

Ciência Atual

Revista Científica
Multidisciplinar das
Faculdades São José

2018

Volume 12 | Nº2



FACULDADES
SÃO JOSÉ

ISSN 2317-1499

DIETA COM ALTO TEOR DE GORDURA LEVA À ESTEATOSE HEPÁTICA MACRO E MICROVESICULAR GRAVE EM RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA

HIGH-FAT DIET LEADS TO SEVERE MACRO AND MICROVESICULAR HEPATIC STEATOSIS IN
DIABETIC RATS STREPTOZOTOCIN-INDUCED

Wilian Rodrigues Lannes

Enfermeiro. Mestre em Biologia Humana e Experimental - UERJ. Docente das Faculdades São José

Ronaldo Barbosa Marins

Enfermeiro. Especialista - UCL. Docente das Faculdades São José

Alessandra Sant Anna Nunes

Enfermeira. Doutoranda em Enfermagem – UERJ. Docente das Faculdades São José, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e da UNESA

Luciane Alves Vercillo

Enfermeira. Mestre em Educação - UNESA. Coordenadora e Docente das Faculdades São José

Geraldo Oliveira Silva-Junior

Dentista. Doutor em Biologia Humana e Experimental - UERJ. Docente da UFF

Glauciane Lacerda-Miranda

Nutricionista. Doutora em Biologia Humana e Experimental - UERJ. Docente das Faculdades São José

RESUMO

A combinação de diabetes induzida por estreptozotocina (STZ) e dieta com alto teor de gordura (HFC) em ratos, pode causar disfunção hepática. O diabetes mellitus experimental foi induzido por injeção de STZ (40 mg/kg), ratos Wistar machos controles (C) e STZ receberam dieta HFC (30% de gordura) ou dieta padrão (comercial) (SC) (6% de gordura) durante um mês. Foram avaliados parâmetros biométricos, bioquímicos e estereológicos. Os animais STZ apresentaram hiperglicemia. A massa corporal (BM) e a razão massa gorda/BM foram maiores no grupo C-HFC, a massa hepática/BM foi maior no grupo STZ-HFC. Os animais STZ apresentaram níveis mais elevados das enzimas hepáticas do que os seus controles, o grupo STZ-HFC apresentou níveis significativamente elevados de lipídios plasmáticos. A densidade do volume da esteatose hepática aumentou acentuadamente nos grupos C-HFC e STZ-HFC. A binucleação de hepatócitos foi menor em STZ-HFC do que no grupo C-HFC. Em conclusão, a HFC leva a esteatose macro e microvesicular grave no fígado dos ratos C e STZ, mas a combinação de STZ e HFC aumenta tanto a relação massa hepática/BM quanto a esteatose hepática, mas não a relação da massa de gordura/BM, indicando que a administração STZ mais HFC possui propriedades importantes que levam ao fígado gorduroso.

Palavras-Chave: Estreptozotocina, Esteatose e Dieta com alto teor de gordura.

ABSTRACT

Combination of high-fat chow (HFC) and streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats may cause liver dysfunction. Experimental diabetes mellitus was induced by STZ injection (40 mg/kg), then Control (C) and STZ male Wistar rats received HFC (30% fat) or standard chow (SC)(6% fat) during one month. Biometrical, biochemical and stereological parameters were evaluated. STZ animals showed hyperglycemia. Body mass (BM) and fat mass/BM ratio were higher in C-HFC group, liver mass/BM was higher in STZ-HFC group. The STZ animals showed higher levels of liver enzymes than their counterparts, STZ-HFC group had significantly elevated levels of plasma lipids. The volume density of liver steatosis was markedly increased in both the C-HFC and STZ-HFC groups. The hepatocyte binucleation was smaller in STZ-HFC than C-HFC group. In conclusion, the HFC leads to severe macro and microvesicular steatosis in the liver in both C and STZ rats, but the combination of STZ and HFC enhances both the liver mass-BM ratio and the liver steatosis, but not the fat mass-BM ratio, indicating that STZ administration plus HFC have additive properties leading to fat liver.

Keywords: Streptozotocin, Steatosis e High-fat chow.

INTRODUÇÃO

Esse trabalho visa o estudo do diabetes, uma síndrome metabólica de origem múltipla induzida por estreptozotocina, (STZ) uma glicosamina-nitrosureia comumente usada para produzir o diabetes junto com uma dieta com alto teor de gordura (HFC) em ratos, podendo causar disfunção hepática. A metodologia utilizada para elaboração experimental para o diabetes mellitus foi induzido por injeção de STZ (40 mg/kg), ratos Wistar machos controles (C) e STZ receberam dieta HFC (30% de gordura) ou dieta padrão (comercial) (SC) (6% de gordura) durante um mês, o objetivo principal é verificar alterações hepáticas nos ratos submetidos a dieta HFC e com diabetes induzida por STZ, os objetivos são avaliar alterações biométricas, bioquímicas e verificar alterações estruturais hepáticas utilizando assim as técnicas rotineiras para uma possível avaliação dos seguintes tópicos: parâmetros biométricos, bioquímicos e estereológicos. Esse trabalho é de suma importância devido ao aumento da ingestão de alimentação fastfood, que é composta basicamente por uma taxa aumentada de níveis de gordura, além do aumento crescente da incidência de diabetes na população em geral.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O desenvolvimento de hiperglicemia em ratos submetidos à injeção de estreptozotocina (STZ) deve-se principalmente à destruição direta das células beta pancreáticas (Rerup, 1970). A STZ tem sido utilizada para induzir o diabetes mellitus insulino-dependente e não dependente de insulina, dependendo do intervalo da dose administrada e do período de vida considerado (Szkudelski, 2001). Além disso, roedores alimentados com dietas possuindo alto teor de gordura desenvolvem sobrepeso, hiperinsulinemia e resistência à insulina e não apresentam hiperglicemia ou diabetes (Storlien, Higgins et al., 2000). Uma vez que tanto a dieta rica em gordura quanto a deficiência de insulina estão intimamente ligadas à etiologia da DM2, a combinação de dieta com alto teor de gordura e tratamento com baixa dose de STZ é um modelo animal alternativo para diabetes mellitus tipo 2 (DM2), simulando a síndrome metabólica em humanos (Reed, Meszaros et al., 2000).

A crescente prevalência de obesidade e DM2 na população estão associadas ao aumento do número de indivíduos com fígado gorduroso. A obesidade causa sobrecarga de ácidos graxos livres para o fígado e o DM2 inibe a oxidação hepática de ácidos graxos livres e de taxas excessivas de lipólise do tecido adiposo (DeFronzo e Ferrannini, 1991; Marceau, Biron et al., 1999; Bugianesi, Zannoni et al., 2004; Gastaldelli A 2007; Korenblat, Fabbrini et al. 2008; Kotronen A 2008). Os aumentos simultâneos na lipogênese hepática e a inibição da oxidação de ácidos graxos resultam em acumulação grave de gordura no fígado. E são fundamentais no desenvolvimento de lipotoxicidade e esteatohepatite na obesidade e DM2 (Koteish e Diehl 2001, Bugianesi, Marzocchi et al., 2004, Belfort, Harrison et al. 2006; Gastaldelli A 2007; Cusi 2009).

De fato, a obesidade, o DM2 e a dislipidemia são riscos adicionais e coexistem freqüentemente com doença hepática gordurosa não alcoólica (Koteish e Diehl 2001; Chitturi, Abeygunasekera et al., 2002; den Boer, Voshol et al., 2004). No diabetes mellitus descompensado, a infiltração gordurosa é suficientemente grave para causar palidez visível (aparência gordurosa) e aumento do fígado com possível disfunção hepática (Kusunoki, Tsutsumi et al., 2004).

Apesar de ser freqüentemente associada a uma ampla gama de distúrbios metabólicos, a ingestão de gordura na dieta é de primordial importância quando se trata de acúmulo de gordura nos hepatócitos (Aguila, Pinheiro et al., 2003). Por exemplo, a dieta com alto teor de gordura administrada em mães no período da gestação e na prole após o desmame, gerou aumento da pressão arterial (PA) com conseqüente hipertrofia cardíaca, alterando o metabolismo de carboidratos, além de aumento das concentrações plasmáticas de corticosterona e a alteração da leptina/massa gorda/padrão de tamanho de adipócitos (Parente, Aguila et al., 2008).

Neste contexto, não só a gordura dietética excessiva aumenta a entrada de ácidos graxos hepáticos, como também diminui sua produção de forma indireta, agravando a hiperinsulinemia e prejudicando a oxidação dos ácidos graxos mitocondriais (Browning e Horton, 2004). Conseqüentemente, estudos em animais direcionados aos efeitos da ingestão de gordura sobre a estrutura hepática podem fornecer novos conhecimentos sobre a patogênese do diabetes mellitus, que tem sido considerado uma grande preocupação para a saúde pública em todo o mundo. Assim, este estudo teve como objetivo analisar as alterações hepáticas metabólicas e estruturais decorrentes da associação entre a dieta com alto teor de gordura e ratos diabéticos induzidos por STZ.

Animais, indução do diabetes e dieta

Os ratos machos Wistar de dois meses de idade foram obtidos de colônias mantidas na Universidade Estadual do Rio de Janeiro e alojados em uma sala com temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ \text{C}$) e umidade ($60 \pm 10\%$) e com 12 h de Ciclo de claro/ escuro de 12 h (luzes artificiais, de 7 a 19 horas) e ciclo de substituição do ar de 15 min/h. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes convencionais para experimentação com animais (publicação NIH nº 85-23, revisada em 1996). Vale ressaltar que o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual do Rio de Janeiro aprovou os procedimentos experimentais utilizados no estudo.

O diabetes mellitus experimental foi induzido em dois grupos de ratos por uma única injeção de estreptozotocina (STZ, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA, i.p. 40 mg/kg dissolvido em 50 mmol/L de tampão de citrato de sódio (pH= 4,5). Os ratos foram submetidos a jejum noturno antes da administração de STZ. O grupo controle recebeu quantidade equivalente de tampão de citrato por injeção intraperitoneal. Antes da injeção de STZ e 24 h depois, mediu-se a concentração de glicose no sangue por punção na veia da cauda, após 6 horas de jejum (glicosímetro Accu-Chek, Roche, São Paulo, Brasil). Os animais injetados com STZ que apresentaram um nível de glicemia em jejum inferior a 11,1 mmol/L foram excluídos dos experimentos.

Após a confirmação do estado diabético, os ratos controle e STZ foram colocados aleatoriamente na dieta com alto teor de gordura (HFC, n = 20 ratos) (30g de gordura/100g dieta, dieta de 2.300kJ/100g) ou normal (SC, n = 20 ratos) (dieta de 6 g de gordura/100 g dieta de 1,800kJ/100g) (Reeves, 1993) durante um mês. A composição da dieta é detalhada na Tabela 1. Posteriormente, os grupos foram divididos da seguinte forma (cada grupo n = 10): (a) STZ alimentado com dieta padrão (grupo STZ-SC), (b) STZ alimentado com dieta com alto teor de gordura (STZ- Grupo HFC), (c) Controle alimentado com dieta padrão (grupo C-SC) e (d) controle alimentado com dieta com alto teor de gordura (C-HFC). Durante o estudo, todos os grupos tiveram ração da dieta com alto teor de gordura ou padrão ad libitum e tinham acesso livre à água.

Table 1. Composição da dieta experimental. SC: dieta padrão (commercial), HFC: high-fat chow (dieta com alto teor de gordura).

<u>Ingredientes (g/100g dieta)</u>		HFC	SC
	<u>Ração Comercial</u> ^a	60,0	100,0
	<u>Margarina</u> ^b	25,0	-
	<u>Leite Condensado</u> ^c	15,0	-
	<u>Proteína (%)</u>	15,0	23,0
	<u>Gordura (%)</u>	30,0	6,0
*Nuvital, Colombo PR, ^b Primor, Catarina SC, Nestle, São Brasil.	<u>Ácidos graxos saturados (SFA)</u>	7,1 (24%)	0,9 (15%)
	<u>Ácidos graxos monoinsaturados (MUFA)</u>	9,8 (33%)	1,3 (22%)
	<u>Ácidos graxos polinsaturados (PUFA)</u>	5,6 (18%)	3,7 (61%)
	<u>Ácidos graxos Trans</u>	7,5 (25%)	0,1 (2%)
	<u>Carboidratos (%)</u>	55,0%	71,0
Massa	<u>Energia (kJ)</u>	2300	1800

Nuvilab,
Brasil,
Santa
Brasil,
Paulo SP,

corporal, ingestão alimentar e controle metabólico

A massa corporal (BM) e a glicemia foram medidas semanalmente (desde o dia anterior à administração da STZ até o final do experimento). A ingestão de alimentos foi medida (8:00 da manhã) e ração nova foi fornecida diariamente, enquanto que a ração restante do dia anterior era descartada. O controle metabólico foi avaliado com base na glicemia e no peso animal no final do experimento.

Coleta de sangue e tecidos

No dia anterior ao sacrifício, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas e privados da ração durante a noite. No momento do sacrifício, os animais foram anestesiados (i.p. pentobarbital de sódio, 50 mg /kg), o tórax foi aberto e as amostras de sangue foram rapidamente obtidas por punção cardíaca. Posteriormente, a injeção intracardiaca de KCl (2 mL) promoveu parada cardíaca em diástole.

Os depósitos de gordura (gordura retroperitoneal e massa gorda epididimária) foram completamente removidos em ambos os lados do animal e pesados. A quantidade de gordura retroperitoneal inclui o depósito ao redor de cada rim e ao longo dos músculos lombares. A quantidade de gordura epididimária incluiu tecido adiposo em torno dos ureteres, bexiga e epidídimo.

O sangue foi centrifugado (120 g durante 15 min) e armazenado -80 °C para posterior análise. Os lipídios e enzimas hepáticas foram extraídos pelo método enzimático colorimétrico. O colesterol total (TC) foi determinado pelo método colesterol esterase/colesterol oxidase/peroxidase e os triglicerídeos (TG) foram medidos utilizando o método glicerol fosfato oxidase/peroxidase. As enzimas hepáticas analisadas foram glutamato-oxaloacetate transaminase (GOT), glutamato-piruvato transaminase (GPT), gamma-glutamil transpeptidase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP). Todos os lipídios e enzimas hepáticas foram medidos por um método cinético-colorimétrico de acordo com as instruções do fabricante (Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte, MG).

Estereologia do fígado

O volume do fígado foi medido pelo deslocamento do fluido (solução salina isotônica), o volume do órgão (V) e posteriormente pesado (W). À medida que a densidade específica da solução salina isotônica (d) é 1,0048, os respectivos volumes foram obtidos por $V[\text{órgão}](\text{cm}^3) = W(\text{g})/d$ ou simplesmente $V(10^3 \text{ cm}^3) = W(\text{g})$ (Weibel 1979). Assim, o fígado foi cortado em vários fragmentos menores mantidos durante 48 h à temperatura ambiente no fixador (formaldeído 1,7 mol/L recentemente preparado em tampão de fosfato 0,1 M, (pH=7,2)). Os fragmentos aleatórios de todas as porções do órgão foram incluídos em Paraplast plus (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), seccionados a 3 e 10 μm , e depois corados com hematoxilina-eosina e Tricromo de Masson. Cinco campos microscópicos por animal foram analisados ao acaso. É importante ressaltar que uma análise totalmente cega foi realizada. Um sistema de vídeo microscópico (microscópio Leica DMRBE com objetivas planacromáticas, Wetzlar, Alemanha) e um sistema-teste composto por 36 pontos (PT) foram utilizados para a análise como descrito (Aguila, Pinheiro et al., 2003; Souza-Mello, Mandarim-de-Lacerda et al., 2007). Resumidamente, a densidade do volume (Vv) foi estimada por contagem de pontos para hepatócitos e esteatose: $Vv[\text{estrutura}] = PP[\text{estrutura}]/PT$ (PP é o número de pontos que atingem a estrutura analisada e PT é o total de pontos teste) (Franzen, Ekstedt et al., 2005).

O método "dissector" foi utilizado para estimar o número de núcleos de hepatócitos (hn) em uma sonda tridimensional que analisa a estrutura das amostras proporcionalmente ao seu número, independentemente do tamanho ou forma (Sterio, 1984). Para simplificar, duas seções paralelas foram usadas para criar um volume de amostragem com uma seção de referência superior e uma seção inferior (olhar para baixo do plano), ambos contendo um quadro de teste. A densidade numérica (Nv) de hn (número de hn por mm³) foi estimada a partir de 10 pares de "dissector" aleatórios para cada animal, sendo definido como $Nv [hn] = Q- [hn]/t.AT$, onde Q- representa o número de perfis de hn contados no quadro de teste na seção de referência, T é a espessura e AT é a área total da armação de teste. O número total de hepatócitos no fígado (N[h]) foi estimado como o produto de Nv [hn] e o volume de fígado medido anteriormente corrigido pela taxa de binucleação dos hepatócitos (Mandarim-de-Lacerda 2003).

Análise de dados

Os dados são apresentados como média±erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram testadas com One Way ANOVA e pós teste de Tukey. As interações da injeção de STZ e da dieta com alto teor de gordura foram testadas com Two Way ANOVA (2x2) (Statistica, Statsoft, Tulsa, OK, EUA). Um valor P de 0,05 foi considerado para significância estatística.

Resultados

Todos os animais toleraram a dieta com alto teor de gordura, sem desenvolver diarreia ou outras restrições físicas e não mostraram diferenças significativas em relação à ingestão alimentar quantitativa.

Massa corporal

A dieta com alto teor de gordura foi iniciada imediatamente após a administração de STZ. Antes da administração de STZ, não houve diferenças na massa corporal entre os grupos. Como mostrado, todos os animais tiveram um aumento de peso ao final do experimento em relação ao início, principalmente o grupo C-HFC (Fig. 1). Não houve aumento significativo de peso nos animais STZ-HFC durante todo o experimento. A massa corporal (BM) foi 14% maior em C-HFC do que no grupo C-SC (P <0,01, One Way ANOVA) e 24% maior em C-HFC do que o grupo STZ-HFC (P <0,01, One Way ANOVA).

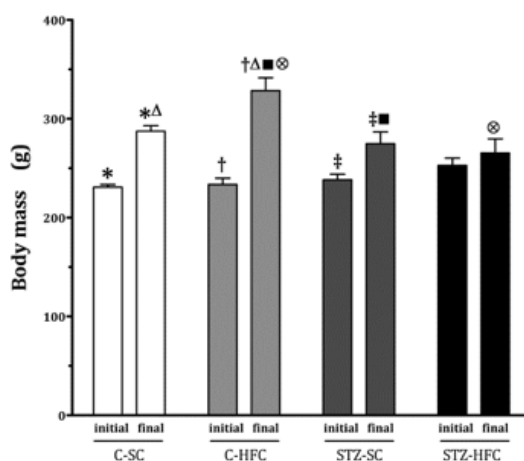


Fig. 1 - Massa corporal (Body mass, em gramas, média e erro padrão da média). As diferenças foram testadas com One-Way ANOVA e pós teste de Tukey (o mesmo símbolo sobre as barras significa diferença estatística significativa entre os grupos, $P \leq 0,05$). Abreviações: SC: ração padrão, HFC: dieta com alto teor de gordura, C: ratos controle, STZ: ratos diabéticos por estreptozotocina.

Relação massa gorda/massa corporal (FM / BM)

A quantidade ventral de gordura representativa de cada grupo é mostrada na Fig. 2. Como esperado, a dieta com alto teor de gordura em C-HFC resultou em aumento significativo na massa relativa de gordura retroperitoneal e genital. No entanto, a quantidade de gordura retroperitoneal e genital diminuíram nos grupos STZ (grupos STZ-SC e STZ-HFC). A relação FM/BM foi 100% maior em C-HFC do que nos outros grupos ($P < 0,05$, One Way ANOVA) (Fig. 3).

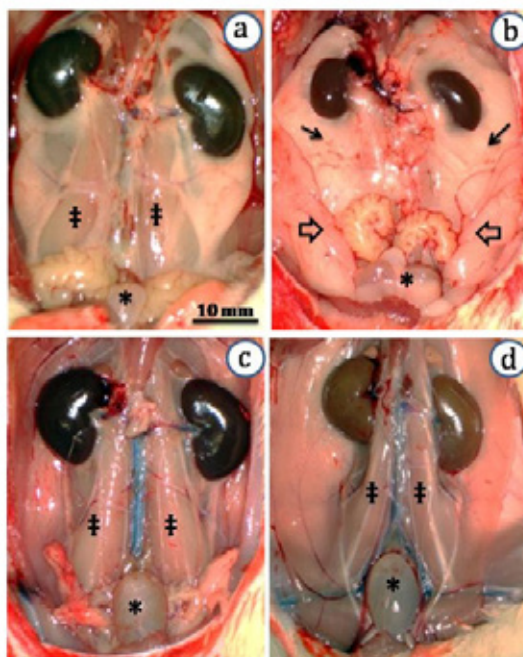


Fig. 2 - Vista ventral da quantidade de gordura: (a) grupo C-SC que mostra a quantidade de gordura que cobre o músculo lombar; (b) grupo C-HFC mostrando aumento da gordura retroperitoneal (seta fina) e quantidade de gordura genital (seta larga), cobrindo parcialmente os rins; (c) grupo STZ-SC que mostra diminuição da quantidade de gordura retroperitoneal e genital; (d) grupo STZ-HFC mostrando quantidade de gordura praticamente ausente deixando o músculo lombar (‡) e a bexiga urinária (*) descobertos.

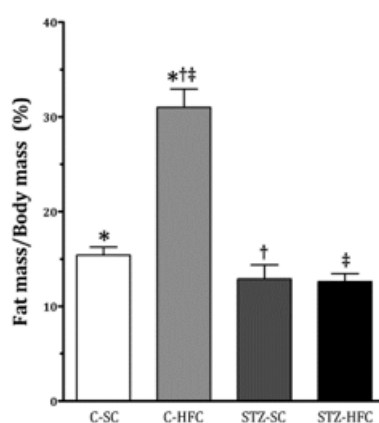


Fig. 3 - Relação massa gordura pela massa corporal (Fat mass/Body mass) (média e erro padrão da média). As diferenças foram testadas com ANOVA unidirecional e teste post-hoc de Tukey. O mesmo símbolo sobre as barras significa diferença estatística ($P < 0,05$). Abreviações: SC: ração padrão, HFC: dieta com alto teor de gordura, C: ratos controle, STZ: ratos diabéticos por estreptozotocina.

Relação massa hepática/massa corporal (LM / BM)

Os grupos STZ (STZ-HFC e STZ-SC) apresentaram maior relação LM/BM do que os animais controles correspondentes (Fig. 4). Assim, a relação LM/BM foi 30% maior no STZ-HFC do que no grupo C-HFC ($P < 0,0002$, ANOVA unidirecional) e 20% maior em STZ-SC do que no grupo C-SC ($P < 0,005$ ANOVA unidirecional).

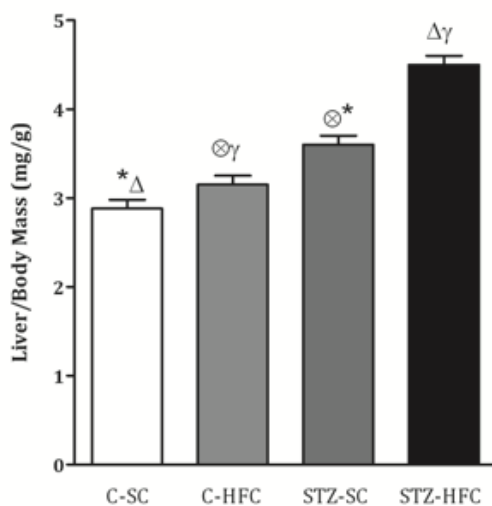


Fig. 4 - Relação massa hepática pela massa corporal (Liver/Body mass) (média e erro padrão da média). As diferenças foram testadas com ANOVA unidirecional e pós teste de Tukey. O mesmo símbolo sobre as barras significa diferença estatística ($P < 0,05$). Abreviações: SC: ração padrão, HFC: dieta com alto teor de gordura, C: ratos controle, STZ: ratos diabéticos por estreptozotocina.

Glicemia plasmática

Os animais STZ apresentaram maiores níveis de glicose no sangue do que os seus controles. Portanto, a glicemia foi 350% maior em STZ-SC do que no grupo C-SC ($P < 0,0002$, One Way ANOVA) e 250% maior em STZ-HFC do que o grupo C-HFC ($P < 0,0003$, One Way ANOVA). Além disso, houve interação entre a dieta de alto teor de gordura e a STZ nos níveis sanguíneos de glicose ($P < 0,005$, Two Way ANOVA) (Tabela 2).

Análise de lipídios plasmáticos

Colesterol total (TC)

Mais uma vez, STZ e HFC desempenharam um papel importante nos valores de TC. O grupo STZ-HFC apresentou níveis significativamente elevados de TC quando comparado ao grupo C-HFC (acima de 80%, $P < 0,0002$, One Way ANOVA) e ao grupo STZ-SC (acima de 140%, $P < 0,0002$, One Way ANOVA). Os valores de TC foram 40% maiores no grupo C-HFC do que no grupo C-SC ($P < 0,01$, One Way ANOVA). Além disso, houve interação entre a dieta com alto teor de gordura e STZ nos níveis plasmáticos de colesterol total ($P < 0,000001$, Two Way ANOVA) (Tabela 2).

Triglicerídeos (TG)

Ambas as variáveis (STZ e HFC) tiveram impacto nos níveis de TG. O grupo STZ-HFC apresentou níveis significativamente elevados de TG quando comparado com o grupo C-HFC (acima de 400%, $P < 0,0002$, One Way ANOVA) e com grupo STZ-SC (acima de 200%, $P < 0,0002$, One-Way ANOVA). Além disso, houve interação entre a dieta com alto teor de gordura e STZ nos níveis plasmáticos de triglicerídeos ($P < 0,000006$, Two-Way ANOVA) (Tabela 2).

Análise das enzimas hepáticas

Para analisar a função hepática em animais que receberam STZ e dieta com alto teor de gordura, avaliamos os níveis de ALP, GGT, GOT e GPT plasmáticos (Tabela 2).

Fosfatase alcalina (ALP)

Os animais STZ apresentaram maior nível de ALP plasmática do que os animais controle correspondentes. Conseqüentemente, o nível plasmático de ALP foi 380% maior em STZ-SC do que no grupo C-SC ($P < 0,0002$, One-Way ANOVA) e foi 230% maior em STZ-HFC do que o grupo C-HFC ($P < 0,0002$, ONE-WAY ANOVA).

Gama-glutamil transpeptidase (GGT)

Não houve diferença significativa entre os grupos quanto aos valores de GGT.

Glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT)

Não houve diferença significativa entre os grupos quanto aos valores GOT.

Glutamato-piruvato-transaminase (GPT)

Os animais STZ apresentaram maior nível de GPT plasmático do que os animais controle correspondentes. Assim, o nível de GPT foi 100% maior no STZ-SC do que no grupo C-SC ($P < 0,05$, One-Way ANOVA) e 75% maior no grupo STZ-HFC do que no grupo C-HFC ($P < 0,005$ One-Way ANOVA). Além disso, este parâmetro foi 60% maior no STZ-HFC do que no grupo STZ-SC ($P < 0,01$, One-Way ANOVA).

Table 2. Dados Bioquímicos (média ± EPM). Abreviações: TC- colesterol Total, TG- Triglicerídeos, ALP- Fosfatase alcalina, GOT- Glutamato-oxaloacetato transaminase, GTP- Glutamato-piruvato transaminase, GGT- Gamma-glutamil transpeptidase, Grupos: C- controle, STZ- streptozotocina, SC- ração comercial HFC- ração rica em gordura. * Diferenças significantes do grupo C-SC; † do grupo C-HFC; ‡ do grupo STZ-SC.

Grupos	Glucose (mmol/l)	TC (mmol/l)	TG (mmol/l)	ALP (U/l)	GOT (U/l)	GTP (U/l)	GGT (U/l)
C-SC	4,9±0,2	1,5±0,09	0,30±0,03	130,0±9,4	75,6±3,4	36,4±4,0	2,4±0,4
C-HFC	5,5±0,2	2,1±0,11*	0,20±0,02	212,9±6,3	99,8±14,1	65,8±6,2	2,3±0,3
STZ-SC	21,4±2,1*	1,6±0,12	0,30±0,03	622,1±24,7*	92,6±11,7	71,6±7,5*	2,4±0,4
STZ-HFC	19,6±1,6†	3,8±0,12‡‡	1,00±0,10‡‡	699,9±45,3‡	62,4±2,4	115,0±13,5‡‡	3,3±0,7
two-way ANOVA							
<u>Streptozotocina</u>	<i>P</i> <0,000001	<i>P</i> <0,000001	<i>P</i> <0,000007	<i>P</i> <0,000001	NS	<i>P</i> <0,0006	NS
<u>Dieta</u>	<i>P</i> <0,02	<i>P</i> <0,000001	<i>P</i> <0,00005	<i>P</i> <0,003	NS	<i>P</i> <0,0001	NS
<u>Interação: STZ x Dieta</u>	<i>P</i> <0,005	<i>P</i> <0,000001	<i>P</i> <0,000006	NS	NS	NS	NS

Estereologia

A dieta com alto teor de gordura e STZ aceleram o processo de esteatose hepática (Fig. 5). O grupo C-SC mostrou que o fígado apresentava uma estrutura preservada, enquanto o grupo C-HFC mostrou uma moderada macro e micro-esteatose dispersa no fígado. Os animais do grupo STZ-SC, apresentaram micro-esteatose menor, enquanto que os animais do grupo STZ-HFC apresentaram esteatose macro e microvesicular grave no fígado.

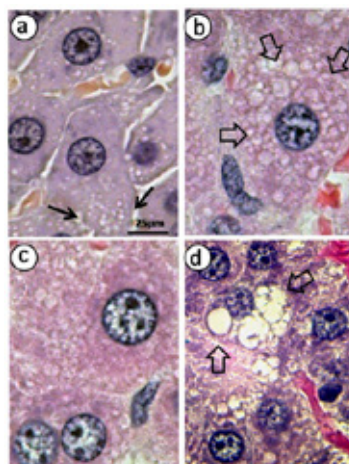


Fig. 5 - Estrutura hepática nos diferentes grupos (corado com hematoxilina-eosina): (a) grupo C-SC, esteatose microvesicular leve (seta fina); (b) grupo C-HFC, macro leve (seta grande) e esteatose microvesicular; (c) grupo STZ-SC, esteatose microvesicular leve; (d) grupo STZ-HFC, esteatose macrovesicular grave (seta larga) e esteatose microvesicular.

A avaliação estereológica da infiltração de lipídios no fígado mostrou uma aumentada densidade de volume da esteatose ocasionada pelo aumento da gordura: mais de 1500% no grupo C-HFC (P = 0,0005, One-Way ANOVA) e 40% no grupo STZ-HFC (P = 0,0005, One-Way ANOVA) em relação ao grupo C-SC. Os ratos STZ alimentados com dieta padrão apresentaram infiltração leve de lipídios no fígado. A densidade de volume da esteatose foi aumentada no grupo STZ-SC quando comparado com o grupo C-SC (mais de 140%, P = 0,05, One-Way ANOVA) (Fig. 6). Além disso, a densidade de volume da esteatose foi 400% maior no STZ-HFC do que no grupo STZ-SC (P <0,005, One-Way ANOVA). A dieta com alto teor de gordura e STZ interagiram para amplificar a esteatose hepática (P <0,001, Two-Way ANOVA).

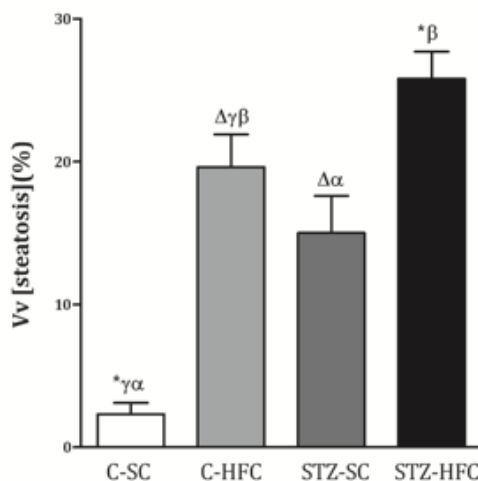


Fig. 6 - Densidade do volume da esteatose hepática (média e erro padrão da média). As diferenças foram testadas com ANOVA unidirecional e pós teste de Tukey. O mesmo símbolo sobre as barras significa diferença estatística (P <0,05). Abreviações: SC: ração normal, HFC: dieta com alto teor de gordura, C: ratos controle, STZ: ratos diabéticos por estreptozotocina.

O número de hepatócitos não apresentou diferença relevante entre os grupos (P <0,05, ANOVA unidirecional) (Fig. 7), mas a taxa de binucleação dos hepatócitos foi significativamente menor no STZ-HFC do que no grupo C-HFC (menos 30% , P <0,05, ANOVA unidirecional) e tanto a dieta com alto teor de gordura quanto a STZ interagiram, alterando este parâmetro (P <0,01, ANOVA bidirecional).

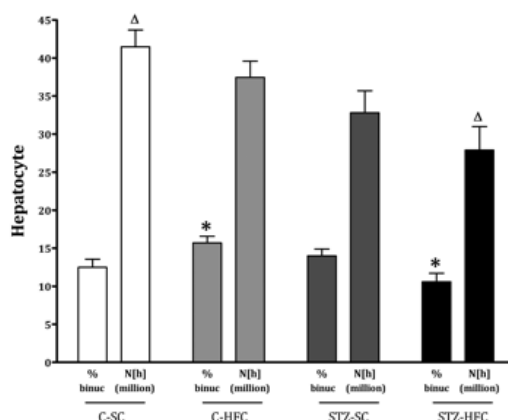


Fig. 7 - Número de hepatócitos e binucleação da taxa de hepatócitos (média e erro padrão da média). As diferenças foram testadas com ANOVA unidirecional e pós teste de Tukey. O mesmo símbolo sobre as barras significa diferença estatística (P <0,05). Abreviações: SC: ração padrão, HFC: dieta com alto teor de gordura, C: ratos controle, STZ: ratos diabéticos por estreptozotocina.

Discussão

A dieta com alto teor de gordura aumenta a massa corporal, relação de massa de gordura por massa corporal e esteatose hepática em ratos. Conseqüentemente, os animais STZ mostraram aumento da massa hepática na relação massa corporal com altos níveis de enzimas hepáticas e esteatose hepática. A combinação da administração de STZ e de dieta com alto teor de gordura agravou a relação massa hepática por massa corporal e a esteatose hepática.

A administração de STZ provocou mobilização de gordura no músculo esquelético (Stearns, Tepperman et al., 1979) induzindo perda de peso (Carpentier, Perrelet et al., 1977), com menor massa de gordura (Wilson, Zeikus et al., 1987) que foi observada no presente estudo. Além disso, os ratos hiperglicêmicos induzidos por STZ são caracterizados por níveis baixos de insulina plasmática e atividade lipoproteica de baixa lipase. Portanto, baixos níveis de insulina causam altos níveis de TG plasmática e níveis de ácidos graxos livres que levam ao fígado gorduroso, que são fatores principais para o desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica (Kusunoki, Tsutsumi et al., 2004; Cusi 2009; Wang, Kamat et al., 2011).

Além disso, a hiperglicemia induziu aumento dos níveis lipídicos no sangue de animais STZ alimentados com dieta com alto teor de gordura. A associação da administração de STZ e a ingestão desta dieta prejudicaram os níveis sanguíneos de colesterol total e triglicérides devido à competição entre ácidos graxos e metabolismo da glicose (Kreisberg 1998; Randle 1998; Wang, Kamat et al., 2011), explicando os níveis mais altos do colesterol total encontrado em ratos STZ alimentados com dieta com alto teor de gordura. Então, podemos especular que as taxas aumentadas de produção de glicose hepática em ratos alimentados com dieta com alto teor de gordura por inibição da gliconeogênese, promoveriam a lipogênese hepática e prejudicariam a oxidação de ácidos graxos, como sugerido no estudo em humanos (Semple, Sleigh et al., 2009).

A administração isolada de STZ ocasionou aumento em algumas enzimas hepáticas. A ALP é uma ectoenzima da membrana plasmática de hepatócitos e o aumento da atividade sérica de ALP tem sido relacionado ao dano à membrana celular do fígado (Kaplan, 1986). No presente estudo, o ALP foi elevada em ratos tratados com STZ, mas a GGT permaneceu inalterada. Para entender esses dados aparentemente conflitantes, é importante pensar que em ratos, de forma semelhante aos humanos, intestino, tecidos não específicos (incluindo isoformas provenientes dos ossos, fígado e rins), placenta e células embrionárias também apresentam a isoenzima ALP (Goldstein, Rogers et al., 1980). Estudos sobre as propriedades da ALP no soro de ratos revelaram duas formas dominantes da enzima: intestinal (I-ALP) e no osso (B-ALP) (Koyama, Yakushiji et al., 1998). Além disso, a atividade isoenzimática intestinal é maior em ratos jovens do que em ratos adultos (Hoffmann, Everds et al., 1994) e a atividade de ALP no intestino e as alterações no soro é dependente das condições da ingestão alimentar. A atividade da fosfatase alcalina no intestino é reforçada por uma dieta com alto teor de gordura (Wada, Yagami et al., 2001).

O GPT é uma enzima citosólica do hepatócito e o aumento desta enzima no soro reflete o aumento da permeabilidade da membrana plasmática, que, por sua vez, está associado à morte celular (Muriel, 1982). No presente estudo, a GTP aumentou em ratos tratados com STZ, que é um composto de glucosamina-nitrosourea tóxico para as células, causando danos ao DNA, embora outros mecanismos também possam contribuir. O STZ é semelhante à glicose e pode ser transportado para a célula pela proteína transportadora de glicose GLUT2, mas não é reconhecido por outros transportadores de glicose. Isso explica sua toxicidade relativa para as células beta, uma vez que estas células possuem níveis relativamente elevados de GLUT2 (Wang e Gleichmann, 1998).

A esteatose hepática não alcoólica é a manifestação hepática da síndrome metabólica e cerca de 25% da população mundial já foi vítima desta doença (Bellentani, Saccoccio et al., 2000; Brunt, 2004). Ainda que a esteatose hepática não alcoólica comece como um processo benigno, torna o fígado mais suscetível a um amplo espectro de danos histológicos. De fato, sua progressão leva a condições de estágio final, como cirrose, carcinoma hepatocelular e insuficiência hepática (Bayard, Holt et al., 2006). No entanto, como característica da síndrome metabólica, a esteatose tem sido mais implicada no agravamento do metabolismo da glicose (Marceau, Biron et al., 1999). O significado clínico da esteatose geralmente é um processo benigno. Os subconjuntos de pacientes, no entanto, continuam a desenvolver a esteatohepatite, que então progride para fibrose, cirrose e insuficiência hepática (Van Steenberghe e Lanckmans 1995; Paradis, Perlemuter et al., 2001). Apenas uma dieta com alto teor de gordura foi considerada como suficiente para causar esteatose (Aguila, Pinheiro et al., 2003). A duração da dieta com alto teor de gordura no presente estudo baseou-se na observação de que duas semanas dessa dieta é suficiente para causar um acúmulo substancial de gordura dentro do fígado que é compatível com o desenvolvimento de um estado de esteatose hepática (Charbonneau 2007).

Neste estudo, a STZ causou esteatose hepática que foi agravada quando combinada com a dieta com alto teor de gordura. A ingestão dessa dieta pode acelerar o acúmulo de gordura no fígado e os ácidos graxos saturados presentes na dieta pode intensificar o acúmulo de gordura no hepatócito (Wang, Wei et al., 2006). Além disso, o alto teor de ácido graxo trans na dieta com alto teor de gordura também está ligado ao depósito de gordura hepática, dado que estes tipos de ácidos graxos exibem taxas de oxidação mais lenta (Guzman, Klein et al., 1999; Colandré, Diez et al. 2003). Como resultado, aumentam a taxa de esterificação/oxidação de ácidos graxos (Milagro, Campion et al., 2006), que juntamente com a hiperglicemia pode aumentar a esteatose hepática.

A interação entre dieta com alto teor de gordura e tratamento com STZ no desenvolvimento de esteatose hepática já foi demonstrada. Em estudo de Kumar Sharma et al. (Sharma, Bharti et al., 2011) ratos tratados com STZ diabéticos e com dieta rica em gordura mostraram um aumento significativo nos ácidos graxos não essenciais no fígado, nos triglicerídeos e no colesterol total em comparação aos ratos controle com dieta rica em gordura. Além disso, essa dislipidemia aumentada em ratos diabéticos também foi associada à esteatose hepática microvesicular, inchaço do retículo endoplasmático e mitocôndrias nos hepatócitos.

Os hepatócitos binucleados e menos frequentemente trinucleados aparecem em fígados humanos e de animais em condições normais, bem como em casos patológicos (David 1992). A poliploidização nos hepatócitos tem sido associada a muitos processos fisiológicos e patológicos, como a proliferação, metabolismo, regeneração, envelhecimento e câncer. A poliploidização de hepatócitos pode também ser um mecanismo protetor contra o estresse oxidativo que ocorre através de um processo controlado ao longo do crescimento e envelhecimento, onde a binucleação é importante (Lu 2007). Curiosamente, observamos pouca binucleação de hepatócitos em ratos simultaneamente tratados por STZ e com dieta com alto teor de gordura.

Além disso, os dados atuais mostraram que a dieta com alto teor de gordura causou um aumento significativo na gordura do fígado que não foi acompanhada por um aumento equivalente na massa do fígado em relação a massa corporal. Neste caso, a massa corporal foi significativamente aumentada pela dieta com alto teor de gordura e a razão massa do fígado pela massa corporal permaneceu constante porque a massa hepática foi normalizada pela massa corporal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos achados nos permitem concluir que a dieta com alto teor de gordura leva a esteatose hepática macro e microvesicular severa tanto no controle quanto nos ratos STZ. Mas a combinação de STZ e da dieta afeta ainda mais o ganho de massa corporal, a razão massa do fígado pela massa corporal e a densidade do volume da esteatose hepática, indicando que a administração de STZ em combinação à dieta hiperlipídica têm propriedades adicionais no agravamento da lesão hepática.

REFERÊNCIAS

- Aguila, M. B., A. R. Pinheiro, et al. (2003). "Dietary effect of different high-fat diet on rat liver stereology." *Liver Int* 23(5): 363-70.
- Bayard, M., J. Holt, et al. (2006). "Nonalcoholic fatty liver disease." *Am Fam Physician* 73(11): 1961-8.
- Belfort, R., S. A. Harrison, et al. (2006). "A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis." *N Engl J Med* 355(22): 2297-307.
- Bellentani, S., G. Saccoccio, et al. (2000). "Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy." *Ann Intern Med* 132: 112-117.
- Browning, J. D. and J. D. Horton (2004). "Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury." *J Clin Invest* 114(2): 147-52.
- Brunt, E. M. (2004). "Nonalcoholic steatohepatitis." *Semin Liver Dis* 24(1): 3-20.
- Bugianesi, E., R. Marzocchi, et al. (2004). "Non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH): treatment." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18(6): 1105-16.
- Bugianesi, E., C. Zannoni, et al. (2004). "Non-alcoholic fatty liver and insulin resistance: a cause-effect relationship?" *Dig Liver Dis* 36(3): 165-73.
- Carpentier, J., A. Perrelet, et al. (1977). "Morphological changes of the adipose cell plasma membrane during lipolysis." *J Cell Biol* 72(1): 104-17.
- Charbonneau, A., Unson, C. G., Lavoie, J. M. (2007). "High-fat diet-induced hepatic steatosis reduces glucagon receptor content in rat hepatocytes: potential interaction with acute exercise." *J Physiol* 579(Pt 1): 255-67.
- Chitturi, S., S. Abeygunasekera, et al. (2002). "NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome." *Hepatology* 35(2): 373-9.
- Colandré, M., R. Diez, et al. (2003). "Metabolic effects of trans fatty acids on an experimental dietary model." *Br J Nutr* 89: 631-638.
- Cusi, K. (2009). "Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis." *Clin Liver Dis* 13(4): 545-63.
- David, H., Uerlings, I (1992). "Nuclear ultrastructure of binuclear and trinuclear hepatocytes." *Zentralbl Pathol* 138: 331-338.

- DeFronzo, R. A. and E. Ferrannini (1991). "Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease." *Diabetes Care* 14(3): 173-94.
- den Boer, M., P. J. Voshol, et al. (2004). "Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(4): 644-9.
- Franzen, L. E., M. Ekstedt, et al. (2005). "Semiquantitative evaluation overestimates the degree of steatosis in liver biopsies: a comparison to stereological point counting." *Mod Pathol* 18(7): 912-6.
- Gastaldelli A, C. K., Pettiti M, et al. (2007). "Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. ." *Gastroenterology* 133: 496-506.
- Goldstein, D. J., C. E. Rogers, et al. (1980). "Expression of alkaline phosphatase loci in mammalian tissues." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(5): 2857-60.
- Guzman, M., W. Klein, et al. (1999). "Metabolism of trans fatty acids by hepatocytes." *Lipids* 34(4): 381-6.
- Hoffmann, W. E., N. Everds, et al. (1994). "Automated and semiautomated analysis of rat alkaline phosphatase isoenzymes." *Toxicol Pathol* 22(6): 633-8.
- Kaplan, M. M. (1986). "Serum alkaline phosphatase, another piece is added to the puzzle." *Hepatology* 6(3): 226-228.
- Korenblat, K. M., E. Fabbrini, et al. (2008). "Liver, muscle, and adipose tissue insulin action is directly related to intrahepatic triglyceride content in obese subjects." *Gastroenterology* 134(5): 1369-75.
- Koteish, A. and A. M. Diehl (2001). "Animal models of steatosis." *Semin Liver Dis* 21(1): 89-104.
- Kotronen A, J. L., Tiikkainen M, et al (2008). "Increased liver fat, impaired insulin clearance, and hepatic and adipose tissue insulin resistance in type 2 diabetes. ." *Gastroenterology* 135: 122-30.
- Koyama, I., M. Yakushijin, et al. (1998). "Reduced alkaline phosphatase activity in diabetic rat bone: a re-evaluation." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 121(4): 417-23.
- Kreisberg, R. A. (1998). "Diabetic dyslipidemia." *Am J Cardiol* 82(12A): 67U-73U; discussion 85U-86U.
- Kusunoki, M., K. Tsutsumi, et al. (2004). "Lipoprotein lipase activator NO-1886 improves fatty liver caused by high-fat feeding in streptozotocin-induced diabetic rats." *Metabolism* 53(2): 260-3.
- Lu, P., Prost, S, Caldwell, H, Tugwood, JD, Betton, GR, Harrison, DJ. (2007). "Microarray analysis of gene expression of mouse hepatocytes of different ploidy." *Mamm Genome* 18(9): 617-26.
- Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2003). "Stereological tools in biomedical research." *An Acad Bras Cienc* 75(4): 469-86.
- Marceau, P., S. Biron, et al. (1999). "Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity." *J Clin Endocrinol Metab* 84(5): 1513-7.
- Milagro, F. I., J. Campion, et al. (2006). "Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress." *Obesity (Silver Spring)* 14(7): 1118-23.

- Muriel, P. (1982). "Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumulation, and liver damage induced by carbon tetrachloride." *Biochim Pharmacology* 56: 775-779.
- Paradis, V., G. Perlemuter, et al. (2001). "High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis." *Hepatology* 34(4 Pt 1): 738-44.
- Parente, L. B., M. B. Aguila, et al. (2008). "Deleterious effects of high-fat diet on perinatal and postweaning periods in adult rat offspring." *Clin Nutr* 27(4): 623-34.
- Randle, P. J. (1998). "Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years." *Diabetes Metab Rev* 14(4): 263-83.
- Reed, M. J., K. Meszaros, et al. (2000). "A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat." *Metabolism* 49(11): 1390-4.
- Rerup, C. C. (1970). "Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells." *Pharmacol Rev* 22(4): 485-518.
- Semple, R. K., A. Sleight, et al. (2009). "Postreceptor insulin resistance contributes to human dyslipidemia and hepatic steatosis." *J Clin Invest* 119(2): 315-22.
- Sharma, A. K., S. Bharti, et al. (2011). "Up-regulation of PPARgamma, heat shock protein-27 and -72 by naringin attenuates insulin resistance, beta-cell dysfunction, hepatic steatosis and kidney damage in a rat model of type 2 diabetes." *Br J Nutr* 106(11): 1713-23.
- Souza-Mello, V., C. A. Mandarim-de-Lacerda, et al. (2007). "Hepatic structural alteration in adult programmed offspring (severe maternal protein restriction) is aggravated by post-weaning high-fat diet." *Br J Nutr* 98(6): 1159-69.
- Stearns, S. B., H. M. Tepperman, et al. (1979). "Studies on the utilization and mobilization of lipid in skeletal muscles from streptozotocin-diabetic and control rats." *J Lipid Res* 20(5): 654-62.
- Sterio, D. C. (1984). "The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector." *J Microsc* 134(2): 127-36.
- Storlien, L. H., J. A. Higgins, et al. (2000). "Diet composition and insulin action in animal models." *Br J Nutr* 83 Suppl 1: S85-90.
- Szkudelski, T. (2001). "The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas." *Physiol Res* 50(6): 537-46.
- Van Steenbergen, W. and S. Lanckmans (1995). "Liver disturbances in obesity and diabetes mellitus." *Int J Obes Relat Metab Disord* 19 Suppl 3: S27-36.
- Wada, H., I. Yagami, et al. (2001). "Distribution and properties of rat intestinal alkaline phosphatase isoenzymes." *Exp Anim* 50(2): 153-8.
- Wang, D., Y. Wei, et al. (2006). "Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis." *Endocrinology* 147(2): 943-951.
- Wang, S., A. Kamat, et al. (2011). "Metabolic factors in the development of hepatic steatosis and altered mitochondrial gene expression in vivo." *Metabolism* 60(8): 1090-9.

Wang, Z. and H. Gleichmann (1998). "GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice." *Diabetes* 47(1): 50-6.

Weibel, E. R. (1979). *Stereological Methods. Practical methods for biological morphometry*. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, Academic Press.

Wilson, D. E., R. Zeikus, et al. (1987). "Relationship of organ lipoprotein lipase activity and ketonuria to hypertriglyceridemia in starved and streptozocin-induced diabetic rats." *Diabetes* 36(4): 485-90

AGRADECIMENTO

Este trabalho foi financiado pelas agências CNPq (Conselho Brasileiro de Ciência e Tecnologia, <http://www.cnpq.br>) e FAPERJ (Fundação do Estado do Rio de Janeiro para Pesquisa Científica, <http://www.faperj.br>). Os autores revelam que não têm interesse financeiro ou patrocinador comercial para este trabalho. Os autores agradecem a Sra. Thatiany Marinho pela assistência técnica.



FACULDADES
SÃO JOSÉ

www.saojose.br | (21) 3107-8600
Av. Santa Cruz, 580 - Realengo - Rio de Janeiro