EFEITOS DA RESTRIÇÃO DE CARBOIDRATOS SOBRE A GLICONEOGÊNESE E OS NÍVEIS DE LIPÍDIOS NO FÍGADO DE RATOS

Júlia Machado Ariozi (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Francielli Maria de Souza Silva Comar, Naiara Cristina Lucredi, Jurandir Fernando Comar (Orientador), e-mail: jfcomar@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá/CCB/Maringá, PR.

Bioquímica – Metabolismo e Bioenergética

Palavras-chave: Dieta cetogênica, metabolismo hepático, gliconeogênese.

Resumo:

A dieta cetogênica tem sido muito utilizada para tratamento de obesidade e diabetes, entretanto, o mecanismo ainda é pouco compreendido. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de uma dieta cetogênica com alto teor de lipídios sobre a gliconeogênese e os níveis de lipídios no fígado de ratos. Os animais foram divididos em 4 grupos: ratos tratados com dieta regular (RC), dieta cetogênica (KD) por 15 dias e 30 dias, e KD sem cisteína por 30 dias. A gliconeogênese foi determinada no fígado em perfusão usando lactato como substrato. Ao final da dieta, o peso dos animais KD não foi diferente dos RC. A produção de glicose basal foi muito aumentada no fígado dos 3 grupos KD e é o resultado da aumentada gliconeogênese a partir de substratos endógenos. A produção de glicose a partir de lactato foi aumentada no fígado de ratos KD por 30 dias com e sem cisteína. O conteúdo de lipídios foi aumentado no fígado de ratos KD e foi maior ainda em KD 30 dias. Os resultados mostram que a gliconeogênese é aumentada no fígado de ratos KD e é a consequência de resistência insulínica causada pela dieta muito rica em lipídios. A não adição de cistina à KD promove um aumento ainda maior da gliconeogênese hepática.

Introdução

Dietas cetogênicas (KD) têm sido usadas no tratamento de obesidade, diabetes e convulsões (ABBASI, 2018). Os mecanismos ainda não são muito claros, mas estão associados com altos níveis séricos de corpos cetônicos. KD se refere a dietas em que a ingestão de carboidratos não excede 5-10% das calorias e a ingestão de gordura excede 70% destas calorias. O baixo conteúdo de glicose da dieta diminui os níveis de insulina, o que estimula a lipólise e a queima de gordura (SCHUGAR e CRAWFORD, 2012). Nesta condição, a gliconeogênese é aumentada no fígado e os aminoácidos das proteínas da dieta são convertidos em glicose (SCHUGAR e CRAWFORD, 2012). Entretanto, o aumento da gliconeogênese pode ser um problema porque evita que o corpo entre em cetose. Com o objetivo de minimizar os efeitos da gliconeogênese hepática na cetose, a quantidade de proteínas e carboidratos

na KD pode ser bastante reduzida em favor de um alto teor de gordura. Por outro lado, indivíduos sob esta dieta desenvolvem resistência à insulina e doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD: do inglês non-alcoholic fatty liver disease) (SCHUGAR e CRAWFORD, 2012). De fato, roedores sob KD no qual o conteúdo calórico é 90-95% de gordura, 1-2% de carboidratos e 5-10% de proteína acumulam lipídios no fígado e desenvolvem resistência insulínica e NAFLD (GRANDL et al., 2018).

A afirmação de que a gliconeogênese está reduzida em indivíduos sob KD com alto teor de gordura não é consenso porque reduções, nenhuma alteração e até mesmo aumentos foram relatados (GRANDL et al., 2018; JORNAYVAZ et al., 2010; SCHUGAR e CRAWFORD, 2012). A gliconeogênese hepática nesses estudos, não foi diretamente medida, mas inferida a partir de dados de expressão gênica. Porém, não há como quantificar a gliconeogênese com dados de expressão gênica, pois enzimas-chave são reguladas por mecanismos muito complexos. Essa incerteza foi explorada neste estudo, no qual os efeitos da KD com muito alto teor de gordura sobre a gliconeogênese em fígados de ratos em perfusão foram quantificados. A homeostase glicêmica e o conteúdo hepático de glicogênio e lipídios foram também determinados.

Materiais e métodos

Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (nº 6039280220).

Ratos machos Wistar (350-400g) foram divididos em 4 grupos: RC, tratados com dieta regular (RC); KD, tratados com dieta cetogênica por 15 e 30 dias; e KD(-cis), KD sem cisteína por 30 dias. Após este período, a cavidade abdominal dos ratos em jejum de 24 h anestesiados (tiopental sódico 100 mg/Kg) foi aberta e o fígado removido para determinar o conteúdo de glicogênio e lipídios. O conteúdo de lipídios no fígado foi determinado por gravimetria. Colesterol total e triglicerídeos foram determinados com kits comerciais. A gliconeogênese foi determinada no fígado de ratos em perfusão usando lactato como substrato.

A proporção de calorias das dietas foi: 9, 68 e 23% de gordura, carboidratos e proteínas (3,5 kcal/g), respectivamente para ração regular (Nuvilab® CR-1, Colombo, Brasil) e 95, 0,5 e 4,5% de gordura, carboidratos e proteína (caseína), respectivamente, (7,6 kcal/g) para KD. Esta última foi preparada manualmente. Foi suplementada ou não com cistina (3 mg/g) como complemento da caseína, sabidamente deficiente em cisteína.

A análise estatística foi feita usando o GraphPad Prism Software (versão 8.0) por meio de ANOVA ONE-WAY com pós teste de Newman-Keuls ($p<0.05$). Quando apropriado foi usado o teste t de Student ($p < 0.05$).

Resultados e Discussão

Não houve uma diferença no peso dos animais sob as dietas KD ou RC e mesmo o consumo alimentar em Kcal foram iguais entre RC e KD (resultados não mostrados). Os pesos dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal em

ratos KD foram maiores que aqueles de RC (resultados não mostrados). A remoção de cistina de KD não modificou estes resultados.

As velocidades de produção de glicose hepática basal foram mínimas para RC e aumentadas para KD 15 dias e maior ainda para KD 30 dias (Figura 1A). Este último é certamente o resultado de uma aumentada gliconeogênese a partir de substratos endógenos, já que o aumento no conteúdo de glicogênio (Figura 1B) pode contribuir, mas não é totalmente responsável por este efeito. Aliás, o aumento de glicogênio em KD deve ser o resultado de aumentada gliconeogênese e é observado no fígado de animais com resistência insulínica. Após a infusão de lactato, a produção de glicose foi aumentada para todos os grupos. Para comparação, os valores de estado estacionário basal e após infusão de lactato está apresentado na Figura 1C. O estímulo na produção de glicose foi igual para RC e KD 15 dias, mas foi 35 e 82% maior para KD 30 dias com e sem cistina, respectivamente. O incremento no consumo de oxigênio e a produção de piruvato foram menores em KD 15 e 30 dias, mas não quando a cistina foi omitida (Figuras 1D e E).

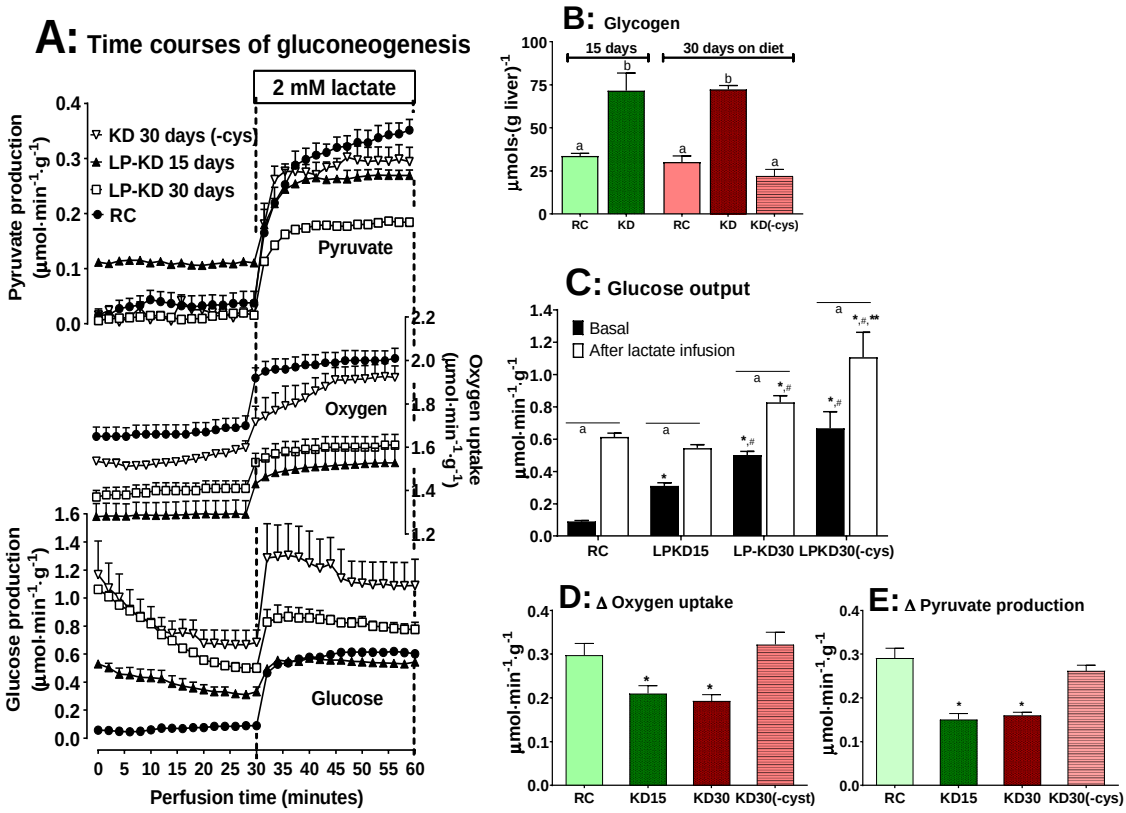

Figura 1 – Efeitos de KD sobre a gliconeogênese em fígados perfundidos. **Painel A:** decurso temporal de produção de glicose e piruvato e consumo de oxigênio. Os fígados foram perfundidos com lactato 2 mM conforme indicado pela barra horizontal. O fluído efluente foi coletado em intervalos regulares e analisado para seus conteúdos de glicose e piruvato. O consumo de oxigênio foi monitorado por polarografia. Os valores nos **Painéis C e E** são aqueles no estado estacionário basal (28 min) e após a infusão de lactato (58 min). Os valores no **Painel D** são os incrementos causados pelo lactato. Os valores no **Painel B** são os conteúdos hepáticos de glicogênio. *p<0,05: diferente de RC; #p<0,05: diferente de 15 dias KD; **p<0,05: diferença entre basal e lactato (teste t).

O conteúdo de lipídios hepático está apresentado na Figura 2. Lipídios totais, colesterol e triglicérides foram aumentados no fígado de animais KD 15 dias e ainda mais no fígado de animais KD 30 dias, o que deve estar associado com esteatose hepática e resistência insulínica, os quais foram já reportados em estudos anteriores (GRANDL et al., 2018; JORNAYVAZ et al., 2010). Ratos KD apresentaram menor tolerância à glicose que RC (resultados não mostrados).

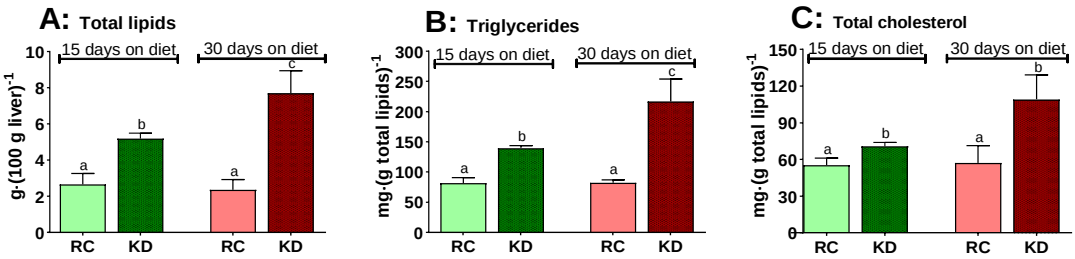

Figura 2 – Conteúdo de lipídios no fígado de ratos alimentados tratados com RC e KD.

Conclusões

Nenhuma significativa perda de peso corporal foi observada em ratos sob KD com alto teor de lipídios. Pelo contrário, os animais tiveram maior conteúdo de gordura corporal e hepática e menor tolerância à glicose oral. A gliconeogênese foi aumentada nos animais sob KD tanto na presença quanto na ausência de substrato exógeno e parece ser o resultado de resistência hepática à insulina. A não suplementação da dieta com cistina está associada com um aumento ainda maior da gliconeogênese hepática.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Metabolismo Hepático e ao CNPq por todo apoio e suporte.

Referências

ABBASI, J. **Interest in the ketogenic diet grows for weight loss and type 2 diabetes**. JAMA, v. 319, p. 215–217, 2018.

GRANDL, G.; STRAUB, L.; RUDIGIER, C.; ARNOLD, M.; WUEEST, S.; KONRAD, D.; WOLFRUM, C. **Short-term feeding of a ketogenic diet induces more severe hepatic insulin resistance than a obesogenic high-fat diet. J. Physiol.**, v. 596, p. 4597-4609, 2018.

JORNAYVAZ, F.R.; JURCZAK, M.J.; LEE, H-Y.; BIRKENFELD, A.L.; FREDERICK, D.W.; ZHANG, D.; ZHANG, X-M.; SAMUEL, V.T.; SHULMAN, G.I. **A high-fat, ketogenic diet causes hepatic insulin resistance in mice, despite increasing energy expenditure and preventing weight gain**. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., v. 299, p. E808–E815, 2010.

SCHUGAR, R.C.; CRAWFORD, P.A. **Low-carbohydrate ketogenic diets, glucose homeostasis, and nonalcoholic fatty liver disease.** Curr. Opin. Clin. Nutr. Metabol. Care, v. 15, p. 374–380, 2012.