

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
MESTRADO EM NUTRIÇÃO

DIETAS PADRÃO UTILIZADAS EM EXPERIMENTAÇÃO
ANIMAL: UMA ANÁLISE COMPARATIVA

JÚNIA HELENA PORTO BARBOSA

MACEIÓ-AL

2008

JÚNIA HELENA PORTO BARBOSA

**DIETAS PADRÃO UTILIZADAS EM EXPERIMENTAÇÃO
ANIMAL: UMA ANÁLISE COMPARATIVA**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Nutrição da Universidade Federal de
Alagoas como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Nutrição.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Suzana Lima de Oliveira

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Terezinha da Rocha Ataíde

**MACEIÓ-AL
2008**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

B238d Barbosa, Júnia Helena Porto.
 Dietas padrão utilizadas em experimentação animal : uma análise comparativa / Júnia Helena Porto Barbosa, 2008.
 61 f : tabs., grafs.

 Orientadora: Suzana Lima de Oliveira.
 Co-Orientadora: Terezinha da Rocha Ataíde.
 Dissertação (mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas.
 Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Maceió, 2008.

 Inclui bibliografia.

 1. Dieta experimental - Ratos. 2. Esteatose hepática. 3. Fígado. I. Título.

CDU: 612.354

Dedico esta dissertação a minha família, em especial meus pais Adão de Brito e Maria Helena, exemplos de vida que me ensinaram, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores.

AGRADECIMENTOS

Agradecer a todos que ajudaram a construir esta dissertação não é tarefa fácil. A simples menção de todos aqueles que direta ou indiretamente me auxiliaram nessa jornada daria origem a uma extensa e, talvez, inexpressiva listagem de nomes. O maior perigo que se coloca para o agradecimento seletivo não é decidir quem incluir, mas decidir quem não mencionar.

A minha família: pais, irmãos, esposo e filha pelo carinho e apoio indispensáveis.

A minha grande e eterna amiga Luci Tojal e Seara, companheira e responsável por minhas primeiras “aventuras” na área da pesquisa científica.

À Suzana Lima de Oliveira, orientadora e, acima de tudo, amiga, pela honrosa, proveitosa e inesquecível oportunidade de ser sua “educanda”.

À Terezinha da Rocha Ataíde, nova amizade firmada, pela valiosa co-orientação e pela proveitosa convivência.

Ao professor Cyro Rego Cabral Jr pelo apoio e orientação durante a realização da análise estatística.

À Juliana Célia de Farias Santos, pela amizade, companheirismo e cumplicidade estabelecidos ao longo desse período de convivência fraterna.

À Ana Luiza de Melo Lucena, pela generosa, fiel e necessária ajuda durante os sacrifícios dos animais.

Às bolsistas Katherine Maria de Araújo Veras, Renata Tenório Antunes, Fernanda Maria de Banneux Leite e Tâmara Gomes pelo convívio pacífico e ajuda prática imprescindível.

Então, a meus amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas ara a realização desse trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

“O que hoje vejo e reconheço belo é apenas uma parte do processo. O que eu não pude ver é o que sustenta a beleza”.

Pe. Fábio de Melo

RESUMO GERAL

Várias dietas de diferentes composições estão disponíveis para o uso em experimentação animal e têm sido utilizadas como padrão, mas podem induzir efeitos metabólicos distintos, comprometendo a comparação entre os resultados dos diversos estudos. A literatura registra inúmeros relatos de alterações relacionadas ao uso dessas dietas, porém, há carência de estudos que comparem os efeitos metabólicos do consumo das diferentes dietas padrão utilizadas em experimentos animais. Assim sendo, o objetivo da presente dissertação foi avaliar as repercussões metabólicas do consumo de dietas consideradas padrão, amplamente utilizadas na pesquisa animal, sendo apresentada na forma de dois artigos: uma revisão da literatura, que reúne evidências ainda pouco debatidas pela comunidade científica relativas à alimentação de animais de laboratório, e um segundo artigo, que se refere a um estudo experimental com ratos *Wistar* recém-desmamados, que receberam dois tipos de dieta: uma comercial à base de cereais, Nuvilab[®], e outra purificada proposta pelo *American Institute of Nutrition*, a AIN-93. Nas condições experimentais estabelecidas, coeficientes de eficiências protéica e alimentar apresentaram-se significativamente maiores no grupo AIN-93 que no grupo Nuvilab[®]. A AIN-93 apresentou digestibilidades lipídica e protéica significativamente maiores que a Nuvilab[®]. As diferentes dietas não causaram diferença na evolução ponderal dos animais e a análise histológica ao microscópio óptico dos rins, coração, baço, estômago e intestinos não evidenciou alterações nas estruturas desses órgãos, apesar dos diferentes tratamentos. Os animais alimentados com a dieta AIN-93, independente da idade, apresentaram esteatose hepática em uma frequência significativamente maior que os animais que receberam a comercial Nuvilab[®]. As diferentes dietas não exerceram influência sobre os pesos absoluto e relativo dos órgãos dos animais, com exceção do peso absoluto do fígado, entre os animais mais jovens, e do peso relativo do intestino, entre os animais mais velhos. Não se observou influência das diferentes dietas sobre os parâmetros bioquímicos avaliados, sendo as diferenças detectadas possivelmente resultantes da interação entre a idade e o tempo de exposição dos animais às dietas. Os marcadores de lesão e função hepática e renal foram similares e a creatinina sérica variou em função da idade. Demonstrou-se que ambas as dietas, AIN-93 e Nuvilab[®], são capazes de promover o crescimento de ratos *Wistar* por um período de estudo considerado subcrônico. Porém, a ocorrência de esteatose hepática nos animais alimentados com a dieta AIN-93 peletizada, reforça a importância de monitoramento de protocolos padrão de experimentação e é indicativa de inadequações nutricionais, impondo a necessidade de investigações adicionais para esclarecer que componentes ou características dessa dieta, amplamente utilizada em experimentação animal, podem ter contribuído para tal resultado. Por hora, sugere-se que a dieta AIN-93 seja oferecida preferencialmente na forma de farinha, particularmente em protocolos que investiguem efeitos metabólicos.

Palavras-chave: rato *Wistar*; AIN-93-G; AIN-93M; esteatose hepática; dietas experimentais.

ABSTRACT

Many diets of different compositions are available for use in animal experiments and have been used as standard, but they may induce adverse metabolic effects, compromising the comparison between the results of several studies. The literature records many reports of changes related to the use of these diets, however it lacks studies that compare metabolic effects of consumption of the different standard diets in animal experiments. Accordingly, the objective of this dissertation was to evaluate the metabolic effects of the consumption of diets considered standard widely used in animal research, being presented in the form of two articles: a review of the literature that gathers evidence yet little discussed by the scientific community on the feeding of laboratory animals; the second article refers to an experimental study with rats newly weaned, who received two types of diets: a commercial cereal-based, Nuvilab®, and another purified proposal by the American Institute of Nutrition, the AIN-93. Under the experimental conditions established, coefficients of protein and feeding efficiency presented significantly higher in group AIN-93 than in group Nuvilab®. The AIN-93 showed significantly higher lipid and protein digestibility than Nuvilab®. The different diets did not cause weight difference evolution of animals and histological analysis to the optical microscope of the kidneys, heart, spleen, stomach and small intestine showed no changes in the structures of these bodies, despite the different treatments. Animals fed the AIN-93 diet, regardless of age, had hepatic steatosis in frequency significantly higher than the animals that received the commercial Nuvilab®. The different diets did not cause influence on the absolute and relative weights of organs of animals, except for the absolute weight of the liver among younger animals and relative weight of the intestine among older animals. There was no influence of different diets on biochemical parameters evaluated, and the differences detected possibly resulting from the interaction between age and length of exposure of animals to diets. The markers of damage of kidney and liver function were similar and serum creatinine varied according to age. It was shown that both diets, AIN-93 and Nuvilab®, are able to promote the growth of rats for a period of study considered subchronic. However, the occurrence of hepatic steatosis in animals fed the AIN-93 diet in pellets, reinforces the importance of tracking the standard protocols of experimentation and is indicative of nutritional inadequacies by imposing the need for further investigations to clarify which components or characteristics of this diet, widely used in animal experiments, may have contributed to this result. For instance, it is suggested that diets in the form of flour are used preferably those pellets, particularly on protocols to investigate metabolic effects.

Keywords: Wistar rat; AIN-93-G; AIN-93M; hepatic steatosis, experimental diets, advanced glycation endproducts.

LISTA DE TABELAS

	Página
<i>Artigo de Resultados: Repercussões metabólicas do consumo de diferentes dietas experimentais padrão em ratos.</i>	
Tabela 1	Composição das dietas AIN-93G e AIN-93M 40
Tabela 2	Composição da dieta comercial Nuvilab®..... 41
Tabela 3	Coeficientes de eficiência protéica (CEP), alimentar (CEA) e de digestibilidades protéica (CDP) e lipídica (CDL) das dietas AIN-93 e Nuvilab® 44
Tabela 4	Pesos absoluto e relativo dos órgãos dos animais alimentados com a dieta purificada (AIN-93) ou comercial (Nuvilab®), por 1 ou 4 meses..... 46
Tabela 5	Variáveis bioquímicas séricas dos animais submetidos às diferentes dietas por 1 ou 4 meses..... 48

LISTA DE FIGURAS

	Página
Artigo de Resultados: <i>Repercussões metabólicas do consumo de diferentes dietas experimentais padrão em ratos.</i>	
Figura 1 Evolução ponderal dos ratos submetidos às dietas padrão AIN-93 e comercial Nuvilab®.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: acrilamida

AA-Hb: aduto acrilamida-hemoglobina

AGEs: *Advanced Glycation Endproducts*

AIN: *American Institute of Nutrition*

AIN-93 G: fórmula purificada para a nutrição de roedores experimentais jovens

AIN-93 M: fórmula purificada para a nutrição de roedores experimentais adultos

ALT: alanina aminotransferase

ASNS: *American Society of Nutritional Sciences*

AST: aspartato aminotransferase

CEA: Coeficiente de Eficiência Alimentar

CEP: Coeficiente de Eficiência Protéica

CDLip: Coeficiente de Digestibilidade Lipídica

CDP: Coeficiente de Digestibilidade Protéica

CML: carboximetilisina

DNA: *Deoxyribose Nucleic Acid*

ALP: fosfatase alcalina

GA: glicidamida

GA-Hb: aduto glicidamida-hemoglobina

HE: hematoxilina eosina

HDLc: *High Density Lipoprotein Cholesterol*

HPLC: *High Performance (pressure) Liquid Chromatography*

LDLc: *Low Density Lipoprotein Cholesterol*

NAFLD: *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*

NRC: *National Research Council*

TK: transcetolase

UFAL: Universidade Federal de Alagoas

VLDLc: *Very Low Density Lipoprotein Cholesterol*

γ -GT: *Gama-Glutamil Transferase*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2 ARTIGOS.....	16
2.1 ARTIGO DE REVISÃO: <i>Tópicos especiais em nutrição experimental</i>.....	17
Resumo.....	18
Abstract.....	19
Introdução.....	20
Necessidades nutricionais de roedores.....	20
Fitoestrógenos.....	23
Micotoxinas.....	25
Processamento.....	27
Considerações finais.....	29
Referências.....	30
2.2 ARTIGO DE RESULTADOS: <i>Repercussões metabólicas do consumo de diferentes dietas experimentais padrão em ratos</i>.....	34
Resumo.....	35
Abstract.....	36
Introdução.....	37
Material e Métodos.....	39

Resultados.....	44
Discussão.....	48
Considerações finais.....	54
Referências.....	55
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

1. INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

A ciência já demonstrou ser a dieta um fator ambiental capaz de influenciar o fenótipo dos animais e, embora os cientistas possam utilizá-la para a indução de doenças como o diabetes, a obesidade ou a hipertensão em seus modelos experimentais, subestima-se o papel extremamente importante que ela pode exercer mesmo quando não é utilizada para esse fim. Formulações inadequadas oferecidas aos animais de laboratório podem causar variações até mesmo em resultados de investigações submetidas a rigorosos procedimentos de controle de variáveis. Um bom exemplo de como os investigadores das mais diversas áreas das ciências biológicas devem estar atentos à qualidade das dietas oferecidas aos seus animais é relatado por Wang *et al.*¹ Esses autores descreveram que a simples mudança do fornecedor da dieta controle utilizada em seus experimentos pôs à prova 30 anos de experiência adquirida pelo grupo. A constatação de que a variação no conteúdo em fitoestrógenos (substância cuja presença era, até então, negligenciada) de dietas comerciais para controle metabólico pode ter influenciado o atual estágio de conhecimento de inúmeras áreas da ciência fez surgir um amplo debate entre cientistas e fabricantes^{2,3,4} e alerta para a importância de se esclarecer diversos outros aspectos da nutrição de animais experimentais, ainda hoje obscuros. O custo da utilização de formulações dietéticas inadequadas em experimentação animal pode ser incalculável para a humanidade e a preocupação com a avaliação e o monitoramento das dietas “padrão” universalmente aceitas e respeitadas pela comunidade científica é atual e imperativa.

A literatura registra inúmeros relatos de alterações detectadas em decorrência da ingestão dessas dietas, mas se costuma considerá-las resultado de falhas experimentais e não de efeitos da dieta administrada. A preocupação advinda de estudos anteriores do nosso grupo, nos quais foi observada a influência da dieta padrão sobre o perfil lipídico e a ocorrência de alterações histológicas do tecido hepático dos animais experimentais⁵,

somada a relatos, formais^{6,7} e informais, de outros autores que, similarmente, relacionaram a escolha da dieta controle a alterações fisiológicas diversas, aliaram-se à carência na literatura de estudos avaliativos dessas dietas, em especial envolvendo roedores da espécie *Wistar*, e motivaram a presente investigação.

O primeiro artigo intitulado *Tópicos especiais em nutrição experimental* reúne evidências registradas na literatura relacionadas à alimentação de animais utilizados em experimentação, mas ainda pouco debatidos pela comunidade científica, evidenciando as diversas “lacunas” nesse campo do conhecimento científico referentes aos requerimentos nutricionais de roedores, a formação de compostos tóxicos durante o processamento e a presença de substâncias como fitoestrógenos e micotoxinas nas dietas, alertando para a necessidade do desenvolvimento de protocolos de pesquisa que avaliem e monitorem essa variável tão importante para a confiabilidade dos resultados das investigações.

O segundo artigo, um estudo experimental denominado *Repercussões metabólicas do consumo de diferentes dietas experimentais padrão em ratos* avalia as repercussões metabólicas do consumo subcrônico de duas dietas padrão amplamente utilizadas, a purificada AIN-93 e a comercial Nuvilab[®], em ratos da espécie *Wistar*, sugerindo o desenvolvimento de novas linhas de investigação e reforçando a importância do monitoramento de protocolos padrão de experimentação.