

Cristiano Machado Salardi

**Efeitos da Elevada Ingestão de Sacarose e da
Restrição no Tempo de Ingestão Alimentar
sobre Parâmetros Morfométricos, Bioquímicos
Séricos e Cardíacos de Ratos**

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em
Fisiopatologia em Clínica Médica,
Faculdade de Medicina de
Botucatu, da Universidade
Estadual Paulista - UNESP, para a
obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Professora Titular Dr^a Ethel Lourenzi Barbosa Novelli

Botucatu - S.P.

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU – UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Galhardi, Cristiano Machado.

Efeitos da elevada ingestão de sacarose e da restrição no tempo de ingestão alimentar sobre parâmetros bioquímicos séricos e cardíacos de ratos / Cristiano Machado Galhardi. – 2007.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2007.

Orientador: Ethel Lourenzi Barbosa Novelli

Assunto CAPES: 40501000

1. Açúcar na nutrição humana - Aspectos bioquímicos 2. Sacarose - Efeitos fisiológicos 3. Metabolismo 4. Doenças cardiovasculares - Aspectos nutricionais

CDD 613.2

Palavras-chave: Dislipidemias; Estresse oxidativo; Metabolismo energético cardíaco; Síndrome metabólica

Projeto Desenvolvido no Departamento
de Química e Bioquímica do Instituto de
Biociências da UNESP - Botucatu

Dedicatória

A minha filha Érika Mayumi Otutumi Galhardi,
dedico.

Agradecimentos Especiais

A Dra Ethel Lourenzi Barbosa Novelli, exemplo de pessoa e profissional, a quem irei me espelhar com orgulho, na nova fase de minha vida.

A minha família pelo amor, compreensão, apoio e paciência nesse período de minha vida. A querida Sandra Tiemi Otutumi e a nossa amada filha Érika Mayumi Otutumi Galhardi, a minha mãe Sônia Marília Machado Galhardi, aos meus avós maternos Maria Morales Machado e Manoel Machado, a minha irmã Cristiane Machado Galhardi e a minha sobrinha Rafaela Galhardi André. E com saudoso carinho dos que não estão presentes, Alberto Galhardi (*in memoriam*) e Alberto Galhardi Júnior (*in memoriam*).

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por todo suporte e apoio financeiro a este projeto, através do processo nº 03/12.121-5.

Agradecimentos

Obrigado a todos os colegas de trabalho, Hosana Gomes Rodrigues, Yeda Sant'ana Diniz, Geovana Maria Xavier Ebaid, Katiucha Karolina Honório Ribeiro Rocha, Juliana Fujihara, Gisele Aparecida de Souza e Fábio Seiva. Que a nossa amizade seja eterna.

Agradeço a todos os professores e funcionários do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu.

Aos professores do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UNESP - Botucatu.

Aos funcionários da pós-graduação, Janete Ap. Herculano Nunes Sieva, Regina Célia Spadin, Lílian C. Nadal B. Nunes e Nathanael Pinheiro Salles.

Aos amigos César Trindade Matinesi e Vanessa, Juliana e Fábio Akinaga (e por sua família que sempre me recebeu com carinho em São Paulo) pelo apoio incondicional de vocês. Nossas boas lembranças sempre serão motivos de alegria. Desejo a vocês toda sorte e felicidade do mundo, e NUNCA desistam de seus sonhos !!!

Lista de Tabelas

CAPÍTULO 01

Tabela 1. Peso inicial, peso final e ganho de peso	24
Tabela 2. Parâmetros nutricionais	25
Tabela 3. Avaliação morfométrica	26
Tabela 4. Concentrações de glicose e triacilglicerol	30
Tabela 5. Energia Ingerida e eficiência alimentar	33

CAPÍTULO 02

Tabela 1. Avaliação do perfil lipídico	52
Tabela 2. Avaliação do estresse oxidativo	53
Tabela 3. Concentração de glicogênio e fosfatase alcalina	54

CAPÍTULO 03

Tabela 1. Peso do coração e concentração de proteína	73
Tabela 2. Avaliação do estresse oxidativo cardíaco	74
Tabela 3. Atividade do metabolismo energético cardíaco	75

Lista de Figuras

CAPÍTULO 01

Figura 1. Correlação entre índice de massa corporal e circunferência abdominal 27

Figura 2. Correlação entre lipídio da carcaça e circunferência abdominal 28

Figura 3. Correlação entre lipídio da carcaça e índice de massa corporal 29

Figura 4. Correlação de Pearson entre as variáveis: concentração de triacilgliceróis versus índice de massa corporal 31

Figura 5. Correlação de Pearson entre as variáveis: concentração de triacilgliceróis versus circunferência abdominal 32

Sumário

Introdução Geral	9
Referências	13
Capítulo 01: Efeitos da restrição no tempo de ingestão alimentar e consumo de sacarose sobre parâmetros nutricionais, morfométricos e alterações metabólicas em ratos	14
Resumo	15
Introdução	16
Material e Métodos	17
Resultados	21
Discussão	34
Referências	41
Capítulo 02: Efeitos da restrição no tempo de ingestão alimentar e consumo de sacarose sobre o glicogênio hepático, perfil lipídico e estresse oxidativo sérico de ratos	43
Resumo	44
Introdução	45
Material e Métodos	47
Resultados	50
Discussão	55
Referências	62
Capítulo 03: Metabolismo energético e equilíbrio oxidante / antioxidante no miocárdio de ratos submetidos à restrição no tempo de ingestão alimentar e suplementação nutricional com sacarose	66
Resumo	67
Introdução	68
Material e Métodos	69
Resultados	71
Discussão	76
Referências	81
Conclusões Finais	84
Apêndices	87

Introdução Geral

Estudos clínicos e epidemiológicos têm demonstrado que doenças cardiovasculares são responsáveis por 40% de mortes na América do Norte (Eikelboom et al., 1999) e também no Brasil.

Deste modo, estudos dos fatores de risco da doença cardiovascular têm grande importância na prevenção e tratamento desta enfermidade. Fatores de risco da doença cardiovascular incluem elevações nas concentrações de triacilgliceróis, colesterol, ácidos graxos livres, lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) e diminuição na lipoproteína de elevada densidade (HDL-colesterol) (Abuja & Albertini, 2001).

Após episódios repetidos de alimentação e jejum prolongado, a atividade da lipase lipoprotéica, responsável pela liberação de triacilglicerol circulante nas lipoproteínas, em ácidos graxos utilizados pelos tecidos, esta diminuída no tecido cardíaco e aumentada no tecido adiposo, sugerindo que hábitos alimentares com intervalos grandes entre as refeições, poderiam induzir elevação nos triacilgliceróis do tecido adiposo e diminuir os substratos energéticos para a atividade miocárdica (Botion, 2001).

Ratos alimentados com dietas suplementadas com sacarose durante duas ou três semanas desenvolveram esteatose hepática e tornaram-se obesos (Koteish & Diehl, 2001). Elevada ingestão de sacarose induziu aumento na síntese hepática de triacilglicerol pela ativação das enzimas acetil coenzima A carboxilase, ácido graxo sintetase e da enzima málica, responsável pela formação de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), utilizado na síntese de ácidos graxos (Sebokova et al., 1996).

Restrição no tempo de ingestão alimentar para uma ou duas horas diárias aumentou a lipogênese em ratos (Hollifield & Parson, 1962). Animais submetidos à restrição no tempo de ingestão alimentar ingeriram maior quantidade de dieta por dia,

em relação aos animais tratados “*ad libitum*” e apresentaram elevação no glicogênio hepático (Stevenson et al., 1964).

O miocárdio contém grande quantidade de mitocôndrias e possui elevada taxa de consumo de oxigênio, desde que utiliza os ácidos graxos como principais substratos para a produção de energia (Henning et al., 1996). A maior utilização de oxigênio pelo músculo cardíaco relaciona-se a maior quantidade de ATP produzida pela oxidação de ácidos graxos em relação a carboidratos, bem como o fato que ácidos graxos ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$), apresentam baixa concentração de oxigênio por molécula, em comparação com carboidratos ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$). Por outro lado, a β -oxidação de ácidos graxos saturados produz equivalentes redutores, $\text{NADH} + \text{H}^+$ e FADH_2 em iguais proporções, além de formar acetil Coenzima A, metabolizada no ciclo do ácido cítrico (Voet et al., 2000).

O músculo cardíaco necessita de cerca de 12% mais oxigênio, quando utiliza ácido graxo, e não glicose como fonte de energia, para produzir a mesma quantidade de ATP (Neely & Morgan, 1974). Estas observações indicam maior susceptibilidade do músculo cardíaco ao estresse oxidativo e a importância do metabolismo energético cardíaco na produção de radicais livres.

A importância do metabolismo energético e produção de ATP na atividade muscular miocárdica têm sido freqüentemente estudadas, porém os efeitos da restrição no tempo de ingestão alimentar e da suplementação nutricional com sacarose ainda não foram estabelecidos.

A elevada ingestão de calorias, pode não ser o único fator associado à dislipidemia, aterosclerose, alteração no metabolismo energético e estresse oxidativo miocárdico. O efeito da inadequada ingestão alimentar, com restrição no tempo de ingestão alimentar e redução no número de refeições diárias, pode induzir dislipidemias,

bem como modificação no metabolismo energético e no estresse oxidativo no tecido cardíaco.

Inúmeras evidências têm demonstrado que dislipidemias e aterosclerose estão associadas à alteração cardiovascular, que constitui importante causa de mortalidade. Embora atribuída à elevada ingestão de calorias e lipídios nas dietas, ainda não foi esclarecido se a restrição no tempo de ingestão alimentar e a diminuição no número de refeições diárias estão relacionadas ao aparecimento de dislipidemias, aterosclerose, alterações metabólicas e indução do estresse oxidativo no tecido cardíaco.

Com base nesses dados e para a realização do presente trabalho, o mesmo foi dividido em três capítulos, sendo:

- Capítulo 01: Efeitos da restrição no tempo de ingestão alimentar e consumo de sacarose sobre parâmetros nutricionais, morfométricos e alterações metabólicas em ratos;
- Capítulo 02: Efeitos da restrição no tempo de ingestão alimentar e consumo de sacarose sobre o glicogênio hepático, perfil lipídico e estresse oxidativo sérico de ratos;
- Capítulo 03: Metabolismo energético e equilíbrio oxidante / antioxidante no miocárdio de ratos submetidos à restrição no tempo de ingestão alimentar e suplementação nutricional com sacarose.

Referências*

- Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 306, p.1-17, 2001.
- Botion LM. The influence of fasting/refeeding on the lipoprotein lipase activity of adipose tissue and muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 34, p. 1411-1414, 2001.
- Eikelboom JW, Lonn E, Genest JJr, Hankey G, Yusuf S. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Journal Article. Review. Annals of Internal Medicine*. v.131(5) p.363-75, 1999.
- Henning SI, Wambolt RB, Schonckess BO. Contribution of glycogen to aerobic myocardial glucose utilization. *Circulation*, v. 93, p.1549-1555, 1996.
- Hollifield G, Parson W.J. Restriction of feeding time and lipogenesis in rats. *J. Clin. Invest.* v.41, p. 250-6, 1962.
- Koteish A, Diehl AM. Animals Models of Steatosis. *Seminar in Liver Diseases*, v. 21(1), p. 85-104, 2001.
- Neely JR, Morgan HE. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Ann. Rev. Physiol.*, v.36, p.413-459, 1974.
- Sebokova E, Klimes I, Gasperikova D, Bogov P, Langer P, Lavau M, Clandinin MT. Regulation of gene expression for lipogenic enzymes in the liver and adipose tissue of hereditary hypertriglyceridemic, insulin-resistant rats: effect of dietary sucrose and marine fish oil. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1303, p. 56-62, 1996.
- Stevenson JAF, Feleki V, Szlavko A, Beaton JR. Food Restriction and Lipogenesis in the Rat. *Proceeding of Society Experimental Biology and Medical*. V. 116, p. 178-182, 1964.
- Voet D, Voet JG, Pratt C. *Fundamentos de Bioquímica*. (São Paulo): Artes Médicas, 2000, 931p.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted journal. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336: 309-315.

Capítulo 01:

Efeitos da restrição no tempo de ingestão alimentar e consumo de sacarose sobre parâmetros nutricionais, morfométricos e alterações metabólicas em ratos

Resumo

A relação entre parâmetros nutricionais e alterações metabólicas relacionadas a modificações morfométricas em função de modelos de inadequada ingestão alimentar, tem sido pouco estudada. No presente estudo, 24 ratos machos *wistar*, de peso inicial médio de $222,69 \pm 16,49\text{g}$, foram divididos aleatoriamente em quatro grupos AD, RT, ADS, RTS com seis ratos cada. O grupo AD foi considerado controle, recebendo dieta basal *ad libitum*. Os animais do grupo RT receberam a mesma quantidade de dieta ingerida pelo grupo AD, oferecida diariamente no período restrito de duas horas (9:00 às 11:00h). Os animais do grupo ADS receberam ração controle *ad libitum* e para beber, solução aquosa de sacarose 30% *ad libitum*. Ratos do grupo RTS foram tratados com a mesma quantidade de ração ingerida pelo grupo ADS, oferecida durante o tempo restrito de 2 horas diárias e solução aquosa de sacarose 30% *ad libitum*. Os parâmetros nutricionais dos animais foram analisados durante 30 dias. Após este período foram feitas análises morfométricas. A glicemia e a trigliceridemia foram determinadas após 25 dias do período experimental. Animais com restrição no tempo de ingestão alimentar (RT) apresentaram menor ganho de peso e peso corporal final com diminuição na energia ingerida, eficiência alimentar, índice de massa corporal (IMC), redução no comprimento corporal e hiperglicemia. Animais do grupo RTS ingeriram maior concentração de solução aquosa de sacarose, compensando a redução de energia proveniente da ração. Obtendo energia a partir da ingestão da solução aquosa de sacarose estes animais apresentaram hiperglicemia de jejum, em relação aos grupos ADS, RT e AD. Animais do grupo ADS apresentaram elevação no ganho de peso, no peso final, circunferência abdominal e no IMC em relação aos demais grupos. Os resultados obtidos permitiram evidenciar que a utilização de medidas morfométricas e parâmetros nutricionais em animais de laboratório pode contribuir consideravelmente, para o estudo da síndrome metabólica, obesidade e controle dos fatores de risco de doenças cardiovasculares.

Introdução

Nos últimos anos tem sido observada elevação na incidência de danos cardiovasculares em vários países, resultante da inadequada ingestão alimentar e obesidade (WHO 1998). Compreender as causas e os fatores relacionados ao ganho de peso é de fundamental importância para prevenir as complicações associadas à obesidade e os riscos a doenças cardiovasculares, que incluem hipertensão, diabetes e dislipidemias. (Iossa et al., 2003; Haffner & Taegtmeyer, 2003)

Este conjunto de fatores foi denominado de síndrome metabólica, tendo sido utilizado eficientemente no prognóstico de doenças cardiovasculares (Solati et al., 2004). Nos dias atuais, tem havido esforço conjunto para padronizar os critérios envolvidos no diagnóstico da síndrome metabólica.

Lemieux (2000) demonstrou um método simples para a detecção da síndrome metabólica, altamente aplicada na prática clínica, com base na hipertrigliceridemia, considerando fatores de risco: circunferência abdominal e elevada concentração de triacilglicerol de jejum. Indivíduos com esses dois fatores, apresentavam maiores riscos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares do que aqueles indivíduos que apresentavam outros fatores, ou apenas um desses separadamente (Solati et al., 2004).

Hollifield e Parson (1962) observaram ativação de mecanismos lipogênicos, quando restringiram a oferta de ração a animais por apenas duas horas diárias. Também observaram que após dez semanas, os animais restritos estavam 30% mais pesados que os animais controles. Stevenson e colaboradores (1964) restringiram a oferta da ração em duas horas por dia e observaram elevação na atividade de enzimas lipogênicas em relação aos animais que recebiam ração *ad libitum*.

Em ratos jovens quando há uma grande quantidade de energia ingerida, proveniente de dieta rica em carboidratos, como a sacarose, a taxa metabólica aumenta e o excesso de energia é liberado sob a forma de calor. Entretanto, tanto humanos quanto roedores desenvolvem obesidade espontânea com o passar da idade, demonstrando falha no mecanismo regulatório de manutenção do peso corporal (Iossa et al., 2003). Dietas ricas em energia podem antecipar os efeitos da idade no ganho de peso, na forma de gordura, tanto em humanos quanto em roedores jovens (Iossa et al., 2003).

Hábitos alimentares com restrição no tempo de ingestão alimentar, em pequeno número de refeições diárias e ingestão de dietas suplementadas com carboidratos, podem constituir importantes fatores associados à dislipidemias e alterações metabólicas, levando a um quadro de síndrome metabólica, aumentando assim o risco de doenças cardiovasculares.

Tendo em vista a importância da ingestão de carboidratos no aparecimento da síndrome metabólica e alterações cardiovasculares, bem como a existência de controvérsias sobre os efeitos da restrição no tempo de ingestão alimentar, neste trabalho foram estudados os efeitos da elevada ingestão de sacarose e da restrição no tempo de ingestão alimentar de duas horas diárias, sobre parâmetros nutricionais e morfométricos, bem como sobre a glicemia e trigliceridemia em ratos.

Material e Métodos

Foram utilizados 24 ratos machos adultos *Wistar*, de peso médio inicial $222,69 \pm 16,49$ g. Os animais foram provenientes do Biotério Central da UNESP "Campus de Botucatu" e transferidos para o Laboratório de Bioquímica na Experimentação Animal, do Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de

Biociências, UNESP/Botucatu, onde permaneceram durante o período experimental de 30 dias, à temperatura de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade $60\pm 5\%$, período claro/escuro de 12 horas.

Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico individuais, recebendo dieta basal *ad libitum* (Purina Labina, Campinas, São Paulo, Brasil), água destilada *ad libitum* ou solução de sacarose 30% *ad libitum*.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos AD, RT, ADS, RTS com seis ratos cada. O grupo AD foi considerado controle e recebeu dieta basal *ad libitum*. Os animais do grupo RT receberam a mesma quantidade de dieta ofertada ao grupo AD, oferecida diariamente no período restrito de duas horas (9:00 às 11:00h). Os animais do grupo ADS receberam ração controle *ad libitum* e para beber, solução aquosa de sacarose 30% *ad libitum*. Ratos do grupo RTS foram tratados com a mesma quantidade de ração ingerida pelo grupo ADS oferecida durante o tempo restrito de duas horas diárias e solução aquosa de sacarose 30% *ad libitum*.

A ingestão alimentar e o consumo de água e solução de sacarose 30% foram controladas diariamente no mesmo horário (9:00 às 11:00h). Foram oferecidas quantidades conhecidas de ração, água e solução de sacarose. Após o período de duas horas nos grupos com restrição no tempo de ingestão (grupos RT e RTS) e após 24 horas nos grupos com ingestão *ad libitum* (grupos AD e ADS) o restante foi pesado (ração) e medido (água e solução de sacarose), permitindo a determinação do consumo alimentar de cada animal de cada grupo, bem como quantificar a água e solução de sacarose ingerida por dia, por animal. Semanalmente os animais foram pesados. Uma semana antes do início do experimento, os animais dos grupos RT e RTS, receberam ração *ad libitum* por um período de uma hora diária (9:00 às 10:00h), no intuito de treinar e adaptar os animais à ingestão de ração em período restrito de tempo.

Tendo como base as quantidades de ração ingeridas e a quantidade de energia metabolizável da ração (3,0 Kcal/g) foi calculada a quantidade de energia ingerida (Kcal/dia) por animal, por dia. Para os grupos com suplementação nutricional com sacarose foi acrescida a quantidade de caloria correspondente. Também foram determinados os parâmetros nutricionais, segundo Diniz e colaboradores (2002):

- Eficiência Alimentar (g/kcal) = ganho de peso total médio / energia ingerida
- Preferência Alimentar (%) = (consumo alimentar / quantidade de dieta ofertada) x 100
- Palatabilidade (%) = (ingestão de sol. aquosa / quantidade de sol. aquosa ofertada) x 100

No 23º dia de tratamento foram determinadas em todos os animais através do sangue caudal as concentrações de glicose pós-prandial (Accu-chek, Roche) e triacilglicerol (Accutrend GCT, Roche). No 25º dia os procedimentos foram repetidos estando os animais em jejum de 12 horas.

No 30º dia de tratamento foram determinados parâmetros morfométricos, como a circunferência abdominal (*Apêndice A*), circunferência torácica (*Apêndice B*) e o comprimento total (exceto cauda) (*Apêndice C*) dos animais.

Os valores obtidos no comprimento do animal e peso corporal foram utilizados para o cálculo do índice de massa corpórea (IMC) dos animais (Diniz et al., 2006), onde:

- $IMC (g/cm^2) = peso\ final / (comprimento^2)$

Após a obtenção dos parâmetros morfométricos, os animais foram sacrificados por fratura cervical e decapitação. Amostra (100g) proveniente da carcaça dos animais (região abdominal) foi retirada com auxílio de pinça e bisturi e colocada em solução

salina gelada (NaCl 0,9%) para análise da quantidade de proteína e lipídio. Alíquotas (100mg) de carcaça foram homogeneizadas para a determinação das concentrações de lipídios e proteínas. A concentração de lipídio foi determinada por extração com clorofórmio-etanol segundo método de Folch (1957). As concentrações de proteínas totais foram determinadas segundo técnica colorimétrica (CELM diagnóstico, Companhia de Equipamentos de Laboratório Moderno, São Paulo, Brasil).

Estatística

Os resultados apresentados no presente capítulo, foram analisados estatisticamente através da Análise de Variância para o esquema fatorial 2x2 no modelo completamente ao acaso, complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey, através do software SigmaStat versão 3.1 (Systat Software, Inc.), o nível de significância foi estimado em 5% (Norman & Streiner, 1994).

Para o estudo longitudinal (peso, consumo de água, consumo de solução aquosa de sacarose e ração) foi utilizada a técnica de variância multivariada envolvendo a análise de medidas repetidas para o esquema fatorial 2x2, com nível de significância estimado em 5% (Johnson & Wichern, 1998).

A análise estatística envolvendo o estudo comparativo entre a glicemia pós prandial e a glicemia de jejum, foi realizada através do teste t de Student para amostras pareadas, com nível de significância estimado em 5% (Iossa et al., 2003).

Comparações entre parâmetros metabólicos séricos e morfométricos foram analisados através da correlação linear de Pearson. O nível de significância foi estimado com $p < 0,05$ (Smith et al., 1998).

Resultados

Após 30 dias de experimento foi observado que animais do grupo ADS, apresentaram elevação no peso corporal em relação aos grupos AD, RT e RTS. O grupo RT apresentou o menor peso corporal em comparação aos demais grupos (*Tabela 1*). O ganho de peso, bem como o peso final dos animais estiveram elevados no grupo ADS e diminuídos nos animais do grupo RT, em comparação aos animais dos grupos AD e RTS, respectivamente (*Tabela 1*).

Os animais do grupo AD apresentaram o consumo de ração mais elevado, quando comparado ao consumo dos animais dos grupos RT, ADS e RTS (*Tabela 2*). A ingestão de ração no grupo RTS foi significantemente menor em relação aos grupos AD, RT e ADS, durante todo o período experimental (*Tabela 2*). Animais do grupo RTS apresentaram a mais baixa preferência alimentar quando comparados aos demais grupos. O grupo AD apresentou a maior preferência alimentar em relação aos demais grupos (*Tabela 2*). Ao observarmos a ingestão média de água, verificamos que os animais do grupo RT ingeriram menor quantidade em relação aos animais do grupo AD (*Tabela 2*). O grupo ADS apresentou ingestão da solução aquosa elevada em relação aos animais do grupo RT, que ingeriram apenas água. Não foi observada diferença na ingestão de solução aquosa no grupo ADS em relação ao grupo AD. A ingestão de solução de sacarose pelos animais do grupo RTS, apresentou-se elevada quando comparada aos grupos AD, RT e ADS (*Tabela 2*). Verificamos que durante o período experimental a palatabilidade da solução aquosa de sacarose (grupos ADS e RTS) foi maior em relação a água (grupos AD e RT). Os animais do grupo AD ingeriram mais água que os animais do grupo RT. Animais do grupo RTS ingeriram mais solução aquosa de sacarose em relação aos demais grupos (*Tabela 2*).

O índice de massa corporal (IMC) nos animais do grupo ADS, apresentou-se elevado em relação aos grupos RT e RTS, não havendo diferença em relação ao grupo AD. O grupo RT foi o que apresentou o menor IMC (*Tabela 3*). O comprimento determinado em todos os animais no 30º dia de experimento demonstrou que os animais dos grupos RT e RTS tiveram o menor comprimento e os grupos AD e ADS os maiores (*Tabela 3*). Quando observamos a circunferência abdominal, verificamos que os animais do grupo RT tiveram a menor circunferência abdominal quando comparada aos grupos AD, RTS e ADS, sendo este grupo, o que apresentou maior circunferência abdominal quando comparado aos demais (*Tabela 3*). Nas relações CA/CT e CT/CA não observamos diferenças entre os grupos. Não houve diferença significativa na concentração de proteína total da carcaça entre os grupos ($p>0,005$) (*Tabela 3*). A concentração do lipídio da carcaça apresentou-se elevada nos animais do grupo ADS e diminuída nos animais do grupo RT (*Tabela 3*).

Ao analisarmos a correlação entre variáveis morfométricas, observamos valores significativamente positivos entre IMC e CA ($R^2=0,97$ – *Figura 1*), lipídio da carcaça e CA ($R^2=0,92$ – *Figura 2*), lipídio da carcaça e GP ($R^2=0,97$) e entre lipídio da carcaça e IMC ($R^2=0,92$ – *Figura 3*).

A glicemia pós prandial obtida durante o 23º dia de experimento, demonstrou que animais do grupo RTS apresentaram elevação da glicose sanguínea em comparação aos grupos AD, RT e ADS, que não apresentaram variação entre si (*Tabela 4*). A glicemia de jejum obtida no 25º dia apresentou-se elevada nos animais do grupo RTS, e diminuída no grupo AD em relação aos grupos ADS e RT (*Tabela 4*). Quando comparamos a glicemia pós prandial e a glicemia de jejum, observamos apenas diferença significativa no grupo AD, que apresentou redução na glicemia de jejum em relação à glicemia pós prandial (*Tabela 4*). As concentrações de triacilgliceróis

apresentaram-se diminuídas nos animais do grupo RT e elevadas nos animais do grupo ADS, quando comparados aos animais dos grupos AD e RTS (*Tabela 4*). Houve correlação positiva entre as concentrações de TG e o IMC dos animais ($p < 0,05$) (*Figura 4*) e entre TG e circunferência abdominal ($p < 0,05$) (*Figura 5*).

A energia ingerida (*Tabela 5*) apresentou-se elevada nos animais do grupo ADS em relação aos grupos AD, RT e RTS. Entre os animais dos grupos RT e RTS houve diferença significativa na energia ingerida, sendo menor quando comparada aos demais grupos. A eficiência alimentar (*Tabela 5*) mostrou-se diminuída nos grupos RTS, ADS e RT em relação ao grupo AD. Animais do grupo RT apresentaram a menor eficiência alimentar.

Tabela 1. Peso inicial, peso final e ganho de peso dos animais dos grupos controle (AD), com restrição no tempo de ingestão (RT), mantidos com dieta suplementada com sacarose (ADS) e com restrição no tempo de ingestão e mantidos com dieta suplementada com sacarose (RTS)

	GRUPOS			
	AD	RT	ADS	RTS
Peso Inicial (g)	220,41±22,39 ^a	223,14±14,14 ^a	221,54±12,74 ^a	226,29±19,77 ^a
Peso Final (g)	408,46±39,71 ^c	271,58±34,47 ^a	435,98±48,73 ^c	334,07±11,06 ^b
Ganho de Peso (g)	188,05±19,50 ^c	67,91±12,38 ^a	214,45±37,90 ^c	107,78±12,46 ^b

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, com $p < 0,05$.

Tabela 2. Consumo alimentar (CA), preferência alimentar (PA), ingestão média de solução aquosa (IMSA) e palatabilidade (P) dos animais dos grupos controle (AD), com restrição no tempo de ingestão (RT), mantidos com dieta suplementada com sacarose (ADS) e com restrição no tempo de ingestão e mantidos com dieta suplementada com sacarose (RTS), durante todo o período experimental

	GRUPOS			
	AD	RT	ADS	RTS
CA (g/dia)	31,74±2,80 ^d	17,22±2,85 ^b	20,70±3,84 ^c	9,01±1,03 ^a
PA (%/dia)	61,21±5,36 ^d	34,00±5,55 ^b	40,01±7,61 ^c	17,83±2,00 ^a
IMSA (mL/dia)	42,79±6,67 ^b	30,09±6,66 ^a	45,58±5,89 ^b	53,84±7,82 ^c
P (%/dia)	14,26±2,22 ^b	10,03±2,22 ^a	15,41±2,13 ^b	17,95±2,61 ^c

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, com $p < 0,05$.

Tabela 3. Avaliação morfométrica realizada no 30º dia de tratamento: índice de massa corporal (IMC), comprimento (C), circunferência abdominal (CA), circunferência torácica (CT), relação CA/CT e relação CT/CA, proteína da carcaça (PT) e lipídio da carcaça (LT), nos animais dos grupos controle (AD), com restrição no tempo de ingestão (RT), mantidos com dieta suplementada com sacarose (ADS) e com restrição no tempo de ingestão e mantidos com dieta suplementada com sacarose (RTS)

	GRUPOS			
	AD	RT	ADS	RTS
IMC (g.cm ⁻²)	0,68±0,06 ^{bc}	0,54±0,05 ^a	0,74±0,07 ^c	0,63±0,03 ^b
C (cm)	24,50±1,52 ^c	22,42±0,66 ^a	24,25±0,27 ^c	23,10±0,42 ^b
CA (cm)	19,17±0,98 ^b	16,33±0,98 ^a	20,67±1,47 ^c	17,90±0,55 ^b
CT (cm)	17,17±1,51 ^b	14,83±0,75 ^a	17,92±0,92 ^b	16,40±0,42 ^b
CA/CT	1,12±0,06 ^a	1,10±0,03 ^a	1,15±0,05 ^a	1,09±0,03 ^a
CT/CA	0,89±0,05 ^a	0,91±0,02 ^a	0,87±0,04 ^a	0,92±0,03 ^a
PT Carcaça (g/100g)	64,6±8,4 ^a	62,6±6,2 ^a	61,6±4,1 ^a	64,6±4,1 ^a
LT Carcaça (g/100g)	74,7±12,4 ^b	44,9±17,6 ^a	172,0±38,4 ^c	89,5±11,5 ^b

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, com p<0,05.

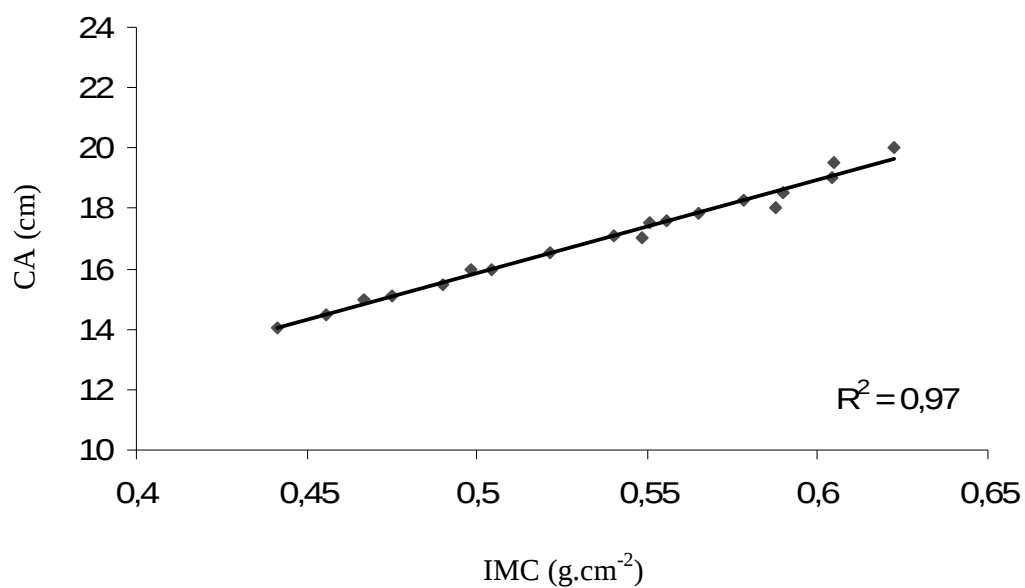


Figura 1. Correlação entre índice de massa corporal (IMC) e circunferência abdominal (CA) dos animais dos grupos controle (AD), com restrição no tempo de ingestão (RT), mantidos com dieta suplementada com sacarose (ADS) e com restrição no tempo de ingestão e mantidos com dieta suplementada com sacarose (RTS).

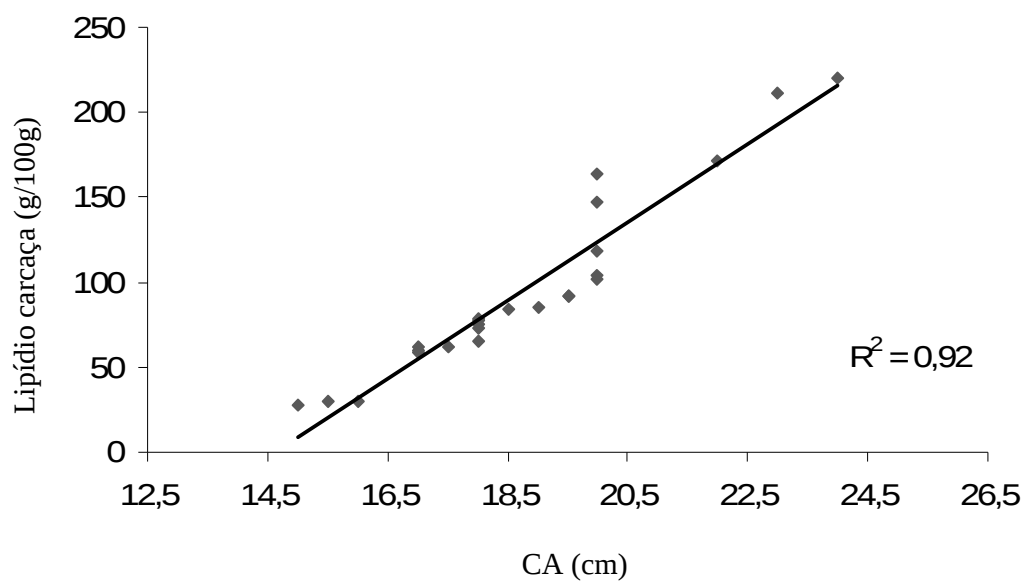


Figura 2. Correlação entre lipídio da carcaça e circunferência abdominal (CA) dos animais dos grupos controle (AD), com restrição no tempo de ingestão (RT), mantidos com dieta suplementada com sacarose (ADS) e com restrição no tempo de ingestão e mantidos com dieta suplementada com sacarose (RTS).

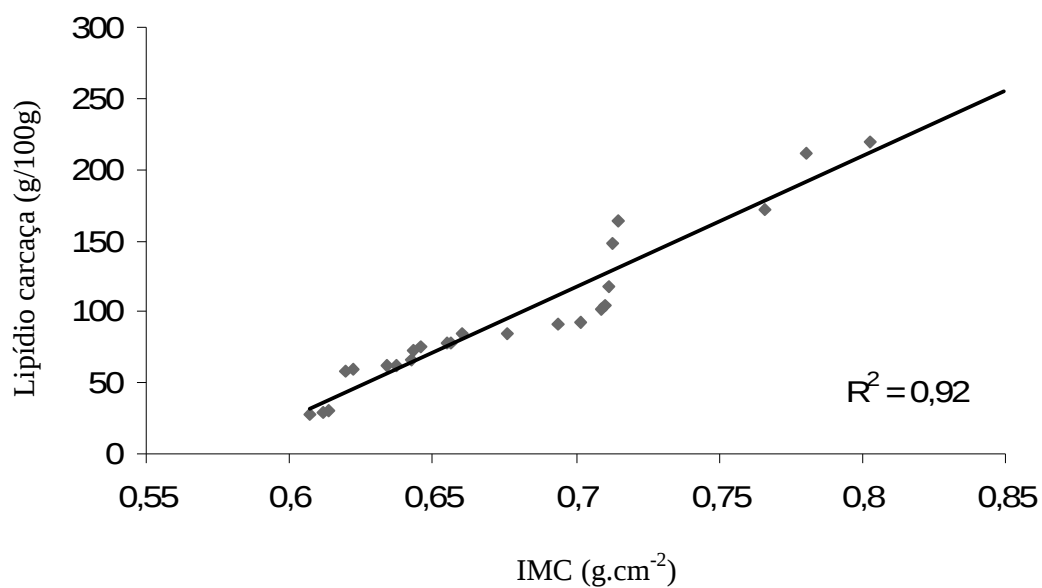


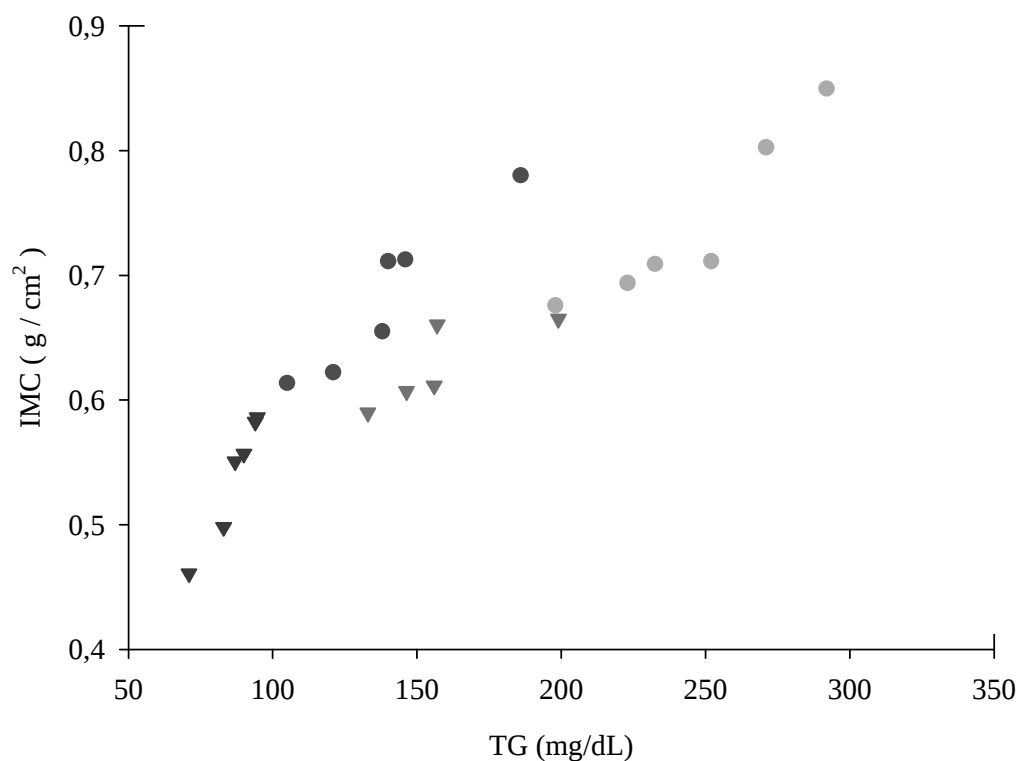
Figura 3. Correlação entre lipídio da carcaça e índice de massa corporal (I.M.C.) dos animais dos grupos controle (AD), com restrição no tempo de ingestão (RT), mantidos com dieta suplementada com sacarose (ADS) e com restrição no tempo de ingestão e mantidos com dieta suplementada com sacarose (RTS).

Tabela 4. Concentrações de glicose em animais não submetidos a jejum (GLI-PP), e glicemia de jejum (GLI-J) e triacilglicerol em animais submetidos a jejum de 12 horas nos animais dos grupos controle (AD), com restrição no tempo de ingestão (RT), mantidos com dieta suplementada com sacarose (ADS) e com restrição no tempo de ingestão e mantidos com dieta suplementada com sacarose (RTS)

	GRUPOS			
	AD	RT	ADS	RTS
GLI-PP (mg/dL)	84,17±6,11 ^a	77,00±3,69 ^a	84,00±7,95 ^a	99,20±12,76 ^b
GLI-J (mg/dL)	^A 70,33±5,72 ^a	83,33±4,93 ^b	90,00±5,62 ^c	105,20±4,4 ^d
TG (mg/dL)	139,33±27,35 ^b	86,61±8,81 ^a	244,75±34,01 ^d	158,28±24,72 ^{bc}

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, com $p < 0,05$.

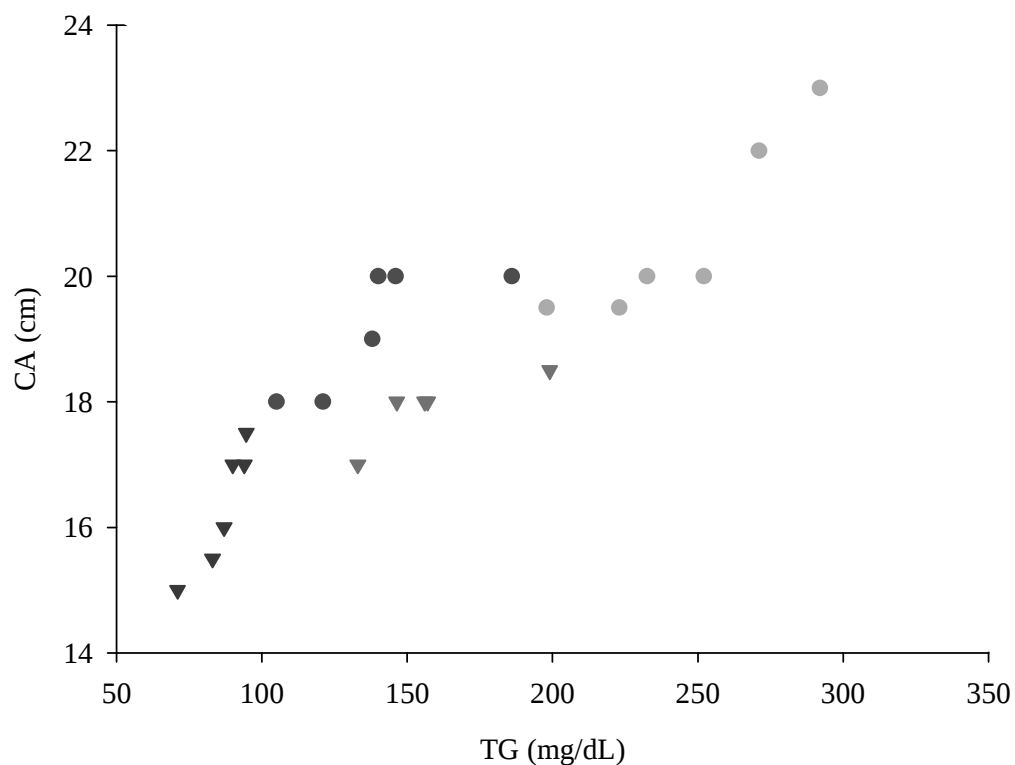
Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre a glicemia pós prandial e glicemia de jejum. ^A diferença significativa em relação à glicemia pós prandial, teste t de Student para amostras pareadas, com $p < 0,05$.



- TG vs IMC - AD $r = 0,948$ com $p = 0,00394$
- ▼ TG vs IMC - RT $r = 0,975$ com $p = 0,000938$
- TG vs IMC - ADS $r = 0,934$ com $p = 0,00637$
- ▼ TG vs IMC - RTS $r = 0,813$ com $p = 0,0146$

Figura 4. Correlação de Pearson entre as variáveis: concentração de triacilgliceróis (TG) versus índice de massa corporal (IMC), obtido dos grupos controle (AD), com restrição no tempo de ingestão (RT), mantidos com dieta suplementada com sacarose (ADS) e com restrição no tempo de ingestão e mantidos com dieta suplementada com sacarose (RTS).

Valores de “r” e “p” obtidos através da Correlação de Pearson, diferenças consideradas significantes com $p < 0,05$.



●	TG vs CA - AD	$r = 0,800$ com $p = 0,05$
▼	TG vs CA - RT	$r = 0,930$ com $p = 0,00712$
●	TG vs CA - ADS	$r = 0,913$ com $p = 0,0110$
▼	TG vs CA - RTS	$r = 0,843$ com $p = 0,0132$

Figura 5. Correlação de Pearson entre as variáveis: concentração de triacilgliceróis (TG) versus circunferência abdominal (CA), obtido dos grupos controle (AD), com restrição no tempo de ingestão (RT), mantidos com dieta suplementada com sacarose (ADS) e com restrição no tempo de ingestão e mantidos com dieta suplementada com sacarose (RTS).

Valores de “r” e “p” obtidos através da Correlação de Pearson, diferenças consideradas significantes com $p < 0,05$.

Tabela 5. Energia Ingerida (EI) e eficiência alimentar (EA) dos animais dos grupos controle (AD), com restrição no tempo de ingestão (RT), mantidos com dieta suplementada com sacarose (ADS) e com restrição no tempo e mantidos com dieta suplementada com sacarose (RTS), durante todo o período experimental.

	GRUPOS			
	AD	RT	ADS	RTS
EI (Kcal/semana)	95,23±8,40 ^c	51,67±8,55 ^a	116,81±13,99 ^d	59,69±7,43 ^b
EA (g/Kcal)	1,98±0,14 ^c	1,31±0,25 ^a	1,83±0,18 ^b	1,82±0,19 ^b

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, com $p < 0,05$.

Discussão

Dietas ricas em carboidratos levam ao elevado consumo de calorias, as quais induzem elevação no peso corporal e aumento no depósito de gordura (Smith et al. 1998). Ratos alimentados com dietas ricas em sacarose apresentam elevação no peso do tecido adiposo (Blakley et al., 1982, Rizkalla et al., 1990, Soria et al., 2001).

Obesidade é usualmente definida como uma condição metabólica na qual o indivíduo apresenta elevada porcentagem de gordura corporal. Homens com valores relativos de 20 a 25% de gordura devem ser considerados obesos (Powers e Howley, 2000). A obesidade pode ainda ser classificada segundo a intensidade em leve, moderada e grave, diferenciadas pela análise do índice de massa corporal (Powers e Howley, 2000).

Obesidade também pode ser definida como um aumento no índice de massa corporal e aumento na relação cintura-quadril, resultando em várias desordens metabólicas que elevam o risco a doenças cardiovasculares (Solati et al., 2004). Inúmeros estudos sobre alterações metabólicas associadas ao ganho de peso e obesidade com animais de experimentação têm sido realizados (Iossa et al., 1999; Chicco et al., 1999; Thomas et al., 2002; Acheson, 2004), embora parâmetros morfométricos que caracterizem obesidade ainda não tenham sido claramente definidos.

De maneira geral, quando a energia ingerida excede o gasto energético, o excesso de energia é depositado como gordura, caracterizando a obesidade (Iossa et al., 1999). Considerando desta maneira simplista, desde que obesidade é observada quando a energia ingerida excede o gasto energético, intuitivamente a perda de peso seria obtida quando a ingestão calórica fosse menor que o gasto energético, independentemente dos componentes da dieta. Entretanto, a variação nos componentes da dieta, além do conteúdo calórico, bem como o número de refeições diárias influenciam

consideravelmente o ganho de peso (Acheson, 2004) e os parâmetros metabólicos a ela associados (Diniz et al., 2002).

Foi demonstrado que animais sob restrição no tempo de ingestão alimentar (grupo RT) apresentaram comprimento inferior aos dos animais dos grupos AD, RTS e ADS (*Tabela 3*). Animais do grupo RT apresentaram menor IMC, menor comprimento corporal, menor peso final e menor ganho de peso ao final do período experimental (*Tabela 1*), indicando que a restrição no tempo de ingestão alimentar levou a diminuição no desenvolvimento desses animais em relação aos ratos do grupo AD. Diminuição no ganho de peso corporal em animais sob restrição no tempo de ingestão alimentar foi observada por Burrin e colaboradores (1998).

Tipicamente, três fases metabólicas distintas têm sido identificadas em animais com jejum prolongado. Um período de adaptação rápido, com aumento na utilização de reservas de glicogênio e mobilização de ácidos graxos. A segunda fase, na qual os ácidos graxos são a principal fonte de energia e as proteínas são preservadas. A terceira fase, após a depleção completa de lipídios é caracterizada pela utilização de proteínas como fonte energética (Habold et al., 2004). Considerando o peso corporal e a análise morfométrica, parece provável que nos animais do grupo RT, grande parte da energia metabólica era proveniente de ácidos graxos.

Observando os animais do grupo RTS, pode-se verificar que os mesmos apresentaram IMC e peso final elevado em relação aos animais do grupo RT. Estes fatos estão associados à suplementação nutricional com sacarose, desde que animais do grupo RTS receberam como fonte de energia além da ração ofertada duas horas diariamente, a solução aquosa de sacarose. Neste grupo, a sacarose constituiu a principal fonte de energia, como pode ser demonstrado pela diminuição no consumo alimentar e preferência alimentar e pela elevação na ingestão de solução aquosa de sacarose (*Tabela*

2). De fato, pode-se verificar que animais do grupo RTS apresentaram maior ganho de peso que animais do grupo RT. Embora animais do grupo RTS tenham apresentado redução no comprimento corporal, não foram observadas alterações significantes entre o IMC de animais do grupo RTS e AD (*Tabela 3*), indicando que a ingestão de sacarose representou importante suplemento energético para os animais do grupo RTS.

Observando os animais do grupo RTS, pode-se verificar que os mesmos apresentaram IMC e peso final elevado em relação aos animais do grupo RT. Isto se deve ao fato dos animais do grupo RTS receberem como fonte de energia além da ração ofertada duas horas diariamente, a solução aquosa de sacarose sendo esta a responsável pelo maior fornecimento de energia para estes animais durante a fase de desenvolvimento. Quando a ingestão de energia excede o gasto, a energia excedente é depositada sob a forma de gordura (Iossa et al., 1999).

O índice de massa corporal (Diniz et al., 2006) (*Tabela 3*) indicou a diferença fenotípica dos animais do grupo ADS, que apresentaram circunferência abdominal elevada em comparação aos animais dos demais grupos, característica semelhante à observada em humanos com síndrome metabólica. A relação cintura-quadril em humanos, referente à relação cintura-torax (*Tabela 3*), mostrou-se inadequada para caracterizar a síndrome metabólica e obesidade abdominal em ratos *Wistar*, utilizados neste experimento, provavelmente devido à anatomia pequena e uniforme. Deste modo, independente do aumento na circunferência abdominal, devido a proximidade da região torácica, as relações CA/CT e CT/CA não apresentaram variações significantes nos diferentes grupos.

Os animais do grupo ADS apresentaram elevação no ganho de peso em comparação aos demais grupos. O ganho de peso observado foi decorrente do depósito de gordura no tecido adiposo abdominal e não proveniente de ganho de massa magra.

Este fato é demonstrado na *Tabela 3*, onde pode ser observado que não houve diferença na concentração de proteína total da carcaça dos animais, enquanto a concentração de lipídios da carcaça, bem como a CA e o IMC estiveram elevados nos animais do grupo ADS (*Tabela 3, Figuras 1 e 2, respectivamente*). O aumento do depósito de gordura na região abdominal é fator de risco para o aparecimento e agravamento de diversas patologias, incluindo síndrome metabólica, diabetes e doenças cardiovasculares.

Existem controvérsias sobre os efeitos da ingestão de sacarose no peso corporal. Tem sido demonstrado que elevada ingestão de sacarose pode induzir ganho de peso em algumas espécies animais, ou reduzir o ganho de peso final em outras (Goodson et al., 2001).

Existe consenso entre os pesquisadores que a composição da dieta é fator importante no desenvolvimento da obesidade (Iossa et al., 2003). Ratos alimentados com dieta rica em carboidratos consomem mais energia para manter seu peso constante, indicando que os carboidratos não provêm energia eficiente (Goodson et al., 2001).

Animais do grupo ADS apresentaram elevação no peso corporal final em relação ao grupo controle AD. Embora a ingestão alimentar (*Tabela 2*) e a preferência alimentar (*Tabela 2*) tenham sido reduzidas no grupo ADS, comparado ao AD, animais com dieta *ad libitum* que receberam suplementação nutricional com sacarose, ingeriram maior quantidade de energia (*Tabela 5*). A elevação na energia ingerida foi decorrente da maior palatabilidade e ingestão de solução aquosa de sacarose (*Tabela 2*).

Segundo Iossa e colaboradores (2003) alterações no gasto de energia refletem as modificações na atividade de tecidos e órgãos. De fato, animais do grupo RTS apresentaram elevação na ingestão de solução de sacarose em relação ao grupo ADS. Embora o consumo de ração tenha sido reduzido neste grupo, comparado ao ADS, o

elevado consumo de solução aquosa de sacarose pelos animais do grupo RTS, indicou a busca de energia para manter o metabolismo, uma vez que a ração destes animais foi restrita a duas horas diárias.

A obesidade está associada ao aumento de fatores de risco para várias alterações metabólicas e cardiovasculares, incluindo hipertensão arterial, resistência à insulina e a síndrome metabólica (Roberts et al., 2001). A obesidade abdominal é uma condição de risco associada à alterações no metabolismo de carboidratos e lipídios, bem como no perfil trombocítico inflamatório que está relacionado com o aumento no risco para doenças coronarianas agudas (St-Pierre et al, 2002).

Segundo Naderali et al. (2003) consumo de dieta hipercalórica alterou o perfil lipídico e a resposta endotelial na ausência de obesidade, indicando que a variação na energia da dieta apresenta importante papel nas alterações metabólicas, independente do ganho de peso.

Hipertrigliceridemia pode ser decorrente de vários fatores, incluindo além dos genéticos, a obesidade, tipo de dieta, excesso no consumo de álcool, diabetes mellitus ou uso de medicamentos que aumentam a produção de triglicérides (Fung & Frohlich, 2002).

Como pode ser observado nas *Tabelas 2 e 4*, os animais do grupo ADS apresentaram quadro característico de síndrome metabólica, desde que demonstraram aumento da circunferência abdominal, elevação dos níveis séricos de glicose e triglicérides de jejum. Na *Figura 4*, pode-se observar a existência de correlação positiva entre o IMC dos animais e as concentrações séricas de triacilgliceróis.

O fenótipo clínico da hipertrigliceridemia abdominal, relatado por Lemieux (2000), quando presente, aumenta em 80% a probabilidade de observar outros fatores que caracterizam a síndrome metabólica, aumentando consideravelmente o risco para

doenças cardiovasculares (St-Pierre et al, 2002). Hipertrigliceridemia constitui um conhecido fator de risco para doenças cardiovasculares (Solati et al., 2004).

A hipertrigliceridemia que acompanha a obesidade abdominal foi observada nos animais do grupo ADS sugerindo modificação na composição de lipoproteínas. Como o aumento nas concentrações de triglicérides contribui para a diminuição na concentração da HDL-colesterol e também para a produção de LDL-colesterol, é possível sugerir que dieta rica em sacarose contribui para o risco de doenças cardiovasculares. Animais sob restrição no tempo de ingestão alimentar e suplementados com sacarose apresentaram hipertrigliceridemia, em relação ao grupo RT, confirmando o efeito adverso da sacarose nos lipídios séricos.

Chicco e colaboradores (1999) atribuíram a hipertrigliceridemia decorrente da elevada ingestão de sacarose à elevada secreção de VLDL e à diminuição na atividade da lipoproteína lipase. Deste modo, a hipertrigliceridemia observada nos animais do grupo ADS pode estar associada à alteração nos mecanismos de mobilização e remoção de triacilgliceróis séricos.

Elevação na concentração de triacilgliceróis e a inadequada utilização destes lipídios têm sido associadas ao desenvolvimento de hiperglicemia, estabelecendo o vínculo entre apetite, obesidade e diabetes (Chicco et al., 1999). A hiperinsulinemia decorrente da elevada ingestão de carboidratos pode constituir importante fator na resistência à insulina (Reaven, 2002). Fatos como estes explicariam os resultados apresentados na *Tabela 4*. Animais do grupo ADS apresentaram hipertrigliceridemia, decorrente da síntese hepática a partir da sacarose. A elevada ingestão de sacarose nos animais do grupo ADS durante o período de 30 dias pode estar associada à resistência à insulina. Animais com restrição no tempo de ingestão alimentar apresentaram hiperglicemia, bem como os animais suplementados com sacarose. A hiperglicemia de

jejum foi mais elevada nos animais com restrição no tempo de ingestão alimentar e suplementação nutricional com sacarose.

Concluiu-se que hipertrigliceridemia e elevada circunferência abdominal podem ser utilizados como critério simples para o prognóstico dos fatores de risco para as doenças cardiovasculares. Foram observadas correlações positivas entre elevada circunferência abdominal e hipertrigliceridemia, bem como entre hipertrigliceridemia e elevação no índice de massa corporal. A composição da dieta e hábitos alimentares apresentam importante papel na indução de síndrome metabólica e fatores de risco para doenças cardiovasculares.

Referências *

- Acheson KJ. Carbohydrate and weight control: where do we stand? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004; 7: 485-492.
- Buisson A, Pellizon M, Ordiz JF, Jen KL. Augmenting leptin circadian rhythm following a weight reduction in diet-induced obese rats: short and long term effects. *Metabolism*. 2004; 53(6): 782-789.
- Burrin DG, Britton RA, Ferrell CL. Visceral organ size and hepatocyte metabolic activity in fed and fasted rats. *J. Nutr.* 1988; 118:1547-1552.
- Chicco A, Bernal C, Soria A, Giangrossi G, Lombrado Y. Dietary effects of partial or total substitution of sucrose for starch on glucose and lipid metabolism in dyslipidemic rats. *Nutrition Research*. 1999; 19(2): 281-293.
- Diniz YS, Faine LA, Almeida JA, Silva MDP, Ribas BO, Novelli ELB. Toxicity of dietary toxicity of fat enriched diets on cardiac tissue. *Food and Chemical Toxicology*. 2002; 40: 1893-1899.
- Diniz YS, Rocha KKHR, Souza GA, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Novelli Filho JLV, Cicogna AC, Novelli ELB. Effects of N-acetylcysteine on sucrose-rich diet-induced hyperglycaemia, dyslipidemia and oxidative stress in rats. *Eur J Phar* 2006; 543: 151-157.
- Folch J, Lees M & Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 1957; 226: 497-510.
- Fung MA, Frohlich JJ. Common problems in the management of hypertriglyceridemia. *Canadian Medical Association Journal*. 2002; 167(11): 1261-1266.
- Goodson S, Halford JCG, Jackson HC, Blundell JE. Paradoxical effects of a high sucrose diet: high energy intake and reduced body weight gain. *Appetite*. 2001; 37: 253-254.
- Habold C, Chevalier C, Dunel-Erb S, Foltzer-Jourdainne C, Maho YL, Lignot JH. Effects of fasting and refeeding on jejunal morphology and cellular activity in rats in relation to depletion of body stores. *Scand. J. Gastroenterol* 2004; 6: 531-539.
- Haffner S, Taegtmeyer H. Epidemic obesity and the metabolic syndrome. *Circulation*. 2003; 108: 1541-1545.
- Hollifield G, Parson WJ. *J. Clin. Invest.* 1962; 41: 250.
- Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Barletta A, Liverini G. Energy intake and utilization vary during development in rats. *J. Nutr.* 1999; 129: 1593-1596.
- Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Barletta A, Liverini G. Effect of high-fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats. *Brit. J. Nutr.* 2003; 90: 953-960.
- Johson RA, Wichern DW. *Applied multivariate statistical analysis*. 4ed. Prentice-hall, New Jersey, 642p., 1998.
- Lemieux I, Pascot A, Couillard C, Lamarche B, Tchernof A, Almeras N, Bergeron J, Gaudet D, Tremblay G, Prud'homme D, Nadeau A, Despres JP.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to journals. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336: 309-315.

- Hypertriglyceridemic waist: a marker of the atherogenic metabolic triad (hyperinsulinemia; hyperapolipoprotein B; small dense LDL) in men ? *Circulation*. 2000; 102(2): 179-184.
- Naderali EK, Williams G. Prolonged endothelial dependent and independent arterial dysfunction induced in the rat by short-term feeding with a high-fat, high-sucrose diet. *Atherosclerosis* 2003; 166: 253-259.
- Norman GR, Streiner DL. *Biostatistics – The bare Essentials*. 1994; St Louis: Ed. Mosby Book, 260p.
- Powers SK, Howley ET. *Fisiologia do exercício. Teoria e aplicação ao condicionamento e ao desenvolvimento*. Manole. 1ª. edição. São Paulo, SP, 2000: 340-352.
- Raveh O, Pinchuk I, Fainaru M, Lichtenberg, D. Kinetics of lipid peroxidation in mixture of HDL and LDL, mutual effects. *Free Rad Biol Med* 2001; 31: 1486–1497.
- Rizkalla SW, Helal I, Boillot J, Fontvielle AM, Laromiguiere M, Desplanque N, Bruzzo F, Techobroutsy G, Slama G. Comparative metabolic effects of 10 week of starch, glucose, fructose in normal rats. In: *Insulin and cell membrane*, edited by Klimes I, Howard BV, Kohn CR. New York: Gordon & Breach, 1990, vol.1, 432-450.
- Roberts CK, Vaziri ND, Liang KH, Barnard RJ. Reversibility of chronic experimental syndrome X by diet modification. *Hypertension*. 2001; 37: 1323-1328.
- Smith BK, Kelly LA, Pina R, York DA, Bray G. Preferential fat intake increases adiposity but not body weight in sprague-dawley rats. *Appetite*. 1998; 31: 127-139.
- Solati M, Ghanbarian A, Rahmani M, Sarbazi N, Allahverdian S, Azizi F. Cardiovascular risk factor in males with hypertriglyceridemic waist (Tehran lipid and glucose study). *International Journal of Obesity*. 2004; 28: 706-709.
- Soria A, D'Alessandro ME, Lombardo Y. Duration of feeding on a sucrose-rich diet determines metabolic and morphological changes in rat adipocytes. *J. Appl. Physiol*. 2001; 91: 2109-2116.
- Stevenson JAF, Feleki V, Szlavko A, Beaton JR. Food restriction and lipogenesis in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1964; 116: 178-182.
- St-Pierre J, Lemieux I, Vohl MC, Perron P, Tremblay G, Després JP, Gaudet D. Contribution of abdominal obesity and hypertriglyceridemia to impaired fasting glucose and coronary artery disease. *The American Journal of Cardiology*. 2002; 90(1): 15-18.
- Thomas MA, Rice HB, Weinstock D, Corwin RL. Effects of aging on food intake and body composition in rats. *Physiology & Behavior*. 2002; 76: 487-500.
- World Health Organization. *Obesity: Preventing and managing the global epidemic*. Geneva, Switzerland , WHO, 1998.

Capítulo 02:

Efeitos da restrição no tempo de ingestão alimentar e consumo de sacarose sobre o glicogênio hepático, perfil lipídico e estresse oxidativo sérico de ratos

Resumo

Estudos relacionados às consequências metabólicas da ingestão de dietas ricas em sacarose ou frutose ainda são limitados. Assim como os estudos que envolvem a restrição no número de refeições diárias. No presente trabalho foram utilizados 24 ratos machos *wistar*, de peso inicial médio de $222,69 \pm 16,49\text{g}$, divididos aleatoriamente em quatro grupos AD, RT, ADS, RTS com seis ratos cada. O grupo AD foi considerado controle, recebendo dieta basal *ad libitum*. Os animais do grupo RT receberam a mesma quantidade de dieta ingerida pelo grupo AD, oferecida diariamente no período restrito de duas horas (9:00 às 11:00h). Os animais do grupo ADS receberam ração controle *ad libitum* e para beber, solução aquosa de sacarose 30% *ad libitum*. Ratos do grupo RTS foram tratados com a mesma quantidade de ração ingerida pelo grupo ADS, oferecida durante o tempo restrito de 2 horas diárias e solução aquosa de sacarose 30% *ad libitum*. Após 30 dias de tratamentos os animais foram sacrificados. O soro foi utilizado para determinação do perfil lipídico e marcadores do estresse oxidativo.

Restrição no tempo de ingestão alimentar desenvolveu dislipidemia com elevação nos fatores de riscos para aterosclerose, elevação no estresse oxidativo, bem como, diminuição de marcadores de defesa antioxidantes. A elevação na atividade sérica da fosfatase alcalina sugere a existência de alteração hepática. O modelo de dieta rica em carboidratos apresentou característica fenotípica de síndrome metabólica, que foi confirmada pela dislipidemia, acompanhada de hipertrigliceridemia. A restrição no tempo de ingestão alimentar com dieta rica em carboidrato induziu dislipidemia, elevação na ALP sugerindo alteração hepática, bem como elevação nos marcadores de estresse oxidativo e diminuição nas defesas antioxidantes.

Introdução

Dietas ricas em carboidratos exercem um importante papel no desenvolvimento da obesidade e são freqüentemente associadas à hiperfagia e ao sobrepeso. Variações na composição das dietas alteram a forma que a energia proveniente destas é utilizada, levando ao aumento nos depósitos de gordura (Smith et al., 1998). Tem sido documentada através de estudos epidemiológicos em humanos, a associação entre obesidade visceral e aparecimento dos fatores de riscos para doenças cardiovasculares como, dislipidemias, resistência à insulina e *diabetes mellitus* (De Boer et al., 2004).

Síndrome metabólica é uma condição caracterizada pela presença de pelo menos três de cinco fatores: hipertensão, gordura abdominal, baixa concentração de HDL-C, hipertrigliceridemia e hiperglicemia de jejum (Programa de Educação Nacional do Colesterol - PENC). Os riscos de mortalidade por doenças cardiovasculares estão elevados em pacientes portadores de síndrome metabólica (Smith et al., 1998).

Restrição no tempo de ingestão alimentar para uma ou duas horas diárias aumentou a lipogênese em ratos (Hollified & Parson, 1962). Animais submetidos a restrição no tempo de ingestão alimentar ingeriram maior quantidade de dieta por dia, em relação aos animais tratados “*ad libitum*” e apresentaram elevação no glicogênio hepático (Stevenson et al., 1964). Tem sido demonstrado que o estado de jejum pode ser um sinalizador para os processos envolvidos na produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (Marczuk-Krynicka et al., 2003). A redução na disponibilidade dos nutrientes essenciais pode contribuir para a diminuição das enzimas antioxidantes nos animais em jejum (Marczuk-Krynicka et al., 2003).

Há evidências que dislipidemia causada tanto por dietas ricas em carboidratos, como em lipídios, podem induzir estresse oxidativo (Roberts et al. 2000). Por definição, estresse oxidativo denota a diferença entre a produção de espécies oxidantes e seus

respectivos mecanismos de defesa (Matsubara & Ferreira, 1997). Essa alteração no balanço oxidante/antioxidante gera alterações no perfil lipídico sérico (Abuja & Albertini, 2001, Galhardi et al., 2005). A ação de radicais livres na LDL-C leva a modificação oxidativa, e aumento da captação da LDL-C por macrófagos, elevando a formação de células espumosas, formando LDL oxidada (LDL-ox), componente fundamental da aterosclerose (Maor et al., 1997, Örem et al, 2002, Lyra, 2005).

Tem sido demonstrado que a LDL-ox e a HDL-C possuem efeitos contrários em relação a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) nas células endoteliais (O'Connell & Genest, 2001), bem como nos papéis cruciais da LDL-C e da LDL-ox na hipercolesterolemia (Vergnani et al. 2000). Estudos demonstraram que elevada inativação da óxido nítrico sintetase (ONS) pelas espécies reativas de oxigênio induz hipertensão e agravamento de doenças cardiovasculares (Vaziri et al., 1999, Roberts et al., 2000).

Outra importante consequência relacionada à ingestão de dietas ricas em carboidratos é a indução de esteatose hepática através da elevação da lipogênese (Koteish & Diehl, 2001, De Boer et al., 2004).

Com base na importância da ingestão de carboidratos, bem como da restrição no tempo de ingestão alimentar no aparecimento da síndrome metabólica e alterações lipídicas, neste trabalho, foram estudados os efeitos da elevada ingestão de sacarose e da restrição no tempo de ingestão alimentar de duas horas diárias, sobre o glicogênio hepático, perfil lipídico e estresse oxidativo sérico de animais submetidos ao protocolo experimental.

Material e Métodos

Foram utilizados 24 ratos machos adultos *Wistar*, de peso médio inicial 220g. Os animais foram provenientes do Biotério Central da UNESP "Campus de Botucatu" e transferidos para o Laboratório de Bioquímica na Experimentação Animal, do Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu, onde permaneceram durante todo o período experimental, à temperatura de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade $60\pm 5\%$, período claro/escuro de 12 horas.

Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico individuais, recebendo dieta basal (Purina Labina, Campinas, São Paulo, Brasil), água destilada *ad libitum* ou solução de sacarose 30%.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos AD, RT, ADS, RTS com seis ratos cada. O grupo AD foi considerado controle e recebeu dieta basal. Os animais do grupo RT receberam a mesma quantidade de dieta ingerida pelo grupo AD, oferecida diariamente no período restrito de duas horas (9:00 às 11:00h). Os animais do grupo ADS receberam ração controle *ad libitum* e para beber, solução aquosa de sacarose 30% *ad libitum*. Ratos do grupo RTS foram tratados com a mesma quantidade de ração ingerida pelo grupo ADS oferecida durante o tempo restrito de duas horas diárias e solução aquosa de sacarose 30% *ad libitum*.

Após 30 dias de tratamento, os animais foram sacrificados por fratura cervical e decapitação. O sangue foi coletado em tubos de ensaio, com auxílio de funil. O soro foi separado por centrifugação a 4500 rpm. As concentrações de proteínas totais, glicose, triacilglicerol, colesterol total, HDL-colesterol, foram determinadas no soro pelo método enzimático (CELM diagnóstico, Companhia de Equipamentos de Laboratório Moderno, São Paulo, Brasil).

As concentrações de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL-colesterol) foram determinadas através do cálculo de Friedewald et al (1972). A lipoproteína de densidade baixa (LDL-colesterol) foi isolada através da precipitação (CELM diagnóstico, Companhia de Equipamentos de Laboratório Moderno, São Paulo, Brasil) e suspensão do precipitado em hidróxido de sódio (Scoccia et al., 2001). A lipoproteína LDL-colesterol foi determinada através da quantificação do colesterol e a LDL-oxidada pela quantificação do hidroperóxido de lipídio na mistura ressuspensa (Jiang et al., 1991).

Hidroperóxido foi determinado através da oxidação do Fe^{2+} (sulfato ferroso amoniacal). O Fe^{3+} formado reage com alaranjado de xilenol formando composto colorido (Jiang et al., 1991). As substâncias antioxidantes totais (SAT) foram calculadas através da porcentagem de inibição da formação de hidroperóxido de lipídio (Mehmetcik et al., 1997).

A atividade da enzima gama-glutamil-transpeptidase nas amostras foi determinada através de método cinético (Moura, 1982). A atividade da enzima óxido nítrico sintetase (ONS) foi determinada através de métodos indiretos, pelos efeitos do óxido nítrico (ON) em produzir nitrito/nitrato (Viaro et al., 2000). O nitrato era convertido em nitrito pela nitrato redutase, em presença de NADPH e FAD. O nitrito formado era convertido em azo produto, em presença de N-1-naftil etilenediamino e sua concentração determinada a 500nm em leitor de microplaca (Santos et al., 2000).

As determinações das concentrações de lipoperóxido foram realizadas pela técnica do ácido tiobarbitúrico (TBA-Sigma) onde a amostra reage com este ácido em temperatura elevada (90°). O malondialdeído (MDA, 1,1,3,3,-tetraethoxipropano – Sigma) liberado em pH baixo e temperatura elevada reage com o TBA, formando um

complexo (TBA₂-MDA). Este complexo era extraído em 4ml de butanol e separado por centrifugação a 3000rpm (Satoh, 1978).

A concentração de GSH total foi determinada através de método cinético, monitorando a redução do DTNB pela GSH na presença de NADPH. A leitura espectrofotométrica era realizada a 412 nm (Tietze, 1969). A concentração de glutathiona reduzida (grupos SH-não protéicos) foi determinada em tampão tris-HCl pH 8,9 e DTNB, após prévia precipitação com TCA 50%. Como padrão foi utilizada glutathiona reduzida (GSH) 1mM (Sedlak & Lindsay, 1968). A concentração de glutathiona oxidada (GSSG) foi estimada através da diferença entre GSH total e GSH reduzida, segundo a proporção estequiométrica (2GSH: GSSG) (Okamoto et al., 2001).

A fosfatase alcalina (o-fosfórico monoester fosfohidrolase, ALP, EC 3.1.3.1) hidrolisa o p-nitro-fenilfosfato (p-NFF), que é incolor, produzindo fosfato e p-nitrofenol a pH 9,8. A velocidade de formação do p-nitrofenol é medida a 405nm e é proporcional a atividade enzimática da fosfatase alcalina da amostra (Moura, 1982).

Após coleta do sangue, o fígado foi imediatamente retirado, lavado em solução salina gelada (NaCl 0,9% a 4^oC). Amostras de 200mg do fígado foram retiradas para determinação de glicogênio (Roehrig & Allred, 1974), e homogeneizadas com 5 mL de ácido perclórico 0,6 mol/L, com uso do *Potter Elvehjem*, com pistilo de teflon, durante 1 minuto a 100 rpm. O homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante utilizado para determinação da concentração de glicose livre. Cerca de 0,01 mL de cada sobrenadante foi misturado a 0,1 mL de tampão acetato de sódio 0,05M, pH 4,5, 3,5 Unidades de aminoglicosidase (Sigma) e 4,8 mL de água destilada. A mistura foi deixada em banho a 55^oC durante 10 minutos. Decorrido este período, a mistura foi utilizada para determinação da concentração de glicose liberada. A

concentração de glicogênio foi obtida subtraindo-se as concentrações de glicose livre das respectivas concentrações de glicose liberadas.

As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro Pharmacia Biotech com temperatura controlada (U/V visible Ultrospec 5000, software Swift II, 974213, Cambridge, England, UK). As atividades enzimáticas foram analisadas a 25 °C usando leitor de microplaca (μ Quant-MQX 200, software Kcjunior, Bio-Tec Instruments, Winooski, Vermont, USA). Todos os reagentes eram de procedência Sigma (St. Louis, MO, USA).

Estatística

Os resultados apresentados no presente trabalho foram analisados estatisticamente através da Análise de Variância para o esquema fatorial 2x2 no modelo completamente ao acaso, complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey, o nível de significância foi estimado em 5% (Norman & Streiner, 1994). Comparações entre parâmetros foram realizadas através da correlação linear de Pearson. O nível de significância foi estimado em 5% (Smith et al., 1998).

Resultados

A concentração de proteína total sérica apresentou-se diminuída nos animais do grupo RT em relação aos animais do grupo AD e elevada no grupo ADS em relação ao grupo RTS (*Tabela 1*). A concentração de colesterol total sérico esteve diminuída no grupo RT em relação aos grupos AD, ADS e RTS, que não apresentaram diferença significativa entre si (*Tabela 1*). A concentração da lipoproteína de elevada densidade (HDL-C) esteve diminuída nos animais dos grupos RT, ADS e RTS em relação aos

animais do grupo AD. Não foram observadas diferenças nas concentrações de HDL-C entre os grupos RT, ADS e RTS (*Tabela 1*). Foi observada elevação na concentração das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C) nos animais dos grupos RT, ADS e RTS em relação aos animais do grupo AD (*Tabela 1*). As concentrações do triacilglicerol e da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL-C) estiveram elevadas nos animais do grupo ADS e diminuídas nos animais do grupo RT em relação ao grupo AD (*Tabela 1*).

As concentrações de hidroperóxido de lipídio (HP), lipoperóxido (TBA) e LDL-ox estiveram elevadas nos animais dos grupos RT, ADS e RTS em relação aos animais do grupo AD (*Tabela 2*). Houve diminuição nas concentrações de SAT no soro dos animais dos grupos RT, ADS e RTS em relação aos do grupo AD (*Tabela 2*). O grupo ADS apresentou concentração de SAT diminuída em comparação aos grupos RT e RTS.

GSH, GSSG e ONS no soro mostraram-se diminuídas nos animais dos grupos RT, ADS e RTS em relação aos animais do grupo AD (*Tabela 2*). Houve elevação nas atividades séricas da GGT nos grupos RT, ADS e RTS em comparação ao grupo AD (*Tabela 2*). O poder redutor apresentou-se elevado nos animais dos grupos RT em relação aos demais grupos e diminuído no grupo RTS (*Tabela 2*).

O glicogênio hepático esteve diminuído nos grupos RT e RTS em relação aos grupos AD e ADS, que não tiveram diferenças significantes entre si (*Tabela 3*). A atividade da fosfatase alcalina esteve elevada nos grupos RT, ADS e RTS em relação aos animais do grupo AD (*Tabela 3*).

Tabela 1. Concentrações de proteínas totais (PT), colesterol total, HDL-colesterol (HDL-C), LDL-colesterol (LDL-C), triacilglicerol (TG) e VLDL-colesterol (VLDL-C) nos animais dos grupos controle (AD), com restrição no tempo de ingestão (RT), mantidos com dieta suplementada com sacarose (ADS) e com restrição no tempo de ingestão e mantidos com dieta suplementada com sacarose (RTS)

	Grupos			
	AD	RT	ADS	RTS
PT (g/dL)	8,5±1,0 ^{bc}	7,0±0,7 ^a	8,9±0,8 ^c	7,2±0,6 ^{ab}
Colesterol (mg/dL)	103,0±17,8 ^a	109,5±16,4 ^a	102,3±19,7 ^a	92,6±16,2 ^a
HDL-C (mg/dL)	51,2±4,3 ^b	34,2±9,5 ^a	37,1±9,1 ^a	36,4±9,0 ^a
LDL-C (mg/dL)	14,1±1,2 ^a	68,7±9,1 ^c	17,9±1,1 ^b	21,2±2,4 ^b
TG (mg/dL)	147,0±30,4 ^b	53,3±6,8 ^a	237,7±44,4 ^c	173,3±47,7 ^b
VLDL-C (mg/dL)	29,4±6,0 ^b	10,6±1,3 ^a	47,5±8,8 ^c	34,6±9,5 ^b

Letras diferentes indicam diferença significante entre os grupos, com $p < 0,05$.

Tabela 2. Concentrações de hidroperóxido de lipídio (HP), lipoperóxido de lipídio (TBA), LDL-oxidada (LDL-ox), substâncias antioxidantes totais (SAT), glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG), poder redutor, gama-glutamil-transpeptidase (GGT) e óxido nítrico sintetase no soro dos animais dos grupos controle (AD), com restrição no tempo de ingestão (RT), mantidos com dieta suplementada com sacarose (ADS) e com restrição no tempo de ingestão e mantidos com dieta suplementada com sacarose (RTS)

	Grupos			
	AD	RT	ADS	RTS
HP (nmol/mL)	4,4±0,1 ^a	5,2±0,5 ^c	5,6±0,3 ^d	4,8±0,2 ^b
TBA (nmol/mL)	0,17±0,03 ^a	0,23±0,02 ^b	0,23±0,03 ^b	0,27±0,02 ^c
LDL-OX (mmol/mg)	36,2±11,1 ^a	61,9±15,6 ^b	61,9±15,6 ^b	61,3±17,9 ^b
SAT (%)	66,4±6,5 ^c	56,2±3,5 ^b	51,7±3,2 ^a	59,5±1,0 ^b
GSH (nmol/mL)	13,3±0,3 ^c	12,9±0,1 ^a	13,0±0,1 ^{ab}	13,0±0,2 ^{ab}
GSSG (mmol/mL)	0,38±0,05 ^c	0,20±0,04 ^a	0,33±0,03 ^b	0,29±0,04 ^b
Poder Redutor	35,3±5,5 ^a	67,0±14,7 ^c	36,5±5,2 ^a	44,6±6,8 ^b
GGT (U/L)	29,1±4,6 ^a	51,9±7,5 ^d	45,7±5,7 ^c	38,9±4,3 ^b
ONS (µM)	11,6±3,3 ^b	7,9±1,5 ^a	7,4±2,0 ^a	8,6±1,4 ^a

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, com $p < 0,05$.

Tabela 3. Concentração de glicogênio hepático e atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) no soro dos animais dos grupos controle (AD), com restrição no tempo de ingestão (RT), mantidos com dieta suplementada com sacarose (ADS) e com restrição no tempo de ingestão e mantidos com dieta suplementada com sacarose (RTS)

	Grupos			
	AD	RT	ADS	RTS
Glicogênio (mg/g tecido)	34,71±8,29 ^b	23,61±6,93 ^a	34,55±5,78 ^b	26,08±7,40 ^a
ALP (U/L)	739,8±183,1 ^a	1340±217,8 ^b	1546±461,2 ^b	1532±316,7 ^b

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, com $p < 0,05$.

Discussão

Alterações nos hábitos alimentares bem como no estilo de vida, constituem importantes fatores nas modificações do perfil lipídico e na alteração do balanço oxidante/antioxidante do organismo (Diniz et al., 2006; Burneiko et al., 2006).

Embora animais do grupo RT tenham apresentado redução nas concentrações de proteína total, a proteinemia foi mantida dentro dos níveis de normalidade (Galhardi et al., 2004), indicando que a restrição no tempo de ingestão alimentar não induziu desnutrição. Entretanto, os efeitos da restrição no tempo de ingestão alimentar sobre os lipídios séricos podem estar associados à diminuição na concentração de proteína.

Indivíduos com síndrome metabólica possuem padrão característico de dislipidemia, com elevadas concentrações de triacilgliceróis, níveis baixos de HDL-C e níveis normais ou discretamente elevados de LDL-C. A LDL-C, sobretudo quando formada de partículas pequenas e densas é responsável pelo maior poder de aterogenicidade (Lyra, 2005). LDL-C menores e mais densas tem sido encontradas em indivíduos com síndrome metabólica (Smith et al. 1998).

Observações semelhantes foram encontradas no perfil lipídico na *Tabela 1*. Pode-se verificar diminuição na concentração da HDL-C, bem como elevação nas concentrações da LDL-C nos animais dos grupos RT, ADS e RTS, indicando o aumento nos fatores de risco para a aterosclerose, bem como a maior susceptibilidade à oxidação da LDL-C.

Carboidratos da dieta, particularmente carboidratos refinadas como a sacarose, induzem obesidade e inúmeras repercussões sistêmicas (Ebaid et al., 2005). No tecido hepático carboidratos constituem fonte endógena para síntese de triacilglicerol, os quais são transportados nos sangue através das VLDL-C ate o tecido adiposo (Ebaid et al.,

2005). Observações como estas estão associadas à hipertrigliceridemia e elevação na concentração de VLDL-C nos animais dos grupos ADS e RTS.

O conteúdo de triacilglicerol nos hepatócitos é regulado através da atividade celular de moléculas que atuam, de um lado na captação de triacilglicerol, na síntese e esterificação de ácidos graxos (“entrada”), bem como na oxidação de ácidos graxos e liberação dos mesmos das células. A esteatose hepática ocorre quando a “entrada” excede a capacidade de “liberação” de lipídios dos hepatócitos (De Boer et al., 2004). Animais dos grupos RT, ADS e RTS apresentaram elevação na fosfatase alcalina (ALP) (*Tabela 3*).

Como resposta a alterações das fontes de substratos energéticos, o fígado mantém a homeostasia em colaboração com outros tecidos, como o tecido adiposo (Koteish & Diehl, 2001). O fígado possui papel principal na adaptação ao jejum (Markzuk et al., 2003). A manutenção da hemostasia pode ser vista claramente nos animais com o fator de restrição no tempo de ingestão alimentar (RT e RTS), onde há diminuição das concentrações de glicogênio hepático devido à glicogenólise (*Tabela 3*), este efeito em animais submetidos a jejum prolongado foi visto por diversos pesquisadores (Allick et al, 2006; O’Doherty et al., 2000). A possibilidade do comprometimento do tecido hepático nos animais do grupo RT pode ser demonstrado com a elevação na atividade sérica da ALP (*Tabela 3*). Os grupos ADS e RTS apresentam elevação na ALP, em relação ao grupo AD (*Tabela 3*). Existe consenso entre os pesquisadores que após as alterações celulares, ocorre liberação de enzimas teciduais para a corrente sanguínea. Alterações nos níveis séricos da fosfatase alcalina são específicas do dano hepático (Vonen & Morland, 1984, Hubert et al., 2000).

Independente dos mecanismos metabólicos envolvidos é evidente que restrição no tempo de ingestão alimentar (grupo RT), elevada ingestão de sacarose (ADS) e a

associação de elevada ingestão de sacarose e restrição no tempo de ingestão alimentar induziram dislipidemia caracterizada pela hipertrigliceridemia, elevação na VLDL-C e LDL-C, bem como redução na HDL-C.

Estas observações indicam que a inadequada ingestão alimentar, nos diferentes grupos experimentais elevou consideravelmente os fatores de risco para síndrome metabólica e alterações cardiovasculares.

A elevação na concentração de triacilglicerol também resulta na elevada geração de LDL-C pequenas e densas. As LDL-C pequenas e densas estão associadas ao aumento do risco para doenças cardiovasculares. É conhecido fato que elevadas concentrações de triacilglicerol e diminuição da HDL-C, causada primariamente, pela elevação na concentração dos triacilgliceróis, que levam ao aumento na transferência de triacilglicerol para a HDL-C, através da ação da colesterol-éster-transferase, são os maiores fatores de riscos para as doenças cardiovasculares (Smith et al. 1998, Lyra 2005).

Animais do grupo ADS apresentaram a maior concentração de triacilglicerol em comparação aos demais grupos, bem como diminuição da HDL-C e elevação na LDL-C, sinais clássicos da síndrome metabólica, que indicam favorecimento ou agravamento de doenças cardiovasculares (*Tabela 1*). Nos animais do grupo RT, durante o jejum ocorre substancial lipólise que pode explicar a elevação nos lipídios séricos. A diminuição na captação da LDL-C através do fígado pode constituir o mecanismo relacionado à elevação dos lipídios séricos (Savendahl et al., 1999).

Interessante efeito da inadequada ingestão alimentar foi a alteração nos marcadores do estresse oxidativo séricos. O mecanismo preciso pelo qual dietas ricas em carboidratos induzem o estresse oxidativo ainda não está elucidado. Entretanto, evidências sugerem que dietas ricas em carboidratos elevam a produção de radicais

livres e a geração de radicais superóxidos em células endoteliais humanas (Roberts et al. 2000).

O uso de oxigênio e o metabolismo oxidativo de nutrientes resultam na produção de radicais livres. Desde que, a oxidação de nutrientes através da cadeia respiratória é vital, alterações nas vias metabólicas e nos nutrientes usados como fonte de energética podem estar associados ao estresse oxidativo (Feurs et al., 1998). Elevada ingestão de calorias diminui a fluidez da membrana mitocondrial elevando a produção de radicais livres (Espósito, 1999).

Na *Tabela 2* pode-se observar que animais dos grupos ADS e RTS, os quais apresentam elevada ingestão calórica através da sacarose mostraram elevação nas concentrações de hidroperóxido de lipídio e lipoperóxido.

A lipoperoxidação é um processo em cascata desencadeado pelo ataque de radicais livres aos ácidos graxos, formando dienos conjugados que se oxidam em hidroperóxidos de lipídios. Através da clivagem do hidroperóxido é formado o lipoperóxido que reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Pode-se notar na *Tabela 2* que o hidroperóxido de lipídio esteve mais elevado nos grupos ADS que em RT e RTS. Por outro lado o TBA esteve significativamente mais elevado nos animais do grupo RTS em relação ao ADS e RT indicando que a interação da restrição no tempo de ingestão e elevado consumo de sacarose aumentou a conversão do HP em lipoperóxido, considerado “segundo mensageiro de toxicidade” (Medeiros et al., 1995) aumentando consideravelmente a toxicidade dos radicais livres.

Compostos derivados dos aldeídos, como o malondialdeído (MDA) produzidos durante a decomposição dos hidroperóxidos de lipídios, interagem com as lipoproteínas favorecendo a oxidação da LDL-C (Maor et al., 1997).

Na *Tabela 2* observamos elevação nos componentes oxidantes nos animais dos grupos RT, ADS e RTS, indicando que a dieta rica em carboidrato bem como o jejum prolongado elevaram a oxidação de componentes celulares. Nos parâmetros estudados, observou-se elevação nas concentrações de hidroperóxido de lipídio e no lipoperóxido de lipídio. Nos animais em jejum, os níveis de radicais livres estiveram elevados (Markzuk et al., 2003) bem como nos suplementados com dieta rica em carboidrato.

A associação entre dislipidemias e estresse oxidativo esta relacionada ao fato que a modificação oxidativa da LDL-C formando LDL-ox constitui ponto chave na seqüência de eventos que levam à aterosclerose (Maor et al., 1997, Vergnani et al. 2000, Örem et al., 2002).

A LDL-ox é mais aterogênica que as partículas normais de LDL-C, estando diretamente envolvidas na formação de células esponjosas (Örem et al, 2002). A LDL-ox apresentou-se elevada nos animais dos grupos RT, ADS e RTS (*Tabela 3*). A HDL exerce efeito protetor contra a apoptose interferindo nos estímulos aos quais as células são expostas. A LDL-ox possui efeito contrário a HDL, favorecendo a apoptose celular (O'Connell & Genest, 2001).

A determinação das concentrações de SAT no plasma pode ser usada como indicador da susceptibilidade de oxidação da LDL-C (Örem et al, 2002). A redução na disponibilidade de nutrientes essenciais pode contribuir para a diminuição das enzimas antioxidantes nos animais em jejum (Markzuk et al., 2003). Animais dos grupos dos grupos RT, ADS e RTS apresentaram elevação no perfil oxidante com elevação nas concentrações de hidroperóxido de lipídio e no lipoperóxido de lipídio, redução nas concentrações de SAT e elevação nas concentrações da LDL-ox (*Tabela 2*).

Tem sido demonstrado que animais mantidos com dietas ricas em carboidratos apresentam diminuição da concentração de NO. Esta observação é consistente com os

dados obtidos com a diminuição de NO em humanos hipertensos (Forte et al., 1997, Wever et al., 1998, Roberts et al. 2000, Vergnani et al. 2000).

Dietas ricas em carboidratos induzem estresse oxidativo, que por sua vez leva a inativação e seqüestro de NO pelos tecidos (Roberts et al. 2000). A inativação e seqüestro do NO favorecem o desenvolvimento de hipertensão (Vaziri & Ding, 1999), marcada pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (Barnard et al., 1998, Roberts et al., 2000).

Estudos em humanos (Forte et al., 1997, Roberts et al., 2000) bem como em animais (Vaziri et al., 1999, Wever et al., 1998) tem relacionado elevação do estresse oxidativo à inativação da NOS. A diminuição na atividade da NOS leva a redução na produção de NO, sendo esta redução diretamente relacionada à elevação da pressão arterial (Forte et al., 1997, Akuzawa et al., 1998, Oliveira et al., 1999, Vaziri et al., 1999, Wever et al., 2000, Roberts et al., 2000, Chao-Yu et al., 2001, Pacca et al., 2002).

A atividade da GGT no soro esta associada a inúmeras condições patológicas, como diabetes, obesidade e insuficiência cardíaca (Sakuta et al., 2005). No presente experimento, tanto animais submetidos à dieta rica em sacarose, bem como os animais com restrição no tempo de ingestão alimentar, apresentaram elevação nas concentrações de GGT (*Tabela 2*). GGT também é usada como um indicador de desordens hepatobiliares que inclui a esteatose (Sakuta et al., 2005).

A produção de radicais livres leva a depleção da glutathiona, induzindo a expressão de GGT no fígado com conseqüente elevação da atividade de GGT no soro (Sakuta et al., 2005). Na *Tabela 2* podemos observar os resultados obtidos com as determinações das glutathionas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). A diminuição na concentração da GSH esta diretamente relacionada à elevação na produção de radicais

livres. A GGT atua como doadora de grupo tiol, responsável pelo efeito antioxidante das glutationas (Ebaid et al., 2006). Uma vez que as concentrações de GSH e GSSG estiveram diminuídas, a elevação na atividade da GGT sugere a tentativa de combater o dano causado pelas espécies reativas de oxigênio (*Tabela 2*). Segundo Boza (1999), a relação GSH/GSSG, também chamada poder redutor, é um marcador do estresse oxidativo. Esta relação apresentou-se elevada nos animais do grupo RT (*Tabela 2*).

Concluindo, restrição no tempo de ingestão alimentar desenvolveu dislipidemia com elevação nos fatores de riscos para aterosclerose, elevação no estresse oxidativo, bem como, diminuição nas defesas antioxidantes. Houve elevação da atividade sérica da ALP sugerindo alteração hepática. O modelo de dieta rica em carboidratos apresentou características fenotípicas de síndrome metabólica, que foi confirmada por dislipidemia, acompanhada de hipertrigliceridemia. A restrição no tempo de ingestão alimentar com dieta rica em carboidrato induziu dislipidemia, elevação nos marcadores bioquímicos de hipertensão, sugerindo alteração hepática, bem como elevação nos marcadores de estresse oxidativo e diminuição nas defesas antioxidantes.

Referências *

- Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta* 2001; 306:1-17.
- Akuzawa N, Nakamura T, Kurashina T, Saito Y. Antihypertensive agents prevent nephrosclerosis and left ventricular hypertrophy induced in rats by prolonged inhibit on of nitric oxide synthesis. *American journal of hypertension*. 1998; 11: 697-707.
- Allick G, van der Crabben SN, Ackermans MT, Endert E, Saverwein HP. Measurement of gluconeogenesis by deuterated water: the effect of equilibration time and fasting. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2006; 290 (6): 1212-7.
- Barnard RJ, Roberts CK, Varon SM, Berger JJ. Diet induced insulin resistance precedes other aspects of the metabolic syndrome. *J Appl Physiol.* 1998; 84: 1311-1315.
- Boza JJ, Moënnos D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-weck D, Fritsché R, Donnet A, Schiffrin EJ, Perruisseau G, Ballèvre O. Food deprivation and refeeding influence growth, nutrient retention and functional recovery of rats. *J. Nutr.* 1999; 129: 1340-6.
- Buisson A, Pellizon M, Ordiz JF, Jen KL. Augmenting leptin circadian rhythm following a weight reduction in diet-induced obese rats: short- and long-term effects. *Metabolism.* 2004; 53(6):782-9.
- Burneiko RCM, Diniz YS, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GMX, Faine LA, Padovani CR, Cicogna AC, Novelli ELB. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 1167–1172.
- Chao-Yu M, Fu-Ming S, Ding-Feng S. Blood pressure variability is increased in genetic hypertension and L-NAME-induced hypertension. *Acta Pharmacol Sin.* 2001; 22: 137-40.
- De Boer PJM, Voshol PJ, Kuipers F, Havekes LM, Romijn JA. Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome lessons from animals models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 644-649.
- Diniz YS, Rocha KKHR, Souza GA, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Novelli Filho JLVB, Cicogna AC, Novelli ELB. Effects of N-acetylcysteine on sucrose-rich diet-induced hyperglycaemia, dyslipidemia and oxidative stress in rats. *Eur J Phar* 2006; 543: 151–157.
- Ebaid GMX, Faine LA, Diniz YS, Rodrigues HG, Galhardi CM, Ribas BO, Novelli ELB. Effects of digitonin on hyperglycaemia and dyslipidemia induced by high-sucrose intake. *Food and chemical toxicology.* 2006; 22: 293-299.
- Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell B, Wallace B. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Nat Acad Sci USA* 1999;96:4820.
- Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Med Ass Brasil* 1997; 43:61-68.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted journal. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336: 309-315.

- Feuers RJ. The effects of dietary restriction on mitochondrial dysfunction in aging. *Ann NY Acad Sci* 1998; 854:192-201.
- Forte P, Copland M, Smith LM, Milne E, Sutherland J, Benjamin N. Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. *Lancet*. 1997; 349: 837-842.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 1972; 18: 499-502.
- Galhardi CM, Diniz YS, Faine LA, Rodrigues HG, Burneiko RCM, Ribas BO, Novelli ELB. Toxicity of copper intake: lipid profile, oxidative stress and susceptibility to renal dysfunction. *Food Chem Toxicol* 2004; 42: 2053–2060.
- Galhardi CM, Diniz YS, Rodrigues HG, Faine LA, Burneiko RC, Ribas BO, Novelli ELB. Beneficial effects of dietary copper supplementation on serum lipids and antioxidant defenses in rats. *An Nutr Metab.* 2005; 49: 283-288.
- Hollifield G, Parson WJ. *J. Clin. Invest.* 1962; 41: 250.
- Hubert MF, Laroque P, Gillet JP, Keenan KP. The effects of diet, ad Libitum feeding, and moderate and severe dietary restriction on body weight, survival, clinical pathology parameters, and cause of death in control sprague-dawley rats. *Toxicology sciences* 58, 195-207, 2000.
- Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Barletta A, Liverini G. Effect of high-fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats. *Brit. J.Nutr.* 2003; 90: 953-960.
- Jiang ZY, Woollard AC, Wolf S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{+2} in the presence of xylenol orange. Comparison with TBA assay and on iodometric method. *Lipids.* 1991; 26: 853-856.
- Koteish A, Diehl AM. Animals models of steatosis. *Seminars in liver disease.*2001; 21(1): 89-104.
- Lyra R. Importância dos triglicérides e do HDL na DAC em diabéticos. Pfizer. 2005.
- Maor I, Hayek T, Coleman R, Aviram M. Plasma LDL oxidation leads to its aggregation in the atherosclerotic apolipoprotein e-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.*1997; 12; 2995-3005.
- Marczuk-Krynicka D, Hryniewiecki T, Piatek J, Paluszak J. The effect of brief food withdraw on the level of free radicals and other parameteres of oxidative status in the liver. *Med Sci Monit* 2003, 9(3), 131-135.
- Medeiros DM, Bagdy D, Ovecká G, McCormick R, Myofibrillar mitochondrial and valvular morphological alterations in cardiac hypertrophy among copper-deficient rats. *J Nut* 1991; 121: 815–824.
- Mehmetcik G, Toker G, Uysal M. Endogenous and copper-induced lipid hydroperoxidation and antioxidant activity of serum of hypercholesterolemic subjects. *Horm Met Res.* 1997; 29: 63-65.
- Moura RA. Técnicas de laboratório. 2ª ed., (São Paulo): Atheneu Editora, 1982. 822p.
- Norman GR, Streiner DL. *Biostatistics – The bare Essentials.* 1994; St Louis: Ed. Mosby Book, 260p.
- O’Doherty RM, Jensern PR, Anderson P, Jones JG, Berman HK, Kearney D, Newgard CB. Activation of direct and indirect pathways of glycogen synthesis by hepatic overexpression of protein targeting to glycogen. *J. Clin. Invest.* 2000; 105 (4): 479-488.

- O'Connell BJ, Genest J. High-density lipoprotein and endothelial function. *Circulation*. 2001; 104: 1978-1983.
- Okamoto OK, Pinto E, Latorre LR, Bechara EJ, Colepicolo P. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2001; 40: 18-24.
- Oliveira CF, Nathan LP, Metze K. Effect of $\text{Ca}^{=2}$ channel blockers on arterial hypertension and heart ischaemic lesions induced by chronic blockade of nitric oxide in the rat. *European journal of pharmacology*. 1999; 373: 195-200.
- Örem C, Örem A, Uydu HA, Çelok S, Erdöl C, Kural BV. The effects of lipid-lowering therapy on low density lipoprotein auto-antibodies: relationship with low density lipoprotein oxidation and plasma total antioxidant status. *Coronary Artery Disease*. 2002; 13(1). 65-71.
- Pacca SRMC, Azevedo AP, Oliveira CF, Luca IMS. Attenuation of hypertension, cardiomyocyte hypertrophy, and myocardial fibrosis by b-adrenoceptor blockers in rats under long-term blockade of nitric oxide synthesis. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2002; 39: 201-7.
- Roberts CK, Vaziri ND, Wang XQ, Barnard RJ. Enhanced NO inactivation and hypertension induced by high-fat, refined-carbohydrate diet. *Hypertension*. 2000; 36: 423-429.
- Roehrig KL., Allred JB. Direct enzymatic procedure for the determination of liver glycogen. *Analytical Biochemistry*, 1974; 59: 414-421.
- Sakuta H, Suzuki T, Yasuda H, Ito T. γ -glutamyl Transferase and metabolic risk factors for cardiovascular disease. *Internal Medicine* 2005; 44: 538-541.
- Santos CX, Bonini MG, Augusto O. Role of carbonate radical anion in tyroxine nitration and hydroxylation by peroxynitric. *Arch. Biol. Biophys.* 2000; 377: 146-52.
- Satoh, K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a colorimetric method. *Clin. Chim. Acta*, 1978; 90: 37-43.
- Sävendahl L, Underwood LE. Fasting increases serum total cholesterol, LDL cholesterol and apolipoprotein B in healthy, nonobese humans. *J. Nutr.* (1999) 129: 2005-2008.
- Scoccia AE, Molinuevo MS, McCARTHY AD, Cortizo AM. A simple method to assess the oxidative susceptibility of low density lipoproteins. *BMC Clinical Pathology*. 2001; 1(1).
- Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and non-protein sulphydril groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochem.* 1968; 25: 192-205.
- Smith BK, Kelly LA, Piña R, York DA, Bray, GA. Preferential fat intake increases adiposity but not body weight in Sprague-Dawley rats. *Appetite*. 1998; 31: 127-139.
- Stevenson JAF, Feleki V, Szlavko A, Beaton JR. Food restriction and lipogenesis in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1964; 116: 178-182.
- Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem.* 1969; 27: 502-522.
- Vaziri ND, Ding Y. Increased NO inactivation by reactive oxygen species in lead induced hypertension. *Kidney Int.* 1999; 56: 1492-1498.

- Vergnani L, Hatik S, Ricci F, Passaro A, Manzoli N, Zuliani G, Brovkovich V, Fellin R, Malinski T. Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production. *Circulation*. 2000; 101: 1261-1266.
- Viaro F, Nobre F, Evora PRB. Expressão das óxidos nítricos sintetases na fisiopatologia das doenças cardiovasculares. *Arq Brás Cadiol* 2000; 74: 365-379.
- Wever RMF, Lüscher TF, Cosentino F, Rabelink TJ. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 1998; 97: 108-112.

Capítulo 03:

Metabolismo energético e equilíbrio oxidante/antioxidante no miocárdio de ratos submetidos à restrição no tempo de ingestão alimentar e suplementação nutricional com sacarose

Resumo

A relação entre diferentes modelos de inadequadas dietas, especialmente as ricas em carboidratos e gorduras, bem como sua influência nas alterações cardiovasculares são de grande interesse. No presente trabalho foram utilizados 24 ratos machos *wistar*, de peso inicial médio de $222,69 \pm 16,49\text{g}$, divididos aleatoriamente em quatro grupos AD, RT, ADS, RTS com seis ratos cada. O grupo AD foi considerado controle, recebendo dieta basal *ad libitum*. Os animais do grupo RT receberam a mesma quantidade de dieta ingerida pelo grupo AD, oferecida diariamente no período restrito de duas horas (9:00 às 11:00h). Os animais do grupo ADS receberam ração controle *ad libitum* e para beber, solução aquosa de sacarose 30% *ad libitum*. Ratos do grupo RTS foram tratados com a mesma quantidade de ração ingerida pelo grupo ADS, oferecida durante o tempo restrito de 2 horas diárias e solução aquosa de sacarose 30% *ad libitum*. Após 30 dias de tratamentos os animais foram sacrificados. O coração foi utilizado para determinação de proteínas totais, hidroperóxido de lipídio, e as atividades das enzimas β -hidroxiacil coenzima A desidrogenase, lactato desidrogenase, citrato sintase, glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase. Restrição no tempo de ingestão de alimentar diminuiu a concentração de SAT e elevou o estresse oxidativo cardíaco. Houve elevação na relação LDH/CS nos animais com restrição no tempo de ingestão alimentar, indicando aumento do metabolismo anaeróbico miocárdico. Animais com elevada ingestão de sacarose apresentaram elevação na LDH. O aumento na CS, independente da elevação do HP indicou que não houve alteração na integridade da membrana mitocondrial miocárdica nestes animais. A restrição no tempo de ingestão alimentar e ingestão de dieta rica em sacarose normalizou a peroxidação lipídica, e apresentou efeitos benéficos no metabolismo energético miocárdico em relação ao grupo RT.

Introdução

A relação entre diferentes modelos de dietas inadequadas, especialmente as ricas em carboidratos e gorduras, bem como sua influência nas alterações cardiovasculares são de grande interesse (Pinotti et al., 2006). A OMS estima que o Brasil deva perder 3 bilhões de dólares de toda a sua produção nacional devido a mortalidade prematura por doenças do coração, acidente vascular cerebral e diabetes. Nos próximos dez anos a perda prevista é de 49 bilhões de dólares (WHO, 2006).

Os efeitos da restrição alimentar sobre alterações fisiológicas cardíacas ainda é controverso. Enquanto alguns pesquisadores observaram melhora no organismo (Thornton, 2002; Berner et al., 2004), outros observaram que a restrição pode levar a disfunções (Cicogna et al., 2000; Okoshi et al., 2002).

Inadequada ingestão alimentar pode estar relacionada à dislipidemia e estresse oxidativo (Hart et al., 1999), e a oxidação de nutrientes através da cadeia respiratória constitui fonte endógena para a produção de radicais livres (Esposito et al., 1999; Novelli et al., 2002; Van Heerebeek et al., 2002).

Espécies reativas de oxigênio (ERO), ou radicais livres, são continuamente produzidas no organismo (Droge, 2002), sendo sua produção controlada na maior parte das reações fisiológicas. Entretanto, a produção excessiva desses compostos, sua exposição a oxidantes externos ou diminuição dos mecanismos de defesa antioxidante pode resultar em dano no DNA, lipídios e proteínas, caracterizando o chamado “estresse oxidativo” (Nishiyama et al., 1998).

O dano produzido pelos radicais livres nas biomoléculas tem sido associado ao risco elevado para o desenvolvimento de doenças crônicas, como câncer e doenças

cardiovasculares (Droge, 2002). Evidências recentes têm sugerido que ERO podem ser importantes fatores relacionados à disfunção cardíaca (Ferrari et al., 1998; Novelli et al., 2002; Diniz et al., 2003).

Em condições fisiológicas normais o miocárdio depende de vias metabólicas eficientemente ativas para a obtenção de ATP. Desta forma, alterações metabólicas induzidas por dietas (Diniz et al., 2004) podem alterar estas vias causando estresse oxidativo, proveniente principalmente das mitocôndrias (Henning et al., 1996).

Neste capítulo, com base na importante relevância entre ingestão de carboidratos, bem como da restrição no tempo de ingestão alimentar sobre as alterações do metabolismo cardíaco, foram estudados os efeitos de dieta rica em sacarose e da restrição no tempo de ingestão alimentar em duas horas diárias, sobre o metabolismo energético e equilíbrio oxidante/antioxidante no miocárdio de ratos.

Material e Métodos

Foram utilizados 24 ratos machos adultos *Wistar*, de peso médio inicial 220g. Os animais foram provenientes do Biotério Central da UNESP "Campus de Botucatu" e transferidos para o Laboratório de Bioquímica na Experimentação Animal, do Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu, onde permaneceram durante todo o período experimental, à temperatura de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade $60\pm 5\%$, período claro/escuro de 12 horas.

Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico individuais, recebendo dieta basal (Purina Labina, Campinas, São Paulo, Brasil), água destilada *ad libitum* ou solução de sacarose 30%.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos AD, RT, ADS, RTS com seis ratos cada. O grupo AD foi considerado controle e recebeu dieta basal. Os animais do grupo RT receberam a mesma quantidade de dieta ingerida pelo grupo AD, oferecida diariamente no período restrito de duas horas (9:00 às 11:00h). Os animais do grupo ADS receberam ração controle *ad libitum* e para beber, solução aquosa de sacarose 30% *ad libitum*. Ratos do grupo RTS foram tratados com a mesma quantidade de ração ingerida pelo grupo ADS oferecida durante o tempo restrito de duas horas diárias e solução aquosa de sacarose 30% *ad libitum*.

Após 30 dias de tratamento, os animais foram sacrificados por fratura cervical e decapitação. O coração foi imediatamente retirado, lavado em solução salina gelada (NaCl 0,9%). Amostras de 200mg do ventrículo esquerdo foram retiradas, identificadas e utilizadas para as determinações de proteínas totais (CELM diagnóstico, Companhia de Equipamentos de Laboratório Moderno, São Paulo, Brasil), hidroperóxido de lipídio (Jiang et al., 1991), substâncias antioxidantes totais (SAT) (Mehmetcik et al., 1997), e as atividades da β -hidroxiacil coenzima A desidrogenase (Bass et al., 1969), lactato desidrogenase (Moura, 1982), citrato sintase (Bass et al., 1969), glutational peroxidase (Nakamura et al., 1974), catalase (Aebi et al., 1974) e superóxido dismutase (Ewing & Janero, 1995).

As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro Pharmacia Biotech com temperatura controlada (U/V visible Ultrospec 5000, software Swift II, 974213, Cambridge, England, UK). As atividades enzimáticas foram analisadas a 25 °C usando leitor de microplaca (μ Quant-MQX 200, software Kcjunior, Bio-Tec Instruments, Winooski, Vermont, USA). Todos os reagentes eram de procedência Sigma (St. Louis, MO, USA).

Estatística

Os resultados apresentados no presente capítulo foram analisados estatisticamente através da Análise de Variância para o esquema fatorial 2x2 no modelo completamente ao acaso, complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey, o nível de significância foi estimado em 5% (Norman & Streiner, 1994). O nível de significância foi estimado em 5% (Smith et al., 1998).

Resultados

O peso do coração dos animais do grupo ADS esteve elevado em comparação aos grupos RT e RTS, não havendo diferença em relação ao grupo AD. O Grupo RT apresentou o menor peso do tecido cardíaco (*Tabela 1*). A relação peso do coração/peso corporal final esteve aumentada no grupo RT em relação ao grupo RTS, os demais grupos não apresentaram diferença significativa entre si (*Tabela 1*). A porcentagem de proteína no tecido cardíaco não variou entre os grupos experimentais (*Tabela 1*).

Os grupos RT e ADS apresentaram elevação nas concentrações de hidroperóxido de lipídio e diminuição nas concentrações de substâncias antioxidantes totais, em relação aos grupos AD e RTS (*Tabela 2*). Ao observarmos a atividade da enzima catalase, o grupo RT apresentou elevação da atividade em relação aos grupos ADS e RTS, não apresentando diferença na atividade em relação ao grupo AD (*Tabela 2*). As atividades das enzimas glutathione peroxidase e superóxido dismutase não variaram entre os grupos (*Tabela 2*).

A atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) esteve elevada nos animais do grupo ADS em relação aos animais dos grupos AD, RT e RTS (*Tabela 3*). A enzima β -hidroxiacil-coenzima A-desidrogenase (β OH), apresentou atividade elevada nos grupos RT e RTS em relação aos demais grupos (*Tabela 3*). Houve elevação na

atividade da citrato sintase (CS) no grupo ADS e diminuição no grupo RT em relação aos demais grupos (*Tabela 3*). A relação LDH/CS esteve elevada nos animais do grupo RT em relação aos animais dos grupos AD e ADS, e não diferiu do grupo RTS (*Tabela 3*). Foi observada elevação na relação β OH/CS nos animais dos grupos RT e RTS em relação aos animais dos grupos AD e ADS (*Tabela 3*).

Tabela 1. Peso do coração, relação peso do coração/peso final corporal (PCor/PFCorp) e porcentagem de proteína do coração (%) dos animais do grupo controle (AD), com restrição no tempo de ingestão (RT), mantidos com dieta suplementada com sacarose (ADS) e com restrição no tempo de ingestão e mantidos com dieta suplementada com sacarose (RTS)

	Grupos			
	AD	RT	ADS	RTS
Peso Coração (g)	1,18±0,13 ^c	0,79±0,12 ^a	1,22±0,12 ^c	0,96±0,10 ^b
Peso Final (g)	408,46±39,71 ^c	271,58±34,47 ^a	435,98±48,73 ^c	334,07±11,06 ^b
PCor / PFCorp (mg/g)	2,94±0,23 ^{ab}	3,10±0,21 ^b	2,84±0,22 ^{ab}	2,97±0,16 ^a
Proteína Coração (% de PT)	16,80±1,99 ^a	16,52±1,51 ^a	17,26±1,12 ^a	17,47±1,69 ^a

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, com $p < 0,05$.

Tabela 2. Concentração de hidroperóxido de lipídio (HP), substâncias antioxidantes totais (SAT), e atividade das enzimas catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) e superóxido dismutase (SOD) nos animais do grupo controle (AD), com restrição no tempo de ingestão (RT), mantidos com dieta suplementada com sacarose (ADS) e com restrição no tempo de ingestão e mantidos com dieta suplementada com sacarose (RTS)

	Grupos			
	AD	RT	ADS	RTS
HP (nmol/mg tec)	2,37±0,25 ^a	3,19±0,48 ^b	3,30±0,33 ^b	2,29±0,53 ^a
SAT (%)	19,60±1,31 ^b	15,80±1,82 ^a	15,30±1,83 ^a	18,01±2,44 ^{ab}
CAT (U/g tec)	1,89±0,22 ^{bc}	1,97±0,32 ^c	1,67±0,18 ^{ab}	1,53±0,27 ^a
GSH-Px (U/100mg tec)	11,52±1,92 ^a	12,18±1,70 ^a	12,90±1,90 ^a	11,87±1,61 ^a
SOD (U/mg pt)	88,89±12,76 ^a	93,24±12,81 ^a	94,92±7,21 ^a	82,72±12,90 ^a

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, com $p < 0,05$.

Tabela 3. Metabolismo energético cardíaco avaliado pela atividade das enzimas lactato desidrogenase (LDH), β -hidroxiacil-coenzima A-desidrogenase (β -OH), citrato sintase (CS) e das relações LDH/CS e β -OH/CS dos animais do controle (AD), com restrição no tempo de ingestão (RT), mantidos com dieta suplementada com sacarose (ADS) e com restrição no tempo de ingestão e mantidos com dieta suplementada com sacarose (RTS)

	Grupos			
	AD	RT	ADS	RTS
LDH (U/g tec)	39,73 $\pm$ 4,83 ^a	36,40 $\pm$ 5,27 ^a	46,18 $\pm$ 5,07 ^b	39,90 $\pm$ 6,91 ^a
β -OH (U/100mg tec)	1,82 $\pm$ 0,07 ^a	2,15 $\pm$ 0,09 ^b	1,83 $\pm$ 0,18 ^a	2,31 $\pm$ 0,14 ^b
CS (U/100mg tec)	1,48 $\pm$ 0,16 ^b	1,22 $\pm$ 0,15 ^a	1,74 $\pm$ 0,18 ^c	1,49 $\pm$ 0,26 ^b
Relação LDH/CS	0,26 $\pm$ 0,014 ^a	0,29 $\pm$ 0,037 ^b	0,26 $\pm$ 0,016 ^a	0,27 $\pm$ 0,034 ^{ab}
Relação β -OH/CS	138,90 $\pm$ 15,45 ^a	198,27 $\pm$ 19,33 ^b	118,77 $\pm$ 16,01 ^a	209,90 $\pm$ 36,14 ^b

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, com $p < 0,05$.

Discussão

Tem sido observado que modificação dos hábitos alimentares e do estilo de vida são os principais fatores que influenciam os fatores de riscos coronarianos (Wan et al., 2003).

Análise da relação peso do coração/peso corporal mostrou que animais do grupo RT, apresentaram elevação nesta relação em comparação aos demais grupos. Esta alteração foi decorrente do peso corporal final, que foi significativamente menor nestes animais. Este fato pode ser comprovado pela manutenção da concentração de proteína no miocárdio, que não apresentou variação significativa entre os grupos. Moe e colaboradores (2005) observaram a mesma situação em seus experimentos, quando estudaram os efeitos da restrição sobre a morfometria de órgãos.

O desenvolvimento de inúmeras condições patológicas, incluindo diabetes, dano renal, enfisema pulmonar, artrite reumatóide e doenças cardiovasculares têm sido relacionado à produção elevada de lipoperóxidos e alteração na atividade de enzimas antioxidantes (Ferreira & Matsubara, 1997; Abuja & Albertini, 2001; Doi et al., 2001; Ceconi et al., 2003).

Wan e colaboradores (2003) observaram que corações de ratos suplementados com dieta rica em sacarose em testes *in vitro*, foram mais susceptíveis a lipoperoxidação quando comparados aos ratos com alimentação normal. Este fato também foi observado *in vivo* neste capítulo (*Tabela 2*), demonstrando que além da suplementação com sacarose, mas também a restrição no tempo de ingestão alimentar induziram elevação na concentração de HP.

Glutathione peroxidase é uma importante enzima de proteção das células contra a toxicidade dos radicais livres (de La Lastra et al., 2002; Rebrin et al., 2003). Assim

como observado neste trabalho (*Tabela 2*), Wan e colaboradores (2005) também observaram a manutenção na atividade da enzima nos grupos experimentais, indicando que não houve depleção da GSH-Px em corações de ratos suplementados com dieta rica em sacarose.

A SOD corresponde a uma família de enzimas com papel antioxidante, responsável por catalisar a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. Suas principais isoformas, CuZn-SOD e Mn-SOD, estão localizadas no citosol e na mitocôndria, respectivamente (Ferreira & Matsubara, 1997). Desde que a cadeia respiratória mitocondrial é a principal fonte intracelular de ânions superóxido (O_2^-) a atividade da Mn-SOD é de grande importância na regulação dos níveis de O_2^- mitocondrial (Chen et al., 2003). Os radicais superóxido gerados no metabolismo mitocondrial, pela ação da SOD são convertidos em H_2O_2 . O peróxido de hidrogênio formado pode ser convertido em H_2O pela ação da catalase e da glutathione peroxidase.

Animais do grupo RT e ADS apresentaram manutenção das atividades da SOD e GSH-Px. As atividades da catalase mostraram-se reduzidas no tecido cardíaco dos animais do grupo RTS, sugerindo que a enzima foi consumida para normalizar a concentração de hidroperóxido. Houve redução na concentração de SAT no tecido cardíaco dos animais dos grupos RT e ADS, demonstrando os efeitos adversos da elevada ingestão de sacarose e da restrição no tempo de ingestão alimentar, alterando o equilíbrio entre os sistemas oxidante/antioxidante miocárdico. A redução nas concentrações de SAT nos animais dos grupos RT e ADS foi associado à elevação nas concentrações de HP no miocárdio dos animais.

A função cardíaca é complexa e esta associada a vários fatores, tais como, substratos provenientes do plasma e níveis hormonais, fluxo sanguíneo e o fornecimento de nutrientes ao tecido (Stanley et al., 1997)

O metabolismo oxidativo dos nutrientes e produção de energia na mitocôndria constitui a principal fonte de radicais livres (Gutteridge & Halliwell, 1990; Feuers, 1998). Tem sido observado que alterações dos substratos do metabolismo contribuem para disfunção do mecanismo de contração e remodelamento do ventrículo esquerdo (Stanley et al., 2005), demonstrando a associação entre estresse oxidativo, metabolismo energético e função cardíaca.

Durante a restrição no tempo de ingestão alimentar, ocorre liberação de ácidos graxos livres do tecido adiposo (Stanley et al., 1997). Esses ácidos graxos circulantes são captados pelo tecido cardíaco sendo metabolizados através da β -oxidação na matriz mitocondrial, gerando moléculas de acetil coenzima-A, que são completamente metabolizadas no ciclo do citrato (Carvajal & Sanchez, 2003). Quando a concentração de acetil coenzima-A excede a capacidade de metabolização pelo ciclo do citrato, ou quando a velocidade desta via é limitada pela elevação no ATP, moléculas de acetil coenzima-A são transportadas para o citosol pela carnitina translocase (Sabbah & Stanley, 2002; Lewin & Coleman, 2003). No citosol, elevadas concentrações de acetil coenzima-A ativam a acetil coenzima-A carboxilase, favorecendo a síntese de malonil Co-A, que inibe a entrada de ácidos graxos ativados para a matriz mitocondrial (Sabbah & Stanley, 2002). Os ácidos graxos no citosol permanecem estocados como triacilgliceróis, sendo passíveis de sofrerem a ação de ERO, aumentando a susceptibilidade à oxidação (Schaffer, 2003).

A CS é enzima marcadora da função mitocondrial e sua atividade esta diretamente relacionada à integridade dos constituintes da cadeia respiratória (Higuchi et al., 1995). Verificou-se também elevação nas relações LDH/CS decorrente da diminuição da atividade da CS, e na relação β -OH/CS pela elevação na atividade da enzima β -OH Acil CoA Desidrogenase (*Tabela 3*). O acúmulo de ácidos graxos no

citosol do tecido cardíaco tem sido observado na presença de elevadas concentrações séricas dos mesmos (Schaffer et al., 1999; Stanley et al., 2005) (*Apêndice D*).

Analisar as enzimas específicas das diferentes vias metabólicas possibilita evidenciar o substrato energético e a integridade das funções celulares (Bass et al., 1969). Em boas condições de oxigenação o coração é um consumidor de lactato, entretanto em condições de isquemia, hipóxia, diabetes ou resistência à insulina, ocorre a desensibilização dos receptores de glicose (GLUT) (Stanley & Rydén, 2003). Nestas condições o coração pode se transformar em produtor de lactato, aumentando o metabolismo anaeróbico de carboidrato e a atividade da LDH (Neely & Morgan 1974; Wolfe et al., 1993). Esta alteração do metabolismo foi observada nos animais do grupo ADS, que apresentaram características de síndrome metabólica e resistência à insulina (Galhardi, Capítulo 2) (*Tabela 3*). A elevação na degradação da glicose evidenciada pela elevação na LDH, forneceu substrato energético para o ciclo do citrato, assim elevando a oxidação da glicose e a atividade da CS (*Apêndice E*).

Nos animais suplementados com dieta rica em sacarose e com restrição no tempo de ingestão alimentar, houve elevação na atividade da enzima β -OH Acil CoA Desidrogenase (*Tabela 3*). Outro efeito observado foi a atividade da enzima CS, que foi semelhante aos animais do grupo controle e elevada em relação aos animais do grupo RT (*Tabela 3*). Este fato pode ser explicado pela ingestão da dieta rica em sacarose, que normalizou a via glicolítica, elevou a oxidação de ácidos graxos, evidenciado pela elevação na β -OH e na relação β -OH/CS, bem como reduziu o desequilíbrio entre os sistemas oxidante/antioxidante celulares (*Tabela 2*). Este efeito produzido pela ingestão de sacarose foi descrito por alguns pesquisadores ao estudar pacientes com isquemia cardíaca (Budingem, 1914, Goulston, 1911 in Stanley et al., 2005) (*Apêndice F*).

Concluindo, restrição no tempo de ingestão de alimentar diminuiu a concentração de SAT e elevou o estresse oxidativo cardíaco. Houve elevação na relação LDH/CS nos animais com restrição no tempo de ingestão alimentar, indicando aumento do metabolismo anaeróbico miocárdico. Animais com elevada ingestão de sacarose apresentaram elevação na LDH. O aumento na CS, independente da elevação do HP indicou que não houve alteração na integridade da membrana mitocondrial miocárdica. A restrição no tempo de ingestão alimentar e ingestão de dieta rica em sacarose normalizou o HP, e apresentou efeitos benéficos no metabolismo energético miocárdico em relação ao grupo RT.

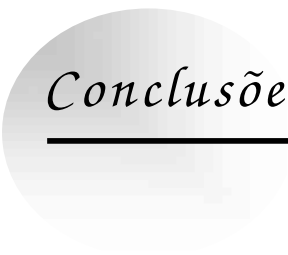
Referências *

- Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta* 2001; 306:1-17.
- Aebi H. Methods of enzymatic analysis. 2^a ed. (New York):Bergmeyer H. V. Editor Verloy Chemia Weinheim, 1974. v. 1, 2, 3 e 4.
- Bass A, Brdicka PE, Eyer P, Hofer S, Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eu J Biochem* 1969;10:198-206.
- Berner YN, Stern F. Energy restriction controls aging through neuroendocrine signal transduction. *Ageing Res Rev.* 2004; 3: 189-98.
- Budingen T. Über die Möglichkeit einer Ernährungsbehandlung des Herzmuskels durch Einbringen von Traubenzuckerlösungen in den groben Kreislauf. *Dt. Arch. Klin. Méd.* 1914; 114: 534-579.
- Carvajal K, Sánchez RM. Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases. *Arch Med Res* 2003; 34:89-99.
- Ceconi C, Boraso A, Cargnoni A, Ferrari R. Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact? *Arch Biochem Biophys* 2003; 420:217-221.
- Chen K, Thomas SR, Keaney Jr JF. Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction. *Free Rad Biol Med* 2003; 35:117-32.
- Cicogna AC, Padovani CR, Okoshi K, Aragon FF, Okoshi MP. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. *AM J Med Sci.* 2000; 320: 244-248.
- De La Lastra AC, Barranco MD, Martin MJ, Herrerias J, Motilva V. Extra-virgin olive oil-enriched diets reduce indomethacin-induced gastric oxidative damage in rats. *Digest Dis Sci* 2002; 47:2783-2790.
- Diniz YS, Cicogna AC, Padovani CR, Santana LS, Faine LA, Novelli ELB. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: Metabolic shifting and cardiac health. *Nutrition* 2004;20:230.
- Diniz YS, Cicogna AC, Padovani CR, Silva MDP, Galhardi CM, Rodrigues HG, Novelli ELB. Dietary fibre supplementation: oxidative stress and metabolic shifting for cardiac health. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81:1042-1048.
- Doi K, Sawada F, Toda G, Yamachika S, Seto S, Urata Y, Ihara Y, Sakata N, Taniguchi N, Kondo T, Yano K. Alteration of antioxidants during the progression of heart disease in streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Rad Res* 2001; 34:251-261.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82:47-95.
- Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell B, Wallace B. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Nat Acad Sci USA* 1999;96:4820.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted journal. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336: 309-315.

- Ewing JF, Janero DR. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal Biochem* 1995; 232: 243-248.
- Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, Gaia G, Bacchetti T, Cargnoni A, et al. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur Heart J* 1998;19 Suppl B:B2-B11.
- Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Med Ass Brasil* 1997; 43:61-68.
- Feuers RJ. The effects of dietary restriction on mitochondrial dysfunction in aging. *Ann NY Acad Sci* 1998; 854:192-201.
- Goulston A. The beneficial effect of ingestion of cane sugar in certain forms of heart disease. *Br. J. Med.* 1911: 615p.
- Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biomed Sci* 1990; 15:129-135.
- Hart R, Dixit R, Seng J, Turturro A, Leakley JEA, Feuers R, Duffy P, Buffington C, Cowan G, Lewis S et al. Adaptative role of caloric intake on the degenerative diseases process. *Toxicol Sci.* 1999; 52: 3-12.
- Henning SI, Wambolt RB, Schonckess BO. Contribution of glycogen to aerobic myocardial glucose utilization. *Circ* 1996; 93:1549-1555.
- Higuchi M, Cartier LJ, Chen M, Holloszy JO. Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptative response to exercise. *J Gerontol* 1995;40:281-6.
- Jiang ZY, Woollard AC, Wolf S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{+2} in the presence of xylenol orange. Comparison with TBA assay and on iodometric method. *Lipids.* 1991; 26: 853-856.
- Lewin TM, Coleman RA. Regulation of myocardial triacylglycerol synthesis and metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1694:63-75.
- Mehmetcik G, Toker G, Uysal M. Endogenous and copper-induced lipid hydroperoxidation and antioxidant activity of serum of hypercholesterolemic subjects. *Horm Met Res.* 1997; 29: 63-65.
- Moe B, Stolevik E, Bech C. Ducklings exhibit substantial energy-saving mechanisms as a response to short-term food shortage. *Physiol Biochem Zool.* 2005; 78: 90-104.
- Moura RA. Técnicas de laboratório, 2ª ed., (São Paulo): Atheneu Editora, 1982. 822p.
- Nakamura W, Hojoda S, Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta.*, v. 358, p. 251-261, 1974.
- Nelly JR, Morgan HE. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Ann Rev Physiol* 1974; 36: 413-59.
- Nishiyama Y, Ikeda , Haramaki N, Yoshida N, Imaizumi T. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J* 1998; 135:115-120.
- Norman GR, Streiner DL. Biostatistics – The bare Essentials. 1994; St Louis: Ed. Mosby Book, 260p.
- Novelli ELB, Fernandes AAH, Diniz YS, Almeida JA, Faine LA, Ribas BO. The adverse effect of a high-energy dense diet on cardiac tissue. *J Nutr Environ Med* 2002; 12:287-94.
- Okoshi K, Matsubara LS, Okoshi MP, Cicogna AC, Fioretto JR, Padovani CR, Aragon FF, Matsubara BB. Food restriction-induced myocardial dysfunction demonstrated by combination of in vivo and in vitro studies. *Nutr Res.* 2002; 22: 1353-1364.

- Pinotti MF, Silva MDP, Sugizaki MM, Diniz YS, Sant'Ana LS, Aragon FF, Padovani CR, Novelli ELB, Cicogna AC.
- Rebrim I, Kamzalov S, Sohal R. Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. *Free Rad Biol Med* 2003; 35:626-635.
- Sabbah HN, Stanley CW. Partial fatty acid oxidation inhibitors: a potentially new class of drugs for heart failure. *Eur J Heart Fail* 2003; 4: 3-6. Editorial.
- Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipodol* 2003; 14:281-87.
- Smith BK, Kelly LA, Piña R, York DA, Bray, GA. Preferential fat intake increases adiposity but not body weight in Sprague-Dawley rats. *Appetite*. 1998; 31: 127-139.
- Stanley CW. Myocardial lactate metabolism during exercise. *Med Sci Sports Exerc* 1991; 23: 920-24.
- Stanley WC & Rydén L. The diabetic coronary patient. Science Press. 2nd edition. 2003.76p.
- Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, McCormack JG. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. *Card. Res.* 1997; 33: 243-257.
- Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol. Rev.* 2005; 85: 1093-1129.
- Thornton R. Caloric restriction: can we extrapolate from animals to humans? *Food Chem Toxicol.* 2002; 40: 743-6.
- Van Heerebeek I, Meischl C, Stooker W, Meijer CJLM, Niessen HWM, Roos D. NADPH oxidase(s): new source(s) of reactive oxygen species in the vascular system. *J Clin Path* 2002; 55:561.
- Wan R, Camandola S, Mattson MP. Intermittent food deprivation improves cardiovascular and neuroendocrine responses to stress in rats. *Nutr Neurosc.* 2003: 1921-1929.
- Wolfe CL, Sievers RE, Visserem FLJ, Donnelly TJ. Loss of myocardial protection after preconditioning correlates with the time course of glycogen recovery within the preconditioned segment. *Circulation* 1993; 87:881-92.
- World Health Organization. Preventing chronic diseases : a vital investment : WHO global report. 2006.



Conclusões Finais

As conclusões finais aqui apresentadas, foram obtidas com base nos resultados dos capítulos 1, 2 e 3, após decorrido o período experimental de 30 dias com os animais submetidos a restrição no tempo de ingestão alimentar, ou mantidos com dieta rica em sacarose, ou com restrição de ingestão alimentar suplementados com sacarose.

Suplementação com dieta rica em sacarose demonstrou ser um excelente modelo de indução de síndrome metabólica. Os animais apresentaram dislipidemia concomitante a alterações morfológicas importantes. Desenvolveram um desequilíbrio no perfil antioxidante/oxidante agravando o estresse oxidativo, o que pode favorecer surgimento de diversas patologias associadas à síndrome metabólica. Pode-se sugerir comprometimento hepático observando a concentração da fosfatase alcalina. No miocárdio destes animais, após 30 dias, houve elevação no metabolismo anaeróbico, relacionado à manutenção da homeostasia nas condições de síndrome metabólica e obesidade, observada nestes animais ao final do período experimental proposto, que elevou o estresse oxidativo com diminuição das substâncias antioxidantes totais.

No modelo proposto de restrição no tempo de ingestão alimentar, os animais apresentaram elevação nos fatores de risco para aterosclerose, elevação nos marcadores de estresse oxidativo, bem como diminuição nas defesas antioxidantes. Elevação na concentração sérica da ALP sugere alteração de tecido hepático. No tecido cardíaco ocorreu diminuição na concentração das SAT com elevação do HP. Houve também elevação na oxidação de ácidos graxos provenientes da degradação do tecido adiposo, que pode ter induzido depósito de triacilglicerol, favorecendo a elevação do estresse oxidativo cardíaco.

Animais com restrição no tempo de ingestão alimentar suplementados com dieta rica em carboidratos, apresentaram dislipidemia, alteração no sistema antioxidante/oxidante com elevação dos marcadores de estresse oxidativo e diminuição

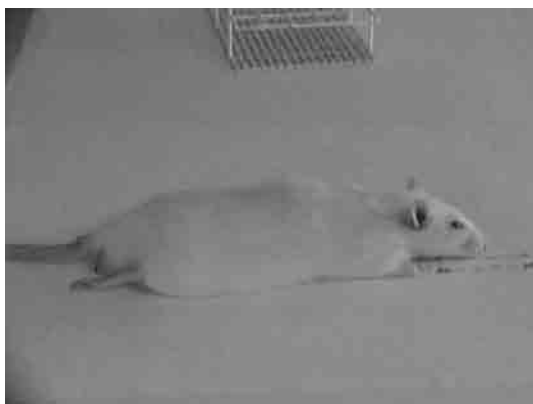
das defesas antioxidantes. Foram observadas alterações nos marcadores de hipertensão e alteração na enzima hepática (ALP). Os efeitos da restrição no tempo de ingestão alimentar com suplementação de dieta rica em sacarose no miocárdio destes animais, após 30 dias de experimento, apresentaram normalização do metabolismo energético, favorecendo a degradação de ácidos graxos, sem apresentar alteração no balanço oxidante/antioxidante. Os efeitos benéficos foram atribuídos à suplementação com sacarose, nesses animais com restrição de ingestão alimentar.

Apêndices

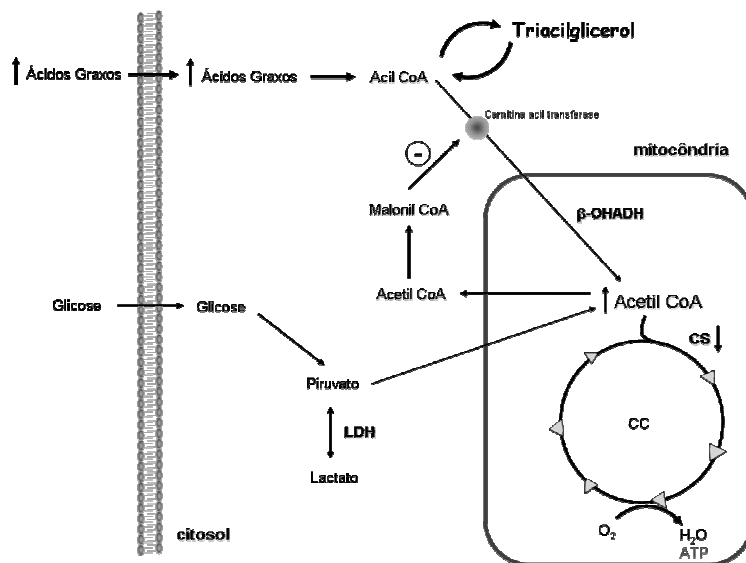


Apêndice A. Determinação da circunferência torácica.

Apêndice B. Determinação da circunferência abdominal.

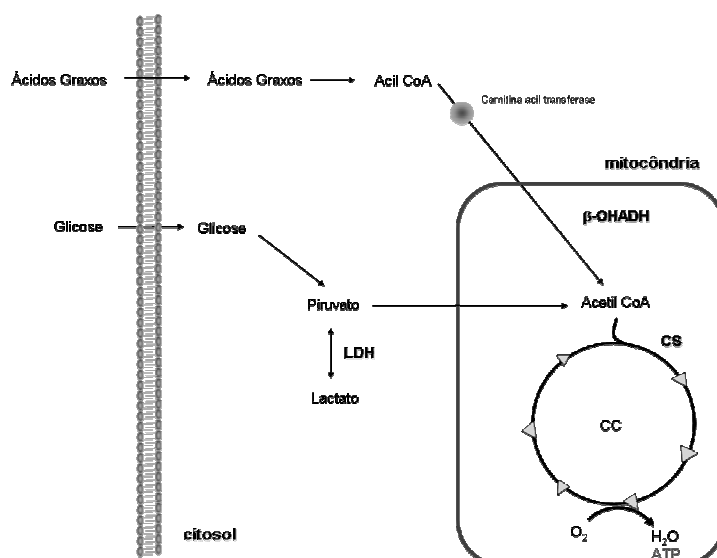
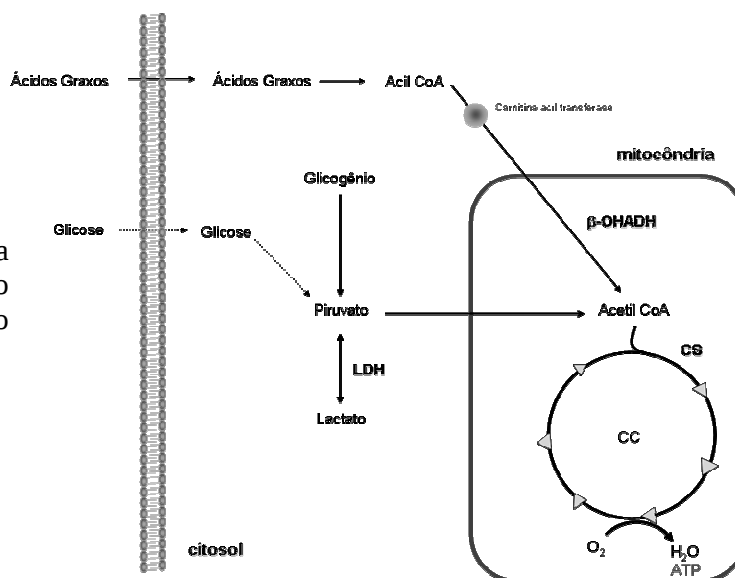


Apêndice C. Determinação do comprimento.



Apêndice D. Esquema resumido do metabolismo energético cardíaco do grupo RT.

Apêndice E. Esquema resumido do metabolismo energético cardíaco do grupo ADS.



Apêndice F. Esquema resumido do metabolismo energético cardíaco do grupo RTS.