



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

Maria Victória Lima Waquim¹, Beatriz Guerreiro Otoboni², Rodrigo Vargas³

¹Acadêmica do Curso de Medicina, Universidade Cesumar – UNICESUMAR, Campus Maringá-PR. Bolsista PIBIC-MED/ICETI- UniCesumar. ra-19127149-2@alunos.unicesumar.edu.br

² Acadêmica do Curso de Medicina, Universidade Cesumar – UNICESUMAR, Campus Maringá-PR,. ra-19128127-2@alunos.unicesumar.edu.br

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

RESUMO

O trabalho avaliou os 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. Para isso, foram utilizados 30 ratos Wistar machos com 25 dias divididos em dois grupos experimentais: ANF, animais que receberam dieta controle (Nuvital®, Curitiba, Brasil) durante toda a vida e AHF, animais que receberam dieta hiperlipídica (35% de gordura) dos 30 aos 60 dias de vida (adolescência). Dos 60 aos 90 dias os animais do grupo AHF receberam dieta controle. Os animais tiveram acesso à água e a ração à vontade durante todos os estágios do protocolo e mantidos em sala ambientada com fotoperíodo (07h00min – 19h00min) e temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) controlados. Após isso, foram feitos 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 cuja quantidade de gordura extraída foi determinada gravimetricamente. Por fim, houve a verificação da evolução histológica do fígado com base em um score para DHGNA e EHNA. Diante do exposto, conclui-se que a alimentação hiperlipídica durante a adolescência leva ao desenvolvimento de DHGNA com focos inflamatórios lobulares, alterações no perfil biométrico, estresse oxidativo e perfil lipídico em ratos adultos.

PALAVRAS-CHAVE: Alimentação; DHGNA; Programação Metabólica.

1 INTRODUÇÃO

Como uma das principais causas de disfunções hepáticas a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), uma doença crônica, ocorre devido ao acúmulo excessivo de gordura no tecido hepático na abstenção do consumo de álcool, com quadro que pode evoluir com inflamação hepática, fibrose, e manifestações sistêmicas (TEMPLE, 2016). Somam-se a isso estudos recentes no qual o desenvolvimento biológico ocorre intrinsecamente com o ambiente. Assim, modificações ambientais podem gerar alterações e levar ao surgimento de fenótipos específicos a partir da adaptação, evento chamado de programação metabólica, que ocorre, também, na adolescência (MOURA et al., 2007). Nesse intervalo de janela metabólica, a presença excessiva ou ausência de nutrientes, podem alterar permanentemente a funcionalidade e metabolismo de órgãos, predispondo a comorbidades na vida adulta. Diante desse panorama, sabe-se que ocorre alto consumo de fast food, alimentos hiperlipídicos, colaboram para desenvolvimento de síndrome metabólica e dhgna (FRANCO, 2007; MAIA et al., 2018).

Nessa perspectiva, o período da adolescência é uma importante janela metabólica onde estímulos externos influenciam 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 MÉTODOS

Esta pesquisa foi desenvolvida de acordo com as normas do Comitê de Ética para Uso e Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá, aprovado sobre número 3723280918.

Ratos Wistar machos (n=30) de 25 dias foram obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá e 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 foram divididos em dois grupos experimentais: ANF, animais que receberam dieta controle (Nuvital®, Curitiba, Brasil) durante toda a vida e AHF, animais que receberam dieta hiperlipídica (35% de gordura, Tabela 1) dos 30 aos 60 dias de vida (adolescência). Dos 60 aos 90 dias os animais do grupo AHF receberam dieta controle. Os parâmetros biométricos foram avaliados durante todo o período experimental registrado semanalmente a evolução ponderal e o consumo alimentar dos animais. Após todos os procedimentos experimentais, os ratos foram eutanasiados por overdose anestésica (Tiopental 120mg/kg de massa corpórea, via intraperitoneal) para retirada dos principais estoques de gordura corporal: retroperitoneal, periepídica e mesentérica e do fígado. O peso das gorduras e do fígado foi expresso em relação ao peso corporal do animal (g/100g de peso corporal).

O teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT) foi feito aos 90 dias onde os animais de todos os grupos receberam uma injeção intraperitoneal de insulina (1U/kg PC). Amostras de sangue foram 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 heparinizado. Os níveis de glicose sanguínea durante o teste foram avaliados pelo método enzimático-colorimétrico (GoldAnalisa®; Belo Horizonte, Brasil). O teste de tolerância à glicose intravenoso (ivGTT) feito após 48 horas da realização do ipITT. No momento da realização do teste, amostras sanguíneas foram 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 foram retiradas nos tempos 5', 15', 30' e 45' para posterior dosagem de glicose e insulina. Os níveis plasmáticos de insulina 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). Perfil lipídico oriundo do plasma obtido no tempo 0' do ivGTT utilizado também para dosagem de colesterol total, triglicérides e HDL-C. Os valores de colesterol LDL e VLDL calculados por meio do cálculo de Friedewald: $LDL (mg/dL) = Colesterol\ total - (Triglicérides / 5) - HDL$ e $VLDL (mg/dL) = Triglicérides / 5$. Extração lipídica do fígado com aproximadamente 500 mg do fígado de cada animal foram removidos e estocados a -20°C, para posterior extração lipídica. A quantidade de gordura extraída foi determinada gravimetricamente (FOLCH; LEES; SLOANE-STANLEY, 1957). Para a análise histológica, aproximadamente 500 mg do fígado foram coletados e fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas. Após fixação, o tecido foi 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, foram realizados cortes de 5 µm e os mesmos 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).

A análise estatística feita com os resultados expressos como média ± erro padrão da média. Para avaliação estatística entre grupos foi utilizado o teste T de Student, seguido do pós-teste de



Tukey. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. O software utilizado para as análises estatísticas será o GraphPad Prism versão 6.00 para Windows (GraphPad Software©).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Em relação a evolução do peso corporal, dos 21 aos 90 dias, os animais do grupo AHF ($18257 \pm 187,0$) apresentaram aumento de 9,56% em relação aos animais do grupo ANF ($16511 \pm 308,5$) ($P < 0,0001$). Com base no peso relativo do fígado dos animais do grupo AHF ($3,573 \pm 0,1024$) não apresentou diferença estatística em relação ao grupo ANF ($3,563 \pm 0,13$). No peso relativo da gordura retroperitoneal, os animais do grupo AHF ($1,424 \pm 0,04675$) apresentaram aumento de 14,25% em relação ao grupo ANF ($1,221 \pm 0,04869$) ($P < 0,01$). A gordura perigonadal dos animais do grupo AHF ($1,295 \pm 0,09178$) apresentou aumento de 22% em relação ao grupo ANF ($1,010 \pm 0,06852$) ($P < 0,05$). No peso relativo da gordura mesentérica os animais do grupo AHF ($0,5857 \pm 0,03170$) não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo ANF ($0,0533 \pm 0,02192$). Segundo as análises de colesterol total e LDL-C, mostrou-se aumento do colesterol total no grupo AHF ($81,88 \pm 1,849$) em comparação ao grupo ANF ($75,15 \pm 2,444$) de 8,22% ($P < 0,05$) e aumento de LDL-C no grupo AHF ($37,51 \pm 1,432$) em relação ao grupo ANF ($30,30 \pm 3,361$) de 19,22% ($P < 0,05$). Em contrapartida, não houve diferença estatística em: triglicerídeos do grupo AHF ($54,72 \pm 1,848$) em relação ao grupo ANF ($54,67 \pm 2,257$); HDL-C do grupo AHF ($35,50 \pm 1,1777$) em relação ao grupo ANF ($34,83 \pm 1,413$); VLDL-C do grupo AHF ($0,4095$) em relação ao grupo ANF ($11,53 \pm 0,4047$). Dentre as análises do estresse oxidativo, a atividade da CAT hepática, no grupo AHF ($0,05728 \pm 0,006993$) e no ANF ($0,05124 \pm 0,005565$), não apresentou diferença estatística significativa. O conteúdo de GSH hepático do grupo AHF ($238,8 \pm 7,652$) em relação ao grupo ANF ($260,6 \pm 3,088$) mostrou diminuição de 9,12% ($P < 0,05$). A atividade da GST hepática no grupo AHF ($111,8 \pm 9,050$) comparado ao grupo ANF ($142,2 \pm 9,434$) mostrou redução de 27,19% ($P < 0,05$). O conteúdo de LOOH hepático no grupo AHF ($31,12 \pm 1,699$) em relação ao grupo ANF ($25,90 \pm 1,894$) foi 16,77% maior ($P < 0,05$). Por fim, a atividade de SOD hepática nos AHF ($1,896 \pm 0,1522$) não apresentou diferença estatística em relação ao grupo ANF ($1,755 \pm 0,1974$). A análise hepática do grau de esteatose mostrou que 71,43% dos animais do grupo ANF apresentaram grau 1 de esteatose, enquanto 57,14% dos animais do grupo AHF apresentaram grau 2. Além disso, observa-se que o grupo ANF apresentou 71,43% de esteatose hepática localizada na zona 1 e os animais do grupo AHF apresentaram 100% de esteatose hepática na mesma região. Por fim, o grupo ANF apresentou 71,42% de inflamação lobular grau 2, enquanto o grupo AHF apresentou 85,71% no mesmo grau.

Neste estudo, avaliamos a oferta de uma dieta rica em lipídios durante a adolescência de ratos wistar e a susceptibilidade aos distúrbios do metabolismo lipídico hepático na vida adulta. Assim, ratos wistar machos adultos alimentados com tal dieta durante a adolescência apresentaram maiores valores de ganho de peso corporal, também, observado em outros estudos cujos ratos wistar, alimentados com dieta hiperlipídica, obtiveram peso maior entre 10-15% em comparação ao grupo controle (KRAVCHENKO, 2021). Sendo assim, por conta do acúmulo de gordura no tecido adiposo, e conseqüentemente, seu aumento de volume e tamanho, devido a dieta hiperlipídica, houve aumento do peso. Este, pode estar diretamente relacionado ao aumento da gordura retroperitoneal e da gordura perigonadal no grupo AHF, esse acúmulo de lipídios ocorre por deposição de triglicerídeos no tecido adiposo adjacente por meio de enzimas lipoproteicas. Dados similares foram encontrados em outros artigos com grupo controle e grupo AHF (ANGÉLOCO et al.,



2012). Outrossim, a oferta da dieta hiperlipídica alterou o perfil lipídico, aumentando os níveis de colesterol total e HDL-C. Esse aumento, ademais, relatado em estudos em que o grupo de animais alimentados com dieta hiperlipídica obteve altas concentrações de lipoproteínas (POLYXENI-MARIA, 2021). Soma-se a isso, o aumento do total de lipídios, triglicerídeos e colesterol em ratos alimentados com dieta hipercalórica deficiente em colina com adição de ácidos lipóicos em comparação ao grupo controle (KRAVCHENKO, 2021). Assim, esse aumento de colesterol e LDL implica na prevalência de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e síndromes metabólicas (POLYXENI-MARIA, 2021). Ademais, no fígado, foi possível verificar que as enzimas GSH e GST se encontravam reduzidas no grupo AHF. Devido a GSH ser considerada como primeira linha de defesa contra os radicais livres, e que atua como substrato para o GST, a diminuição dessas duas enzimas evidencia a presença de um estresse oxidativo nos animais analisados, mostrando que a dieta hiperlipídica aumenta a produção de radicais livres, superando a capacidade de geração de compostos antioxidantes pelo corpo, causando danos nas células hepáticas e favorecendo o aparecimento da DHGNA (BHANDARI, 2010). Também, em outros estudos houve diminuição de aproximadamente 47,52% de GST em ratos alimentados com a mesma dieta (EL-NEWARY, 2016). Ademais, obteve-se aumento no LOOH, capaz de gerar subprodutos com efeitos oxidativos, corroborando para a presença de um estresse oxidativo nos animais do grupo HFD, como previamente descrito (BHANDARI, 2010). O tecido hepático mostrou-se comprometido nos animais alimentados por dieta hiperlipídica que apresentaram grau 2 de esteatose, localizada na zona 1. Assim, foi observado em estudo o grau de esteatose 2 e 3 em 71,43% dos ratos alimentados com dieta rica em lipídios, sendo o grau 2 encontrado em 66,66% dos ratos e grau 3 em 33,34% (TURSUN, 2021). Ademais, a inflamação hepática lobular observada nos animais alimentados pela dieta é indicativo de esteato-hepatite, devido ao maior estímulo do metabolismo hepático pela deposição de triglicerídeos, mobilização de insulina, beta-oxidação e estresse oxidativo. Por fim, estudos em ratos wistar albinos com alimentação hiperlipídica evidenciaram sinais de fibrose, inflamação, esteatose na área portal, assim aumento na quantidade de marcadores hepáticos (KARAÇOR, 2014) (SAEIDI; MOTAGHIPUR; SEPEHRIAN; MOHTASHAMI; NIA; GHASEMI, 2020).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que os ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica durante a adolescência, desenvolveram alterações significativas do aumento do peso corporal, aumento da gordura retroperitoneal e retrogonadal, aumento de LOOH hepático, diminuição de GSH e GST hepático e presença de esteatose hepática em diferentes graus nos animais.

REFERÊNCIAS

TEMPLE, Jonathan; CORDERO, Paul; LI, Jiawei; NGUYEN, V. I.; OBEN, Jude. A guide to non-alcoholic fatty liver disease in childhood and adolescence. **International Journal Of Molecular Sciences**, jun. 2016. MDPI AG.

CUZMAR, Valeria; ALBERTI, Gigliola; UAUY, Ricardo. Early Obesity: risk factor for fatty liver disease. **Journal Of Pediatric Gastroenterology & Nutrition**, jan. 2020. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).



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**, 2015. Medknow.

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.

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.

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

VILLARES, José Manuel Moreno. Los mil primeros días de vida y la prevención de la enfermedad en el adulto. **Nutr Hosp** 2016.

KARAÇOR, Kayıhan; ÇAM, Meryem; ORHAN, Nuri; COŞGUN, Erdal; DEMIRIN, Hilmi. High Fatty Diet Effects on Rat Liver. **Electronic Journal Of General Medicine**, abr. 2014. Modestum PublishingLtd.

TURSUN, Serkan; GÜLERMAN, Hacer Fulya; GAZYAĞÇI, Serkal; ŞAHİN, Yaşar; EREL, Özcan; NEŞELİOĞLU, Salim. Investigation of Thiol/Disulfide Balance in Obese Rats with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition**, 2021. The Korean Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition.

KRAVCHENKO, Lidia V.; AKSENOV, Ilya V.; NIKITIN, Nikolay S.; GUSEVA, Galina V.; AVRENYEVA, Ludmila I.; TRUSOV, Nikita V.; BALAKINA, Anastasia S.; TUTELYAN, Victor A. Lipoic Acid Exacerbates Oxidative Stress and Lipid Accumulation in the Liver of Wistar Rats Fed a Hypercaloric Choline-Deficient Diet. **Nutrients**, 2021. MDPI AG.

SARLI, Polyxeni-Maria; MANOUSOPOULOU, Antigoni; EFTHYMIU, Elias; ZOURIDIS, Andreas; POTIRIS, Anastasios; PERVANIDOU, Panagiota; PANOULIS, Konstantinos; VLAHOS, Nikolaos; DELIGEOROGLOU, Efthymios; GARBIS, Spiros D. Liver Proteome Profile of Growth Restricted and Appropriately Grown Newborn Wistar Rats Associated With Maternal Undernutrition. **Frontiers In Endocrinology**, 2021. Frontiers Media SA.

EL-NEWARY, Samah A.; SULIEMAN, A. M.; EL-ATTAR, S. R.; SITOHY, M. Z. Hypolipidemic and antioxidant activity of the aqueous extract from the uneaten pulp of the fruit from *Cordia dichotoma* in healthy and hyperlipidemic Wistar albino rats. **Journal Of Natural Medicines**, 2016. Springer Science and Business Media LLC.

BHANDARI, Uma; KUMAR, Vinay; KHANNA, Naresh; PANDA, Bibhu Prasad. The effect of high-fat diet-induced obesity on cardiovascular toxicity in wistar albino rats. **Human & Experimental Toxicology**, 2010. SAGE Publications.



SAEIDI, Jafar; MOTAGHIPUR, Reza; SEPEHRAN, Atefe; MOHTASHAMI, Mahnaz; NIA, Fatemeh Forooghi; GHASEMI, Ahmad. Dietary fats promote inflammation in Wistar rats as well as induce proliferation, invasion of SKOV3 ovarian cancer cells. **Journal Of Food Biochemistry**, 2020. Wiley.