de 12h (06:00-18:00 h)



e temperatura ( $22,0 \pm 2$  °C). O peso corporal e a ingestão alimentar foram acompanhados semanalmente durante todo período.

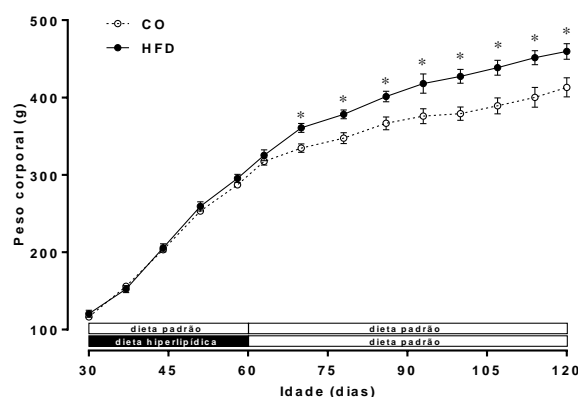
Com 120 dias de idade e após jejum de 12 horas, uma parte dos animais de cada grupo foi pesada e anestesiada por meio de aplicação intraperitoneal (ip) de Tiopental Sódico (45mg/kg/peso corporal). Em seguida foi realizada laparotomia mediana para coleta de amostras sanguíneas através da veia cava inferior com seringas descartáveis previamente heparinizadas. A eutanásia ocorreu por choque hipovolêmico. As amostras de sangue foram depositadas em tubos eppendorf armazenados em gelo para posterior centrifugação (13000 rpm/5 min) e coleta do plasma, que foi armazenado a  $-20^{\circ}$  C para posterior análise. Posteriormente, foram retirados e pesados os seguintes tecidos: gorduras periepididimal (PERI), retroperitoneal (RETRO) e inguinal (ING) e fígado.

As amostras de fígado de ratos com 120 dias de idade ( $n=6$ ) por grupo, foram fixadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer  $-80$  °C. Posteriormente, estas amostras foram embebidas em OCT (Optimumcottingtemperature, Tissue-Tek, SakuraFinetek, Torrance, CA, USA), cortadas com 10  $\mu$ m de espessura em micrótomo (Leica<sup>®</sup> CM1850, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) e coradas com Sudam III (OilRed). O percentual de inclusões lipídicas foi 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 foram feitas em 40 imagens /animal/grupo. As imagens foram 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 foram realizadas com o software *GraphPadPrism*<sup>®</sup> versão 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  o erro padrão da média (EPM). Para a comparação das diferenças entre os grupos experimentais foi utilizado o teste *t* de Student não pareado. O nível de significância foi fixado em  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

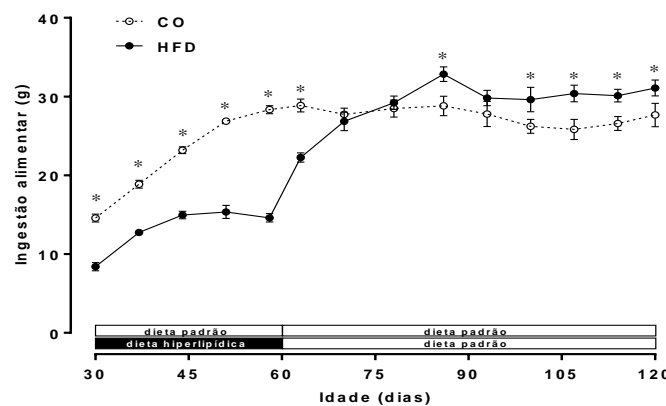
A dieta HFD vem sendo amplamente utilizada como um modelo experimental para o estudo da síndrome metabólica, sendo esta responsável pelo aumento de peso e alterações deletérias do perfil metabólico em ratos (GOMES et al., 2013; MARQUES et al., 2015; ICKIN GULEN et al., 2015).



**Figura 1.** Efeito da HFD sobre o peso corporal. Curva do peso corporal (30 – 120 dias de idade) de animais controle (CO) e de animais alimentados com HFD dos 30 aos 60 dias de idade. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 20$ ). Teste *t* de Student; \*  $p < 0,05$ .

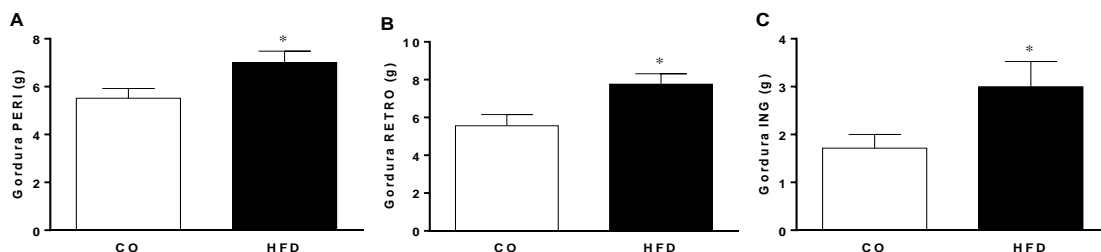


De acordo com a Figura 1 observa-se que o grupo HFD apresenta aumento significativo do peso corporal a partir da sexta semana de idade quando comparados ao grupo CO ( $p < 0,05$ ). Após os 60 dias de idade o grupo HFD passou a receber a dieta padrão, normolipídica, no entanto, ainda assim observou-se um aumento gradativo do peso corporal destes animais, indicando que estes apresentam sobrepeso durante a vida adulta. Estudos anteriores realizados com roedores verificaram um padrão semelhante de ganho de peso e peso final em animais expostos à dieta HFD durante o período da adolescência (BARELLA et al., 2012; BOITARD et al., 2012; TEEGARDEN; SCOTT; BALE, 2009).



**Figura 2.** Efeito da HFD sobre a ingestão alimentar. Curva da ingestão alimentar (30 – 120 dias de idade) de animais controle (CO) e de animais alimentados com HFD dos 30 aos 60 dias de idade. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 20$ ). Teste  $t$  de Student; \*  $p < 0,05$ .

A Figura 2 mostra a ingestão alimentar dos animais ao longo de todo o período experimental. Observa-se que os animais do grupo HFD apresentaram redução na ingestão alimentar durante o período de tratamento (30 – 60 dias), comparado aos animais do grupo controle. Estudos anteriores realizados pelo grupo encontraram o mesmo padrão quando os animais iniciam a dieta HFD (BARELLA et al., 2012; TOFOLO et al., 2014). No entanto, algumas semanas após o tratamento verifica-se o aumento gradativo da ingestão alimentar dos animais no grupo HFD, que ao fim dos 120 dias apresenta uma maior ingestão em relação ao outro grupo. Este aumento do consumo parece estar relacionado com alterações no ritmo circadiano destes animais, que passam a comer mais durante o período claro (PENDERGAST et al., 2013).

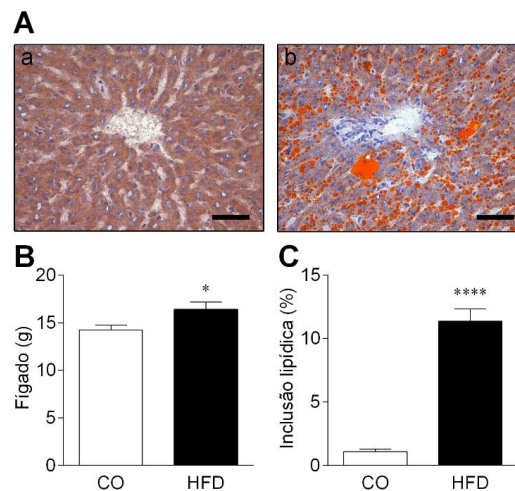


**Figura 3.** Efeito da HFD sobre a gordura corporal. (A) gordura periepididimal, (B) gordura retroperitoneal e (C) gordura inguinal de animais controle (CO) e de animais alimentados com HFD dos 30 aos 60 dias de idade. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 20$ ). Teste  $t$  de Student; \*  $p < 0,05$ .

Os animais tratados com HFD, apresentaram maiores depósitos de gordura durante a vida adulta, como pode-se constatar através da análise da Figura 3. Em estudo semelhante, Barella LF et. al (2012) observou o aumento da adiposidade corporal em



animais tratadas com HFD durante a adolescência e assim como no presente estudo, encontrou valores significativamente maiores dos depósitos de gordura periepididimal e retroperitoneal. Desta forma, entende-se que o sobrepeso destes animais acontece em grande parte pelo maior acúmulo de energia sob a forma de triglicerídeos no tecido adiposo branco.



**Figura 4.** Micrografias do fígado de ratos Wistar CO (A) e HFD (B), (B) peso do fígado e (C) percentual de inclusões lipídicas. Cortes corados com Sudam III, objetiva de 40x, as barras representam 50  $\mu$ m, (n=6). Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. Teste *t* de Student;  $p < 0,05$ .

O fígado de animais do grupo HFD apresenta significativa hipertrofia com o aumento do peso absoluto do órgão (Figura 4B). Além disso, observa-se nas micrografias que o tecido hepático do grupo HFD apresenta um elevado nível de inclusões lipídicas. Através da análise da Figura 4C pode-se observar esta diferença quantitativamente, verificando-se, assim, que o fígado dos animais tratados com HFD apresentam cerca de 10 vezes mais inclusões lipídicas quando comparado com o grupo CO.

Os ácidos graxos livres obtidos a partir da dieta ou pela síntese hepática podem ser utilizados de várias formas, sendo utilizados para a geração de energia através da  $\beta$ -oxidação, exportados do fígado para outros tecidos na forma de VLDL ou reesterificados na forma de triglicerídeos e estocados como gotas lipídicas no citoplasma dos hepatócitos (MAZEN NOUREDDIN, 2016). A resistência à insulina parece contribuir para o aumento da importação e síntese de ácidos graxos pelo fígado, o que excede a capacidade hepática de metabolização e exportação, favorecendo assim a deposição de lipídios caracterizando a esteatose hepática (DEN BOER et al., 2004).

#### 4 CONCLUSÃO

Conclui-se, assim, que a ingestão de uma dieta rica em gordura durante adolescência promove hiperfagia na vida adulta, sobrepeso, aumento dos estoques de gordura, hipertrofia do fígado e esteatose hepática não-alcoólica.

#### REFERÊNCIAS

ARMITAGE, J. A.; POSTON, L.; TAYLOR, P. D. Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: the role of maternal obesity. **Front Horm Res**, v. 36, p. 73-84, 2008.



- 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. **Hormone and Metabolic Research**, v. 44, n. 6, p. 458–464, 2012.
- BARKER, D. J. The fetal and infant origins of adult disease. **BMJ**, v. 301, n. 6761, p. 1111, Nov 17 1990.
- BOITARD, C. et al. Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. **Hippocampus**, v. 22, n. 11, p. 2095–2100, 2012.
- 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.
- DE OLIVEIRA, J. C. et al. Poor pubertal protein nutrition disturbs glucose-induced insulin secretion process in pancreatic islets and programs rats in adulthood to increase fat accumulation. **Journal of Endocrinology**, v. 216, n. 2, p. 195–206, 2013.
- DEN BOER, M. et al. **Hepatic Steatosis: A Mediator of the Metabolic Syndrome. Lessons from Animal Models Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 2004.
- 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. **Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**, v. 32, n. 2, p. 310–21, 2013.
- GRUNDY, S. M. Metabolic syndrome update. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 26, n. 4, p. 364–373, 2015.
- HAN, T. S.; LEAN, M. E. Metabolic syndrome. **Medicine**, v. 43, p. 80–87, 2015.
- ICKIN GULEN, M. et al. Histopathological changes in rat pancreas and skeletal muscle associated with high fat diet induced insulin resistance. **Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission**, p. 1–11, 2015.
- 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.
- MARQUES, C. et al. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. **Adipocyte**, n. July, p. 1–11, 2015.
- MAZEN NOUREDDIN, A. Z. & R. L. Promising Therapies for Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, p. 1–46, 2016.



PENDERGAST, J. S. et al. High-fat diet acutely affects circadian organisation and eating behavior. **European Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 8, p. 1350–1356, 2013.

TEEGARDEN, S. L.; SCOTT, A. N.; BALE, T. L. Early life exposure to a high fat diet promotes long-term changes in dietary preferences and central reward signaling. **Neuroscience**, v. 162, n. 4, p. 924–932, 2009.

TOFOLO, L. P. et al. Short-term moderate exercise provides long-lasting protective effects against metabolic dysfunction in rats fed a high-fat diet. **European journal of nutrition**, 2014.

VAN DEN BERGH, B. R. Developmental programming of early brain and behaviour development and mental health: a conceptual framework. **Dev Med Child Neurol**, v. 53 Suppl 4, p. 19-23, Sep 2011.

WIDEN, E. et al. Pubertal timing and growth influences cardiometabolic risk factors in adult males and females. **Diabetes Care**, v. 35, n. 4, p. 850-6, Apr 2012.