

ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA

HEPATIC STEATOSIS IN RATS WITH INDUCED OBESITY

Raquel de Carvalho Marciano^{1*}, Guilherme Muniz Pereira Chaves Urias², Claudemir de Carvalho³

¹ Graduanda do Curso de Farmácia, FUNVIC/Faculdade de Pindamonhangaba, Pindamonhangaba, SP.

² Doutor em Educação para a Ciência.

³ Professor Doutor, Curso de Farmácia, FUNVIC/Faculdade de Pindamonhangaba, Pindamonhangaba, SP.

*Correspondência: prof.claudemircarvalho.pinda@funvic.edu.br

RECEBIMENTO: 14/12/17 - ACEITE: 18/12/17

Resumo

A esteatose hepática é uma doença metabólica resultante da alteração da síntese de triglicérides a partir de ácidos graxos. Caracteriza-se pelo acúmulo de micro e macro vesículas de lipídeos no citoplasma das células hepáticas, numa graduação que varia de insignificante a severa. Neste experimento foi induzida a obesidade em 15 ratos Wistar por meio da ingestão de uma dieta hipercalórica, durante nove semanas. Esses animais foram mantidos no biotério da instituição, em ambiente com temperatura e ciclo de luz controlados. O grupo controle (n=10) foi mantido em mesmas condições, porém com ingestão de ração normocalórica. O consumo de ração, água e o peso dos animais foram mensurados durante o experimento. Após esse período os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico e foi coletada amostra do fígado de todos os animais para histopatologia. No grupo tratado observou-se esteatose discreta (40%) e moderada (60%), enquanto no grupo controle observou-se esteatose insignificante em um dos animais apenas. Houve, portanto significância estatística ($p < 0,0001$).

Palavras-chave: Esteatose hepática. Doença hepática gordurosa não alcoólica. Ratos obesos.

Abstract

Hepatic steatosis is a metabolic disease resulting from the alteration of the synthesis of triglycerides from fatty acids. It is characterized by the accumulation of micro and macro vesicles of lipids in the cytoplasm of hepatic cells, ranging from insignificant to severe. In this experiment obesity was induced in 15 Wistar rats by eating a hypercaloric diet for nine weeks. These animals were kept in the vivarium of the institution, in an environment with controlled temperature and light cycle. The control group (n = 10) was maintained under the same conditions, but with normocaloric ration intake. Feed intake, water and animal weight were measured during the experiment. After this period the animals were sacrificed by anesthetic deepening and a liver sample of all the animals was collected for histopathology. In the treated group, mild (40%) and moderate (60%) steatosis was observed, while in the control group insignificant steatosis was observed in one animal only. There was, therefore, statistical significance ($p < 0.0001$).

Keywords: Hepatic steatosis. Fatty non-alcoholic liver disease. Obese rats.

Introdução

A esteatose hepática (EH) consiste no acúmulo de lipídios histologicamente visível no citoplasma dos hepatócitos, que atinge 5% a 40% do peso do órgão. É a alteração metabólica hepática mais frequente e resulta no desequilíbrio entre a síntese de triacilgliceróis (TAG) a partir de ácidos graxos, e a baixa secreção destes pelo hepatócito na forma de lipoproteínas. Inicialmente, os TAG acumulam-se nos hepatócitos por uma ou mais das seguintes vias: aumento da quantidade de ácidos graxos livres circulantes; redução da β -oxidação, ou diminuição da síntese ou da secreção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), que é a principal responsável pela secreção de TAG pelo fígado.¹

As alterações morfológicas hepáticas relacionadas à EH podem ser de origem alcoólica (ou ter etiologias diversas. A partir da década de 1980, as alterações de etiologias não alcoólicas passaram a ser denominadas Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA). Apesar de ter sido apontada há muito tempo como condição benigna, 15% a 40% dos casos de EH pode progredir para esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) apresentando inflamação, balonização e fibrose perissinusoidal e/ou portal, e formas mais graves e terminais de doenças hepáticas, tais como cirrose (20% dos casos) e carcinoma hepatocelular.²

A real prevalência da EH é ainda desconhecida, mas sabe-se que ela atinge adultos e crianças e está emergindo como a condição hepática mais comum no mundo ocidental.³ Estima-se que 20% a 30% dos adultos e até 75% dos pacientes com diabetes mellitus e obesidade, em países ocidentais, possam ter EH.^{4,5} Estudos recentes descobriram que a DHGNA também está associado a disfunção pancreática significativa de células β em indivíduos obesos não-diabéticos.^{6,7}

Sob o ponto de vista nutricional, a EH desperta grande interesse por sua forte correlação com a obesidade, as dislipidemias e o diabetes mellitus tipo 2, cujo principal elemento é a resistência à insulina.^{8,9}

A obesidade pode ser encarada como um grave dilema de saúde pública no Brasil e em muitos países do mundo e está associada com doenças cardiovasculares, metabólicas e neurais, como hipertensão arterial, trombose e acidente vascular cerebral. A obesidade decorre de várias condições genéticas e ambientais, incluindo hábitos alimentares incorretos e ausência de atividade física.⁸

Ligada a várias condições de riscos metabólicos, tais como resistência à insulina, níveis plasmáticos elevados de Triglicérides (TG) e baixos

níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL), a obesidade está vinculada a uma redução da esperança de vida em países desenvolvidos e em crescimento.^{1,8}

Dada a crescente importância da DHGNA e tendo em vista os hábitos alimentares da população ocidental com base em uma dieta rica em carboidratos de absorção rápida, especialmente os hábitos do paciente obeso, o objetivo do presente estudo foi oferecer dieta hipercalórica, com alto teor de carboidratos, para um grupo de ratos e investigar a presença de esteatose hepática nos ratos obesos.

Método

Foram utilizados 25 Ratos Wistar (grupos de 5 animais) com seis meses de vida e peso médio de 340 g. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas de polipropileno, em ambiente com temperatura de $24 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ (⁵), com ciclo de 12 horas de escuro. O modelo experimental utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da FUNVIC / Faculdade de Pindamonhangaba, protocolo 023/2012.

Os animais foram separados em grupo controle (GC, n=10), que recebeu alimentação normocalórica composta por ração comercial para ratos (Nuvilab® CR1), e grupo experimental (GE, n=15), alimentado com dieta hipercalórica constituída por 450 g de ração Nuvilab CR1, 150 g de bolacha de amido de milho, 300 g de amendoim com casca e 300 g de chocolate ao leite hidrogenado.¹⁰

A alimentação e a água foram fornecidas à vontade diariamente, durante nove semanas. A ingestão de alimentos e de água foi mensurada diariamente, no início da manhã, subtraindo a sobra do volume oferecido na manhã anterior. O peso corporal foi monitorado semanalmente, durante o período experimental. Todos os animais tiveram massa corporal registrada no final do experimento por meio de balança semi analítica (Marte Balance®). Foram considerados obesos os animais do grupo GE que apresentaram ganho de peso 15% superior ao do grupo controle, o que ocorreu na terceira semana.¹¹ Os dados foram tabulados e expressos como média \pm erro padrão da média e foram analisados utilizando o teste t de Student com nível crítico fixado em 5% ($p < 0,05$).

Eutanásia, necropsia e coleta de amostras

Após o tratamento os animais foram submetidos à eutanásia por processo indolor (0,2 mL/100 g de peso vivo de uma solução 1:1 de cloridrato de xilasina 2% e cloridrato de quetamina 10%) para coleta do órgão alvo. O óbito foi induzido por aprofundamento anestésico. A necropsia foi realizada por incisão na linha branca e abertura de abdômen e do tórax.

Histologia

Após inspeção macroscópica, fragmentos do fígado de cada animal foram coletados e fixados em solução de formaldeído a 10% tamponada, para preparo de cortes histológicos conforme rotina histotécnica. Para microscopia foram realizados cortes histopatológicos de 5 µm que foram fixados em lâminas e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) de maneira convencional. Os cortes foram analisados em microscópio óptico binocular. Investigou-se a presença de micro e macro vesículas de lipídios nos hepatócitos.

A classificação quanto ao teor de lipídeos hepáticos foi expressa em cruces (0 a 3+), obtida pela predominância referente a seis campos

microscópicos aleatórios de cada animal dos grupos GE e GC (Almeida et al.¹² modificado), considerando-se: 0+: ausência ou presença insignificante de gotas lipídicas no citoplasma hepático; 1+: presença de gotas lipídicas no citoplasma hepático de intensidade leve (menos de 25% do campo analisado); 2+: presença de gotas lipídicas no citoplasma hepático de intensidade moderada (25 a 50% do campo analisado); 3+: presença de gotas lipídicas no citoplasma hepático de intensidade alta (mais de 50% do campo analisado).¹² Para análise dos dados foi utilizado o teste de Mann-Whitney para grupos independentes, com nível de significância de 5%.

Resultados

A ingestão diária de água e de ração foi semelhante entre animais do mesmo grupo, porém, houve diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparados animais tratados com animais controles, sendo maior a ingestão pelos animais tratados com a ração hipercalórica (Tabela 1). Da mesma forma, houve significância estatística ($p < 0,05$) quando se comparou peso inicial e peso final dos animais do grupo experimental e quando se comparou GE com GC (Tabela 1).

Tabela 1- Média e desvio padrão do consumo de ração (g) e água (mL) e do Peso (g) de ratos Wistar tratados com ração hipercalórica (GE) e seus controles

	C	E
Consumo de ração	125,65± 8,04	200,36± 22,33*
Consumo de água	109,48± 15,56	146,29± 12,52*
Peso	417,77± 9,35	496,70± 40,27*

* $P < 0,05$ quando se comparou E com C.

Não foram observadas alterações macroscópicas no fígado de nenhum dos animais.

Quanto à microscopia hepática, foi observada esteatose insignificante em um animal do grupo-controle (10%) (predominância de hepatócitos com núcleo de aparência e localização normais), contra 40% de esteatose discreta e 60% moderada no grupo experimental (hepatócitos com tamanho aumentado pela presença de gotículas de gordura no citoplasma), mostrando que houve diferença significativa ($p < 0,0001$) entre

os grupos GE e GC quanto à presença de esteatose hepática (Figura 1). Não foi observada esteatose acentuada ou intensa em nenhum animal obeso. Foram observados indícios da formação de ateromas na parede de vasos sanguíneos (Figura 1B) de quatro animais do grupo experimental (26,66%). Foi observado também infiltrado inflamatório em pequena intensidade, em cinco (33,33%) animais do grupo experimental (dados não mostrados).

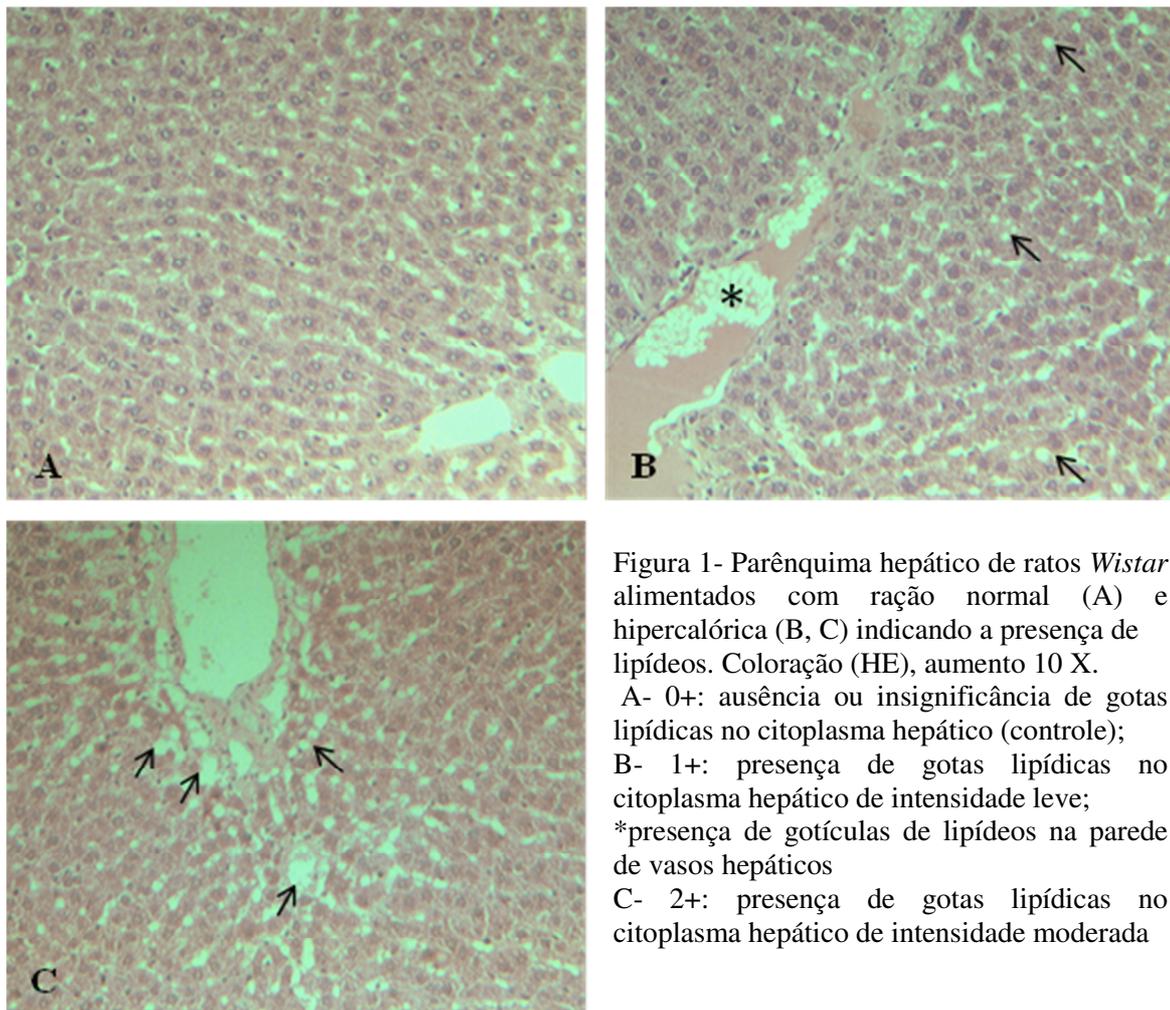


Figura 1- Parênquima hepático de ratos *Wistar* alimentados com ração normal (A) e hipercalórica (B, C) indicando a presença de lipídeos. Coloração (HE), aumento 10 X.
A- 0+: ausência ou insignificância de gotas lipídicas no citoplasma hepático (controle);
B- 1+: presença de gotas lipídicas no citoplasma hepático de intensidade leve;
*presença de gotículas de lipídeos na parede de vasos hepáticos
C- 2+: presença de gotas lipídicas no citoplasma hepático de intensidade moderada

Discussão

Estudos em animais ajudam a entender os mecanismos fisiopatogênicos e terapêuticos de DHGNA. Vários modelos de animais estão atualmente disponíveis para o estudo desta condição e de EH, embora nenhum deles possa reproduzir completamente os componentes essenciais da doença no ser humano.¹³⁻¹⁵

A esteatose hepática emerge como a condição hepática mais comum no mundo ocidental, atingindo crianças e adultos portadores de DHGNA.³ No entanto, nos últimos 20 anos, também nos países asiáticos a prevalência de DHGNA cresceu rapidamente e demonstrou ser uma tendência para gerações mais jovens, provavelmente em função da mudança de hábitos alimentares, com a introdução das *fast foods*.¹⁶

A gordura se acumula nos hepatócitos quando a quantidade de ácidos graxos que entra no fígado (ácidos graxos não esterificados absorvidos pelo plasma e ácidos graxos sintetizados de novo nos hepatócitos) é maior que a quantidade de ácidos

gordurosos que sai (oxidação de ácidos graxos e secreção de ácido graxo ligada a triglicerídeos).¹⁷ No presente estudo, a dieta hipercalórica administrada por nove semanas induziu EH, conforme revelado pelos vacúolos lipídicos detectados por análise histológica em todos os animais tratados. Achados similares são descritos por outros pesquisadores.¹⁸⁻²⁰ No entanto, o tempo de 9 semanas de ingestão de tratamento não foi suficiente para o desenvolvimento de esteatose hepática intensa (3+).

A esteatose hepática é caracterizada por um acúmulo de partículas de lipídeos, fazendo com que o fígado apresente um peso 5% maior que o valor de referência, sendo essa característica uma resultante direta do tipo de fonte lipídica utilizada.²¹ Neste estudo, não se observou alteração da macroscopia do órgão com aparente manutenção da sua massa, embora não se tenha procedido à pesagem do fígado dos animais.

Almeida et al.¹² descreveu presença de gotículas lipídicas na parede das coronárias e vasos hepáticos de animais com obesidade induzida por

diferentes métodos, o que também foi observado no fígado dos animais deste experimento. Isso demonstra a necessidade de outros estudos para verificar se foram oriundas da própria síntese vascular e se conduzirão a processos patológicos.

Outro achado histológico, embora sem significância neste experimento, foram os infiltrados inflamatórios. É de conhecimento que a obesidade é uma doença sistêmica que resulta em um processo inflamatório intenso,^{22,23} sugerindo que, se a ingestão da ração hipercalórica fosse mantida por período de tempo mais longo, esses infiltrados no fígado dos animais experimentais poderiam

significar um agravamento da doença com uma provável evolução para uma esteatohepatite.^{2,24}

Conclusão

O modelo adotado mostrou-se eficaz para indução de obesidade em ratos adultos, como também para a indução de esteatose de intensidade leve e intensidade moderada, confirmando a relação entre obesidade e a Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica. O tempo de consumo da ração hipercalórica não foi suficiente para indução de esteatose severa.

Referências

- Oda E. The Metabolic Syndrome as a Concept of Adipose Tissue Disease. *Hypertens Res.* 2008;31(7):1283-91.
- Silva GH, Escanhoela CAF. Doença hepática gordurosa não alcoólica: patogênese e achados histológicos com ênfase nas alterações mitocondriais. *Rev. Ciênc. Méd.* 2009;18(5/6):269-79.
- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 2002;346(16):1221-31.
- Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40(Suppl 1):S5-10.
- Samuel VT, Liu Z-X, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al. Mechanism of Hepatic Insulin Resistance in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J Biol Chem.* 2004;279(31):32345-53.
- Bedogni G, Gastaldelli A, Tiribelli C, Agosti F, De Col A, Fessehatsion R, et al. Relationship between glucose metabolism and non-alcoholic fatty liver disease severity in morbidly obese women. *J. Endocrinol. Invest.* 2014;37:739-44.
- Siddiqui MS, Cheang KL, Luketic VA, Boyett S, Idowu MO, Patidar K, et al. Nonalcoholic steatohepatitis (nash) is associated with a decline in pancreatic beta cell (β -cell) function. *Dig. Dis. Sci.* 2015, doi:10.1007/s10620-015-3627-7.
- Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell.* 2004; 116(2):337-50.
- Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Battle EH, Driscoll CJ. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology.* 1999;29(3):664-9.
- von Diemen V, Trindade EN, Trindade MRM. Experimental model to induced obesity in rats. *Acta Cir. Bras.* 2006;21(6):425-9.
- Levin BE, Triscari E, Sullivan AC. Metabolic features of diet-induced obesity without hyperphagia in young rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1986; 251(3):433-40.
- Almeida MEF, Medeiros RS, Figueiredo FJB, Coelho EJB, Sena MPT. Efeitos do estresse auditivo e da dieta hipercalórica sobre o peso corporal, lipídeos e glicemia de ratos wistar. *Alim.Nutr.* 2011;22(3):359-65.
- Nanji AA. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis. *Clin Liver Dis.* 2004;8:559-74.
- Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:502-9.
- Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Foufelle F, Dyck JR, Girard J, Postic C. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes.* 2006;55:2159-70.
- Fan JG, Farrell GC. Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in China. *J Hepatol.* 2009;50:204-10.
- Koo SH. Nonalcoholic fatty liver disease: Molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin. Mol. Hepatol.* 2013;19:210-5.
- Pereira LO, Francischi RP, Lancha AH. Obesidade: Hábitos Nutricionais, Sedentarismo e Resistência à Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003;47(2):111-27.
- Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RAM, Nogueira CR, Cicogna AC: A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in Wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(6):968-74.
- Ghanayem BI, Bai R, Kissling GE, Travlos G, Hoffler U: Diet-induced obesity in male mice is associated with reduced fertility and potentiation of acrylamide induced reproductive toxicity. *Biol Reprod.* 2010;82(1):94-104.
- Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin

- resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest.* 2008;118(3):829-38.
22. Gregor MF, Hotamisligil GS. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum end metabolic disease. *Lipid Res.* 2007;48(9):1905-14.
 23. Medzhitov R. Inflammation. New adventures of an old flame. 2010;140(6):771-6.
 24. Fabbrini E, Magkos F. Hepatic Steatosis as a Marker of Metabolic Dysfunction. *Nutrients.* 2015;7:4995-5019, doi:10.3390/nu7064995.