

Priscila Paola Wildner

**EFEITO DAS DIETAS AIN-93M E AIN-93M COM
MODIFICAÇÕES NA FONTE PROTEICA SOBRE
PARÂMETROS HEPÁTICOS E SANGUÍNEOS EM RATOS
Wistar MACHOS**

Dissertação submetida
ao Programa de Pós-
Graduação em Nutrição
da Universidade Federal
de Santa Catarina para
obtenção do grau de
Mestre em Nutrição.
Orientadora: Prof.^a Dra.
Júlia Dubois Moreira.

Florianópolis, 2017

Ficha Catalográfica

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Wildner, Priscila Paola
EFEITO DAS DIETAS AIN-93M E AIN-93M COM MODIFICAÇÕES NA
FONTE PROTEICA SOBRE PARÂMETROS HEPÁTICOS E SANGUÍNEOS EM
RATOS WISTAR / Priscila Paola Wildner ; orientadora, Julia
Dubois Moreira , 2017.
72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Nutrição, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Nutrição. 2. dietas purificadas. 3. proteína isolada
de soja. 4. ratos. 5. nutrição experimental. I. , Julia
Dubois Moreira. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. III. Título.

EFEITO DAS DIETAS AIN-93M E AIN-93M COM MODIFICAÇÕES
NA FONTE PROTEICA SOBRE PARÂMETROS HEPÁTICOS E
SANGUÍNEOS EM RATOS WISTAR

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Nutrição, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 14 de julho 2017.

Prof^a Patricia Faria Di Pietro, Dra.
Coordenadora do Curso

Prof. Julia Dubois Moreira, Dra.
Orientadora e Presidente da banca
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:

Prof.^a: Alexandre Pastoris Muller, Dr.
Universidade do Extremo Sul Catarinense

Prof.^a Everson Araújo Nunes, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^o. Eduardo Luiz Gaznhar Moreira, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho
aos meus pais, irmão e
namorado, por
estarem comigo
incondicionalmente
neste mestrado.

AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos por **DEUS**, que colocou pessoas boas nessa trajetória, que me fizeram crescer, não só como profissional mas como pessoa.

Aos meus pais, **Neide** e **Jadir**, que sempre foram exemplos de pessoas guerreiras e honestas e sempre me incentivaram a seguir firme com meus sonhos e objetivos, apoiando de todas as formas todas as minhas decisões.

Ao meu amor, **Felipe**, que desde sempre acreditou no meu potencial e esteve no meu lado, incondicionalmente. Tudo se tornou mais fácil com sua amizade, paciência, companheirismo e alegria. Obrigada por estar sempre ao meu lado, me colocando para cima em todos os momentos. Essa vitória também é sua.

Agradeço também à **Juliane**, que se tornou uma amiga e também participou de momentos de tensão e responsabilidades dessa minha trajetória. Obrigada por me aguentar todos os dias!

À minha amiga **Tamara**, que desde a infância esteve comigo compartilhando sonhos e desejos, e nessa parte da minha vida, mesmo à distância, se fez presente. Estarei sempre contigo também, obrigada!

À colega de mestrado e amiga **Luana** que compartilhou comigo alegrias, frustrações e vitórias ao longo desses dois anos de estudo, juntas em momentos de estudo e distração. Obrigada pela amizade!

Ao meu irmão **Mateus** pelo incentivo e apoio sempre.

Aos meus tios, **Rogério** e **Fabricia**, meus principais exemplos de pesquisadores, e minha prima favorita **Renata**, que estiveram muito presentes nesses dois anos de estudo, aprendizado e conhecimento. Vocês foram meus melhores amigos e minha segunda casa em Florianópolis, sempre dispostos a qualquer coisa para facilitar esses meses de muito trabalho no mestrado. Obrigada pelo carinho, disponibilidade e braços sempre abertos para mim. Nunca vou esquecer tudo o que vocês fizeram e fazem.

Ao pessoal do laboratório – alunas de graduação, professoras **Jussara e Leticia** e técnico de laboratório **Gerson** - que direta ou indiretamente auxiliaram neste trabalho com ensinamentos, orientações e amizade. Compartilhando, entre muito trabalho duro na área experimental, algumas risadas e momentos de descontração.

À aluna de graduação **Larissa**, que aceitou trabalhar como voluntária no desenvolvimento do experimento: um muitíssimo obrigada. Seu trabalho foi essencial para eu não enlouquecer em meio a tantas responsabilidades.

Um agradecimento especial à **Cinthia**, que além de veterana e colega de mestrado, foi uma grande amiga e exemplo de aluna para mim. Muito obrigada por compartilhar teu conhecimento comigo e me auxiliar tão bem em todo esse processo. Você foi muito importante nessa parte da minha história e para a concretização deste trabalho.

À minha professora orientadora **Julia**, que com apenas um olhar foi capaz de me acalmar desde o dia de seleção do mestrado até ao fim de elaboração deste trabalho. Suas palavras de confiança, seu conhecimento e orientação fizeram esse trabalho possível.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Nutrição da UFSC que compartilharam sabedoria e conhecimentos, tornando-me mais crítica e aprofundando o que conhecia de pesquisa científica. Muito obrigada.

E por fim, agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do nosso projeto e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos nesses dois anos.

RESUMO

O uso de dietas experimentais para animais de laboratório deve ocasionar crescimento saudável e manutenção de peso na fase adulta sem causar qualquer prejuízo à saúde do animal. No entanto, estudos mostram que o modelo amplamente utilizado preconizado pela *American Institute of Nutrition* (AIN-93) tem causado efeitos indesejáveis em ratos Wistar. Além disso, os estudos que evidenciaram tais efeitos não propuseram alterações na composição da dieta para contornar estes prejuízos. Neste sentido, esta pesquisa objetivou verificar o efeito das dietas AIN-93M, AIN-93M com modificação na fonte proteica sobre parâmetros sanguíneos e hepáticos em ratos Wistar machos.

Ratos Wistar (P60) foram aleatoriamente divididos em 03 grupos (n= 6 por grupo): C (controle) = ração comercial padrão; AIN1 (AIN-93M); AIN2 (AIN92M modificada) = ração AIN93 com modificação da fonte proteica. Na fonte proteica, foi substituída a caseína por proteína isolada de soja (90% de pureza). Todos os animais foram pesados semanalmente. Para avaliar o consumo de ração, a dieta oferecida e sobras do dia posterior foram pesadas diariamente. Ao final dos tratamentos dietéticos (12 semanas), os animais foram sedados com cetamina e xilazina e eutanasiados por hipovolemia ao realizar punção cardíaca. Plasma foi coletado para análise de variáveis sanguíneas. Fígado e tecido adiposo foram dissecados e pesados. Foi realizado contagem de infiltrado gorduroso no tecido hepático. Na análise estatística, foi utilizado ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey e Qui quadrado de Pearson (Protocolo CEUA PP00973).

A média do consumo alimentar dos animais foi diferente entre os três grupos avaliados, sendo que os animais do AIN2 tiveram o maior consumo (C = 22,5 g \pm 1,7; AIN1 = 31 g \pm 0,7; AIN2 = 41,2 g \pm 4,3; p 0,0001; F=332,6). Houve diferença no peso corporal final dos animais, sendo que os animais AIN1 tiveram o maior peso corporal ao final do tratamento quando comparado ao grupo C (controle = 360 g \pm 18,52; grupo 02 = 402 g \pm 42,2; grupo 03 = 377,5 \pm 39,24; p <0,0009; F = 11,74). O delta peso dos grupos AIN93 foram maiores do que o grupo controle (C = 110,42 g \pm 14,5; AIN1= 217,2 g \pm 23,66; AIN2 = 206 g \pm 28,9; p <0,0001; F= 38,77). O peso do tecido adiposo e do fígado do grupo AIN1 foi maior do que o dos animais controles (p<0,05 para ambos). Em relação às variáveis bioquímicas, o triglicerídeo plasmático dos animais alimentados com a dieta comercial (animais controles) foi maior do que

os demais grupos. Foi verificada diferença no padrão de esteatose hepática entre todos os grupos ($p < 0,0001$). Somente os animais do grupo AIN1 apresentaram níveis preocupantes de esteatose hepática.

Nossos achados são consistentes com estudos anteriores com animais alimentados com a dieta AIN-93M. A dieta com substituição da caseína por proteína isolada de soja protegeu os animais da esteatose hepática e diminuiu valores de peso (peso corporal, ganho de peso, tecido adiposo total, peso do fígado), sugerindo um benefício no uso da proteína vegetal no lugar da proteína animal.

Palavras Chave: AIN-93M, dieta purificada, proteína isolada de soja, caseína.

ABSTRACT

The use of experimental diets for laboratory animals should cause healthy growth and weight maintenance in adulthood without causing any injury to the animals. However, studies have shown that the widely used dietary model recommended by the American Institute of Nutrition (AIN-93) has caused undesirable effects in Wistar rats. In addition, studies that demonstrated such effects did not propose changes in diet composition to overcome these healthy problems. In this sense, this research aimed to verify the effect of AIN-93M diet and AIN-93M diet with protein source modification on plasma metabolic biomarkers and liver parameters in male Wistar rats.

Wistar rats (P60) were randomly divided into 03 groups (n = 6 per group): C (control) = standard commercial diet; AIN1 (AIN-93M); AIN2 (AIN92 Modified) = AIN93M diet with modification of the protein source. Concerning protein source, casein was replaced with isolated soy protein (90% purity). All animals were weighed weekly. To evaluate feed intake, the diet offered and leftovers from the later day were weighed daily. The glucose tolerance test was performed firstly with the animals fasted and later at the time intervals 30/60/120 minutes after application of 4 g / kg of intraperitoneal glucose solution. At the end of the dietary treatments, which lasted 12 weeks, the animals were sedated with ketamine and xylazine and euthanized by hypovolemia when performing cardiac puncture. Plasma was collected for analysis of blood variables. Liver and adipose tissue were dissected and weighed. The presence of hepatic steatosis was evaluated on liver tissue. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Tukey's post-test and Pearson's Chi-square test. CEUA Protocol PP00973.

The mean intake of the animals was different among the three groups, with AIN2 animals having the highest consumption (C = 22.5 g ± 1.7, AIN1 = 31 g ± 0.7, AIN2 = 41.2 g ± 4.3, p 0.0001, F = 332.6). There was a difference in the final body weight of the animals, and the AIN1 animals had the highest body weight at the end of the treatment when compared to group C (control = 360 g ± 18.52; AIN1 = 402 g ± 42.2; AIN2 = 377.5 ± 39.24, p <0.0009, F = 11.74). The weight gain (delta weight) of both AIN93M groups was higher than the control group (C = 110.42 g ± 14.5, AIN1 = 217.2 g ± 23.66, AIN2 = 206 g ± 28.9, p <0.0001; F = 38.77). In the glucose tolerance test, the area under the curve in the

AIN2 group was statistically larger than in the C group ($p < 0.05$). The weight of adipose tissue and liver of the AIN1 group was higher than that of the control animals ($p < 0.05$ for both). Regarding the biochemical variables, the triglycerides of the animals fed the commercial diet (control animals) were significantly higher. There was a difference in hepatic steatosis pattern among all groups ($p < 0.0001$). Only the AIN1 group showed higher hepatic steatosis lesions

Our findings are consistent with previous studies with animals fed the AIN-93M diet. AIN93M made with isolated soy protein protected the animals from hepatic steatosis and decreased values of weight (body weight, weight gain, total adipose tissue, liver weight), suggesting a benefit in the use of vegetable protein instead of protein animal.

Key words: AIN-93M, purified diet, isolated soy protein, casein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Valores de ingestão alimentar ao longo das 12 semanas.....	50
Figura 2. Valores de peso corporal. (A) Pesagem ao longo das 12 semanas de experimento. (B) Pesagem dos animais ao fim do experimento. (C) Variação de peso ao longo do experimento (peso final – peso inicial).....	51
Figura 3. Peso do tecido adiposo (A) e do fígado (B) dos animais.....	52
Figura 4. Imagens de graus de esteatose hepática representativos para cada um dos grupos experimentais. (A) Grupo Controle (B) Grupo AIN1 (C) Grupo AIN2.....	55

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Dieta purificada AIN-76 ¹ (para ratos e camundongos).....	29
Tabela 2. Composição da dieta comercial.....	34
Tabela 3. Composições das dietas AIN-93M e AIN-93M modificada.....	35
Tabela 4. Composição da mistura de minerais constituintes da dieta AIN-93.....	36
Tabela 5. Composição da mistura vitamínica presente nas dietas AIN-93.....	37
Tabela 6. Composição da dieta controle.....	47
Tabela 7. Composições das dietas AIN1 e AIN2.....	47
Tabela 8. Variáveis bioquímicas dos grupos controle, AIN1 e AIN2...53	
Tabela 9. Contagem de campos em tecido hepático com células gordurosas em diferentes graus de esteatose nos grupos controle, AIN1 e AIN2.....	54
Tabela 10. Contagem de campos em tecido hepático com foco de células inflamatórias nos grupos controle, AIN1 e AIN2.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NRC – National Research Council (Conselho Nacional de Pesquisa)

NPU – Net Protein Utilization (Utilização proteica líquida)

AIN – American Institute of Nutrition (Instituto Americano de Nutrição)

FASEB – Federal of American Societies for Experimental Biology (Federação das Sociedades Americanas para Biologia Experimental)

LDL - Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de baixa densidade)

HDL - High Density Lipoprotein (Lipoproteína de alta densidade)

AST - Aspartate Transaminase (Aspartato transaminase)

ALT - Alanine Transaminase (Alanina transaminase)

GOT - Glutamato-Oxalacetato Transaminase (Glutamato oxalacetato transaminase)

GPT - Glutamato Piruvato Transaminase (Glutamato piruvato transaminase)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	PROBLEMA E JUSTIFICATIVA	20
1.2	OBJETIVOS	21
1.2.1	Objetivo geral	21
1.2.2	Objetivos específicos	21
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	O USO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO E A NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL	22
2.2	RATOS DE LABORATÓRIO E SUAS NECESSIDADES NUTRICIONAIS	23
2.2.1	Energia	23
2.2.2	Proteína	24
2.2.3	Carboidratos	25
2.2.4	Lipídeos	25
2.2.5	Fibras	26
2.2.6	Vitaminas e Minerais	26
2.3	DIETAS UTILIZADAS EM LABORATÓRIOS DE ANÁLISE EXPERIMENTAL	27
2.3.1	Dieta comercial padrão peletizada	27
2.3.2	Dieta purificada	28
2.4	EFEITOS DA DIETA AIN-93M EM RATOS WISTAR	30
2.5	USO DE DIETAS COM PROTEÍNA DE ISOLADA DE SOJA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	32
3.2	FORMULAÇÃO DAS RAÇÕES	33
3.2.1	Composição comercial	33
3.2.2	Formulação AIN-93M e AIN-93M com modificações	34

3.3	ENSAIO BIOLÓGICO	37
3.3.1	Animais	37
3.3.2	Peso e consumo	38
3.3.3	Eutanásia	38
3.4	PARÂMETROS SANGUÍNEOS	39
3.4.1	Processamento do sangue	39
3.5	PARÂMETROS HEPÁTICOS	40
3.5.1	Histologia do fígado	40
3.6	PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS	41
3.7	PROCEDIMENTOS ÉTICOS DE PESQUISA	42
4	RESULTADOS – ARTIGO CIENTÍFICO	42
1	Introdução	44
2	Material e Métodos	46
2.1	Animais e dietas	46
2.2	Parâmetros sanguíneos	48
2.2.1	Processamento do sangue	48
2.2.2	Estruturas anatômicas	48
2.3	Parâmetros hepáticos	48
2.3.1	Histologia do fígado	48
2.4	Estatística	49
3	Resultados	49
3.1	Consumo alimentar e pesagem corporal	49
3.2	Variáveis bioquímicas	52
3.1	Parâmetros hepáticos	54
4	Discussão	56
5	AGRADECIMENTOS	59
6	REFERÊNCIAS	59
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62

6	REFERENCIAS	63
7	APENDICE	70
7.1	APENDICE A: Modelo de planilha para cálculo da média do consumo alimentar diário dos animais.	70
7.2	APENDICE B: Modelo para preenchimento de peso corporal dos animais semanalmente.	71
7.3	APENDICE C: Nota à imprensa	72
8	ANEXOS	74
	ANEXO A. Parecer do comitê de ética a respeito do projeto.	74
	ANEXO B. Parecer favorável do comitê de ética a respeito do adendo submetido.	75

1 INTRODUÇÃO

A utilização de animais de laboratório nas pesquisas científicas traz diversas vantagens, uma vez que oferece a oportunidade de controlar variáveis que em humanos seriam muito difíceis ou impossíveis, além do acesso praticamente irrestrito a tecidos e estruturas corporais. A dieta é uma dessas variáveis, uma vez que influencia diretamente o crescimento, a capacidade de reprodução dos animais e o seu estado de saúde e desenvolvimento de doenças (SANTOS et al, 2015a).

Quando o pesquisador opta por realizar um estudo experimental utilizando modelos animais é fundamental que uma alimentação adequada e sem restrições seja oferecida, principalmente quando se refere a animais de grupo controle. Para isso, deve-se levar em conta as características do ciclo de vida do animal (crescimento, desenvolvimento, gestação) para que a dieta atenda essas necessidades nutricionais e para que não haja interferências indesejáveis na resposta ao experimento que se deseja realizar (COSTA et al, 2014). Nesse sentido, temos dietas que tem a principal função manter a saúde do animal sem influenciar no desfecho do estudo. Essas dietas podem ser divididas em dietas comerciais e dietas purificadas.

O *American Institute of Nutrition* publicou em 1993, a partir de um comitê, a dieta purificada que considera quatro fases da vida: crescimento, gestação e lactação (dando origem a dieta AIN-93G) e manutenção da saúde na vida adulta (dieta AIN-93M), que são utilizadas como dieta padrão/controlado em diversos estudos na nutrição experimental (REEVES, et al, 1993; LIEN, et al, 2000; SILVA, et al, 2008; MOURA, et al, 2012; FERREIRA, et al, 2015; SANTOS, et al, 2015; SANTOS, et al, 2015). Essa dieta foi elaborada basicamente com a finalidade de padronizar as pesquisas médicas em relação a alimentação ofertada a animais de grupo controle e minimizar os vieses dos experimentos que utilizam animais de laboratório em todo o mundo.

Contudo, alguns autores passaram a evidenciar alterações metabólicas em roedores que eram alimentados com ambas dietas AIN-93 (AIN-93G e AIN-93M), como alterações no perfil lipídico (LIEN et al., 2001) e esteatose hepática (SILVA et al., 2008). Santos et al. (2015a) fizeram a comparação da dieta AIN-93 com uma dieta comercial,

evidenciando o acúmulo de ácidos graxos no fígado dos animais tratados com AIN-93M após quatro meses de tratamento. Apesar destes achados recentes, pouco ainda se sabe dos efeitos destas dietas sobre a saúde de roedores em experimentação animal.

Não obstante a isso, não foram encontrados estudos recentes que propuseram algum tipo de mudança de composição da dieta AIN-93M de forma a prevenir estes efeitos deletérios evidenciados nos ratos. Uma das alternativas seria tornar a composição da dieta AIN-93M mais próxima a composição encontrada nas dietas comerciais, levando em conta que essas dietas utilizam preferencialmente ingredientes de fonte vegetal e não se encontram achados negativos sobre o metabolismo dos animais alimentados com esta dieta.

Neste sentido, por ser uma dieta amplamente utilizada na literatura científica como sendo o padrão para uma dieta adequada ou como uma dieta controle, a qual é utilizada de maneira crônica ao longo da vida dos roedores de laboratório, faz-se necessário mais estudos que auxiliem na investigação dos efeitos metabólicos da AIN-93M, bem como sua adequação para a manutenção da saúde destes animais.

1.1 PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

Existem alguns estudos que sugerem que as dietas propostas pelo *American Institute of Nutrition* (AIN), utilizadas na atualidade para alimentar animais de laboratório, causam acúmulo de gordura no fígado (esteatose hepática) e alterações no perfil lipídico e sanguíneo (SANTOS et al., 2015a; BUENO et al., 2010; SILVA et al., 2008). Este efeito indesejado pode ser um causador de confusão nos estudos que almejam investigar efeitos metabólicos mediados pela alimentação em roedores, podendo este estar relacionado à composição das dietas administradas aos animais. Os animais de laboratório no âmbito da Nutrição Experimental são usados em diversas pesquisas para benefício da sociedade em pesquisas relacionadas a ingredientes alimentares, produtos ou substâncias que possam ser nocivas à saúde. Para tanto, é essencial que a dieta dos roedores não seja um fator interveniente às conclusões dos estudos propostos.

Além disso, os estudos que evidenciaram efeitos negativos da dieta no organismo dos ratos nos experimentos não propuseram alterações na dieta para comprovar as possíveis causas para as alterações negativas apresentadas. Neste sentido, esta dissertação tem a seguinte pergunta de partida:

Qual é o efeito das dietas AIN-93M e AIN-93M com modificações na fonte proteica sobre parâmetros hepáticos e sanguíneos em ratos *Wistar adultos*?

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito das dietas AIN-93M e AIN-93M com modificações na fonte proteica sobre parâmetros hepáticos e sanguíneos em ratos *Wistar* adultos.

1.2.2 Objetivos específicos

- Implementar o protocolo de dieta AIN-93M e AIN-93M modificada com proteína isolada de soja;
- Avaliar o desenvolvimento ponderal dos animais tratados com os modelos dietéticos citados semanalmente, bem como o consumo alimentar diário;
- Avaliar os parâmetros hepáticos (histologia do fígado, quantidade de ácidos graxos, peso do fígado) dos animais adultos submetidos aos diferentes protocolos de dieta;
- Avaliar os parâmetros sanguíneos (Hemograma, albumina, proteína total, creatinina, perfil lipídico, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase) dos animais adultos submetidos aos diferentes protocolos de dieta;
- Verificar se existe potencial diferença entre as diferentes fontes proteicas sobre os parâmetros avaliados quando comparados aos animais que recebem a dieta comercial padrão disponibilizada pelo biotério da UFSC.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O USO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO E A NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL

O uso de animais de laboratório na pesquisa científica visa os avanços nos conhecimentos a respeito de tratamentos ou até mesmo cura para doenças em seres humanos (GNADT, 2006). Mais de 70% dos principais avanços biomédicos estão relacionados à experimentação em modelos animais (COSTA et al., 2014). Dentro das pesquisas biológicas, a área da nutrição tem relevantes pesquisas experimentais.

Na história da nutrição, os experimentos em animais foram fundamentais. Muitos alimentos e nutrientes eram testados em animais a fim de conhecer seu potencial benefício sobre desordens que os seres humanos estavam apresentando (WAITZBERG, 2006).

Dentre os animais utilizados em laboratório, os roedores figuram como os mais utilizados em pesquisas científicas (COSTA et al., 2014). Seus ciclos vitais curtos e facilidade de reprodução podem ter contribuído para a utilização generalizada desses animais (GNADT, 2006). Não é preciso o momento em que os roedores começaram a ser utilizados em pesquisas experimentais. Aristóteles já utilizava camundongos albinos em suas pesquisas científicas, mas a utilização de ratos tem suas bases anotadas há mais de 300 anos atrás. (COSTA et al., 2014).

Os roedores permitem ainda uma fácil manutenção e observação, onde pode-se trabalhar com padronização de variáveis ambientais, o que é muito difícil de se fazer com seres humanos (COSTA et al., 2014). Também possuem características fisiológicas e genéticas semelhantes aos humanos, tal como o sistema digestivo em termos de fisiologia e disposição dos órgãos – sendo que os roedores apenas não possuem visícula biliar (TRAMONTE; SANTOS, 2012; CARVALHO et al., 2009).

Além das vantagens citadas, há um fator primordial na utilização dos roedores em experimentos, que é a mutação genética. As alterações genéticas realizadas nestes animais possibilitam que os cientistas gerem modelos de animais específicos, com doenças semelhantes aos dos seres humanos, o que possibilita estudá-las com a finalidade de encontrar tratamentos e avanços para doenças específicas (HEDRICH, 2006).

A nutrição experimental é uma área muito complexa, uma vez que envolve variáveis como: espécie genética, categoria zootécnica, ambiente, etologia, sistema de alimentação, composições de rações e exigências nutricionais (MOURA, 2014). Todas essas variáveis devem

ser levadas em conta ao decidir trabalhar com nutrição em modelos animais.

2.2 RATOS DE LABORATÓRIO E SUAS NECESSIDADES NUTRICIONAIS

Os ratos (*Rattus norvegicus*) são os animais mais utilizados como modelo experimental em nutrição pelas vantagens já citadas como roedores (TRAMONTE; SANTOS, 2012). São animais que consomem alimentos de origem animal e vegetal (onívoros) e possuem dentição heterodonte, sem presença dos caninos. Os dentes incisivos possuem crescimento contínuo, por este motivo é necessário que recebam alimentação com dureza suficiente a desgastar seus dentes para que não comprometam sua saúde bucal, e conseqüentemente, sua ingestão (MOURA, 2014).

A alimentação dos animais desempenha papel chave na nutrição experimental por oferecer as condições necessárias para que o animal se desenvolva e mantenha sua saúde, respondendo ao máximo aos estímulos pretendidos (ANDRADE, 2002).

Os nutrientes dos quais os animais necessitam são classificados por macronutrientes (proteínas - que incluem aminoácidos essenciais e não essenciais, carboidratos e lipídeos) e micronutrientes (vitaminas e minerais, além de aditivos) (MOURA, 2014).

Em 1972, o Conselho Nacional de Pesquisa (*National Research Council* – NRC) publicou um arquivo referente às exigências de nutrientes para roedores, que foram atualizadas até sua última versão em 1995, a fim de orientar os pesquisadores da área em relação à oferta de energia, proteína, carboidrato, lipídeos, fibras e micronutrientes.

2.2.1 Energia

A energia é calculada em quilocaloria por quilo de peso do animal (Kcal/kg) e varia de acordo com o alimento oferecido (MOURA, 2014). A energia resultante da queima total dos alimentos é denominada energia bruta. Porém, há de se considerar a energia que é perdida pelas fezes, urina e gases, onde como resultado disso, obtemos a energia líquida (FARIA, 2010).

Nos ratos, aproximadamente 60 a 70% da energia metabolizável fornecida pela dieta é destinada a exigências metabólicas (respiração, sinapses, equilíbrio da temperatura corporal) e 5 a 10% para eventos associados à digestão. Para animais alojados em caixas, a necessidade energética para atividade e exercícios é de apenas 13 a 35% (LLOYD et al., 1978). Segundo o NRC, a necessidade energética para ratos em crescimento é de 114 kcal multiplicado pelo seu peso elevado a 0,75 (NRC, 1995).

2.2.2 Proteína

A necessidade proteica dos roedores varia com seu estado fisiológico (idade, gestação, lactação), sendo que a deficiência de proteína resulta em diminuição da ingestão alimentar e menor ganho de peso, hipoproteinemia, anemia, edema, esgotamento de proteína corporal, perda de massa muscular e pelagem áspera (LEWIS, et al., 2006).

Em geral, o consumo dos animais é feito a satisfazer as necessidades energéticas. Assim, se o alimento conter uma densidade energética maior, eles comerão uma menor quantidade, e assim consequentemente, uma menor quantidade proteica (NRC, 1995).

A proporção e quantidade de aminoácidos absorvidos deve ser semelhante com a proporção e quantidade de aminoácidos oferecido ao organismo. Os aminoácidos em excesso são metabolizados e utilizados como fonte de energia. Porém, a deficiência de aminoácido limita a síntese das proteínas, exigindo que os demais aminoácidos cubram sua função, prejudicando a síntese proteica no organismo (ANDRIGUETTO, 2002).

Além da importância na quantidade proteica a ser oferecida aos animais, é importante que se avalie a qualidade proteica da dieta (LEWIS et al., 2006). Segundo o National Research Council (NRC) de 1995, os aminoácidos essenciais para ratos adultos são histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, triptofano, treonina, valina. Além disto, o NRC determina que a necessidade de proteína para crescimento e reprodução seja de 15% e para manutenção de 5% (NRC, 1995).

A digestibilidade verdadeira é um método que avalia a qualidade da proteína e consiste numa fórmula matemática que avalia a medida do nitrogênio ingerido na dieta e com o nitrogênio eliminado nas fezes. Segundo estudo, a digestibilidade verdadeira da caseína é de 99% enquanto que a da proteína de soja é de 96%, demonstrando que apesar de pouca diferença, a digestibilidade de proteína de fonte animal é maior

que a de fonte vegetal (SARWAR, 1997). O motivo para essa diferença pode ser a ausência de fatores antinutricionais em proteínas de origem animal (PIRES, 2006).

Para avaliar o coeficiente da eficiência proteica de uma dieta, faz-se a relação de ganho de peso relacionado à quantidade de proteína consumida. Esse coeficiente determina a capacidade de uma proteína promover o crescimento de ratos. (WAITZBERG, 2006).

2.2.3 Carboidratos

Os carboidratos são moléculas orgânicas que fornecem 4 kcal/g, sendo principalmente responsáveis pelo fornecimento de energia. São vários os hidratos de carbono que podem ser utilizados metabolicamente pelo rato como, por exemplo, a sacarose, glicose, frutose, amido, dextrina e maltose. Todas essas fontes suportam taxas de crescimento parecidas, porém, em dietas adequadas, a frutose e sacarose podem desencadear alterações como aumento do peso do fígado e esteatose hepática (NRC, 1995). A sacarose em níveis aumentados na dieta está relacionada ao aparecimento de nefrocalcinoses nos ratos (REEVES, 1993). O amido apresenta-se como fonte de carboidrato mais facilmente metabolizados do que a sacarose quando a dieta possui menores taxas de proteína (NRC, 1995).

2.2.4 Lipídeos

Os lipídeos contêm 9 kcal/g, o que significa que é o nutriente mais calórico da natureza (2,25 vezes mais que um grama de proteína ou carboidrato) (MOURA, 2014). Além da importante função energética, o lipídeo tem as funções de promover o crescimento do animal, auxiliar na absorção de vitaminas lipossolúveis para organismo do animal, síntese de hormônios, sinalização intra e extracelular e fornecem ácidos graxos essenciais (NRC, 1995; LEWIS et al., 2006; WAITZBERG, 2006).

Comumente, as dietas apresentam-se com valores entre 5 e 15% de lipídeos para animais adultos, sendo que essa quantidade é suficiente para absorção de caroteno e vitamina A pelo organismo (ROGERS, 1979; LEWIS et al., 2006). Segundo a NRC, a quantidade recomendada para esse nutriente nas dietas para ratos é de 5%.

Os ratos necessitam três tipos de ácidos graxos essenciais, sendo eles o linoleico ômega-6, a-linolênico ômega-3. O ácido linoleico é o mais facilmente encontrado e os ratos podem metaboliza-lo e convertê-lo em ácido araquidônico (LEWIS et al., 2006). Portanto, é necessário o consumo de no mínimo 12 g/kg de dieta de ácido linoleico e 2 g/kg de dieta de ácido a-linolênico para atender as necessidades nutricionais do rato.

O requerimento lipídico pode ser suprido com o uso de óleo de soja na formulação da dieta. Esse óleo possui cerca de 14% de ácidos graxos saturados, 23% monoinsaturados, 51% de ácido linoleico e 7% de ácido a-linolênico.

2.2.5 Fibras

Apesar da fibra não ser mencionada na literatura com tanta importância como outros nutrientes (carboidratos, lipídeos, proteínas) e não haver uma padronização a respeito de sua recomendação, a sua composição pode influenciar na saúde gastrointestinal do rato de laboratório (LEWIS et al., 2006).

As características quanto à solubilidade em água são as consideradas mais importantes quando se trata do ponto de vista biológico. Nesse sentido, as fibras são divididas em solúveis e insolúveis. As fibras insolúveis são aquelas que formam com a água misturas de baixa densidade, como é o caso da celulose e lignina. Já as fibras solúveis são aquelas que apresentam viscosidade alta quando misturadas à água, como as pectinas e gomas (EUFRÁSIO, 2003).

2.2.6 Vitaminas e Minerais

As vitaminas, com exceção do ácido ascórbico (Vitamina C), não são sintetizadas pelo organismo dos ratos, portanto devem fazer parte da dieta. Se configuram por um grupo de compostos orgânicos que apesar de serem necessárias em quantidades baixas, desempenham papel primordial no organismo (LEWIS, et al., 2006; COSTA, et al., 2014).

Como outros nutrientes, vitaminas são necessários para o crescimento, regulação do metabolismo (expressão do gene e cofatores de enzimas), auxílio na conversão de hidratos de carbono e gordura para energia e na formação de ossos e tecidos. São classificadas de acordo com sua solubilidade em óleo ou água (hidrossolúveis ou lipossolúveis) (LEWIS, et al., 2006).

Os minerais são encontrados nas células, tecidos e órgãos. Suas principais funções incluem manutenção do pH para uma atividade celular normal, contração de músculos, produção de energia, conferindo dureza dos ossos e dentes, determinando propriedade osmótica de fluidos corporais. Uma dieta para ratos que contenha quantidade satisfatória de minerais pode ser medida a partir da sua quantidade de cinzas, que vai de 3,5 a 8,5% (LEWIS, et al., 2006).

2.3 DIETAS UTILIZADAS EM LABORATÓRIOS DE ANÁLISE EXPERIMENTAL

Levando em conta as necessidades nutricionais dos animais, as dietas utilizadas em laboratório têm a principal finalidade manter a saúde do animal. Porém encontra-se pouca atualização em relação às necessidades nutricionais dos roedores e esse pode ser um motivo de questionamento em relação à composição das dietas comerciais (MOURA, 2014)

2.3.1 Dieta comercial padrão peletizada

Formula-se a dieta comercial com alimentos processados, como grãos de trigo, milho, soja e farinha de peixe (COSTA et al., 2014). Essas dietas são amplamente utilizadas por serem mais econômicas, terem grande durabilidade e serem bem aceitas pelos animais. Porém, como a dieta é fabricada com ingredientes naturais, mesmo a dieta sendo da mesma marca, nem sempre ela possui a mesma composição de nutrientes, levando em consideração que podem haver variações em relação à espécie, número e qualidade dos ingredientes utilizados (LEWIS et al., 2006).

Atualmente em nosso país, as empresas que formulam as rações comerciais para roedores não levam em conta as diferenças nutricionais que há nas diversas etapas da vida dos animais de laboratório, como recomendado pelo NRC, portanto, essas rações devem ser submetidas a controles químicos e biológicos periódicos (NEVES; FILHO; MENEZES, 2013).

Outro fator que restringe a utilização deste tipo de dieta em pesquisas de nutrição experimental é o fato de que não é possível fazer a alteração de apenas um nutriente na dieta (LEWIS et al., 2006).

2.3.2 Dieta purificada

As dietas purificadas são formuladas com uma combinação de ingredientes purificados, extraídos de alimentos, como, por exemplo, a caseína ou a albumina (fontes proteicas); a sacarose e o amido (carboidratos) e o óleo vegetal (lipídeo). Pelos tipos de ingredientes utilizados, essa dieta tem sua composição conhecida e bem estabelecida (COSTA et al., 2014).

As variações entre fabricações deste tipo de dieta são mínimas, já que a padronização da dieta é possível pelo fato de serem utilizados apenas ingredientes refinados. A curto prazo, as dietas purificadas são muito bem aceitas, porém, são poucos estudos que avaliam a repercussão da dieta purificada a longo prazo (LEWIS et al., 2006). Além disso, as dietas purificadas são passíveis de alterações em fontes alimentares para situações em que há necessidade de estudo de algum ingrediente alimentar específico.

Segundo Faria (2010), é importante que os pesquisadores fiquem atentos ao utilizar dietas purificadas tendo em vista que seus ingredientes altamente refinados têm maior digestibilidade e melhor absorção, o que pode acarretar em problemas fisiológicos como aumento de colesterol sanguíneo.

Em 1973, o *American Institute of Nutrition* (AIN) organizou um comitê a fim de identificar uma dieta purificada padrão que fosse adotada em estudos nutricionais experimentais com roedores em laboratório. A padronização era necessária a fim de reduzir as variações nos estudos. Os resultados das pesquisas desse comitê deram origem à publicação da dieta AIN-76 (tabela 1).

A dieta AIN-76 era uma dieta purificada indicada para estudos de curta duração para ratos e camundongos em crescimento, gestação e lactação. Essa dieta foi elaborada a partir das recomendações nutricionais do NRC.

Tabela 1 - Dieta purificada AIN-76¹ (para ratos e camundongos).

INGREDIENTES	%
Caseína ²	20
DL- Metionina	0,3
Amido de milho	15
Sacarose	50
Fibra ³	5
Óleo de milho ⁴	5
Mix de mineral	3,5
Mix de vitamina	1,0
Bitartarato de colina	0,2

¹ Esta dieta é destinada para o crescimento e manutenção durante o primeiro ano de vida. Os pesquisadores devem estar cientes de que dietas ricas em sacarose podem ser carcinogênicas, e que algumas estirpes de ratos alimentados com dietas podem desenvolver lesões nos rins depois de períodos prolongados. A dieta foi considerada satisfatória para reprodução e lactação em ratos e camundongos. Se for utilizada para estudos de deficiência, modificações são necessárias. Se for utilizada em ambiente ultra limpo, vários elementos devem ser adicionados (Federação Proc. 33, 1748-1773, 1974). A dieta pode ser peletizada se desejado, por adição de água (sem ligante). ²Fonte de proteína, a caseína deve ser pelo menos 85% pura. ³Celulose micro fina de fibra. ⁴Alguns óleos de milho comerciais contêm antioxidantes (máximo 0,02%) Estes aditivos devem ser inócuos para a maioria dos estudos nutricionais, mas os pesquisadores devem estar cientes de sua presença. É recomendado que um óleo com antioxidante adicional seja utilizado para evitar o ranço. A dieta deve ser armazenada a 4 °C, e recomenda-se que a dieta não seja mantida por mais de 4 meses. A composição total de alguns minerais da dieta, devido à presença da caseína, será um pouco maior e pode variar de acordo com a caseína utilizada.

Fonte: AIN, 1977.

Em 1980, um segundo relatório foi publicado mencionando problemas de oxidação na dieta por armazenamento inadequado. Foi sugerido que uma adição de um antioxidante fosse realizada, porém sem muitos detalhes sobre tipo e quantidade. Além disto, foi questionada a utilização da sacarose como hidrato de carbono predominante da dieta e seus riscos metabólicos a longo prazo (AIN, 1977).

A partir daí, iniciaram-se diversas críticas referente à composição da dieta AIN-76, levando à necessidade de se reavaliar a composição. Problemas incluindo hiperlipidêmica, lesões hepáticas e problemas

técnicos com a composição foram citados em trabalhos que utilizaram a AIN-76 para alimentação dos roedores (FARIA, 2010).

Para o estabelecimento dessa nova recomendação, foi organizado, em 1989, um *workshop* em Los Angeles, Orleans, durante a reunião da *Federation of the American Societies for Experimental Biology* (FASEP), onde foi elaborado um resumo publicado no *Journal of Nutrition* (REEVES *et al.*, 1993). Como resultado do *workshop* e das sugestões enviadas, foi sugerida uma dieta considerando as quatro diferentes fases de vida do rato. Para o crescimento, a gestação e a lactação se recomendou a dieta AIN-93G, e para a manutenção da saúde do animal adulto, a dieta AIN-93M (REEVES *et al.*, 1993).

As alterações mais significativas nas dietas AIN-93 em relação à AIN-76A foram: 1) para aumento do ácido linoleico, substituiu-se os 5 g de óleo de milho por 7 g de óleo de soja para cada 100 g de alimento; 2) a quantidade de sacarose foi diminuída e amido de milho tornou-se o hidrato de carbono predominante; 3) a quantidade de fósforo foi reduzida para eliminar os problemas de calcificações renais em ratos; 4) a DL-metionina foi substituída por L-cisteína como complemento da caseína; e 5) as quantidades de vitaminas E, K e B12 foram aumentadas, e os minerais lítio, vanádio, níquel e molibdênio foram somadas às misturas dos minerais. Na dieta de manutenção AIN-93M, para cada kg de alimento, foram reduzidas as quantidades de lipídios para 40 g e de caseína para 140 g. Essas dietas apresentam um balanço mais correto de nutrientes essenciais quando comparados à AIN-76 (FARIA, 2010; REEVES *et al.*, 1993).

Ainda, segundo a publicação de Reeves *et al.* (1993), alterações em relação à fonte proteica ou fonte lipídica para estudos específicos podem ser realizados. Para esses tipos de alterações, no entanto, são necessárias alterações a fim de adequar a composição às necessidades dos animais. Por exemplo, com a substituição da caseína por proteína isolada de soja, é recomendado que a L-metionina seja adicionada à formulação para o equilíbrio dos aminoácidos sulfurados da dieta.

2.4 EFEITOS DA DIETA AIN-93M EM RATOS Wistar

Apesar das modificações realizadas na composição da dieta AIN-93G e AIN-93M, evidências científicas apontam efeitos negativos em ratos que são alimentados com esse tipo de dieta.

Lien *et al.* (2001) fizeram uma comparação entre as dietas AIN-76, AIN-93G e uma dieta comercial, por um período de 13 semanas com

ratos. Eles encontraram nesse estudo alterações no perfil lipídico e acúmulo de ácidos graxos em ambas as dietas do *American Institute of Nutrition*.

As alterações a nível hepático quanto à deposição de gordura também foram observadas no estudo de Silva et al. (2008), que avaliaram efeito hepatoprotetor de dieptanoína e trieptanoína em ratos alimentados com ambas as dietas AIN-93. Esse estudo corrobora ainda os achados de Santos et al. (2015a) que compararam a dieta AIN-93M com uma dieta comercial em ratos. Santos et al. (2015b) avaliaram dietas deficientes em colina e cistina para indução de esteatose hepática, que evidenciou acúmulo de ácidos graxos no fígado também na dieta controle AIN-93M (sem restrição de proteínas).

Ainda segundo estudo de Ferreira et al. (2006), que avaliaram o efeito da dieta restrita em calorias e dieta *ad libitum* AIN-93M, foi encontrado elevação do peso e da glicemia nesses ratos.

De acordo com estudo de Moura et al. (2012), a dieta AIN-93M provocou aumento de peso, tolerância à glicose reduzida e conduziu ao acúmulo de gordura no fígado, quando comparado com a dieta comercial.

Levando em conta a importância de ter uma dieta que preserve o objetivo inicial da pesquisa sem causar interferências externas e os achados científicos recentes que têm demonstrado alterações em parâmetros hepáticos e sanguíneos em ratos, a proposta deste trabalho é avaliar a dieta AIN-93M, AIN-93M com modificação na fonte proteica e dieta comercial e seus efeitos sobre os parâmetros já citados em ratos *Wistar* machos.

2.5 USO DE DIETAS COM PROTEÍNA DE ISOLADA DE SOJA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Segundo Avila (2007), a soja é um alimento com composição química quase completa, sendo fornecedor de proteína, ácidos graxos saturados e insaturados, vitaminas e compostos polifenólicos, como por exemplo as isoflavonas. Dados experimentais e clínicos têm mostrado que as isoflavonas representam uma alternativa promissora na prevenção e/ou tratamento de muitas doenças hormônio dependentes, incluindo câncer, sintomas da menopausa, doenças cardiovasculares e osteoporose (SETCHELL, 1999). Essas vantagens da proteína de soja para o

organismo traz a necessidade de investigações, primeiramente, em animais.

Segundo Reeves, et al. (1993), a dieta purificada pode ser modificada quanto a fonte de lipídeos, proteínas ou carboidratos, desde que os cuidados quanto a necessidades de nutrientes para os roedores sejam tomados. Neste caso, mesmo que a dieta original indique o uso de proteína de fonte animal (caseína), é possível modificar a proteína para fonte vegetal (proteína de soja isolada), porém, deve-se levar em consideração as deficiências quanto aminoácidos desta última fonte e suplementá-los (REEVES, et al., 1993).

O estudo de Moura et al. (2014), por exemplo, verificou mudanças positivas na glicemia e biomarcadores de estresse oxidativo da dieta com proteína de soja isolada, em contraste com a dieta com caseína, em ratos diabéticos. Outro trabalho, de Hagen et al. (2010), analisou e comparou o teor de isoflavonas em produtos de soja para verificar a eficácia das isoflavonas como antioxidantes para ratos com enfarte do miocárdio, também encontrando resultados favoráveis quando comparados a caseína.

Portanto, há vantagens na utilização da proteína isolada de soja no organismo e há pesquisas experimentais que vem sendo realizadas com animais utilizando esse tipo de fonte de proteína, o que justifica a utilização da proteína isolada de soja na dieta AIN-93M modificada deste projeto.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O estudo será analítico experimental, intervencional com animais e controlado. Os estudos experimentais são caracterizados pela comparação do efeito da intervenção entre o grupo controle e os grupos experimentais, possibilitando o estudo de relações causais entre os tratamentos ou intervenções aplicadas e suas respectivas respostas observadas (BONITA; BEAGLEHOLE; KJELLSTROM, 2010). A coleta de dados teve duração total de três meses e foi realizada no laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

3.2 FORMULAÇÃO DAS RAÇÕES

Com a finalidade de evitar contaminações fúngicas ou perda das características organolépticas, as dietas foram formuladas a cada sete dias. As formulações AIN-93M e AIN-93M com modificações foram preparadas no Laboratório de Nutrição Experimental da UFSC, embaladas em papel alumínio e acondicionadas em sacos plásticos, armazenadas sob refrigeração entre 4 a 6 °C, até que oferecidas aos animais. Todas as dietas foram oferecidas no mesmo horário, de forma *ad libitum*, ao início do ciclo escuro a fim de respeitar os hábitos noturnos da espécie.

3.2.1 Composição comercial

A dieta comercial foi adquirida da empresa Biobase® e fornecida pelo biotério central da UFSC. A ração comercial BIOTEC® é composta por: Milho moído, farelo de soja, farelo de trigo, DL-metionina, óleo de soja degomado, fosfato bicálcico, calcário calcítico, cloreto de sódio (sal comum), vitamina A, vitamina D, vitamina E, vitamina K, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, biotina, cloreto de colina, ácido fólico, ácido nicotínico, ácido pantotênico, iodato de cálcio, selenito de sódio, óxido de zinco, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato de manganês, sulfato ferroso, aditivo adsorvente, aditivo antifúngico, aditivo antioxidante, veículo q.s.p. (conforme fabricante).

Tabela 2 - Composição da dieta comercial.

INGREDIENTES	g/kg
Proteína Bruta (Mín.)	220,0 g/kg
Cálcio (Mín.)	10,0 g/kg
Cálcio (Máx.)	14,0 g/kg
Fósforo (Mín.)	8,0 g/kg
Lipídeos (Extrato Etéreo) (Mín.)	40,0 g/kg
Fibras (Matéria Fibrosa) (Máx.)	80,0 g/kg
Matéria Mineral (Máx.)	100,0 g/kg
Umidade (Máx.)	120,0 g/kg

Fonte: Site Biobase®

3.2.2 Formulação AIN-93M e AIN-93M com modificações

Para formulação da ração AIN-93M foi levado em consideração as recomendações para composição da dieta purificada conforme Reeves et al. (1993). A fim de observar a influência de determinados componentes da dieta sobre parâmetros de saúde dos animais e torna-la semelhante a dieta comercial, a composição da dieta AIN-93M sofreu algumas modificações (conforme tabela 3). A fonte proteica foi substituída por proteína isolada de soja (marca *Solae* SUPRO, pureza de no mínimo 90%). Foi realizada a adequação da quantidade proteica devido à digestibilidade diferenciada na proteína vegetal a partir do NPU. Outros estudos que utilizaram dieta modificada com proteína isolada de soja também utilizaram esses valores (ASSIS et al., 2015; HAGEN et al., 2009; LONDERO et al., 2013).

Foi adicionada a L-metionina, com a finalidade de completar a composição de aminoácidos da proteína isolada de soja. O amido dextrinizado foi retirado e a proporção do ingrediente foi acrescentada na

proporção de amido de milho, cujo cálculo correspondeu à diferença percentual para completar 100%, ou 100 g da ração. A proporção de metionina e cistina foi de 1:1 e foram baseadas no estudo de Byington e Howe de 1972, uma vez que o fabricante da ração comercial padrão não forneceu informações sobre a quantidade de metionina disponível.

Tabela 3 - Composições das dietas AIN-93M e AIN-93M modificada.

INGREDIENTES	AIN-93M (g/kg)	AIN-93M MODIFICADA (g/kg)
Amido de milho	465,692	508,892
Amido Dextrinizado ^b	155	-
Proteína de soja isolada ^a	-	250
Caseína ^b	140	-
Sacarose	100	100
Óleo de soja (sem aditivos)	40	40
Fibra (celulose micro fina) ^b	50	50
Mistura de minerais ^b	35	35
Mistura de vitaminas ^b	10	10
Cistina ^b	1,8	1,8
Metionina ^b	-	1,8
Bitartarato de colina ^b	2,5	2,5
Tetrabutyl Hidroquinona ^b	0,008	0,008

^a Proteína de soja isolada (ISP SUPRO 783, Tovani Benzaken, Brasil) ^b Amido Dextrinizado, Caseína, Celulose microfina, Mix de vitaminas e minerais AIN-93M, L-cistina, L-metionina, bitartarato de colina e tetrabutyl-hidroquinona (Rhoister, Brasil).

Fonte: Reeves et al., 1993.

Tabela 4 - Composição da mistura de minerais constituintes da dieta AIN-93.

Elementos minerais essenciais (g/kg da mistura)	
Carbonato de cálcio anidro (40,04% Ca)	357
Fosfato de potássio monobásico (22,76% P; 28,73% K)	250
Citrato de potássio, tripotássio, monoidratado (36,16% K)	28
Cloreto de sódio (39,34% Na; 60,66% Cl)	74
Sulfato de potássio (44,87% K; 18,39% S)	46,60
Óxido de magnésio (60,32% Mg)	24
Citrato de ferro (16,5% Fe)	6,06
Carbonato de zinco (52,14% Zn)	1,65
Carbonato de manganês (47,79% Mn)	0,63
Carbonato de cobre (57,47% Cu)	0,30
Iodato de potássio (59,3% I)	0,01
Selenato de sódio anidro (41,79% Se)	0,01025
Paramolibdato de amônio tetraidratado (54,34% Mo)	0,00795
Elementos minerais potencialmente benéficos	
Metassilicato de sódio nonaidratado (9,88% Si)	1,45
Sulfato de cromo e potássio dodecaidratado (10,42% Cr)	0,275
Cloreto de lítio (16,38% Li)	0,0174
Ácido bórico (17,5% B)	0,0815
Fluoreto de sódio (45,24% F)	0,0635
Carbonato de níquel (45% Ni)	0,0318
Vanadato de amônio (43,55% V)	0,0066
Sacarose	209,806

Fonte: Reeves et al, 1993.

Tabela 5 - Composição da mistura vitamínica presente nas dietas AIN-93.

Composição da mistura vitamínica (g/kg da mistura)	
Ácido nicotínico	3
Pantotenato de cálcio	1,6
Piridoxina-HCl	0,7
Tiamina-HCl	0,6
Riboflavina	0,6
Ácido fólico	0,2
D-biotina	0,02
Vitamina B12 (cianocobalamina: 0,1% em manitol)	2,5
Vitamina E (all-rac- α -acetato de tocoferila: 500UL/g)	15
Vitamina A (all-transpalmitato de retinil: 500.000 UL/g)	0,8
Vitamina D (colecalfiferol: 400.000UL/g)	0,25
Vitamina K (fitoquinona)	0,075
Sacarose	974,655

Fonte: Reeves *et al*, 1993.

3.3 ENSAIO BIOLÓGICO

3.3.1 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem *Wistar*, com idade inicial de 60 dias, idade na qual são considerados adultos jovens (SUCKOW; WEISBROTH; FRANKLIN; 2005). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFSC e foram mantidos e tratados no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição da UFSC. Foram utilizados 6 animais por grupo, sendo que, habitualmente, em estudos similares de comparação entre diferentes protocolos de dieta, utiliza-se um número de 6 a 12 ratos para cada tipo de protocolo dietético (SANTOS *et al.*, 2015a; BUENO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2008).

Os animais foram mantidos em condições padrão de luz e temperatura, com ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura ambiente de 21 ± 1 °C e acondicionados em 3 (três) animais por caixa, conforme o estudo de Santos et al., 2015a. Previamente à distribuição dos animais nas caixas, foi realizada a pesagem e distribuição homogênea e aleatória dos ratos nos diferentes grupos de tratamento de acordo com o peso corporal.

O grupo 01 corresponde ao grupo controle e recebeu ração comercial para ratos e camundongos da empresa BIOBASE® de Águas Frias, SC. O grupo 02 recebeu a ração formulada a partir das orientações do *American Institute of Nutrition* - AIN-93M. O grupo 03 recebeu uma ração formulada a partir das orientações do *American Institute of Nutrition* – AIN-93M, porém com adaptações referentes à fonte proteica (proteína de soja isolada) e ausência de amido dextrinizado, para que a sua composição fique mais próxima possível da ração comercial padrão, onde a fonte proteica é derivada do farelo de soja em sua maior parte, e ausência de carboidratos previamente processados, porém sem perder a característica de ser uma dieta purificada (REEVES et al.,1993).

3.3.2 Peso e consumo

Todos os animais foram pesados semanalmente e simultaneamente em um dia fixo para avaliar o ganho ponderal de peso. A balança utilizada é de precisão, utilizando um recipiente com tampa que teve seu peso descontado. Para avaliar o consumo dos animais, a dieta oferecida também foi pesada, bem como as sobras do dia posterior, para cálculo da diferença. Para ratos de laboratório, o consumo habitual médio é de 30 g de ração por dia, valor qual será utilizado de base para fornecer a dieta aos animais. Inicialmente nessa pesquisa foi ofertado 60 g por animal para garantir o consumo *ad libitum* (ANDRIGUETO, 2002; GUIMARÃES; MAZZARO, 2004).

3.3.3 Eutanásia

O método de eutanásia proporcionou aos animais o mínimo de desconforto possível e o tempo entre a inconsciência e a morte foi o menor possível (COSTA et al., 2014). Ao final dos tratamentos dietéticos, que duraram 12 semanas, os animais foram sedados com cetamina e xilazina e eutanasiados por hipovolemia ao realizar punção cardíaca.

3.4 PARÂMETROS SANGUÍNEOS

3.4.1 Processamento do sangue

O sangue foi obtido por punção cardíaca antes do procedimento de eutanásia com os animais anestesiados e em jejum de 12 horas, e foi acondicionado em tubo contendo anticoagulante EDTA e centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos para obtenção do plasma. Posteriormente, o plasma foi acondicionado em tubos eppendorf e mantidos em freezer a -80 °C até os procedimentos de análise. Abaixo estão os parâmetros sanguíneos que foram avaliados.

3.4.1.1 Albumina

A albumina foi determinada através de kit comercial específico da marca Labtest® a partir do plasma obtido por centrifugação do sangue. Esse teste avalia, a partir de um sistema de medição, levando em consideração o desvio do pico de absorvância máxima de um corante (verde de bromo-cresol) quando ligado à albumina. Para isso, foi utilizado um espectrofotômetro capaz de medir essa absorvância entre 600 e 640 nm, sendo que os resultados dos valores da albumina foram expressos em g/dL, conforme estudo de Carvalho et al. (2009).

3.4.1.2 Proteína Total

Foram determinadas proteínas totais a partir do método calorimétrico utilizando kit Labtest® de proteínas totais para tal. Utilizando o reagente de Biureto, os íons de cobre (Cu²⁺) em meio alcalino reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando uma cor púrpura. Para tanto, foi utilizado um fotômetro capaz de medir a absorvância entre 510 e 560 nm. Os resultados das proteínas totais foram expressos em g/dL. (CARVALHO et al., 2009)

3.4.1.3 Creatinina

Foi determinada a partir do método cinético utilizando o kit Creatinina K Labtest®. A dosagem da creatinina é realizada a partir da reação de Jaffé (MYERS et al., 2006). Sua mensuração é realizada a

partir de uma reação cinética, onde a creatinina reage com o ácido pícrico, formando um complexo de cor que é lida no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 500 a 540 nm, sendo que a formação desta cor é proporcional a creatinina da amostra e os resultados são expressos em mg/dl (CARVALHO et al., 2009).

3.4.1.4 Perfil lipídico

Para realização do exame de Colesterol HDL foi utilizado o kit colesterol HDL da Labtest, por meio do sistema para precipitação das lipoproteínas de baixa e de muito baixa densidade (LDL e VLDL), e determinação do colesterol HDL no sobrenadante após centrifugação (RODRIGUES et al, 2009). O Triacilglicerol foi determinado pelo método enzimático colorimétrico, conforme o kit triglicérides da Labtest. A determinação do LDL-colesterol será por meio do parâmetro não-HDL-colesterol, obtido pela diferença entre colesterol total e HDL-colesterol). Os resultados foram expressos em mg/dl.

3.4.1.5 Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT)

Foram utilizados sistemas para determinação de transaminases através da metodologia de cinética UV juntamente com kits AST/GOT Liquiform e ALT/GPT Liquiform da Labtest. O piruvato e o oxaloacetato formados pela ação das aminotransferases foram acoplados a uma segunda reação onde o piruvato (pela ação da lactato desidrogenase) ou oxaloacetato (pela ação da malato desidrogenase) são reduzidas respectivamente a lactato e malato, enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD⁺. Com a oxidação, a redução na absorvância em 340nm foi monitorada fotometricamente, sendo diretamente proporcional a atividade de ALT e AST nas amostras. Os resultados se mostram em U/L. (PINTO, 2010).

3.5 PARÂMETROS HEPÁTICOS

3.5.1 Histologia do fígado

O fígado foi dissecado da cavidade abdominal do rato e pesado em balança centesimal 0,01 (Kern 440-53). O lobo maior (lobo esquerdo), foi

seccionado no seu maior diâmetro e o fragmento obtido foi imerso em solução de formol a 10% para fixação.

Subsequentemente, lóbulos cortados foram processados em álcool 70%, embebido em parafina e foi utilizada a coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE) para análise. Os graus de esteatose hepática foram avaliados de acordo com a porcentagem de hepatócitos contendo gordura macrovesicular (grau 1: 0% - 25%; grau 2: 26% - 50%; grau 3: 51% - 75%; grau 4: 76% - 100%) (KIRSCH et al, 2003). A análise das placas foi realizada por um patologista treinado cegado para os grupos experimentais.

As alterações patológicas foram avaliadas sob um microscópio Olympus BX-41. Os focos de inflamação, definidos como grupos de cinco ou mais leucócitos (objetivo de $\times 40$), foram expressos como a média de diferentes campos dentro de cada slide, sendo classificado como presente ou ausente.

3.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram tabulados no programa Microsoft Office Excel 2010[®]. A normalidade dos dados foi verificada com o teste de *Shapiro-Wilk*, sendo que todos apresentaram distribuição normal. A estatística descritiva constou do cálculo de média, desvio-padrão, mínimo e máximo para todos os dados contínuos e discretos e frequências absoluta e relativa para os dados categóricos. Para as análises foi utilizado o software estatísticos Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software, Inc.).

Para analisar as diferenças entre os grupos nos parâmetros avaliados para cada dieta, foi utilizado o teste ANOVA (*ANalysis Of VAriance*) de uma via seguido da aplicação do pós-teste de *Tukey*.

Para análise do peso dos animais e do consumo alimentar ao longo do experimento foi utilizado o teste ANOVA de medidas repetidas, no qual a dieta é o fator e o tempo (em semanas) é a medida repetida. Quando houve diferença significativa, foi aplicado o teste *ANOVA de uma via* para cada ponto do tempo.

Para os dados de contagem de esteatose hepática do fígado foi realizado teste Qui quadrado de Pearson.

Para todos os testes estatísticos que foram realizados, foi adotado o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

3.7 PROCEDIMENTOS ÉTICOS DE PESQUISA

Todos os procedimentos seguiram as normas apresentadas no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH) e foram submetidos à apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) vinculada à Pró-Reitoria de Pesquisa da UFSC, sob adendo do projeto de número de protocolo 00973.

4 RESULTADOS – ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados provenientes do projeto de dissertação serão submetidos na forma de artigo ao periódico *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, cujo qualis na Nutrição é B1 e o fator de impacto (2015) é 2.09. As normas de submissão ao periódico desejado estão disponíveis no seguinte *link*:
<http://www.nrcresearchpress.com/page/apnm/authors>

Artigo de pesquisa

EFEITO DAS DIETAS AIN-93M E AIN-93M COM MODIFICAÇÃO DA FONTE PROTEICA SOBRE PARAMETROS HEPÁTICOS E SANGUÍNEOS EM RATOS *WISTAR*

Priscila Paola Wildner¹, Rodrigo Otávio Alves de Lima², Edson Luiz da Silva³, Letícia Carina Ribeiro⁴, Julia Dubois Moreira^{5*}

¹Aluna do curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Nutrição – Universidade Federal de Santa Catarina, bolsista CAPES, priscilapwildner@gmail.com

²Professor do Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Doutor em Patologia, rodrigo.alves.lima@ufsc.br

³Professor do Programa de Pós-Graduação em Nutrição – Universidade Federal de Santa Catarina, Doutor em Farmácia, dasilvael@hotmail.com

⁴Professora do Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Doutora em Neurociências, leticia.ribeiro@ufsc.br

⁵ Professora do Programa de Pós-Graduação em Nutrição – UFSC. Doutora em Bioquímica. Campus Trindade. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Nutrição. Rua Delfino Conti s/ número. CEP 88040-900. juliamoreira@gmail.com

*Autor correspondente: Profa. Júlia Dubois Moreira. Email: juliamoreira@gmail.com.

RESUMO:

Estudos experimentais na área da Nutrição são muito importantes para o entendimento do papel dos nutrientes no organismo. Estudos recentes mostram que o protocolo de dieta preconizado pela *American Institute of Nutrition* (AIN-93) tem causado efeitos indesejáveis em ratos Wistar. Neste sentido, esta pesquisa objetivou verificar o efeito da dieta

AIN-93M, sobre parâmetros sanguíneos e hepáticos, bem como se a modificação da fonte proteica pode melhorar a resposta metabólica. Ratos Wistar (P60) foram aleatoriamente divididos em 03 grupos (n= 6 por grupo): grupo controle (C); grupo AIN93M (AIN1); e grupo AIN93M com proteína isolada de soja (AIN2). Durante o tratamento (120 dias) foram obtidos valores de peso corporal semanal e consumo alimentar. Ao final do tratamento, foram avaliados: o ganho de peso corporal; peso do fígado e tecido adiposo; concentração plasmática de biomarcadores (glicose, albumina, proteína total, creatinina, colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina, AST e ALT); histologia do fígado para verificar presença de esteatose hepática. Na análise estatística, utilizou-se ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey e Qui quadrado de Pearson. Os animais do grupo AIN1 tiveram maior peso corporal, ganho de peso e peso dos órgãos, apresentando também maiores graus de esteatose hepática quando comparados ao controle. O grupo controle teve a maior concentração de TG plasmáticos. Pode-se concluir que o protocolo de dieta AIN93M causa esteatose hepática em ratos. A substituição da caseína por proteína isolada de soja é uma alternativa para prevenir o ganho excessivo de peso e o desenvolvimento de esteatose hepática.

Palavras Chave: AIN-93M; dieta purificada; proteína isolada de soja; caseína; alterações metabólicas; esteatose hepática.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de animais de laboratório nas pesquisas científicas traz diversas vantagens, uma vez que oferece a oportunidade de controlar variáveis que em humanos seriam muito difíceis ou impossíveis de controlar, além do acesso praticamente irrestrito a tecidos e estruturas corporais. A dieta é uma dessas variáveis, uma vez que influencia diretamente o crescimento, a capacidade de reprodução dos animais e o seu estado de saúde e desenvolvimento de doenças (SANTOS et al, 2015a).

Quando o pesquisador opta por realizar um estudo experimental utilizando modelos animais, é fundamental que uma alimentação adequada e sem restrições seja oferecida, principalmente quando se refere a animais de grupo controle. Para isso, deve-se levar em conta as características do ciclo de vida do animal (crescimento, desenvolvimento, gestação) para que a dieta atenda essas necessidades nutricionais e para

que não haja interferências indesejáveis na resposta ao experimento que se deseja realizar (COSTA et al, 2014).

O *American Institute of Nutrition* publicou em 1993, a partir de um comitê, um protocolo de dieta que considera quatro fases da vida de roedores: crescimento, gestação e lactação (dieta AIN-93G), e manutenção da saúde na vida adulta (dieta AIN-93M), que são utilizadas como dieta padrão/controle em estudos na nutrição experimental (REEVES, et al, 1993; LIEN, et al, 2000; SILVA, et al, 2008; MOURA, et al, 2012; FERREIRA, et al, 2015; SANTOS, et al, 2015a; SANTOS, et al, 2015b). Essa dieta foi elaborada com a finalidade de padronizar as pesquisas biomédicas em relação a alimentação ofertada a animais de grupo controle e minimizar os vieses dos experimentos que utilizam animais de laboratório em todo o mundo.

Contudo, alguns autores passaram a evidenciar alterações metabólicas em roedores que eram alimentados com ambas dietas AIN-93 (AIN-93G e AIN-93M), como alterações no perfil lipídico (LIEN et al., 2001) e esteatose hepática (SILVA et al., 2008). Santos e colaboradores (2015a) fizeram a comparação da dieta AIN-93 com uma dieta comercial, evidenciando o acúmulo de ácidos graxos no fígado dos animais tratados com AIN-93M após quatro meses de tratamento. Apesar destes achados recentes, pouco ainda se sabe dos efeitos destas dietas sobre a saúde de roedores em experimentação animal desde sua padronização.

Não obstante, não foram encontrados estudos recentes que propuseram algum tipo de mudança de composição no protocolo AIN-93M com o objetivo de prevenir estes efeitos deletérios evidenciados. Uma das alternativas propostas seria tornar a composição da dieta AIN-93M mais próxima possível à composição encontrada nas dietas comerciais padrão, levando em conta que essas dietas utilizam preferencialmente ingredientes de fonte vegetal.

Neste sentido, por ser uma dieta amplamente utilizada na literatura científica como sendo o padrão para uma dieta adequada ou como uma dieta controle, a qual é utilizada de maneira crônica ao longo da vida dos roedores de laboratório, faz-se necessário mais estudos que auxiliem na investigação dos efeitos metabólicos da AIN-93M, bem como sua adequação para a manutenção da saúde destes animais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e dietas

Foram utilizados ratos Wistar machos (n=18) de 60 dias de vida (peso 194-281 g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), mantidos em condições de luz e temperatura controladas ($21\pm 1^\circ\text{C}$, ciclo claro-escuro de 12 horas, acesso à água e comida *ad libitum*, acondicionados três animais por caixa). Os animais foram pesados semanalmente e seu consumo alimentar foi calculado diariamente. Todos os procedimentos seguiram as normas apresentadas no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH) e foram submetidos à apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) vinculada à Pró-Reitoria de Pesquisa da UFSC, sob adendo do projeto de número de protocolo 00973.

O tratamento dietético teve duração de 12 semanas e os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos: 1) dieta controle (C), onde os animais receberam ração padrão comercial (Biobase®, Brasil); 2) dieta AIN-93M (AIN1), onde os animais receberam a ração formulada conforme Reeves e colaboradores (1993); e 3) dieta AIN-93M com modificação de fonte proteica (AIN2), com a substituição da caseína por proteína isolada de soja (Tabela 3). As formulações AIN1 e AIN2 foram preparadas diariamente pelos pesquisadores.

No grupo AIN2, a caseína foi substituída por proteína isolada de soja (marca *Solae* SUPRO, pureza de no mínimo 90%), na proporção baseada em estudos prévios (ASSIS et al., 2015; HAGEN et al., 2009; LONDERO et al., 2013). Foi adicionada L-metionina, com a finalidade de completar a composição de aminoácidos da proteína isolada de soja. A proporção de metionina e cistina foi de 1:1, baseado no estudo de Byington e Howe de 1972, uma vez que o fabricante da ração comercial padrão não forneceu informações sobre a quantidade de metionina disponível. O amido dextrinizado foi retirado, uma vez que não está presente na ração comercial padrão, e a proporção deste ingrediente foi acrescentada na proporção de amido de milho, cujo cálculo correspondeu à diferença percentual para completar 100%, ou 100 g da ração. Ambos os protocolos AIN eram isocalóricos.

Tabela 6. Composição da dieta controle.

INGREDIENTES	g/kg
Proteína Bruta (Mín.)	220,0
Cálcio (Mín.)	10,0
Cálcio (Máx.)	14,0
Fósforo (Mín.)	8.000,0
Lipídeos (Extrato Etéreo) (Mín.)	40,0
Fibras (Matéria Fibrosa) (Máx.)	80,0

Fonte: Site Biobase®. Fornecida pelo Biotério Central da UFSC.

Tabela 7. Composições das dietas AIN1 e AIN2.

INGREDIENTES	AIN1 (g/kg)	AIN2 (g/kg)
Amido de milho	465,692	508,892
Amido Dextrinizado ^b	155	-
Proteína de soja isolada ^a	-	250
Caseína ^b	140	-
Sacarose	100	100
Óleo de soja (sem aditivos)	40	40
Fibra (celulose micro fina) ^b	50	50
Mistura de minerais ^b	35	35
Mistura de vitaminas ^b	10	10
Cistina ^b	1,8	1,8
Metionina ^b	-	1,8
Bitartarato de colina ^b	2,5	2,5
Tetrabutil Hidroquinona ^b	0,008	0,008

Sendo que C= Controle; AIN1=AIN-93M; AIN2 = AIN-93M modificada

^a Proteína de soja isolada (ISP SUPRO 783, Tovani Benzaken, Brasil) ^b Amido Dextrinizado, Caseína, Celulose microfina, Mix de vitaminas e minerais

AIN-93M, L-cistina, L-metionina, bitartrato de colina e tetrabutyl-hidroquinona (Rhoister, Brasil).

Após as doze semanas de intervenção, os animais foram anestesiados com cetamina (100ml/kg intraperitoneal) e xilazina (10ml/kg intraperitoneal) e eutanasiados por hipovolemia ao realizar punção cardíaca para obtenção do sangue para análises bioquímicas.

2.2 *Parâmetros sanguíneos*

2.2.1 *Processamento do sangue*

O sangue foi obtido por punção cardíaca antes do procedimento de eutanásia, com os animais anestesiados e em jejum de 12 horas, e foi acondicionado em tubo contendo anticoagulante EDTA e centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos para obtenção do plasma. Posteriormente, o plasma foi acondicionado em tubos *ependorf* e mantidos em freezer a -80 °C até os procedimentos de análise. Os parâmetros sanguíneos avaliados foram glicose, albumina, proteína total, creatinina, colesterol, triglicerídeos, fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Para as análises foram usados kits comerciais específicos para cada biomarcador (Labtest®, Brasil).

2.2.2 *Estruturas anatômicas*

Após eutanásia, foram retiradas e pesadas as estruturas corporais: fígado, tecido adiposo epididimal e retroperitoneal para comparação de massa das estruturas entre os grupos. A gordura total foi obtida do somatório do peso dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal.

2.3 *Parâmetros hepáticos*

2.3.1 *Histologia do fígado*

O fígado foi dissecado da cavidade abdominal do rato e pesado em balança centesimal 0,01 (Kern 440-53). O lobo maior (lobo esquerdo), foi seccionado no seu maior diâmetro e o fragmento obtido foi imerso em solução de formol a 10% para fixação.

Subseqüentemente, lóbulos cortados foram processados em álcool 70%, embebido em parafina e foi utilizada a coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE) para análise. Os graus de esteatose hepática foram avaliados de acordo com a porcentagem de hepatócitos contendo

gordura macrovesicular (grau 1: 0% - 25%; grau 2: 26% – 50%; grau 3: 51% - 75%; grau 4: 76% - 100%) (KIRSCH et al, 2003). A análise das placas foi realizada por um patologista treinado cegado para os grupos experimentais. As alterações patológicas foram avaliadas sob um microscópio Olympus BX-41. Os focos de inflamação, definidos como grupos de cinco ou mais leucócitos (objetivo de $\times 40$), foram expressos como a média de diferentes campos dentro de cada slide

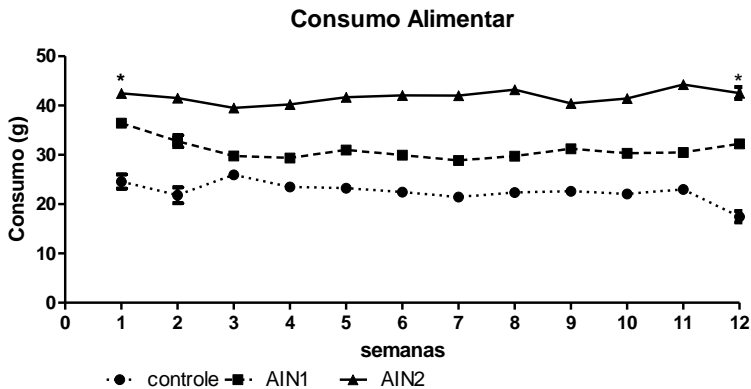
2.4 Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Para análise da normalidade dos dados foi aplicado o teste Shapiro-Wilk; os dados que apresentaram simetria foram expressos na forma de média desvio padrão e, quando assimétricos, foram expressos como mediana e intervalo interquartil. Para analisar as diferenças de médias entre os grupos nas variáveis bioquímicas, peso corporal e de tecidos corporais foi utilizado ANOVA de uma via seguido *post hoc* de Tuckey. Para análise da variância do peso dos animais ao longo do experimento foi utilizado ANOVA de medidas repetidas seguida do *post hoc* Tuckey. Para avaliar contagem de células hepáticas com esteatose foi utilizado teste Qui quadrado Pearson. Para todos os testes estatísticos realizados foi adotado o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 Consumo alimentar e pesagem corporal

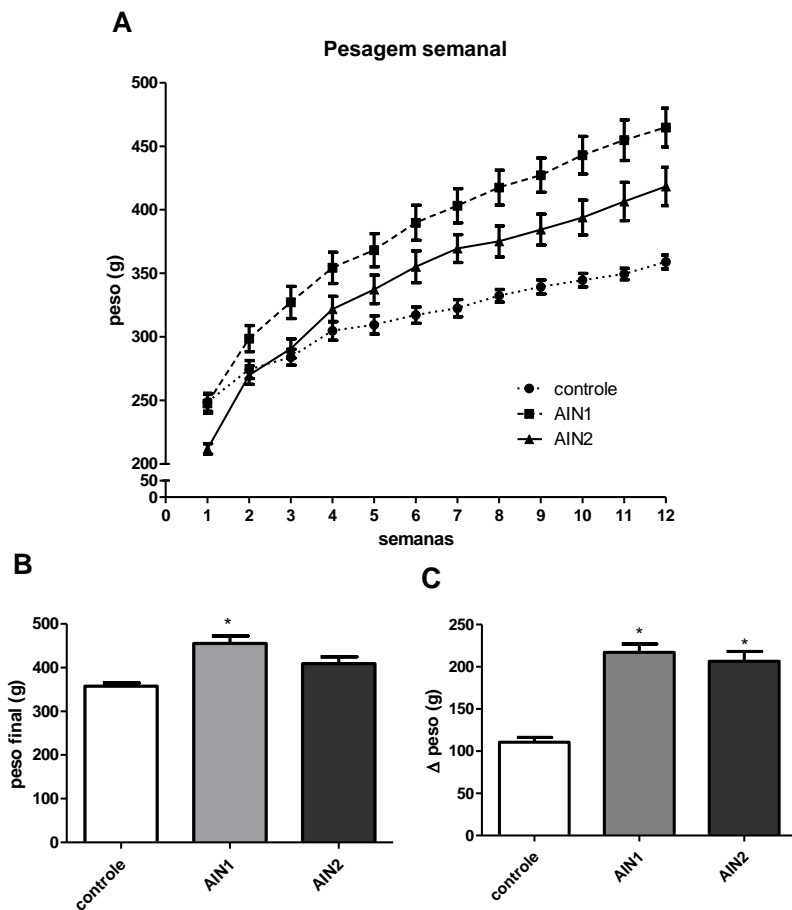
A figura 1 traz a média de consumo alimentar semanal dos animais em experimentação. Observa-se que o consumo alimentar dos animais AIN2 foi maior do que o consumo dos demais grupos ($F= 332,6$; $p = <0,0001$), apesar de ao longo das doze semanas o consumo não ter apresentado variações significativas dentro dos grupos.

Figura 1. Valores de ingestão alimentar ao longo das 12 semanas.

Os valores são representados por média de desvio padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle utilizando ANOVA com pós teste de Tuckey.

Em relação ao peso corporal, a média dos pesos iniciais de todos os grupos não foram diferentes estatisticamente; porém, ao longo da intervenção (figura2A), a variação do ganho ponderal foi diferente entre os grupos ($p < 0,0001$). Ao avaliar o peso dos animais ao final do experimento (figura2B), o grupo AIN1 apresentou maior peso ($p = 0,0009$), diferindo somente do grupo controle. A diferença entre o peso final e inicial dos animais (figura2C) foi estatisticamente maior nos grupos AIN1 e AIN2 quando comparados ao grupo C (Controle: $110 \text{ g} \pm 14,5$; AIN-93M: $217,2 \text{ g} \pm 23,6$; AIN-93M modificada: $206 \text{ g} \pm 29,9$, $F = 38,67$; $p = < 0,0001$).

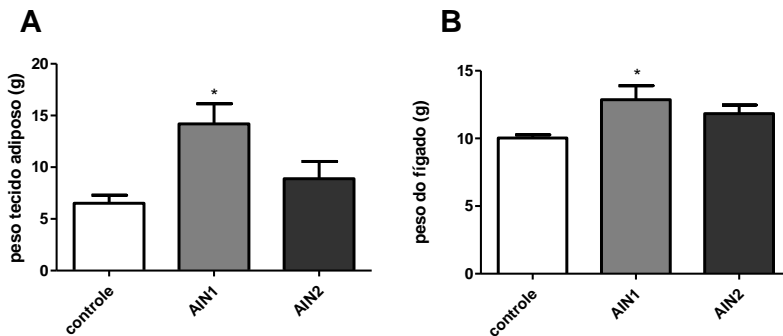
Figura 2. Valores de peso corporal. (A) Pesagem ao longo das 12 semanas de experimento. (B) Pesagem dos animais ao fim do experimento. (C) Variação de peso ao longo do experimento (peso final – peso inicial).



Os valores são representados por média e desvio padrão. * $p < 0,05$ em relação ao controle utilizando ANOVA de uma via e pós teste de Tuckey.

A figura 3 mostra o peso do fígado e tecido adiposo dos animais em experimentação. Os tecidos com maior peso foram dos animais do grupo AIN1, sendo que, tanto no peso do tecido adiposo total (figura 3A - Controle: $6,5 \text{ g} \pm 1,8$; AIN93M: $14,9 \text{ g} \pm 4,7$; AIN-93M modificada: $8,8 \text{ g} \pm 4,0$; $F = 6,489$; $p = 0,0093$) quanto no peso do fígado (figura 3B - Controle: $10,03 \text{ g} \pm 0,5$; AIN-93M: $11,83 \text{ g} \pm 2,5$; AIN-93M modificada: $10,03 \text{ g} \pm 1,5$; $F = 3,986$; $p = 0,0409$) houve diferença estatística em relação ao controle. Os animais do grupo AIN2 não foram diferentes estatisticamente dos demais grupos.

Figura 3. Peso do tecido adiposo (A) e do fígado (B) dos animais.



Os valores são representados por média e desvio padrão.

¹Tecido adiposo total = tecido adiposo retroperitoneal + tecido adiposo epididimal

* $p < 0,05$ em relação ao controle.

3.2 Variáveis bioquímicas

De acordo com as variáveis bioquímicas avaliadas (tabela 8), os biomarcadores de função renal, creatinina e fosfatase alcalina, apresentaram-se significativamente elevados no grupo AIN2 em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$), porém, sem ultrapassar valores de referência para ratos Wistar (MELO, et al, 2012). As concentrações de proteína total para o grupo AIN2 foram significativamente menores quando comparado aos valores dos outros dois grupos ($p < 0,0001$). Os resultados de proteína total para todos os grupos apresentaram-se

elevados para os valores de referência de normalidade para ratos (5,4 a 6,6 g/dL) (MELO, et al, 2012).

Tabela 8. Variáveis bioquímicas dos grupos controle, AIN1 e AIN2.

Variáveis	GRUPOS					
	C		AIN1		AIN2	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Glicose (mg/dL)	197,5	39,7	220,7	38,4	190,5	34,8
Creatinina (mg/dL)	0,201	0,004	0,225	0,02	0,393 ^a	0,055
Colesterol (mg/dL)	94,8	16,1	77,1	13,9	98,0	24,41
Triglicerídeos (mg/dL)	224,7 ^b	32,25	150,3	52,5	87,5	41,56
Albumina (g/dL)	3,11	0,27	3,5	0,3	2,8 ^b	0,28
Proteína Total (g/dL)	8,7	0,13	9,14	1,1	7,05 ^a	0,4
AST* (U/L)	62,5	7,7	54,3	9,48	84,3 ^a	19,9
ALT* (U/L)	66,33 ^b	5,3	29,8	3,81	26,6	15,6
Fosfatase Alcalina (U/L)	29,3	2,8	28,3	6,6	98,5 ^a	18,1

Sendo que C= Controle; AIN1=AIN-93M; AIN2 = AIN-93M modificada

*AST = Aspartato aminotransferase ALT: Alanina aminotransferase

^a p < 0,05 em relação ao controle por ANOVA de uma via e pós teste de Tuckey.

^b p < 0,05 em relação à AIN1.

As concentrações de albumina se mostrou superior ao indicado como normalidade por MELO, et al (2012) no grupo AIN1, sendo que o grupo AIN2 apresentou menor concentração quando comparado ao grupo AIN1 (p=0,0043).

Foram encontradas concentrações elevadas de triglicérido no grupo controle, sendo esses valores maiores que os outros dois grupos (p=0,0002).

As variáveis de função hepática apresentaram valores distintos. As concentrações de AST se encontram diminuídas quando comparados com os valores de referência para ratos nos grupos C e AIN1. No grupo AIN2, as concentrações de AST apresentaram-se significativamente maiores ($p=0,0046$) quando comparado aos outros dois grupos. Os valores de ALT foram menores nos grupos AIN quando comparadas ao controle ($p<0,0001$).

3.1 Parâmetros hepáticos

Foi verificada diferença no padrão de esteatose entre todos os grupos ($p<0,0001$). Os grupos controle e AIN2 mantiveram valores semelhantes nos graus de esteatose hepática, sendo classificados como histologia normal. Já o grupo AIN1 mostrou focos de esteatose muito maiores que os demais grupos (tabela 9, figura 4).

Foram observados também focos de células inflamatórias (tanto células monomorfonucleares quanto polimorfonucleares) no tecido dos animais (tabela 10). A maior prevalência foi nos animais no grupo AIN1, sendo diferente do grupo controle e AIN2 ($<0,0001$).

Tabela 9. Contagem de campos em tecido hepático com células gordurosas em diferentes graus de esteatose nos grupos controle, AIN1 e AIN2.

Esteatose (%)	Grupos		
	C	AIN1	AIN2
0 – 25	394	102	358
26 – 50	11	120	40
51 – 75	30	212	27
>76	4	14	0
Total	439	448	425

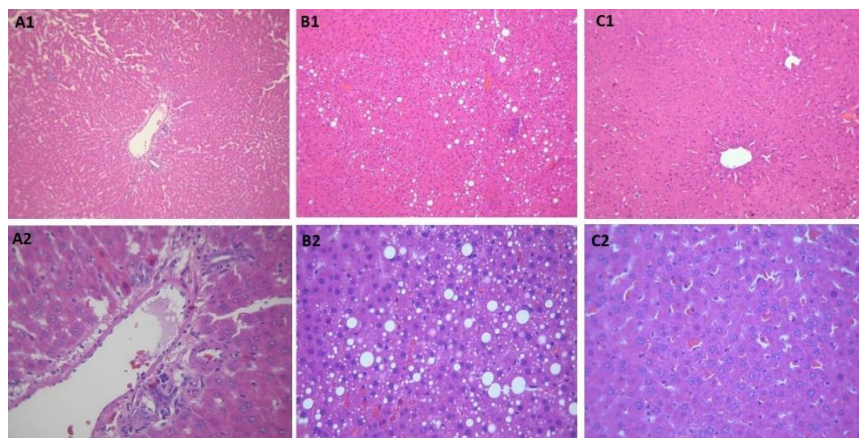
Sendo que C= Controle; AIN1=AIN-93M; AIN2 = AIN-93M modificada

Tabela 10. Contagem de campos em tecido hepático com foco de células inflamatórias nos grupos controle, AIN1 e AIN2

Inflamação	Grupos		
	C	AIN1	AIN2
Ausente	419	348	410
Presente	20	100	15
Total	439	448	425

Sendo que C= Controle; AIN1=AIN-93M; AIN2 = AIN-93M modificada

Figura 4. Imagens de graus de esteatose hepática representativos para cada um dos grupos experimentais. (A) Grupo Controle (B) Grupo AIN1 (C) Grupo AIN2



(A) Tecido hepático do animal representativo do grupo controle apresentando esteatose hepática grau 1 (0 – 25%); A1 aumento 100x; A2 aumento 400x. (B) Tecido hepático do animal representativo do grupo AIN1 apresentando esteatose hepática de grau 3 (51 - 75%); B1 aumento 100x, B2 Aumento 400x. (C) Animal representativo do grupo AIN2 apresentando esteatose hepática grau 1 (0 – 25%), C1 aumento 100x, C2 aumento 400x.

4 DISCUSSÃO

Existe um interesse muito grande no meio científico sobre o estudo do papel da dieta e padrões alimentares no desenvolvimento de doenças, ou mesmo como determinados nutrientes podem atuar como tratamento para tais males. Desta forma, a dieta do grupo controle deve ser a mais idônea possível, com o intuito de ser adequada nutricionalmente e não causar efeitos adversos que possam comprometer os resultados de tais pesquisas. Em nosso estudo, observamos que o protocolo de dieta AIN93M, frequentemente utilizada como dieta do grupo controle em estudos experimentais, causou aumento de peso corporal e esteatose hepática. A substituição da caseína por proteína isolada de soja neste protocolo dietético amenizou algumas destas alterações, sugerindo ser uma alternativa de fonte proteica com menor risco para estes desfechos.

Neste trabalho, ao avaliarmos o consumo alimentar e peso corporal dos animais tratados com as dietas AIN93M com distintas fontes proteicas, o grupo AIN1, apesar de não ser o grupo com maior consumo alimentar, apresentou os maiores pesos corporais (valores de pesagem semanal, peso corporal final, variação de peso, tecido adiposo e fígado) quando comparado aos demais grupos. Este efeito também foi evidenciado em outras pesquisas (KOBAYASHI et al, 2014; BRANDSCH et al, 2007; CHEN, et al, 2016), onde animais alimentados com dieta a base de soja tiveram menor peso e menor acúmulo de tecido adiposo quando comparados a animais que foram alimentados com dieta com caseína. Também é possível que a qualidade da proteína da dieta tenha influenciado de alguma forma estes achados. A relação de eficiência de proteína (PER) foi calculada no estudo de Han, Chee e Cho (2015) para dietas com caseína e proteína isolada de soja e obteve-se o valor de 2,58 para dietas com caseína e 1,51 para dietas com proteína isolada de soja. Esse coeficiente determina a capacidade de uma proteína promover o crescimento de ratos, evidenciando que, no estudo supracitado, a dieta de proteína animal teve maior eficiência proteica que a dieta com proteína de origem vegetal. Em nosso estudo, a diferença de peso corporal parece estar mais relacionada ao ganho excessivo de peso, principalmente na forma de gordura, pelo grupo AIN1, pois houve a suplementação de aminoácidos limitantes da proteína vegetal para compensar este efeito. Porém, não podemos descartar que a eficiência proteica pode ter influenciado nossos achados, pois a concentração plasmática de proteínas totais ficou diminuída no grupo alimentado com a proteína isolada de soja, mas ainda dentro de valores de referência (MELO, et al, 2012).

O maior consumo alimentar por parte dos grupos que receberam ambos os protocolos AIN93M podem se dever ao fato destas possuírem na sua composição valores significativos de sacarose e serem visivelmente mais processadas do que a dieta comercial padrão, tornando-as mais palatáveis que a dieta oferecida ao grupo controle. A palatabilidade da dieta é um alvo de estudos que tentam relacionar o ganho de peso e a obesidade com o aumento do consumo de alimentos mais palatáveis. Souza e colaboradores (2014) observaram que os animais alimentados com uma dieta hiperpalatável rica em sacarose durante quatro meses tiveram alterações no peso final e variação de peso, alteração nos níveis de colesterol total, triglicerídeos plasmáticos e hepáticos, corroborando alguns dos nossos achados. Outra situação que pode ter interferido no consumo alimentar dos animais é a consistência da dieta. A dieta purificada (AIN1 e AIN2) tem a ração com consistência mais macia que a ração comercial ofertada aos animais controle, sendo que, o ato de roer pode promover maior saciedade nos animais.

Nos resultados referentes aos exames bioquímicos plasmáticos, observou-se poucas diferenças entre os grupos e a maioria dos parâmetros avaliados estavam dentro dos valores de referência preconizados para ratos de laboratório (MELO, et al, 2012), com exceção dos triglicerídeos plasmáticos, que estavam aumentados no grupo controle.

Em relação ao perfil lipídico plasmático, já é estabelecido que os efeitos da proteína de soja sobre os lipídeos plasmáticos são, em parte, atribuíveis ao seu conteúdo de isoflavonas, como a genisteína e daidzeína. No estudo de Peluso, et al (2000), os animais alimentados com uma dieta de proteína isolada de soja enriquecida com isoflavonas (2,89mg/gPTN) mostrou menores valores de peso do fígado, concentrações de triglicerídeos do fígado, colesterol total, éster de colesterol e concentração plasmática de colesterol total quando comparado a ratos Zucker jovens alimentados com dieta com caseína. Em nosso estudo, os teores de isoflavonas na dieta com proteína isolada de soja foi de 1,81mg/g PTN (informação do fabricante da proteína isolada de soja). Essa pode ser a causa da diminuição dos valores de peso de fígado e triglicerídeos nos animais alimentados com dieta de proteína isolada de soja, porém, não houve redução no colesterol total desses animais.

No estudo de Kritchevsky, Tepper, (2005) os ratos alimentados com uma dieta AIN93M rica em celulose apresentaram maior teor de colesterol hepático em comparação com ratos alimentados com uma dieta

AIN93M contendo uma mistura de fibras solúveis e insolúveis. No nosso estudo, a dieta controle, que contém 80g/kg de ração de fibras, pode ter protegido os animais em comparação aos dos grupos AIN93M, para os quais a única fonte de fibra foi a celulose microcristalina e com o teor de 30,3 g/kg de fibras na ração (HENRIQUES, HELM e SIMEONE, 2013).

Os triglicérides dos animais alimentados com a dieta comercial (animais controle) ficaram com valores bastante aumentados. Curiosamente, houve uma redução nesses valores nos grupos AIN93M, primeiramente no grupo AIN1 e com valores ainda menores no grupo AIN2. A razão para esses achados não é bem esclarecida, e pode estar relacionada ao conteúdo de isoflavonas informado pelo fabricante. São necessários maiores estudos para elucidar esses efeitos.

Na análise de função renal a partir das análises bioquímicas coletadas, foram encontradas concentrações elevadas de creatinina e fosfatase alcalina no grupo AIN2 em relação aos outros grupos. Esta análise preliminar pode sugerir algum tipo de comprometimento renal causado pelo consumo de proteína isolada de soja, porém estudos mais aprofundados com o objetivo específico de investigar a função renal são necessários. Apesar desta diferença, cabe salientar que as concentrações destes dois biomarcadores estava dentro dos valores de referência para ratos.

Quando avaliado os exames bioquímicos de função hepática, AST e ALT, tivemos valores elevados de ALT no grupo controle quando comparado aos demais grupos e AST elevada no grupo AIN2. Sabe-se que as concentrações plasmáticas de AST podem ser oriundas de tecidos extra-hepáticos (rim, músculo, coração) e que as de ALT são mais específicas para avaliar a função hepática (Estridge e Reynolds, 2011). Com base nos resultados obtidos de função renal (creatinina, fosfatase alcalina), as concentrações de AST elevadas podem estar relacionadas de algum comprometimento a nível renal, e não hepático.

Em nosso estudo, observou-se elevadas taxas de esteatose hepática nos animais do grupo AIN1 quando comparado com os demais grupos. Este resultado corrobora os resultados dos outros estudos (Lien et al., 2000; Silva et al., 2008; Moura et al., 2012; Santos et al., 2015a; Santos et al., 2015b). Curiosamente, o grupo alimentado com a dieta AIN93M com proteína isolada de soja não apresentou valores consideráveis de esteatose hepática nos animais, se comparado, inclusive, aos animais do grupo controle. Um estudo realizado por Panneerselvam e colaboradores (2016) verificou em ratos Wistar alimentados com dieta com alto teor de gorduras e dieta com isoflavonas provindas da soja, uma melhora nos

níveis de esteatose hepática e na hipertrigliceridemia em um experimento de 8 semanas. Além da esteatose hepática observada, os animais alimentados com a dieta AIN1 tiveram focos de inflamação no fígado, podendo representar uma progressão da esteatose hepática à esteatohepatite não alcoólica.

Nossos achados são consistentes com estudos anteriores que demonstram que o protocolo de dieta AIN93M causa ganho de peso excessivo e esteatose hepática em ratos. A substituição da caseína por proteína isolada de soja parece ter prevenido o desenvolvimento da esteatose hepática e controlou parcialmente o ganho de peso e de gordura corporal, sugerindo um benefício no uso da proteína vegetal no lugar da proteína animal para estes desfechos.

5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do nosso projeto, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos durante os dois anos de mestrado e ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição.

6 REFERÊNCIAS

ASSIS, A.M. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids revert renal responses induced by a combination of 2 protocols that increase the amounts of advanced glycation end product in rats. *Nutri Res.*, n. 35, v. 6, p. 512-22, 2015.

BRANDSCH, C.; et al. Effect of proteins from beef, pork and turkey meat on plasma and liver lipids of rats compared with casein and soy protein. *Nutrition*, v. 22, p. 1162 -/ 1170, 2007.

BYINGTON M. H.; HOWE J. M.. Effect of level and proportion of methionine and cystine 10 on plasma amino acids of young rats. **The Journal of Nutrition**, v. 102, pp. 995-1000, 1972.

CHEN, JH.; et al. The effect of vegan protein-based diets on metabolic parameters, expressions of adiponectin and its receptors in Wistar rats. *Nutrients*, n. 8, v.10, p. 643, 2016.

COSTA, N. M. B., et al. **Nutrição experimental: Teoria e prática**. 1 ed, Rio de Janeiro: Rubio, 2014.

ESTRIDGE B.H. e REYNOLDS A. P. Técnicas básicas de Laboratório Clínico. 5ª edição. Porto Alegre - Editora Artmed, 2011.

FERREIRA, F. R., et al. Effect of feed restriction on learning, memory and stress of rodents, **Biosci. Journal**, v. 22, n. 1, pp. 91-97, 2006.

HAGEN, M.K, et al. Diet with isolated soy protein reduces oxidative stress and preserves ventricular function in rats with myocardial infarction. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, n.19, v.2, p. 91-97, 2009.

HAN, SW.; CHEE, K.M; CHO, SJ. Nutricional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. *Food Chemistry*, v. 172, n 1, p. 766 – 769. 2015.

HENRIQUES, G.S; HELM, C.V.; SIMEONE, M.L.F. Comparação da glicemia de ratos feitos diabéticos por estreptozotocina e de ratos normais a partir da ingestão de dietas experimentais ricas em fibra alimentar de diferentes fontes. *Rev. Med. Res., Curitiba*, v.15, n.4, p. 258-271, out./dez. 2013.

KIRSCH, R. et al. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. *J Gastroenterol Hepatol*, n. 18, v. 11, p. 1272-82, 2003.

KOBA, K.; et al. Effect of phytate in soy protein on the serum and liver cholesterol levels and liver fatty acid profile in rats. *Bioscience biotechnology biochemical*, n 1, v. 67, p. 15 – 22, 2003.

KRITCHEVSKY, S.; TEPPER, SA. Influence of a fiber mixture on serum and liver lipids and on fecal fat excretion in rats. [Nutrition Research](#), n. 25, v.5, p. 485 – 289, 2005.

LIEN, E.L. Comparison of AIN-76A and AIN-93G diets: a 13-week study in rats. *Food Chemical Toxicological*, n. 39, v. 4, p. 385-92, 2001.

LONDERO, L.G. et al. Dietary n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids modify phosphoenolpyruvate carboxykinase activity and lipid synthesis from glucose in adipose tissue of rats fed a high-sucrose diet. **Cell Biochemical Function**, v. 31 p. 636–642, 2013.

MELO, DÓRIA G. A. A., SERAFINI M. R., ARAÚJO A. A. S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. *Sci Plena* 2012;8:1–6.

MOURA, L.P. et al. Dietary restriction, caloric value and the accumulation of hepatic fat. **Lipids in health and disease**, v.11, n.2, 2012.

PANNEERSELVAM, S., et al. Soy isoflavones ameliorate hypertriglyceridemia and hepatic steatosis in high fat-fed ovariectomized Wistar rats (an experimental model of postmenopausal obesity). **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 38, p. 57-69, 2016.

PELUSO, M.R.; et al. A cooperative interaction between soy protein and its isoflavone-enriched fraction lowers hepatic lipid in male obese Zucker rats and reduces blood platelet sensitivity in male Sprague-Dawley rats. **The journal of Nutrition**, v. 130, p 2333– 2342, 2000.

REEVES P. G., NILESEN F. H., FAHEY C. J., 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, *The Journal of Nutrition*, v.22, n. 3166, pp. 1939-1951, 1993.

SANTOS, J.C.F et al. Choline and Cystine Deficient Diets in Animal Models with Hepatocellular Injury: Evaluation of Oxidative Stress and Expression of RAGE, TNF- α , and IL-1 β . **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 11p., 2015b.

SANTOS, J.C.F et al. Dietary intake of AIN-93 standard diet induces fatty liver with altered hepatic fatty acid profile in *Wistar* rats.

Nutrición Hospitalaria, v.31, n.5, pp. 2140 a 2146, 2015a.

SILVA, et al. Efeito Hepatoprotetor do Consumo Crônico de Dieptanoína e Trieptanoína contra a Esteatose em Ratos. Arquivo Brasileiro de endocrinologia, pp 52 a 57, 2008.

SOUZA, C.G; et al. Effects of a highly palatable diet on lipid and glucose parameters, nitric oxide, and ectonucleotidases activity. [Applied Physiology, Nutrition & Metabolism](#), v. 35, n 5, p 595 – 597, 2010.

WANG, et al. Effects of Dietary Fibers on Weight Gain, Carbohydrate Metabolism and Gastric Ghrelin Gene Expression in High Fat Diet Fed Mice. *Metabolismo*, n. 52, v. 12, p. 1635 – 1642, 2007.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho auxiliou no entendimento dos efeitos metabólicos de três diferentes dietas, utilizadas em laboratórios experimentais, sobre parâmetros hepáticos e sanguíneos em ratos *Wistar*. O estudo colaborou com a pesquisa e literatura científica a respeito do uso dessas três dietas em animais de laboratório e em pesquisas científicas experimentais, tanto em nutrição quanto em outras áreas do conhecimento, levando em conta que, elucidou os efeitos dessas dietas amplamente utilizadas na pesquisa científica.

Nessa pesquisa encontrou-se resultados semelhantes à de outros achados da literatura que afirmam efeitos negativos, como esteatose hepática, hipertrigliceridemia e hiperglicemia nos animais alimentados pela dieta AIN-93M. Foi possível verificar um efeito positivo da alteração da fonte proteica sobre parâmetros sanguíneos e hepáticos nos ratos, onde os animais se apresentaram pouca esteatose hepática em proporção parecida com o grupo controle, menor glicemia e menores valores de triglicérides plasmáticos. São necessários mais pesquisas relacionando a dieta AIN93-M sobre parâmetros renais e de insulina, por exemplo, para melhor elucidar os achados neste estudo.

Esta pesquisa pode auxiliar com escolhas mais precisas de nutrientes e dietas para animais de laboratório com a finalidade de manter a saúde dos animais a longo prazo. Para melhor elucidar os efeitos das dietas AIN93 sobre o metabolismo de ratos, sugere-se estudos a nível renal. Também investigações a respeito da forma de administração da dieta (ad libitum ou controlada) e sua influência no consumo alimentar dos animais. Com base nos achados deste trabalho, sugere-se mais estudos que avaliem a ação da dieta AIN93 sobre redução dos níveis de triglicérides dos animais quando comparados a animais alimentados com dieta comercial.

Os resultados desse projeto estão gerando um artigo científico que será submetido em revista de qualis B1 de artigo ao periódico *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, cujo qualis na Nutrição é B1 e o fator de impacto (2015) é 2.789

6 REFERENCIAS

AIN, 1977. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. **Journal of Nutrition** 107, 340±1348.

AIN, 1980. Second report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. **Journal of Nutrition** 110, 1726

ANDRADE, A. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Disponível em: SciELO Books.

ANDRIGUETTO, J. M. **Nutrição Animal: As bases e os fundamentos da nutrição animal**. São Paulo: Nobel, 2002. 400 p. Disponível em SciELO Books.

ASSIS, A.M. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids revert renal responses induced by a combination of 2 protocols that increase the amounts of advanced glycation end product in rats. **Nutri Res.**, n. 35, v. 6, p. 512-22, 2015.

ÁVILA, M. R. et al. Componentes do rendimento, teores de isoflavonas, proteínas, óleo e qualidade de sementes de soja. **Rev. bras. sementes**, Londrina, v. 29, n. 3, 2007.

BERLITZ, C.G.B. Exposição crônica a dieta hiperlipídica e isolamento social no período pré-pubere alteram comportamento alimentar em ratos machos adultos. Exposição no Salão UFRGS 2014: SIC - XXVI Salão De Iniciação Científica Da UFRGS, Porto alegre, 2014. Disponível em: https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/113753/Resumo_36268.pdf?sequence=1.

BONITA R., BEAGLEHOLE R., KJELLSTROM, T. Capítulo 03: Tipos de estudos. In: **Epidemiologia Básica**, L. S. E. C. I. Ltda., pp. 39-62, 2ª Ed., Santos, São Paulo, 2010.

BUENO, et al. Hepatic fatty acid profile of rats with AIN-93 diet induced steatosis attenuated by the partial substitution of soybean oil by diheptanoin and triheptanoin. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, p 54 a 56, 2010.

BYINGTON M. H.; HOWE J. M.. Effect of level and proportion of methionine and cystine 10 on plasma amino acids of young rats. **The Journal of Nutrition**, v. 102, pp. 995-1000, 1972.

CARVALHO, G. D. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem *Wistar*): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. **Revista Ceres**, v.56, n.1, p. 51-57, 2009.

COSTA, N. M. B., et al. **Nutrição experimental: Teoria e prática**. 1 ed, Rio de Janeiro: Rubio, 2014.

EUFRÁSIO, M. R. Ação de diferentes tipos de fibras sobre frações lipídicas do sangue e fígado dos ratos. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de alimentos como requisito para a obtenção do título de mestre. Lavras, MG, 2003.

FARIA, H. Considerações sobre dietas experimentais para animais de laboratório: formulações, aplicações, fornecimento e efeitos experimentais. I Simpósio de Bioterismo da Fiocruz – Pernambuco, 2010.

FERREIRA, F. R., et al. Effect of feed restriction on learning, memory and stress of rodents, **Biosci. Journal**, v. 22, n. 1, pp. 91-97, 2006.

FRIEDEWALD, W.T, LEVI, R.I., FREDRICKSON D.S. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. **Clin. Chem.** n.18, p. 499-502, 1972.

FOLCH, J; LESS, M.; STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**. p. 497 a 509, 1957.

GUIMARÃES, M. A; MÁZARO, R. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de laboratório de experimentação**. São Paulo: UNIFESP, 2004.

GNADT, B.J. Etical and legal perspectives. In: SUCKOW, M. A., WEISBROTH, S.H., FRANKLIN, C.L. **The laboratory rat**. American College of Laboratory Animal Medicine, Pages 53–70, 2006.

HAGEN, M.K, et al. Diet with isolated soy protein reduces oxidative stress and preserves ventricular function in rats with myocardial infarction. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, n.19, v.2, p. 91-97, 2009.

HEDRICH, H.J. Taxonomy and stocks and strains. In: SUCKOW, M. A., WEISBROTH, S.H., FRANKLIN, C.L. **The laboratory rat**. American College of Laboratory Animal Medicine, Pages 53–70, 2006.

KRUMEL, A.P. Investigação sobre o comportamento alimentar na vida adulta de ratos submetidos a regime de superalimentação no período de lactação. Tese Apresentada Ao Programa de Pós Graduação de Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2010.

KIRSCH, R. et al. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. **J Gastroenterol Hepatol**, n. 18, v. 11, p. 1272-82, 2003.

HAN, SW.; CHEE, K.M; CHO, SJ. Nutricional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. **Food Chemistry**, v. 172, n 1, p. 766 – 769. 2015

KOBA, K.; et al. Effect of phytate in soy protein on the serum and liver cholesterol levels and liver fatty acid profile in rats. **Bioscience biotechnology biochemical**, n 1, v. 67, p. 15 – 22, 2003.

BRANDSCH, C.; et al. Effect of proteins from beef, pork and turkey meat on plasma and liver lipids of rats compared with casein and soy protein. **Nutrition**, v. 22, p. 1162 - 1170, 2007.

CHEN, JH.; et al. The effect of vegan protein-based diets on metabolic parameters, expressions of adiponectin and its receptors in Wistar rats. **Nutrients**, n. 8, v.10, p. 643, 2016.

WANG, et al. Effects of Dietary Fibers on Weight Gain, Carbohydrate Metabolism and Gastric Ghrelin Gene Expression in High Fat Diet Fed Mice. **Metabolism**, n. 52, v. 12, p. 1635 – 1642, 2007.

Kritchevsky S, Tepper SA. Influence of a fiber mixture on serum and liver lipids and on fecal fat excretion in rats. **Nutrition Research**, n. 25, v.5, p. 485 – 289, 2005.

MELO, DÓRIA G. A. A., SERAFINI M. R., ARAÚJO A. A. S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. *Sci Plena* 2012;8:1–6.

LEWIS, S. M, *et al.* Nutrition. In: SUCKOW, M. A., WEISBROTH, S.H., FRANKLIN, C.L. **The laboratory rat**. American College of Laboratory Animal Medicine, Pages 53–70, 2006.

LIEN, E.L. Comparison of AIN-76A and AIN-93G diets: a 13-week study in rats. **Food Chemical Toxicological**, n. 39, v. 4, p. 385-92, 2001.

LLOYD, L.E., et al. Energy requirements of the body. In: **Fundamentals of Nutrition**. San Francisco, pp. 396-438, 1978.

LONDERO, L.G. et al. Dietary n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids modify phosphoenolpyruvate carboxykinase activity and lipid synthesis from glucose in adipose tissue of rats fed a high-sucrose diet. **Cell Biochemical Function**, v. 31 p. 636–642, 2013.

MOURA, A.M.A. **Nutrição de roedores de laboratório: paradigmas e desafios**. Resbcal, São Paulo, v.2, n.4, p. 288-296, 2014.

MOURA, L.P. et al. Dietary restriction, caloric value and the accumulation of hepatic fat. **Lipids in health and disease**, v.11, n.2, 2012.

MYERS, G. L., et al. Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. **Clin Chem**, v. 52, p. 5-18, 2006.

NATIONAL RESERACH COUNCIL. Nutrient Requirements of Laboratory Animals, (Second Edition 1972). Washington, D.C.: National Academy Press, 1972, 173p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL Nutrient Requeriments of Laboratory Animals. (Fourth Revised Edition, 1995). Washington, D.C.: National Academy Press, 1995, 173p.

NEVES, S.M; FILHO, J.M.; MENEZES, E.W. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo: FCF-IQ/USP, 216 p., 2013.

PINTO, S. B. Comparação entre as dosagens AST e ALT em presença e na ausencia de pyridoxal fosfato. Trabalho de conclusão de curso apresentada como requisito para obtenção de título de Farmacêutico da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS, 2010.

PIRES, C.V. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes proteicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n. 26, v. 1, p. 179-187, 2006.

REEVES P. G., NILESEN F. H., FAHEY C. J., 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, **The Journal of Nutrition**, v.22, n. 3166, pp. 1939-1951, 1993.

ROGERS, A. E. Nutrition. In: KEENAN, K.P et al. **The Laboratory Rat**, vol I. Academic Press, San Diego. 1989.

SANTOS, J.C.F et al. Dietary intake of AIN-93 standard diet induces fatty liver with altered hepatic fatty acid profile in *Wistar* rats. **Nutrición Hospitalaria**, v.31, n.5, pp. 2140 a 2146, 2015a.

SANTOS, J.C.F et al. Choline and Cystine Deficient Diets in Animal Models with Hepatocellular Injury: Evaluation of Oxidative Stress and Expression of RAGE, TNF- α , and IL-1 β . **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 11p., 2015b.

SARWAR, G. The protein digestibility-corrected amino acid score method overestimates quality of proteins containing antinutritional factors and of poorly digestible proteins supplemented with limiting amino acids in rats. **Journal of Nutrition**, v. 127, p. 758-764, 1997.

SEARCY, R. L, et al. Evaluation of a new technique for estimation of urea nitrogen in serum. **Am J Med Technol**, v. 27, p. 255-62, 1961.

SETCHELL, K.D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **American Journal Clinical of Nutrition**, Bethesda, v.134, n.6, p.1333S-1343S, 1998. Supplement.

SILVA, et al. Efeito Hepatoprotetor do Consumo Crônico de Dieptanoína e Trieptanoína contra a Esteatose em Ratos. Arquivo Brasileiro de endocrinologia, pp 52 a 57, 2008.

SUCKOW, M. A., WEISBROTH, S.H., FRANKLIN, C.L. **The laboratory rat**. American College of Laboratory Animal Medicine, Pages 53–70, 2006.

TRAMONTE, V. L. C.; SANTOS, R. A. **Nutrição e metabolismo:** Nutrição experimental. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

WAITZBERG, D. L. **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica.** 4. ed. v. 1. São Paulo: Atheneu, 2006.

7 APENDICE

- 7.1 APENDICE A: Modelo de planilha para cálculo da média do consumo alimentar diário dos animais.

SEMANA 01

DATA		CAIXA 01	CAIXA 02	UMIDADE	
				Inicial	Final
15/02	Oferta	180	180		
15/02	Sobra				
15/02	Oferta	180	180		
16/02	Sobra				
16/02	Oferta	180	180		
17/02	Sobra				
17/02	Oferta	180	180		
18/02	Sobra				

7.2 APENDICE B: Modelo para preenchimento de peso corporal dos animais semanalmente.

SEMANA	NA	CAIXA 01			CAIXA 02		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	15/fev						
2	22/fev						
3	29/fev						
4	07/mar						
5	14/mar						
6	21/mar						
7	28/mar						
8	04/abr						
9	11/abr						
10	18/abr						
11	25/abr						
12	02/mai						

7.3 APENDICE C: NOTA À IMPRENSA

Mestranda: Priscila Paola Wildner

Orientadora: Júlia Dubois Moreira

Órgão financiador da bolsa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Órgão financiador do projeto: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Os resultados da pesquisa do trabalho de Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina fazem parte de um projeto universal cujo financiamento foi concedido pelo CNPq, além disso, a bolsa de mestrado, fornecida durante vinte e quatro meses, foi fornecida pela CAPES. Juntamente à dissertação, foram desenvolvidos dois Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC) no ano de 2015 e 2016 e mais um trabalho de dissertação de mestrado no ano de 2016.

A utilização de animais de laboratório nas pesquisas científicas traz diversas vantagens, uma vez que oferece a oportunidade de controlar variáveis que em humanos seriam muito difíceis ou impossíveis de controlar, além do acesso praticamente irrestrito a tecidos e estruturas corporais dos humanos. A dieta é uma dessas variáveis, uma vez que influencia diretamente o crescimento, a capacidade de reprodução dos animais e o seu estado de saúde e desenvolvimento de doenças.

Quando se utilizam animais de laboratório, é necessário que se utilizem dietas que mantenham a saúde do animal sem serem prejudiciais. Para isso, existem dois tipos de dieta que são comumente utilizados em laboratório: Dietas purificadas e dietas comerciais. A primeira utiliza ingredientes altamente purificados e é manipulada em laboratório, já a segunda geralmente é comprada de empresas especializadas e vem processada e pronta. Ambas dietas devem ser neutras para os animais, causando apenas um crescimento saudável e uma manutenção de peso ao longo de suas vidas.

No entanto, estudos mostram que dietas purificadas de um modelo que é amplamente utilizado, preconizado pela *American Institute of Nutrition* (AIN-93) tem causado efeitos indesejáveis em ratos Wistar. Além disso, os estudos que evidenciaram tais efeitos não propuseram alterações na composição da dieta para contornar estes prejuízos. Neste

sentido, esta pesquisa objetivou verificar o efeito das dietas AIN-93M, AIN-93M com modificação em parâmetros sanguíneos e hepáticos em ratos Wistar machos.

Para o experimento, foram utilizados ratos *Wistar*, com idade inicial de 60 dias, os quais são considerados adultos jovens, que foram divididos em 03 grupos, com 06 animais por grupo: grupo controle (C), grupo AIN93M (AIN1) e grupo AIN93M modificada (AIN2), onde foi realizada uma modificação na fonte proteica. Essa modificação foi a substituição da caseína por proteína isolada de soja (90% de pureza), a fim de assemelhar essa última dieta com a dieta controle.

Resumidamente, os resultados da pesquisa mostraram que os animais que foram alimentados com a dieta AIN2 tiveram maior consumo alimentar de todos os grupos, porém sem apresentar o maior peso corporal. Os animais que tiveram o maior peso corporal eram do grupo AIN1, que tiveram também maior peso de tecido adiposo, maior peso de fígado e maior contagem de esteatose hepática com infiltrado inflamatório.

Concluimos que os animais alimentados pela dieta AIN93M com modificações na fonte proteica tiveram menor peso corporal e menor conteúdo de tecido adiposo, mesmo sendo os que tiveram maior consumo alimentar, o que sugere um efeito benéfico com a substituição da proteína animal por vegetal.

8 ANEXOS

ANEXO A. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA A RESPEITO DO PROJETO.

Florianópolis, 13 de Agosto de 2015.

Srs. Membros da Comissão de ética no Uso de Animais - CEUA/UFSC

O presente documento trata do parecer de apreciação do projeto com protocolo **PP00973** intitulado

Avaliação dos efeitos da restrição calórica e dos ácidos graxos ω 3 sobre parâmetros

bioquímicos, comportamentais e neuroprotetores em ratos

coordenado pela **Profa. Dra.**

Letícia Carina Ribeiro da Silva - Departamento de Nutrição –

Centro de Ciências Biológicas -

UFSC.

Na apreciação anterior, surgiram alguns questionamentos, que foram satisfatoriamente esclarecidos. Dessa forma, sou de parecer favorável à aprovação do protocolo PP00973.

ANEXO B. PARECER FAVORÁVEL DO COMITÊ DE ÉTICA A RESPEITO DO ADENDO SUBMETIDO.

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00973

Título

Avaliação dos efeitos da restrição calórica e dos ácidos graxos w3 sobre parâmetros bioquímicos, comportamentais e neuroprotetores em ratos.

Data de Entrada

28/05/2015

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

07/04/2016

Considerações

Ofício nº 006/CEUA/PROPESQ/2017

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA

A.o(à): Prof(a) Dr(a), Leticia Carina Ribeiro da Silva, Departamento de Nutrição - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO Adendo.

Adita-se o Ofício nº 084/CEUA/PROPESQ/2015

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

A.o(à): Prof(a) Dr(a) Leticia Carina Ribeiro da Silva, Departamento de Nutrição - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de duzentos e dezesseis ratos (*Rattus Norvegicus*).