

Caracterização da esteatose hepática não alcoólica induzida por dieta hipoprotéica em ratos

Characterization of nonalcoholic fatty liver disease in rats for low protein diet induced

Gabriela S. F. Castro, Mirele S. Mialich, Eloisa M. Anjos, Lillian P. Almeida, Paula F. Arroyo, Guilherme V. Portari, Alceu A. Jordao Jr

RESUMO

Modelo de estudo: Estudo experimental. **Objetivos:** este estudo teve como objetivo avaliar e caracterizar a dieta hipoprotéica como um modelo experimental para estudo de EHNA. **Métodos:** foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* divididos em dois grupos com dietas isocalóricas: controle (GC) no qual a dieta utilizada seguiu o preconizado pela AIN-93 e hipoprotéico (GH) com quantidade de proteína reduzida de 20% para 10%. As dietas e água foram ofertadas *ad libitum* por quatro semanas. Após esse período, os animais foram sacrificados e analisados: glicemia; nitrogênio urinário; proteína sérica; gordura hepática; colesterol; variação de peso e quantidade de ração consumida. **Resultados:** glicemia e nitrogênio urinário não apresentaram diferenças significativas entre GC e GH ($p > 0,05$), a variação de peso no último dia do experimento foi significativa ($p < 0,02$). A porcentagem de gordura hepática foi estatisticamente maior no GH, quando comparado ao GC ($p < 0,04$). Foram menores o nível de colesterol ($p < 0,01$) e proteína sérica ($p < 0,005$) no GH. A quantidade de dieta consumida não foi diferente entre os grupos, considerando-se as médias de ingestão semanal. **Conclusões:** neste trabalho a dieta hipoprotéica constitui um modelo de indução de EHNA que pode ser caracterizada pela diminuição da proteína sérica e do colesterol plasmático e aumento da gordura hepática, entretanto não ocorreram alterações na glicemia sugerindo que não existiu mudança na sensibilidade à insulina, constituindo assim um modelo falho para estudar um dos principais fatores de risco para o estabelecimento da EHNA, a resistência à insulina.

Palavras-chave: Esteatose Hepática. Dieta com Restrição de Proteínas. Ratos.

Introdução

A subnutrição protéica é reconhecida como um problema mundial que afeta, principalmente, gestan-

tes e crianças. Quando esta ocorre na infância pode haver comprometimento da taxa de crescimento e gerar alterações comportamentais e de aprendizado¹. Filiputti et al. (2008)² demonstraram que ratos alimen-

Curso de Nutrição e Metabolismo, Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP.

Correspondência:
Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Jr.
Curso de Nutrição e Metabolismo.
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP.
Av. Bandeirantes, 3900,
14049-900, Ribeirão Preto/SP.

Artigo recebido em 24/03/2008
Aprovado para publicação em 26/01/2009

tados com baixa quantidade protéica (6%) apresentaram baixo peso, baixa quantidade de albumina e insulina plasmática, alta gordura e glicogênio hepáticos.

Um efeito da dieta hipoprotéica já estabelecido é o aumento da gordura corporal. Ratos em crescimento tendem a aumentar o seu consumo para adequar a sua ingestão ao seu requerimento protéico, exigido para a formação de tecidos magros³.

Na ausência de doença ou trauma, a deficiência protéica aumenta os níveis de glicocorticóides por ativar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, as alterações hormonais levam a uma diminuição do apetite⁴.

Também a menor ingestão protéica parece causar o aumento de homocisteína sérica no plasma de ratos, como demonstrado em um estudo de Okawa et al. (2006)⁵, o qual discorda de outros dados reportados por Stead et al. (2000)⁶, que verificaram que o aumento de homocisteína está ligado a uma maior ingestão protéica, já Smolin et al. (1984)⁷ reportaram que a concentração de homocisteína não apresentou diferenças entre animais alimentados com 10% ou 60% de caseína. A suplementação de creatina isoladamente demonstrou ser outro fator que pode elevar a homocisteína sérica⁸. Estes dados conflitantes evidenciam que ainda não há na literatura concordância sobre a influência protéica nos níveis de homocisteína, um reconhecido fator de risco para doenças cardiovasculares.

A deficiência protéica pode constituir um modelo indutor de esteatose hepática não alcoólica (EHNA) por meio de dieta, que atualmente apresenta diversas outras formas de indução em modelos experimentais, tais como a deficiência de colina e metionina⁹, dieta rica em gordura^{10, 11} e rica em carboidratos simples, dentre outros. Sabe-se que a deficiência protéica é um causador de esteatose hepática¹². A EHNA apresenta relevância em saúde pública devido a sua alta prevalência¹³.

A EHNA caracteriza-se por um acúmulo de lipídios no fígado, primeiramente na forma de triacilgliceróis, sem a ingestão de quantidades significativas de álcool e com a exclusão de outras causas conhecidas de esteatose, como algumas drogas e toxinas¹². Pode ser definida como um excesso de gordura hepática, na qual o fígado possui ao menos 5% dos hepatócitos com gotas lipídicas que excedem de 5 a 10% o peso do órgão em pacientes que não consomem quantidades significativas de álcool¹⁴.

Sua patogênese está fortemente associada à resistência a insulina, tanto hepática quanto de adipócitos. A alta insulinemia é um denominador comum

para os componentes da Síndrome Metabólica e a EHNA pode ser uma manifestação hepática dessa síndrome que é definida com a presença de 3 ou mais das seguintes manifestações: hipertrigliceridemia, hipertensão, alta glicemia de jejum, baixos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e aumento da circunferência da cintura.¹⁵

Este trabalho tem como objetivo principal provocar a desnutrição protéica em ratos e caracterizar algumas de suas consequências ao metabolismo, principalmente hepático, descrevendo assim um modelo de estudo para esteatose hepática.

Métodos

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, recém-desmamados, com peso médio de 58 gramas e provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Os animais foram transferidos ao Biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP, onde permaneceram durante todo o estudo. Os grupos experimentais foram divididos em:

- Grupo Controle (n=6): ratos que receberam água *ad libitum* e dieta padrão segundo AIN-93 (American Institute of Nutrition, 1993)¹⁶.
- Grupo hipoprotéico (n=7): ratos que receberam água *ad libitum* e dieta baseada na AIN-93 e com restrição protéica.

As dietas foram ofertadas durante quatro semanas e após esse período os animais foram sacrificados. A dieta do grupo controle seguiu a recomendação da AIN-93 com caseína 20% e carboidrato 63,5%, já a dieta pobre em proteína continha caseína 10% e carboidrato 73,5%. As quantidades dos componentes das dietas estão especificadas na Tabela 1. Os ratos foram acomodados em gaiolas individuais com ciclo claro-escuro de 12 horas, com iluminação artificial, e temperatura média de 25° C.

A ingestão foi controlada por meio de pesagem regular de comedouros a cada dois dias e o mesmo realizado com os animais. Ao final de 28 dias os animais foram sacrificados por decapitação após jejum de 12 horas. Em seguida, foi coletada uma amostra de sangue, que foi submetida à centrifugação (3500 rpm por 10 min) para separação do soro que foi congelado. Foram retirados também os fígados que, após pesagem, foram congelados em nitrogênio líquido (-196° C).

Tabela 1
Composição das dietas por kg

| Ingredientes | Controle | Hipoprotéico |
|--------------------------|----------|--------------|
| Caseína (g) | 200,00 | 100,00 |
| Amido (g) | 530,50 | 630,50 |
| Sacarose (g) | 100,00 | 100,00 |
| Óleo de Soja (g) | 70,00 | 70,00 |
| Fibra (g) | 50,00 | 50,00 |
| Minerais (g) | 35,00 | 35,00 |
| Vitaminas (g) | 10,00 | 10,00 |
| L-cistina (g) | 3,00 | 3,00 |
| Colina (g) | 2,50 | 2,50 |
| Butil hidróxitolueno (g) | 0,02 | 0,02 |
| Energia (kcal) | 3952 | 3952 |

Este estudo teve como finalidade a dosagem de parâmetros bioquímicos em ratos alimentados com dietas hipoprotéicas para verificar suas consequências metabólicas e causadoras de esteatose hepática. Para tanto, ele foi delineado através da comparação entre um grupo de ratos com dieta controle e um grupo com carência de 50% do recomendado de proteína.

Dosagens bioquímicas

As dosagens de proteína, glicemia e colesterol séricos foram realizadas por meio de kits comerciais (Labtest Diagnóstica S.A., Brazil). O nitrogênio urinário foi dosado através do método micro-Kjeldahl, e a gordura hepática foi determinada por extração contínua em aparelho Soxhlet, ambos segundo AOAC (Association of Analytical Communities).¹⁷

As variáveis são apresentadas como média mais ou menos o desvio padrão. As comparações entre os grupos foram feitas com base nas análises estatísticas obtidas pelo teste T não pareado com correção de Welch e foram consideradas as diferenças com $p < 0,05$.

Resultados

Quanto à evolução ponderal dos animais, a média de peso ao final do período experimental de 28 dias do grupo que recebeu dieta hipoprotéica foi

significativamente menor que a do grupo controle (Tabela 2), enquanto o consumo de dieta mostrou diferença estatisticamente significativa na última semana do experimento com o grupo hipoprotéico consumindo menor quantidade (Figura 1).

Tabela 2
Médias de pesos inicial e final dos grupos em gramas do primeiro e último dia de experimento

| | Grupos | |
|-----------------|-----------------|----------------|
| | Controle | Hipoprotéico |
| Peso inicial(g) | 57,50 ± 3,08 | 59,00 ± 3,32 |
| Peso Final(g) | 146,33 ± 13,32* | 97,43 ± 18,17* |

* significa $p < 0,02$ entre os grupos Controle e Hipoprotéico quanto ao peso final.

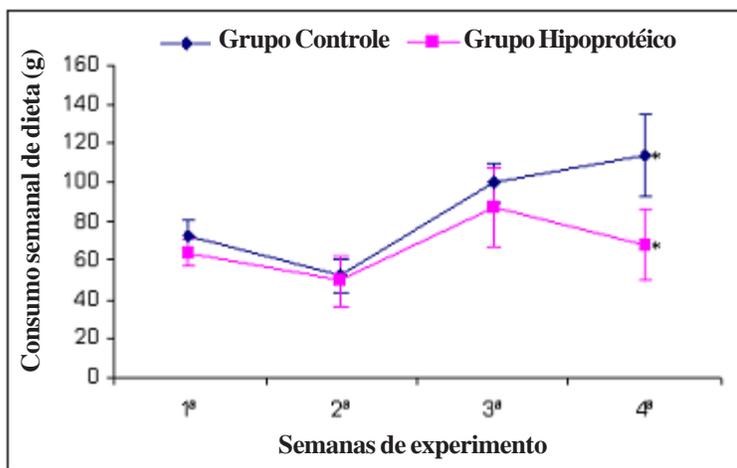


Figura 1: Média de consumo semanal de dieta.
* significa $p < 0,05$ entre os grupos na 4ª semana.

O conteúdo lipídico hepático, expresso em mg de lipídios/100 mg de fígado, está representado na Figura 2. Observa-se que no grupo hipoprotéico foi mais elevado quando comparado com o grupo controle ($41,08 \pm 11,54$ mg/100 mg e $28,92 \pm 11,21$ mg/100 mg, respectivamente).

A Tabela 3 traz os valores das variáveis bioquímicas. Em relação a concentração do colesterol sérico, nota-se que as concentrações são menores nos animais que receberam dieta hipoprotéica quando comparadas à do grupo controle ($91,29 \pm 12,18$ mg/dL e $116,12 \pm 19,96$ mg/dL, respectivamente).

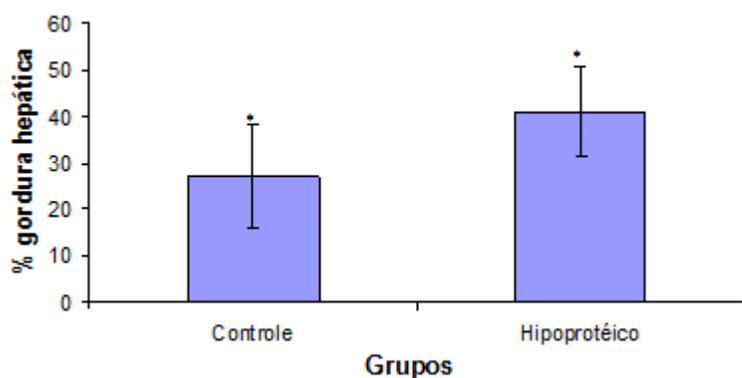


Figura 2: Porcentagem de gordura hepática.
* significa $p < 0,05$.

Tabela 3
Variáveis bioquímicas avaliadas

| | Grupos | |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|
| | Controle | Hipoprotéico |
| Colesterol sérico (mg/dL) | 116,10 ± 20,00* | 91,30 ± 12,20 * |
| Glicemia (mg/dL) | 95,50 ± 20,00 | 84,60 ± 31,20 |
| Proteína sérica (g/dL) | 4,97 ± 0,38 * | 4,27 ± 0,04 * |
| Nitrogênio urinário (mg/dL) | 889,40 ± 489,90 | 548,70 ± 345,40 |

* $p < 0,05$

Em relação à proteína sérica (Tabela 3) o grupo controle obteve valor significativamente maior ($p < 0,0064$) do que os ratos do grupo hipoprotéico ($4,97 \pm 0,38$ g/dL e $4,27 \pm 0,04$ g/dL, respectivamente).

Não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo hipoprotéico quanto aos valores de glicemia ($95,47 \pm 20,03$ mg/dl e $84,63 \pm 31,17$ mg/dl, respectivamente) e nitrogênio urinário ($889,35 \pm 489,89$ mg/dl e $548,86 \pm 345,43$ mg/dl, respectivamente), como pode ser visualizado na Tabela 3.

Discussão

Todos os animais encontravam-se em fase de crescimento, dessa forma era esperado um ganho de peso o qual ficou evidenciado neste estudo. No entanto, os animais do grupo que recebeu dieta hipoprotéica tiveram um ganho de peso menor do que os que receberam dieta controle, devido ao baixo aporte protéico

essencial para a formação dos tecidos e manutenção das funções normais. Em um clássico estudo publicado em 1977, Heard et al. (1977)¹⁸ avaliaram em ratos jovens os efeitos de dieta pobre em proteínas. O trabalho encontrou baixa concentração de hemoglobina e proteínas séricas, acúmulo de gordura no fígado, além de valores diminuídos de glicose-6-fosfatase e alanina aminotransferase no músculo e fígado; a quantidade de insulina plasmática estava diminuída nesses animais, entretanto não houve alteração da glicemia. No presente estudo, a glicemia também não foi diferente entre os grupos.

A gordura hepática foi significativamente maior no grupo que recebeu dieta hipoprotéica. Esse acúmulo de gordura pode ser explicado pela lipólise prejudicada e produção reduzida de lipoproteína carreadora. Em um estudo com dieta hipoprotéica comparada a dietas suplementadas em metionina e cisteína o acúmulo de gordura hepática não demonstrou estar ligado a esses aminoácidos e sim a um controle endócrino, gerando maior produção hepática de gorduras e menor utilização destas com consequente acúmulo hepático¹⁵.

A dosagem de proteína sérica (PS) esteve diminuída no grupo hipoprotéico. Ferreira et al. (2007)¹⁹ encontraram menores quantidades de albumina e proteínas totais no plasma de ratos com dieta hipoprotéica. A menor concentração de PS reflete a adaptação orgânica dos animais a restrição dietética.

A dieta hipoprotéica administrada apresentou como resultados diferenças na porcentagem de gordura hepática, proteínas séricas e colesterol quando comparadas com o grupo controle.

Isso ocorre, pois as proteínas constituem lipoproteínas, responsáveis pelo transporte de ácidos graxos no sangue e a retirada destes do fígado. Dessa forma, o principal indício causador de EHNA nos animais estudados foi à diminuição de proteínas carreadoras e consequente acúmulo de triglicérides e colesterol em hepatócitos.

As proteínas séricas podem refletir o nível de adequação de ingestão protéica. Assim, a baixa concentração dessas proteínas no grupo experimental confirma os resultados já esperados.

A diminuição da ingestão protéica foi acompanhada por uma menor excreção de nitrogênio urinário, mas sem diferenças estatísticas entre os grupos.

Em seu estudo com dietas baixas em proteína e suplementação de ácidos graxos poliinsaturados, Andreoli et al. (2007)¹ verificaram que o nitrogênio urinário não se modificou. Os animais apresentaram mudanças adaptativas gerando um aumento na proporção do aproveitamento de nitrogênio para ressíntese de proteínas e também diminuição do catabolismo de aminoácidos, diminuindo assim a excreção urinária de nitrogênio.

Conclusão

Este trabalho caracterizou um modelo experimental de esteatose hepática utilizado em diversos estudos. As diferenças na PS, colesterol e gordura hepática permitiram constatar a presença de EHNA.

Contudo, a indução de esteatose hepática não alcoólica por dieta deficiente em proteína acarreta complicações indesejadas como menor consumo de dieta, menor crescimento dos animais e diminuição das proteínas séricas, fatores não concordantes com os modelos clássicos para o estudo dessa doença. Também outro fator limitante é a não alteração da glicemia e aparente manutenção da sensibilidade a insulina, impossibilitando o estudo de um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento da EHNA, que é a elevada insulinemia.

A dieta hipoprotéica constitui um modelo clássico de desnutrição e a indução de EHNA através dela não deve ser comparada a outros modelos que apresentam quantidades excessivas de macronutrientes, como as hiperlipídicas e ricas em carboidratos simples.

ABSTRACT

Model of study: Experimental study. **Objectives:** this study had as objective evaluate and characterize a low protein diet as an experimental model for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods:** male *Wistar* rats were divided in two groups with isocaloric diets: control (GC) in which the used diet followed praised for the AIN-93 and the low protein (GH), with reduced amount of protein of 20% for 10%. The diets and water had been offered *ad libitum* over four weeks. After this period the animals were sacrificed and analyzed: glycemia; urinary nitrogen; serum protein; liver total lipids; cholesterol; weight variation and food consumed. **Results:** the glycemia and the urinary nitrogen had not presented significant differences between GC and GH ($p>0,05$). The change of weight in the last day of the experiment was significant ($p<0,02$). The percentage of total liver lipids was higher in the GH, when compared with the GC ($p<0,04$). There was lower levels of cholesterol ($p<0,01$) and serum protein (0,005) in GH. The food consumed was not different between the groups. **Conclusions:** in this paper the low protein diet constitutes a model of NAFLD induction that can be characterized for serum protein and plasmatic cholesterol and increased fat in the liver, however not alterations in the glycemia suggest no changes in insulin sensitivity, thus constituting a defective model to study one of the main factors of risk for the establishment of the NAFLD, the resistance to insulin.

Keywords: Fatty Liver, Disease. Diet, Protein-Restricted. Rats.

Referências

- 1- Andreoli MF, Scalerandi MV, Borel IM, Bernal CA. Effects of CLA at different dietary fat levels on the nutritional status of rats during protein repletion. *Nutrition*. (Burbank) 2007; 23 827-35.
- 2- Filiputti E, Ferreira F, Souza KL, Stoppiglia LF, Arantes VC, Boschero AC, et al.. Impaired insulin secretion and decreased expression of the nutritionally responsive ribosomal kinase protein S6K-1 in pancreatic islets from malnourished rats. *Life sci*. 2008; 82 (9-10): 542-8.
- 3- Webster AJ. Energy partitioning, tissue growth and appetite control. *Proc. nutr. soc.* 1993; 52 (1): 69-76.
- 4- Jacobson L. CRH and NPY are not decreased in hypophagic, protein-deprived rats. *Peptides*. 2000; 21(10): 1487-93.
- 5- Okawa H, Morita T, Sugiyama K. Increased plasma homocysteine concentration in rats from a low casein diet. *Biosci. biotechnol. biochem.* 2006; 70(12): 3050-3.
- 6- Stead LM, Brosnan ME, Brosnan JT. Characterization of homocysteine metabolism in the rat liver. *Biochem. j.* 2000; 350 Pt 3: 685-92.
- 7- Smolin LA, Benevenga NJ. Factors affecting the accumulation of homocyst(e)ine in rats deficient in vitamin B-6. *J. nutr.* 1984; 114 (1): 103-11.
- 8- Deminice R, Vilhena R, Portari GV, Jordão AA. Suplementação de creatina, homocisteína e estresse oxidativo. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2007; 40 (3): 368-77.
- 9- Kirsch R, Clarkson V, Shephard EG, Marais DA, Jaffer MA, Woodburne VE, et al.. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. *J. gastroenterol. hepatol.* 2003; 18(11): 1272-82.

- 10- Gauthier MS, Couturier K, Latour JG, Lavoie JM. Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. *J. appl. physiol.* 2003; 94(6): 2127-34.
- 11- Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am. j. clin. nutr.* 2004; 79(3): 502-9.
- 12- Zivkovic AM, German JB, Sanyal AJ. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Am. j. clin. nutr.* 2007; 86(2): 285-300.
- 13- Delarue J, LeFoll C, Corporeau C, Lucas D. N-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity? *Reprod. nutr. dev.* 2004; 44(3): 289-99.
- 14- Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World j. gastroenterol.* 2008;14(2):193-9.
- 15- Osumi Y, Nagasaka Y, Shimamoto K. Lipid metabolism in the rats with fatty liver caused by low protein diet and effects of the oral administration of L-methionine, L-cysteine, pantethine and calcium pantothenate upon it. *Jpn j. pharmacol.* 1969; 19(1): 74-88.
- 16- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. nutr.* 1993; 123(11): 1939-51.
- 17- AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. 12th ed. Washington: AOAC International, 1975.
- 18- Heard CR, Frangi SM, Wright PM, McCartney PR. Biochemical characteristics of different forms of protein-energy malnutrition: an experimental model using young rats. *Br. j. nutr.* 1977; 37(1):1-21.
- 19- Ferreira CL, Macedo GM, Latorraca MQ, Arantes VC, Veloso RV, Carneiro EM, et al. Serum leptin and insulin levels in lactating protein-restricted rats: implications for energy balance. *Br. j. nutr.* 2007; 97(1): 27-34.