



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

PRISCILA MANFIO QUEIROZ

IMPACTO DA DIETA HIPERCALÓRICA NO TECIDO CARDÍACO E DA SUPLEMENTAÇÃO COM NARINGENINA: PARÂMETROS METABÓLICOS E ESTRESSE OXIDATIVO

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Angélica Henrique Fernandes

BOTUCATU

2018

PRISCILA MANFIO QUEIROZ

**Impacto da dieta hipercalórica no tecido cardíaco e da
suplementação com naringenina: parâmetros metabólicos
e estresse oxidativo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Angélica Henrique Fernandes

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Queiroz, Priscila Manfio.

Impacto da dieta hipercalórica no tecido cardíaco e da suplementação com naringenina : parâmetros metabólicos e estresse oxidativo / Priscila Manfio Queiroz. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Ana Angélica Henrique Fernandes

Capes: 20803001

1. Metabolismo energético. 2. Suplementação alimentar. 3. Stress oxidativo. 4. Dietas. 5. Metabolismo. 6. Flavanonas.

Palavras-chave: Dieta hipercalórica; Estresse oxidativo; Metabolismo energético ; naringenina.

“Quando tudo tiver parecendo ir contra você, lembre-se que o avião decola contra o vento, e não a favor dele”.

Henry Ford

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Luiz Carlos Queiroz e Silvia Raquel Manfio Queiroz, sem a paciência, compreensão, e o total apoio durante toda a minha jornada de estudos nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Ana Angélica Henrique Fernandes sempre muito atenciosa, presente e paciente. Obrigado pelos ensinamentos e pela confiança em me dar essa oportunidade.

Ao técnico do biotério do Departamento de Bioquímica Fábio pelo auxílio no manejo dos animais.

À equipe do laboratório Lucas, Anderson, Pedro, Barbara, Mariana e Nagilla, por toda colaboração quando precisei e troca de conhecimento.

Aos meus amigos pelo companheirismo, dividir momentos bons e ruins, conselhos, auxílio e dedicação em me ajudar em momentos com dificuldade.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental pelo auxílio nas atividades do dietário.

RESUMO

Introdução: A dieta ocidental rica em carboidrato e lipídio promove o desenvolvimento da síndrome metabólica. Alterações do metabolismo energético provocadas por um desbalanço redox em virtude de dieta hipercalórica, gera danos oxidativos e deficiência no sistema enzimático antioxidante, intensificando fatores de risco e eventos que levam à doença cardiovascular. Os flavonoides são compostos de origem vegetal com propriedades antioxidante e antiaterogênico. O objetivo do estudo foi avaliar as alterações metabólicas séricas e cardíacas em ratos submetidos a dieta hipercalórica e tratados com naringenina. **Material e Métodos:** Foram utilizados 32 ratos *Wistar* machos, distribuídos em 4 grupos: (C) Controle, (N) naringenina, (H) hipercalórico, (HN) hipercalórico tratado com naringenina. Os grupos (C e N, n=16) receberam dieta padrão enquanto que os grupos (H e HN, n=16) receberam dieta hipercalórica durante 30 dias. Após este período iniciou-se o tratamento com naringenina 50mg/kg (grupos N e HN) durante 43 dias à intervalos de 7 dias via intra gástrica. Ao final do experimento, os animais foram anestesiados para eutanásia. Foram coletadas duas porções de tecido cardíaco e amostra sérica para análise de perfil lipídico, glicemia, metabolismo energético, estresse oxidativo e glicogênio cardíaco. **Resultados:** O grupo (HN) tiveram uma diminuição na ingestão hídrica e ingestão alimentar, peso final, ganho de peso e glicemia. Não houve diferença significativa no peso inicial entre os grupos. Houve uma melhora no grupo (HN) no perfil lipídico, metabolismo energético e estresse oxidativo com exceção do glicogênio, proteínas totais, e atividade da catalase que não apresentaram diferença significativa. **Conclusão:** O consumo de dieta hipercalórica causou dislipidemia, hiperglicemia, prejudicou o metabolismo energético e provocou consequentemente o estresse oxidativo no miocárdio. A análise da glicemia e perfil lipídico demonstrou que a suplementação de naringenina foi eficiente em atenuar esses parâmetros em animais submetidos à dieta hipercalórica. A oxidação exacerbada de ácidos graxos e o estresse oxidativo no tecido cardíaco, provocados pela dieta hipercalórica, foram controlados pela administração de naringenina.

Palavras-chave: Naringenina, Dieta hipercalórica, Metabolismo energético, Estresse oxidativo

ABSTRACT

Introduction: Western diet rich in carbohydrates and lipids is an important role in metabolic syndrome development. Energy metabolism alterations caused by redox unbalance due to high fat diet, generated oxidative damage and deficiency in the antioxidant enzyme system, increasing risk factors and events that lead to cardiovascular disease. Flavonoids are natural compounds with antioxidant and antiatherogenic properties. This study assessed serum and cardiac metabolic alterations in rats fed with high fat diet and treated with naringenin. **Material and Methods:** We used 32 male *Wistar* rats, divided into 4 groups: (C) control, (N) naringenin, (H) high fat diet, (HN) high fat diet treated with naringenin. Groups (C and N, n=16) received standard diet whereas the groups (H and HN, n=16) received high fat diet during 30 days. After this period, the rats were treated with naringenin 50mg/kg (groups N and HN) during 43 days and at 7 days interval by gavage. Animals were anesthetized and led to euthanasia. Two cardiac tissue portions were collected as well as blood serum to evaluate lipid profile, glycemia, energy metabolism, oxidative stress and cardiac glycogen. **Results:** Group (HN) showed a decreased in water and food intake, final body weight, body weight gain and glycemia. There wasn't significant difference in initial body weight between the groups. There was an improvement in group (HN) on lipid profile, energy metabolism and oxidative stress. There wasn't significant difference on catalase activity, cardiac glycogen and total protein. **Conclusion:** It was concluded that high fat diet ingestion lead to dyslipidemia, hiperglycemia, empaired energy metabolism and caused oxidative stress in myocadium. Glycemic analysis and lipid profile showed that the supplementation of naringenin was effective to reduce these parameters in animals induced to high fat diet. The exacerbated oxidation of fatty acids and the oxidative stress in the cardiac tissue induced by high fat diet were controlled by naringenin administration.

Keywords: Naringenin, High fat diet, Energy metabolism, Oxidative stress

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados médios obtidos para ingestão hídrica (ml/dia), ingestão alimentar (g/dia), peso inicial (g), peso final (g), ganho de peso (g) e glicemia nos diferentes grupos experimentais.....	31
Tabela 2 - Resultados médios obtidos para a concentração sérica de colesterol total (CT), LDL-colesterol (LDL-c), triacilgliceróis (TG), VLDL-colesterol (VLDL-c) e HDL-colesterol (HDL-c) para os diferentes grupos experimentais.....	32
Tabela 3 – Resultados médios obtidos para a atividade da lactato desidrogenase (LDH), citrato sintase (CS) e β -hidroxi acil CoA-desidrogenase (OHADH) no tecido cardíaco para os diferentes grupos experimentais.....	34
Tabela 4 – Resultados médios obtidos para concentração de glicogênio e proteínas totais no tecido cardíaco para os diferentes grupos experimentais.....	36
Tabela 5 – Resultados médios obtidos para concentração de hidroperóxido de lipídio (HP), atividade da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e da glutiona peroxidase (GSH-Px) no tecido cardíaco para os diferentes grupos experimentais.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Geração e degradação de espécies reativas	15
Figura 2 – Desbalanço energético na insuficiência cardíaca	17
Figura 3 – Estrutura química dos flavonoides	19
Figura 4 – Resumo do efeito do flavonoide cítrico no metabolismo do modelo animal	22
Figura 5 – Delineamento experimental	25
Figura 6 – Resultados médios obtidos para a concentração da glicemia sérica nos diferentes grupos experimentais	31
Figura 7 – Resultados médios obtidos para a concentração sérica de CT (A), LDL-colesterol (B), TG (C), VLDL-colesterol (D) e HDL-colesterol (E) para os diferentes grupos experimentais	33
Figura 8 – Resultados médios obtidos para a atividade de LDH (A), CS (B) e OHADH (C) para os diferentes grupos experimentais	35
Figura 9 – Resultados médios obtidos para a concentração de glicogênio (A) e Pt (B) no tecido cardíaco para os diferentes grupos experimentais	36
Figura 10 – Resultados médios obtidos para a concentração de HP (A), atividade da CAT (B), SOD (C) e da GSH-Px (C) para os diferentes grupos experimentais	38

Sumário

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
INTRODUÇÃO	11
HIPÓTESE	23
OBJETIVO GERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
RESULTADOS.....	31
DISCUSSÃO	40
CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas, estudos relacionados às alterações metabólicas ganharam importância principalmente devido aos maus hábitos alimentares (CAMERON et al., 2004; GRUNDY, 2006; GAMI, et al., 2007). Estudos mostraram uma relação entre o tipo de alimento e ingestão de nutrientes com a obesidade, distribuição de gordura corporal, hipertensão, resistência insulínica e hiperglicemia, associados às doenças como câncer, diabetes e cardiovasculares (PANIAGUA, 2016).

Segundo análise gênica, apenas 10% das síndromes metabólicas apresentam predisposição genética, ou seja, a maioria é caracterizada por fatores ambientais como sedentarismo e alimentação (BRYAN et al., 2013).

A ingestão de dietas hipercalóricas, enriquecidas com carboidratos e lipídios, associadas ao sedentarismo compõem importantes fatores de risco na etiologia de várias condições patológicas, principalmente aquelas relacionadas a doenças cardiovasculares (DINIZ et al., 2008; PIETILAINEN et al., 2010; DUFFEY et al., 2013). Estes aspectos merecem ser considerados ao analisar diversos países com alterações na composição da dieta, acompanhada das mudanças econômicas, sociais, demográficas e suas repercussões na saúde populacional (POPKIN, 2001). Contudo, o aumento de sobrepeso e da obesidade já é considerado um problema de saúde pública, que independe de idade, sexo, etnia, educação, nível econômico, afetando assim todos os grupos demográficos (PANIAGUA, 2016).

Segundo estimativas econômicas, o Brasil gastou cerca de 3 bilhões de dólares com a população na prevenção e tratamento de morbidades prematuras relacionadas a doenças metabólicas, tais como obesidade e diabetes mellitus tipo 2, o que predispõe a fatores de risco para doenças cardiovasculares. Estima-se que nos próximos dez anos o gasto previsto pode atingir 49 bilhões de dólares para o tratamento destas enfermidades que já atingem patamares epidêmicos (WHO, 2011).

As doenças cardiovasculares levam à números exorbitantes em questão de óbitos e custo na saúde global. A estimativa em 2013 de óbitos foi mais do que 17,3 milhões, sendo que o esperado para 2030 é de 23,6 milhões. Isto representa cerca de 31% de indivíduos no mundo que chegam ao óbito. O custo para doenças

cardiovasculares avaliado em 2010 foi de 863 bilhões de dólares. Espera-se que em 2030 passara para 1.044 bilhões de dólares (BENJAMIN et al., 2017).

A ingestão de dietas contendo grandes quantidades de lipídios apresentam características importantes, pois desencadeiam alterações metabólicas com consequências deletérias provocando os distúrbios cardiovasculares, os quais estão associados à síndrome metabólica (PELTONEN et al., 2003; NOVELLI et al., 2006). Índices elevados de triacilgliceróis e colesterol total, e menor nível de HDL-colesterol, constituem alguns aspectos que definem a síndrome metabólica, a qual tem sido utilizada frequentemente no prognóstico de doenças cardiovasculares (LOPASCHUK et al., 2007; BRUNZELL et al., 2008; PANCHAL et al., 2011).

É fato conhecido que dietas ricas em lipídeos e carboidratos induzem a obesidade (HILL, 2006), desde que o elevado consumo de lipídeos aumenta o apetite e induz hiperfagia (FRIEDMAN, 1998). Porém, o tipo de lipídio ingerido pode apresentar maior relevância em relação ao total de lipídio consumido na dieta (PANIAGUA, 2016).

Rutledge & Adeli (2007) relataram que o ganho de peso pode ser visto não apenas como consequência de um balanço energético positivo, mas também como o mecanismo através do qual a energia proveniente dos substratos energéticos é metabolizada e estocada.

A associação entre obesidade e doenças cardiovasculares tem estimulado pesquisas sobre o controle do peso corporal (CARMONA et al., 2009) e sobre a redução de seus efeitos adversos, notadamente no tecido cardíaco (NOVELLI et al., 2010). Entretanto, a despeito dos conhecimentos sobre a associação entre incidência de obesidade e a elevada ingestão de lipídeos e carboidratos, a dieta ocidental frequentemente consumida é hipercalórica, contendo quantidade considerável de sacarose e colesterol (WHO/FAO, 2003).

Dietas enriquecidas com carboidratos refinados levaram à menor sensibilidade à insulina acompanhada do aumento e secreção de insulina pelas células β -pancreáticas, indicando condições pré-diabéticas com severa intolerância à glicose (STANHOPE; HAVEL, 2008; PANCHAL et al., 2011). Sato et al. (2010) observaram que a ingestão de sacarose provocou aumento da atividade hepática de enzimas lipogênicas, além de alterações na homeostase da glicose e hiperinsulinemia. Estudos mostraram que além da exposição de células β -pancreáticas à

elevados níveis de glicose, a exposição a altos níveis de ácido graxo livre, ou a combinação de ambos, também pode levar a disfunções metabólicas (MAHJOUB & MASROUR-ROUDSARI, 2011).

Dietas hipercalóricas alteram o metabolismo da glicose, podendo modificar a composição das apolipoproteínas e elevar a concentração de triacilgliceróis (STROHL et al, 1997). Ingestão deste tipo de dieta, que induz dislipidemias, constitui importante fator para o surgimento de alterações cardiovasculares.

O metabolismo miocárdico constitui um aspecto singular na bioquímica e representa importante alvo farmacológico. O miocárdio pode alterar as vias metabólicas para produção de energia, dependendo do suprimento de oxigênio, da necessidade de energia e do substrato energético oxidável disponível na corrente sanguínea (STANLEY et al., 2005).

O músculo cardíaco é caracterizado pela elevada capacidade oxidativa (STANLEY; SABBH, 2005). Em condições aeróbicas normais, as moléculas de acetil-CoA, proveniente da β -oxidação de ácidos graxos são metabolizadas no ciclo do ácido cítrico produzindo equivalentes redutores NADH e FADH₂. Estes são transferidos através da cadeia transportadora de elétrons, produzindo ATP pela fosforilação oxidativa. Nestas condições, o citrato, formado no ciclo do ácido cítrico e elevadas concentrações intracelulares de ATP inibem a via glicolítica e o complexo enzimático piruvato desidrogenase (LOPASCHUK et al., 2007).

O desbalanço energético aumenta a atividade do ciclo do ácido cítrico promovendo excesso de NADH mitocondrial, o que contribui para geração de espécies reativas de oxigênio na cadeia transportadora de elétrons (MAHJOUB & MASROUR-ROUDSARI, 2012).

Além da oxidação de ácidos graxos, a glicose é outro substrato energético cardíaco, o qual é oxidado na glicólise em piruvato. A enzima piruvato desidrogenase, limitante da oxidação da glicose, converte o piruvato em acetil CoA e NADH na matriz mitocondrial. O metabolismo de ácidos graxos restringe a oxidação de glicose, isto é, o aumento na oxidação de ácido graxo inibe a piruvato desidrogenase para a produção de acetil CoA e NADH. Também inibe a fosfofrutoquinase 1 pelo aumento nos níveis de citrato pelo ciclo do ácido cítrico. Da mesma forma, um aumento na oxidação de glicose inibe a β cetoacil CoA e a β hidroxil acil CoA-desidrogenase (FILLMORE; MORI; LOPASCHUCK, 2014).

Se o excesso de NADH mitocondrial não é dissipado completamente pela fosforilação oxidativa, elétrons transferidos na membrana mitocondrial interna podem reduzir parcialmente o oxigênio molecular com consequente produção de espécie reativa de oxigênio, em especial o ânion superóxido (MAHJOUR & MASROUR-ROUDSARI, 2012).

O oxigênio molecular, essencial durante os processos oxidativos envolvidos com a produção de energia na cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa e as alterações na constituição alimentar e/ou no substrato oxidável para geração de energia, contribuem para produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que frequentemente resulta em estresse oxidativo (NOVELLI, 2005). EROs são moléculas ou átomos, com número ímpar de elétrons não pareados em seu orbital mais extremo, o que os tornam reativos (FRIDOVICH, 1998; BONNEFONT-ROUSSELOT, 2004). As principais ERO são superóxido (O_2^-), hidroxil (OH^-), peroxil (RO_2), hidroperoxil (HRO_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LOPES et al., 2008).

Tem sido estimado que no processo de fosforilação oxidativa, acoplado a cadeia respiratória mitocondrial, a redução incompleta do oxigênio resulta na produção de radical superóxido (O_2^-) que reduzido leva a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SEIVA et al., 2009).

Em condições normais o transporte de elétrons na mitocôndria é acoplado ao O_2 para converter em H_2O . Porém, se os elétrons são dispersos do complexo I e III ocorre a formação de $O_2^{\bullet-}$, devido ao declínio da fosforilação de ADP e o alto gradiente de próton entre espaços inter membranas e a matriz mitocondrial. O superóxido pode ser convertido facilmente em H_2O_2 . Essas duas espécies reativas de oxigênio, através de reações, com participação dos equivalentes Fe^{3+} ou Fe^{2+} , podem ser convertidas em radical hidroxil (OH^-), o qual é altamente reativo e deletério às células (POHJOISMAKI; GOFFART, 2017).

A combinação de $O_2^{\bullet-}$ e NO produz o peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) que é reativo e torna-se pró-oxidante a macromoléculas como proteínas e fosfolípidios (Figura 1). Tanto o $O_2^{\bullet-}$ como NO inibem a atividade de proteínas e enzimas por atuarem sobre centros enxofre-ferro (MAHJOUR; MASROUR-ROUDSARI, 2012).

reativas de oxigênio (MATSUZAWA-NAGATA et al., 2008) como na peroxidação lipídica (STRANAHAN et al., 2011).

Tem sido observado acúmulo de triacilgliceróis no tecido muscular de indivíduos com síndrome metabólica, decorrente da utilização deficiente de ácidos graxos para geração de energia (KELLEY et al., 1999; PERSEGHIN, 2005). O aumento da concentração de lipídios pode desencadear o estresse oxidativo, devido a susceptibilidade a peroxidação lipídica de membranas, especialmente as mitocondriais.

Evidências a respeito da lipotoxicidade indicam que o acúmulo de triacilgliceróis no tecido cardíaco pode constituir importante alvo para a ação de radicais livres e formação de hidroperóxido (CHONG et al., 2007) e desencadear estresse oxidativo (STANLEY et al., 2005). Tem sido observada estreita relação entre o acúmulo de lipídios e cardiopatias (LEWIN, COLEMAN, 2003), decorrente do desequilíbrio entre a captação de lipídios, pelo tecido cardíaco, e a capacidade em oxidá-los completamente (FINCK et al., 2003). O estresse oxidativo com elevação em hidroperóxido de lipídio afeta a função miocárdica de maneira similar aos danos provocados pela isquemia (MALLET et al., 2005).

A lipoperoxidação de membranas, provocado por radicais livres, foi observada no miocárdio de ratos suplementados com dieta rica em sacarose (WAN et al., 2003).

O tecido cardíaco, por ser essencialmente aeróbico utiliza grande quantidade de oxigênio (LOPASCHUK et al., 2010) pode ser considerado paradoxo, uma vez que a função cardíaca depende de oxigênio para obtenção de ATP e constitui importante fonte de EROs, os quais induzem a lipoperoxidação, alterando o metabolismo energético, reduzindo a fosforilação oxidativa e, portanto, a disponibilidade de ATP para contração muscular.



Figura 2 – Desbalanço energético na insuficiência cardíaca. O desbalanço energético na insuficiência cardíaca é caracterizado pelo aumento da demanda energética e diminuição da produção, transferência e utilização de energia (Adaptação: Ventura-Clapier et al., 2011).

Sabe-se que na insuficiência cardíaca para compensar a diminuição do metabolismo oxidativo mitocondrial e o declínio na oxidação de ácido graxo, aumenta a velocidade da oxidação da glicólise. Por outro lado, a queda na oxidação de glicose induz o desacoplamento da glicólise que leva maior produção de prótons. Essas alterações provocam um desequilíbrio na homeostase iônica, redirecionando o ATP da função contrátil para restabelecer a homeostase iônica, significando disfunção cardíaca (Figura 2) (FILLMORE; MORI; LOPASCHUCK, 2014).

Tem sido observado que alterações nos combustíveis metabólicos contribuem para disfunção metabólica e remodelamento do ventrículo esquerdo (STANLEY et al., 2005), demonstrando a associação entre estresse oxidativo, metabolismo energético e função cardíaca. O remodelamento cardíaco é caracterizado por mudanças estruturais e funcionais. Sendo assim, o metabolismo cardíaco desempenha um ponto crucial na fisiopatologia (DOENST; NGUYEN; ABEL, 2014).

Elevada ingestão de calorías diminui a fluidez da membrana mitocondrial aumentando a produção de EROs (NOVELLI et al., 2010), induzindo o estresse oxidativo (NISHYIAMA et al., 1998). Em proteínas as EROs causam a peroxidação proteica, levando a formação de proteína carbonil e alterações funcionais nas células (YEUM et al., 2004). Nos lipídeos a ação das EROs resulta na peroxidação dos lipídeos insaturados das membranas celulares, podendo levar à perda de função e lise celular.

Os níveis excessivos das EROs causam danos às proteínas, membranas celulares, ácidos nucleicos que resultam em morte celular e injúria tecidual, acompanhada por inúmeras condições patológicas (MARTIM et al., 2003). Na tentativa de evitar esta situação, o organismo dispõe de sistemas antioxidantes que inibem as ERO e protegem os sistemas biológicos contra os efeitos lesivos da oxidação excessiva (BIESALKSKI, 2000).

Este sistema antioxidante é composto por enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSHPx) e antioxidantes não enzimáticos como glutathione (GSH) e vitaminas. Dietas ricas em carboidrato e lipídio associadas à obesidade aumentam a respiração mitocondrial produzindo superóxido. Os antioxidantes enzimáticos como SOD, CAT e GSHPx diminuem gerando um desbalanço redox (BRYAN et al., 2013).

Estes fatos explicam a associação entre metabolismo energético, obtenção de energia através da oxidação de substratos, com estresse oxidativo.

Considerando que o metabolismo energético depende do suprimento de substrato no tecido cardíaco, ingestão de dietas com elevada concentração de sacarose e colesterol pode alterar as vias metabólicas miocárdicas para obtenção de energia, induzindo modificações na oxidação de nutrientes e na liberação de espécies radicalares associadas ao estresse oxidativo. Alterações na composição das membranas celulares e mitocondriais decorrentes das alterações na composição da dieta podem afetar não somente, as propriedades elétricas do tecido cardíaco, como também a produção de energia (DINIZ et al., 2008). Nestas condições, compostos capazes de controlar o estresse oxidativo e modular as atividades de enzimas reguladoras das vias metabólicas podem contribuir para melhora do metabolismo energético.

Os flavonóides compõem ampla classe de substâncias de origem vegetal, cuja síntese não ocorre nos animais. Entretanto, tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que atuam sobre sistemas biológicos de forma benéfica para o organismo, sendo indicado para tratamento de doenças degenerativas mediadas por estresse oxidativo (LOPEZ-REVUELTA et al., 2006).

Flavonóides são compostos polifenólicos biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e do acetato, precursores de outros grupos, principalmente como aminoácidos alifáticos e terpenóides (MANN, 1987). São classificados de acordo com

sua estrutura química em seis subclasses principais: flavonol, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianinas e flavanol (catequinas e proantocianidinas). A maior ocorrência de flavonóide, ou seja, cerca de 95% é representado pelas flavanonas tendo como principal fonte dietética frutas e suco de frutas cítricas, além do tomate, no qual encontra-se níveis significativo desta substância (TESTAI & CALDERONI, 2017). A quercetina, naringerina e a rutina são os flavonóides com maior distribuição entre as plantas e com autopoder antioxidante (MANACH et al., 1997). Ross et al (2000) quantificou a naringenina no suco de toranja e observaram concentrações em torno de 17-76mg/100mL.

A naringenina é um glicosídeo de flavanona com a forma molecular $C_{27}H_{32}O_{14}$ encontrada em uvas e frutas cítricas como basicamente limão e laranja (KUMAR; PANDEY, 2013; ALAM et al., 2014).

Mais de 8.000 flavonóides já foram identificados (PIETTA, 2000) e sua estrutura básica consiste em um núcleo fundamental, constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (C6-C3-C6), sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (cadeia heterocíclica C) acoplado ao anel A (Figura 3).

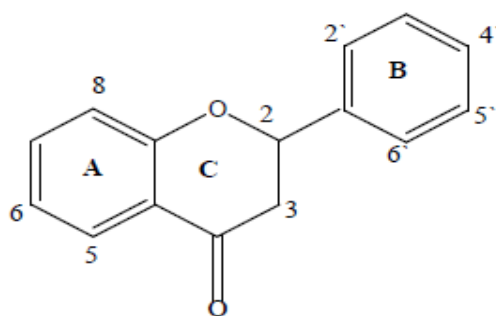


Figura 3. Estrutura química dos flavonóides (Fonte: DI CARLO et al., 1999).

Os flavonóides são antioxidantes efetivos devido à suas propriedades sequestrantes de radicais livres e por quelar íons metálicos, protegendo assim as células dos radicais livres e, portanto, da peroxidação lipídica. A propriedade antioxidante é direcionada sobre o radical hidroxil ($\bullet OH$) e o ânion superóxido (O_2^-), espécies altamente reativas envolvidas no desencadeamento da peroxidação lipídica (KAHRAMAN et al., 2003). Apresentam propriedades estabilizadoras de membranas, podendo afetar processos do metabolismo intermediário (GALATI et al., 2002).

Os flavonóides são termodinamicamente favorecidos por provocar redução completa em espécies reativas parcialmente reduzidas pelo alto potencial redox. Seu anel B hidroxil captura EROS e doa um hidrogênio e um elétron para RO_2 , $\bullet OH$, $ONOO\bullet$, estabilizando essas espécies e originando um radical de flavonoide (KUMAR; PANDEY, 2013).

Além disso, os flavonóides sequestram radicais de oxigênio como $\bullet OH$ e O_2^- , inibe a xantina oxidase e a peroxidação lipídica. O radical hidroxil e o ânion superóxido promovem dano tecidual por iniciarem a peroxidação lipídica (BELHIN et al., 2004). Desta forma, os flavonóides podem apresentar atuação protetora contra fatores que induzem o estresse oxidativo (GREGORY & KELLY, 2011).

Em estudo realizado por Arai et al. (2000) o consumo de flavonóides associou-se à baixa incidência de aterosclerose, devido à proteção de LDL-colesterol contra a lipoperoxidação.

A utilização de flavonóides tem despertado interesse na clínica devido aos efeitos benéficos sobre doenças cardiovasculares. Estudos epidemiológicos demonstraram correlação inversa entre distúrbios cardiovasculares e consumo de dietas ricas em flavonóides. Em especial a naringenina, verificou-se aumento sérico da HDL (lipoproteína de alta densidade), diminuição tanto na concentração sérica de triacilgliceróis como de LDL (lipoproteína de baixa densidade), além de protegê-las da oxidação. Além disso, observou que este flavonoide inibiu a absorção de glicose, melhorou a defesa antioxidante endógena e reduziu a regulação de genes envolvidos na aterosclerose (TESTAI & CALDERONE, 2017).

Em outros estudos a concentração plasmática e hepática de colesterol total e triacilgliceróis reduziram, enquanto que o nível sérico de HDL-colesterol aumentou com a administração de flavonóides (SILVA et al., 2011).

A associação entre hiperlipidemia e doenças coronarianas está bem estabelecida e fundamenta-se principalmente no papel do colesterol no desenvolvimento da aterosclerose. O acúmulo das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) sobre a membrana endotelial torna-se fator de risco para a arteriosclerose e doenças cardiovasculares (YOSHIDA et al., 2005). Por outro lado, a fração HDL impede este depósito, uma vez que atua transportando o excesso de colesterol dos tecidos extra-hepáticos para o fígado (WHITNEY, 1997). Embora a patogênese dessa enfermidade seja complexa, um dos fatores reside na oxidação dos ácidos graxos de

fosfolipídios da LDL-colesterol, provocando, desta forma, a endocitose pelos macrófagos presentes na camada subendotelial, o que contribui para a formação de células espumosas e conseqüentemente o desenvolvimento de aterosclerose (BRUCE-CHERTOW, 2004; MATHEUS et al., 2008).

O possível mecanismo pelo qual o flavonóide age contra aterosclerose é a ativação de receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR α) proporcionando baixa regulação de proteínas envolvidas na patogênese da aterosclerose, assim diminui a formação de células espumosas e aumento do influxo de lipídio diminuindo a resposta inflamatória (MULVIHILL; HUFF, 2012).

Supõe-se que os flavonóides, primeiramente, possam reduzir a geração ou aumento de radicais livres nos macrófagos ou ainda podem proteger os fosfolipídios estruturais da LDL contra a oxidação provocadas pelos radicais livres. Além disso, podem reduzir α -tocoferol pela doação de átomos de hidrogênio ao radical α -tocoferol; quando este perdeu hidrogênio durante a peroxidação lipídica (DORNAS et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010).

A naringenina promove a diminuição da secreção de VLDL-colesterol e de captação de LDL-colesterol pelos macrófagos, aumentando a oxidação hepática de ácidos graxos e utilização da glicose pelos tecidos periféricos responsivos à insulina. Dessa forma, ocorre melhora tanto na dislipidemia e como na resistência insulínica no modelo animal (Figura 4) (MULVIHILL; HUFF, 2012).

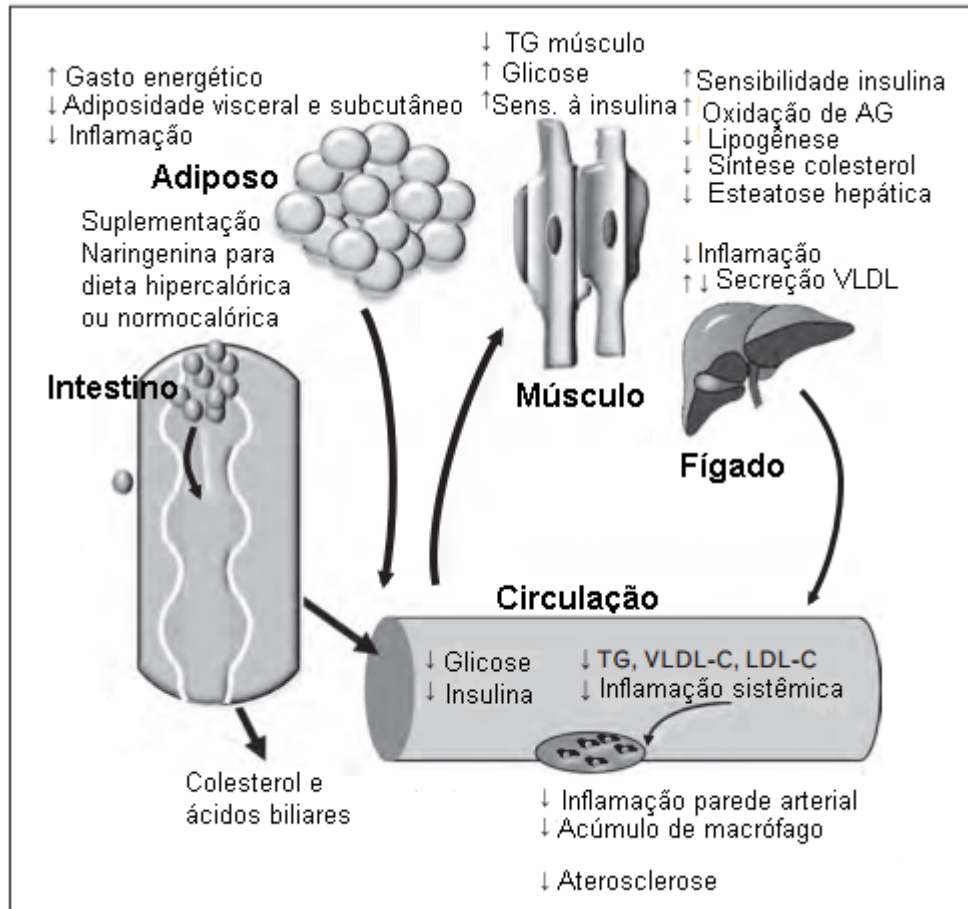


Figura 4 – Resumo do efeito do flavonoide cítrico no metabolismo do modelo animal. A naringenina parece não ter efeito na ingestão de calorias e absorção de lipídio, mas na redução da esteatose hepática através da lipogênese, melhorando assim a dislipidemia e reduzindo oxidação de ácido graxo. Pelo aumento na captação de glicose no músculo, melhora a sensibilidade a insulina no fígado e no músculo. Também reduz processo inflamatório do tecido adiposo e da circulação. Somando esses fatores, o tratamento indica a prevenção da aterosclerose (Adaptação: Assini; Mulvihill; Huff, 2013).

Atualmente observa-se forte tendência na valorização de substâncias naturais para fins terapêuticos na medicina humana. Neste cenário os flavonóides têm especial destaque, pois sendo um produto de origem natural vem conquistando numerosos adeptos de sua utilização. Porém, para que estes compostos possam ser efetivamente utilizados com a finalidade terapêutica, há necessidade de estudos, no sentido de manter os níveis normais dos parâmetros bioquímicos e possível controle do estresse oxidativo, em especial no tecido cardíaco.

HIPÓTESE

A naringenina atenua o estresse oxidativo e melhora o metabolismo energético no tecido cardíaco em ratos submetidos a dieta hipercalórica.

OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações metabólicas séricas e cardíacas em ratos submetidos a dieta hipercalórica e tratados com naringenina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Considerando-se as complicações metabólicas decorrentes da ingestão de dietas hipercalóricas e as propriedades biológicas dos flavonóides, os objetivos específicos foram:

- ❖ Determinar as alterações metabólicas provocadas pela dieta hipercalórica através de parâmetros nutricionais, bioquímicos séricos e cardíacos;
- ❖ Evidenciar o efeito da dieta hipercalórica sobre o estresse oxidativo;
- ❖ Analisar os efeitos metabólicos da administração de naringenina sobre os parâmetros nutricionais, bioquímicos séricos e cardíacos;
- ❖ Identificar os efeitos da administração de naringenina sobre o estresse oxidativo em ratos submetidos a dieta hipercalórica.

MATERIAIS E MÉTODOS

1) Grupos experimentais e composição das dietas

Os animais foram provenientes do Biotério Central da UNESP/“Campus de Botucatu” e transferidos para o Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Química e Bioquímica/IB-UNESP-Botucatu. Foram utilizados 32 ratos, linhagem *Wistar*, machos, recém-desmamados com 21 dias de idade. Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno, em ambiente com temperatura ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo (ciclos 12:12 horas claro/escuro) controlados. O protocolo (sob no. 836) experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biociências/UNESP “Campus de Botucatu”, adotado pelo Colégio Brasileiro de experimentação animal (COBEA).

Inicialmente os animais foram distribuídos em dois grupos ($n=16$) mantidos com ração padrão (C) e com ração hipercalórica (H), durante 30 dias. Após este período os grupos foram subdivididos e constituíram os seguintes grupos experimentais ($n=8$):

Grupo C: recebeu dieta padrão;

Grupo N: recebeu dieta padrão com suplementação de naringenina,

Grupo H: recebeu dieta hipercalórica;

Grupo HN: recebeu dieta hipercalórica com suplementação de naringenina.

Estes grupos foram mantidos durante 43 dias. Os animais receberam as respectivas dietas *ad libitum* com monitoramento de ingestão de ração e água diários e a pesagem dos animais efetuada semanalmente.

A dieta hipercalórica foi preparada a partir da ração padrão (Purina Labina, Campinas, SP), a qual foi obtida pela trituração. Para cada 1000g da ração triturada foram adicionados 12,33g de colesterol, 1,23g de ácido cólico, 131,0g de sacarose e 84,77 mL de óleo de soja (COSTA et al., 1993; REEVES, 1997; QUILES et al, 2003). A mistura foi homogeneizada com água e submetida à formação de *pellet*, os quais foram desidratados em estufa com circulação forçada de ar.

Os animais dos grupos N e HN receberam o flavonóide naringenina (Sigma N-5893), via intragástrica (gavage), na concentração de 50mg/kg de peso corporal a intervalos de 7 dias, durante 43 dias. Enquanto, os animais do grupo C e H receberam gavagem com água na mesma concentração (Figura 5) (FERNANDES et al., 2010).

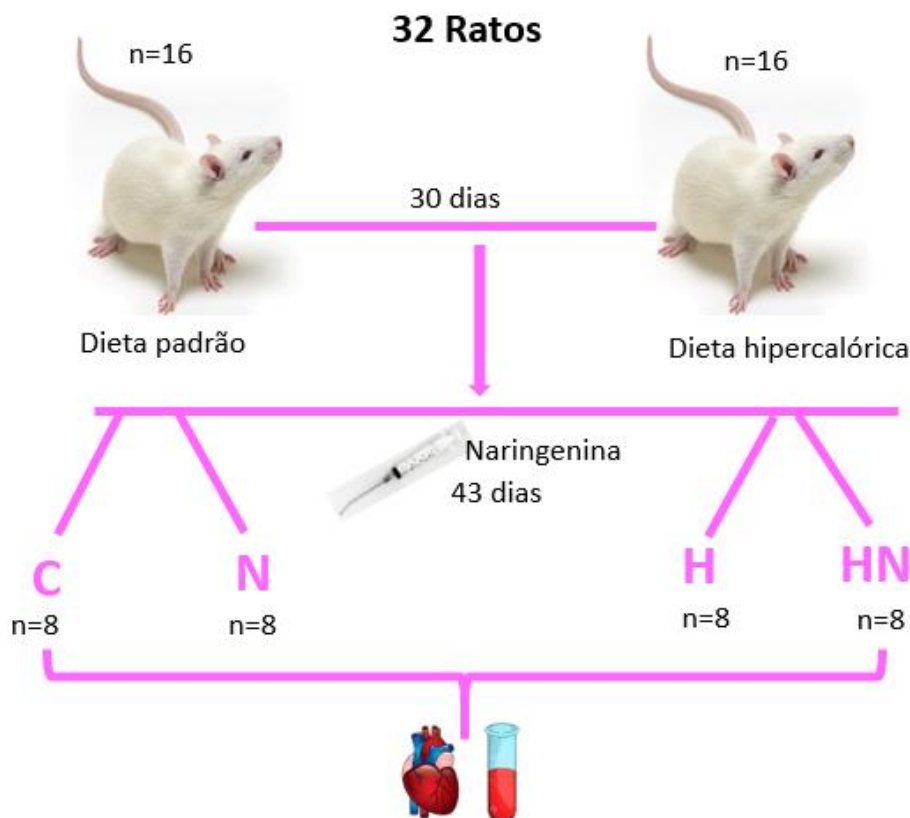


Figura 5 – Delineamento experimental. Legenda: (C): controle; (N): naringenina; (H): hipercalórica, (HN): hipercalórica e tratamento com naringenina.

2) Análise Bromatológica das dietas

A análise bromatológica das dietas (padrão e hipercalórica) foi realizada no Laboratório de Bromatologia – Departamento de nutrição animal da Faculdade de Ciências Agrônômicas/ UNESP Campus Botucatu.

As análises químicas da composição de proteína, lipídios e carboidratos, bem como de energia metabolizável foram realizadas de acordo com a metodologia indicada pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC (2006). Os valores obtidos são expressos em kilocalorias (Kcal) e gramas para proteínas, lipídios e carboidratos, em 100g de ração (Quadro 1).

Quadro 1 – Composição centesimal média da ração

Componentes	Padrão		Hipercalórica	
	g/100g	kcal/100g	g/100g	kcal/100g
Proteína	24,88	99,52	23,6	94,4
Lipídio total	4,71	42,39	11,13	100,17
Carboidrato total	31,97	127,88	39,51	158,04
Energia Metabolizável	100	269,79	100	352,61

3) Obtenção das amostras

No final do período experimental (43 dias), os animais foram anestesiados (cloridrato de cetamina 10%, 0,1 mL/100g de peso corporal, i.p.) e sacrificados por decapitação. O sangue foi coletado e o soro separado por centrifugação a 6000 rpm, por 15 minutos, e utilizado para determinação de proteínas totais, glicose, triacilgliceróis, colesterol total, HDL-colesterol, VLDL-colesterol, LDL-colesterol (LDH). Após a retirada do sangue, o coração foi imediatamente retirado e lavado em solução tampão fosfato de sódio (0,01M; pH 7,0). As amostras de aproximadamente 100 mg de tecido cardíaco do ventrículo esquerdo foram estocadas em “freezer” à -80°C para determinação metabolismo energético e estresse oxidativo.

4) Determinações séricas

4.1) Determinação da glicemia

A glicose sanguínea, por ação da glicose-oxidase, é oxidada a ácido glicônico e forma peróxido de hidrogênio. Este peróxido de hidrogênio (H₂O₂) formado reage por ação da peroxidase com 4-aminoantepirina e com 1,4-diclorofenol. Por junção oxidativa forma-se aintipirilquinonimina, de cor vermelha. A intensidade de coloração foi proporcional à concentração de glicose (MOURA, 1982).

4.2) Determinação da concentração de triacilgliceróis

Os triacilgliceróis foram determinados através de sua hidrólise enzimática produzindo glicerol e ácidos graxos. Segundo Soloni (1971), o glicerol oxida-se com

ácido periódico a formaldeído, o qual foi quantificado colorimetricamente como 3,5 diacetil-1,4 diidrolutidina.

4.3) Determinação da concentração de colesterol total

O colesterol foi determinado enzimaticamente pela colesterol oxidase com hidrólise prévia dos ésteres mediante lipase. O peróxido de hidrogênio liberado, na oxidação, produz fenol oxidado e 4-aminofenazona, o qual foi quantificado (MOURA, 1982).

4.4) Determinação da concentração HDL-colesterol

A lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e a lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram precipitadas seletivamente pelo ácido fosfotungstíco. No sobrenadante, separado por centrifugação, estão as lipoproteínas de alta densidade (HDL), na qual se determinou o colesterol incorporado às mesmas (LOPES-VIRELLA et al., 1977).

4.5) Determinação da concentração de LDL e VLDL-colesterol

Os valores de LDL e VLDL-colesterol foram obtidos pela equação de Friedewald (VLDL=TG/5; LDL=CT-(HDL+VLDL) (COHN; ROTH, 1996).

5) Análises no Tecido Cardíaco

As amostras de aproximadamente 100mg de tecido cardíaco foram homogeneizadas em *Potter Elvehjem*, com pistilo de teflon, na presença de tampão fosfato de sódio (0,01M) pH 7,0. Os homogeneizados foram centrifugados a 12 000 xg, durante 30 minutos a -4°C (PEREIRA et al., 1998). O sobrenadante foi utilizado para a determinação dos marcadores do estresse oxidativo, atividade das enzimas do metabolismo energético e glicogênio.

5.1) Análise do Estresse Oxidativo: Marcadores do Estresse Oxidativo

5.1.1) Determinação da concentração de hidroperóxido de lipídio

Foi determinado através da oxidação do sulfato ferroso amoniacal (Fe^{2+}) na presença de alaranjado de xilenol, ácido sulfúrico e butilato hidroxitolueno (BHT) em metanol à temperatura ambiente. O Fe^{3+} reage com alaranjado de xilenol e forma

cromógeno, cuja intensidade de coloração foi medida espectrofotometricamente (JIANG et al., 1991).

5.1.2) Determinação da atividade da glutathiona peroxidase

A atividade da glutathiona peroxidase foi determinada segundo método de Nakamura et al. (1974) na presença de peróxido de hidrogênio. A mistura da reação foi preparada com tampão fosfato de sódio, NADPH₂, azida sódica, EDTA, glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona redutase. Através da oxidação do NADPH₂, na presença da glutathiona redutase, a qual catalisa a redução da glutathiona oxidada (GSSG), a atividade da GSH-Px, foi determinada.

5.1.3) Determinação da concentração da atividade da superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela técnica de Crouch et al. (1981), tendo como base a capacidade da enzima inibir a redução do nitroblue-tetrazólico (NBT) por radicais livres gerados pela hidroxilamina em meio alcalino (pH 10). A hidroxilamina gera fluxo de O₂⁻ do NBT para blue-formazana em temperatura ambiente. Quando a amostra foi adicionada, a velocidade de redução do NBT foi inibida, conforme a porcentagem de SOD presente na amostra.

5.1.4) Determinação da atividade da catalase

A atividade da catalase foi determinada em tampão fosfato de sódio e potássio 50mM, pH 7.0, utilizando 0,5mL de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). As leituras foram realizadas à 240nm (AEBI, 1974).

5.2) Análise do Metabolismo Energético

O metabolismo energético foi analisado através da atividade das enzimas regulatórias das vias metabólicas, lactato desidrogenase associadas à glicólise e ao metabolismo anaeróbico, a citrato sintase reguladora do fluxo de substrato através do ciclo do ácido cítrico e marcadora do metabolismo aeróbico. A β-hidroxiacil-CoA-desidrogenase corresponde a enzima reguladora da β-oxidação dos ácidos graxos.

5.2.1) Determinação da atividade da lactato desidrogenase

A atividade da lactato desidrogenase foi determinada segundo técnica de Wilkinson et al. (1965) utilizando o método UV otimizado, onde foi medida a velocidade

do consumo de NADH₂, tendo como substrato o piruvato, que foi proporcional à atividade da enzima presente na amostra.

5.2.2) Determinação da atividade da citrato sintase

A citrato sintase foi determinada a 412nm em tampão TRIS-HCl 50mM, pH 8,0, contendo acetil-CoA, dithiobis-2-nitrobenzoato (DTBN) 0,1mM e oxaloacetato 0,5 mM (BASS et al, 1969).

5.2.3) Determinação da atividade da β-hidroxiacil-CoA desidrogenase

Atividade da β-hidroxiacil CoA desidrogenase foi determinada em meio contendo acetoacetil coenzima A e NADH (BASS et al., 1969).

5.2.4) Determinação da Concentração do Glicogênio

Na determinação do glicogênio, amostras de 100mg de tecido cardíaco foram homogeneizadas (3000 rpm por 10 minutos) com ácido perclórico (0,6 mol/L). Do sobredanadante retirou-se uma alíquota (20μL) para determinar a concentração de glicose inicial e outra de 10μL, que recebeu amiloglicosidase juntamente com tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 4,5), e determinou a concentração de glicose final. A concentração de glicogênio (mg/g de tecido) foi determinada pela diferença entre as concentrações de glicose final e inicial, segundo Roehrig & Allred (1974). A concentração de glicose foi determinada segundo Moura (1982).

5.2.5) Determinação da Concentração de Proteínas Totais

A concentração de proteínas foi determinada utilizando o método de Biureto, onde as ligações peptídicas das proteínas reagem com íon cúprico, em meio alcalino, resultado em um complexo violeta, cuja intensidade de coloração foi proporcional à concentração de proteína totais na amostra do tecido cardíaco (MOURA, 1982).

6) Forma de análise dos resultados – Procedimento estatístico

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 8 repetições, segundo esquema da análise de variância (ANOVA):

C.V.	G.L.
Tratamentos	3
Resíduo	29
Total	32

O nível de significância adotado para as análises estatísticas foi de 5% de probabilidade e as estatísticas F foram significativas quando $p < 0.05$. Foi utilizado Teste de Tukey para a comparação entre as médias (ZAR, 1996).

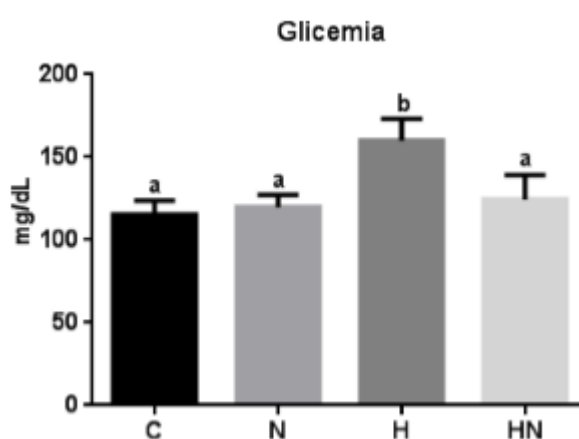
RESULTADOS

Tabela 1 – Resultados médios obtidos para ingestão hídrica (ml/dia), ingestão alimentar (g/dia), peso inicial (g), peso final (g), ganho de peso (g) e glicemia nos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros metabólicos	Grupos				Valor-p
	C	N	H	HN	
Ingestão hídrica	38,84±6,89b	39,22±3,17b	40,25±1,59b	31,47±2,94a	<0.0001
Ingestão alimentar	25,18±0,58ab	23,37±4,35a	26,73±1,40b	22,65±1,94a	<0.0001
Peso inicial	277,9±23,98a	270,0±23,64a	286,5±31,31a	251,60±28,70a	0.0876
Peso final	391,6±29,41a	404,80±21,40a	470,40±50,49b	379,10±42,06a	<0.0046
Ganho de peso	113,7±26,54a	131,7±14,99a	183,9±34,10b	127,5±17,73a	<0.0001
Glicemia	115,3±8,43a	119,9±7,32a	160,0±13,22b	124,60±14,64a	<0.0001

Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos. C= dieta normocalórica (controle); N= dieta normocalórica e tratamento com naringenina; H= dieta hipercalórica; HN=dieta hipercalórica e tratamento com naringenina.

Figura 6 – Resultados médios obtidos para a concentração da glicemia sérica nos diferentes grupos experimentais.



Pode-se verificar a partir da Tabela 1, que o tratamento com naringenina diminuiu significativamente a ingestão hídrica no grupo que recebeu a dieta

hipercalórica (HN) em relação aos demais grupos, os quais não diferiram entre si. A ingestão alimentar foi maior nos animais alimentados com dieta hipercalórica (H), porém sem diferença significativa com grupo controle. Enquanto os grupos tratados com naringenina (N) e (HN) também não diferiram entre si.

Nota-se que não houve diferença significativa no peso inicial, obtido na semana que iniciou a administração de naringenina. Contudo, os animais alimentados com dieta hipercalórica (H) obtiveram maior peso final ($p < 0,05$) em comparação aos demais grupos, no final do período experimental. Conseqüentemente isto refletiu também em maior ganho de peso para o grupo H, em relação aos demais grupos que não diferiram entre si, indicando que a dieta hipercalórica foi eficiente em acumular massa corpórea e a naringenina em controlar este acúmulo no grupo HN.

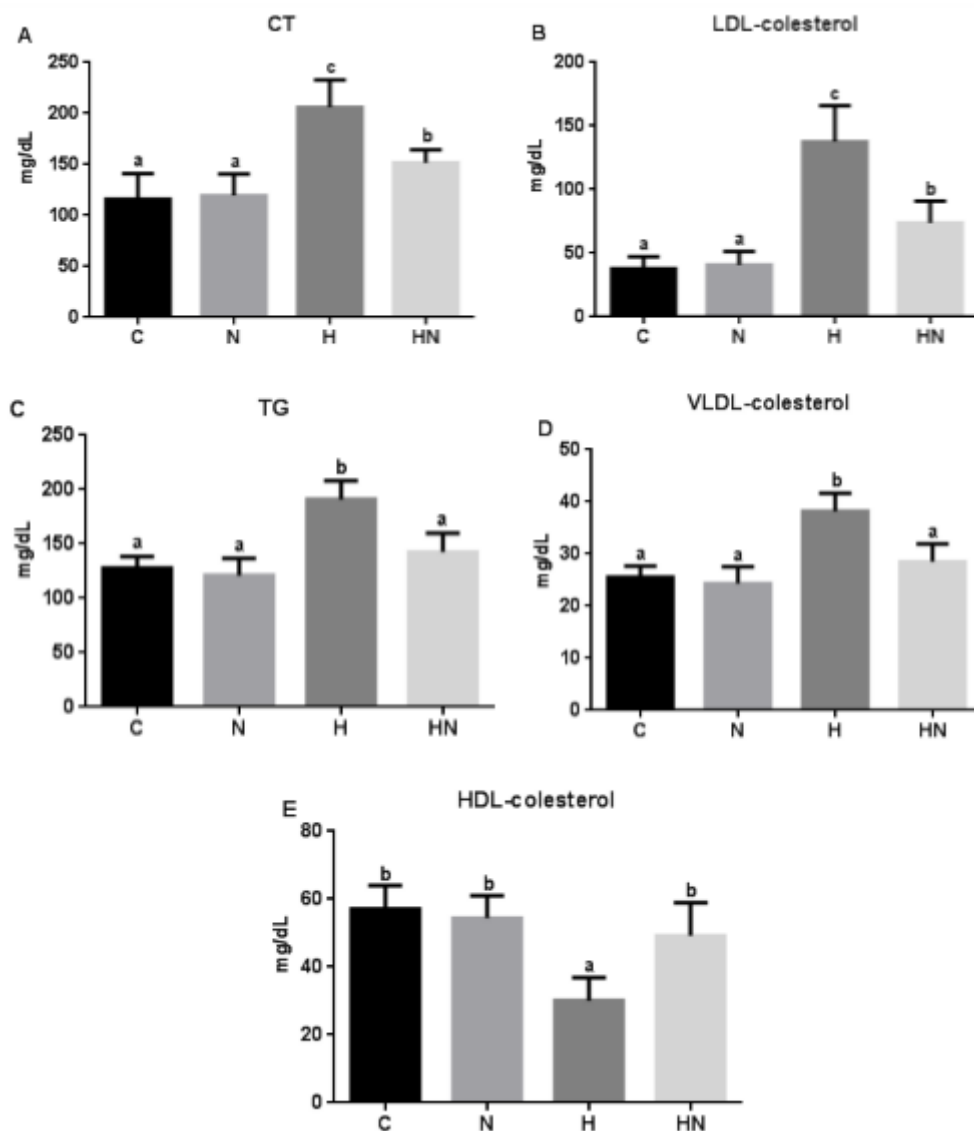
A concentração de glicose foi superior nos animais submetidos à dieta hipercalórica (H). Enquanto o tratamento com naringenina, em animais com dieta hipercalórica (HN), reduziu a glicemia a valores próximos àqueles obtidos para grupo controle C e N (Figura 6).

Tabela 2 - Resultados médios obtidos para a concentração sérica de colesterol total (CT), LDL-colesterol (LDL-c), triacilgliceróis (TG), VLDL-colesterol (VLDL-c) e HDL-colesterol (HDL-c) para os diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos				Valor-p
	C	N	H	HN	
CT (mg/dL)	116,1±24,98a	119,5±21,17a	206,0±26,78c	151,5±13,05b	<0.0001
LDL-c (mg/dL)	37,80±9,53a	40,71±10,53a	137,6±28,32c	73,79±17,31b	<0.0001
TG (mg/dL)	128,1±10,63a	120,8±15,99a	190,9±17,35b	142,5±17,42a	<0.0001
VLDL-c (mg/dL)	25,62±2,12a	24,36±3,17a	38,18±3,47b	28,51±3,48a	<0.0001
HDL-c (mg/dL)	57,14±6,88b	54,46±6,56b	30,20±6,68a	49,23±9,66b	<0.0001

Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos. C= dieta normocalórica (controle); N= dieta normocalórica e tratamento com naringenina; H= dieta hipercalórica; HN=dieta hipercalórica e tratamento com naringenina.

Figura 7 – Resultados médios obtidos para a concentração sérica de CT (A), LDL-colesterol (B), TG (C), VLDL-colesterol (D) e HDL-colesterol (E) para os diferentes grupos experimentais.



Na tabela 2 e figura 7 encontram-se os resultados obtidos para o perfil lipídico. A concentração sérica de colesterol total e LDL-colesterol aumentou significativamente nos animais alimentados com dieta hipercalórica (H) em relação aos demais grupos. Enquanto que o tratamento com naringenina em animais com dieta hipercalórica (HN) diminuiu ($p < 0.05$) os níveis séricos tanto de colesterol total como de LDL-colesterol, porém sem atingir os valores próximos aos obtidos para os

grupos que receberam dieta normocalórica na ausência (C) ou presença de naringenina (N) (Figura 7A e B).

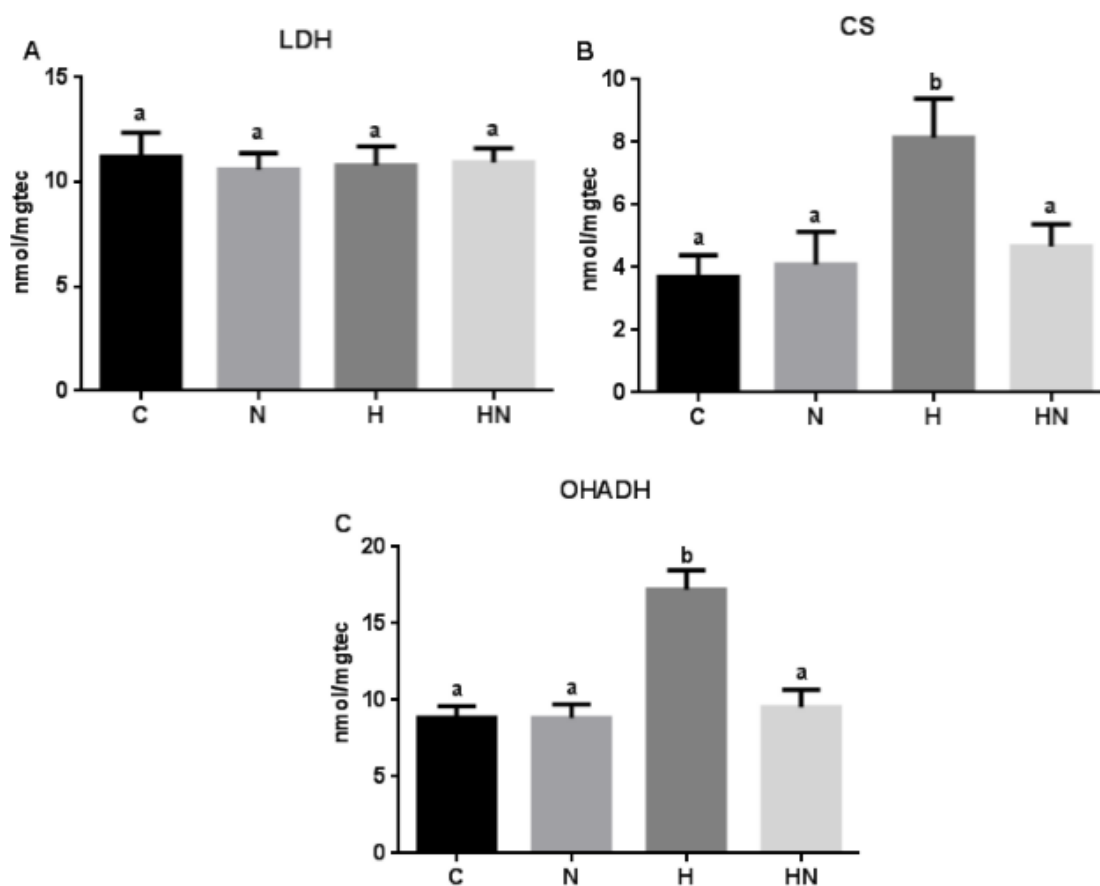
Os animais que receberam apenas dieta hipercalórica (H) apresentaram aumento significativo nos níveis séricos de triacilgliceróis e de VLDL-colesterol em relação aos demais grupos que não diferiram entre si (Figura 7C e D). A concentração de HDL-colesterol esteve diminuída em animais que consumiram dieta hipercalórica (H), comparativamente aos demais grupos (Figura 7E).

Tabela 3- Resultados médios obtidos para atividade da lactato desidrogenase (LDH), citrato sintase (CS) e β -hidroxil acil CoA desidrogenase (OHADH) no tecido cardíaco para os diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos				Valor-p
	C	N	H	HN	
LDH nmol/mgtec	11,22±1,13a	10,61±0,77a	10,79±0,91a	10,94±0,66a	0.5945
CS nmol/mgtec	3,70±0,69a	4,09±1,03a	8,14±1,24b	4,67±0,69a	<0.0001
OHADH nmol/mgtec	8,85±0,75a	8,83±0,90a	17,21±1,27b	9,53±1,15a	<0.0001

Valores expressos como média \pm desvio padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos. C= dieta normocalórica (controle); N= dieta normocalórica e tratamento com naringenina; H= dieta hipercalórica; HN=dieta hipercalórica e tratamento com naringenina.

Figura 8 – Resultados médios obtidos para a atividade de LDH (A), CS (B) e OHADH (C) para os diferentes grupos experimentais.



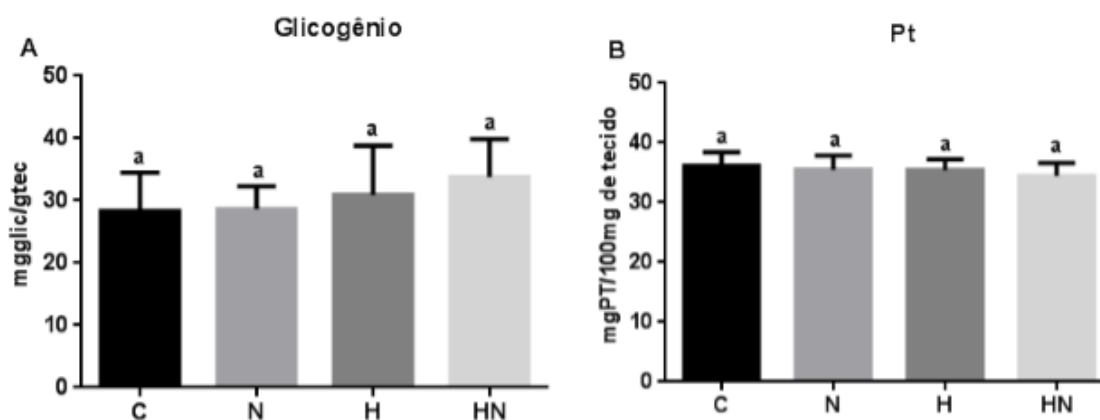
A Tabela 3 apresenta a atividade das enzimas-chave marcadoras de vias do metabolismo energético no tecido cardíaco. Observa-se ausência de significância para a atividade cardíaca da lactato desidrogenase entre os grupos estudados (Figura 8A). Enquanto as atividades da citrato sintase e da β - hidroxil acil CoA desidrogenase foram maiores significativamente nos animais que receberam dieta hipercalórica (H), em comparação aos demais grupos que não apresentaram diferenças significativas (Figura 8B e C). Nota-se redução na atividade dessas enzimas no tecido cardíaco de animais que consumiram a dieta hipercalórica e submetidos ao tratamento com naringenina (HN).

Tabela 4 - Resultados médios obtidos para concentração de glicogênio e proteínas totais no tecido cardíaco para os diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos				Valor-p
	C	N	H	HN	
Glicogênio mgglic/gtec	28,34±6,20a	28,64±3,69a	30,94±7,86a	33,79±6,11a	0.2990
Proteínas totais mgPt/100mgtec	36,17±2,27a	35,53±2,34a	35,42±1,86a	34,45±2,19a	0.4788

Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos. C= dieta normocalórica (controle); N= dieta normocalórica e tratamento com naringenina; H= dieta hipercalórica; HN=dieta hipercalórica e tratamento com naringenina.

Figura 9 – Resultados médios obtidos para a concentração de glicogênio (A) e Pt (B) no tecido cardíaco para os diferentes grupos experimentais.



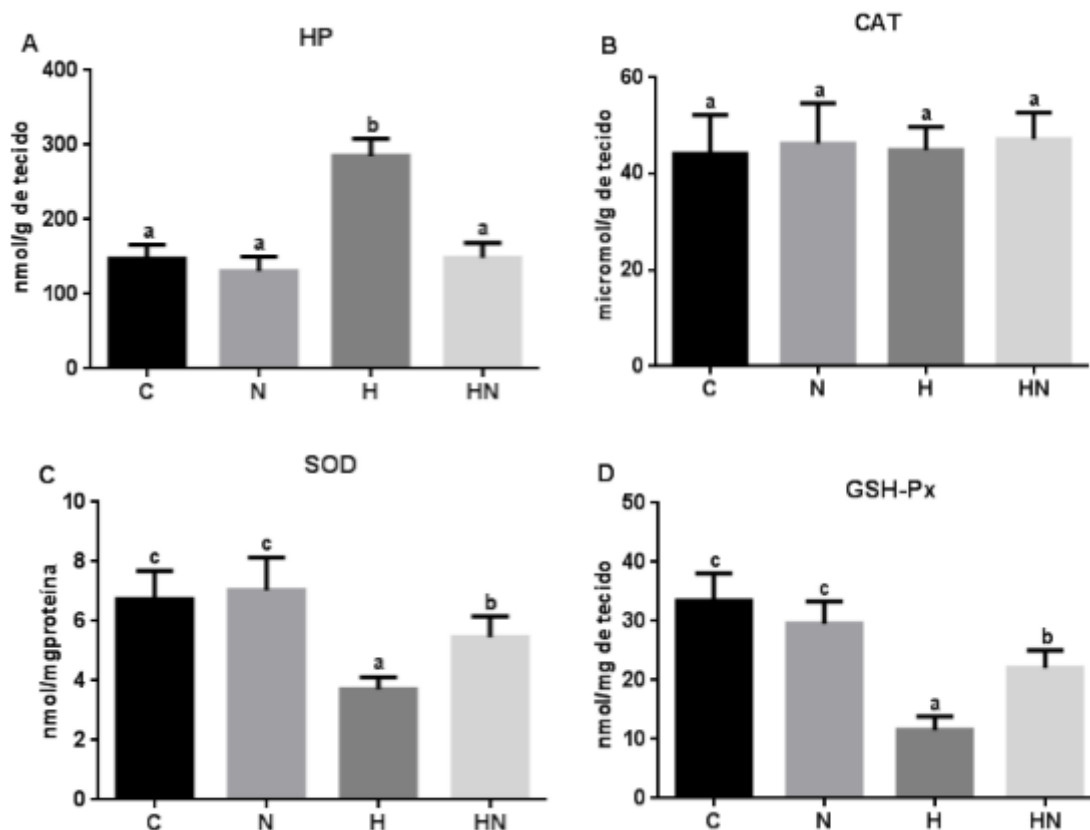
Tanto a concentração cardíaca de glicogênio como de proteínas totais não mostraram diferenças significantes entre os grupos experimentais (Figura 9 A e B).

Tabela 5 - Resultados médios obtidos para concentração de hidroperóxido de lipídio (HP), atividade da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e da glutathiona peroxidase (GSH-Px) no tecido cardíaco para os diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos				Valor-p
	C	N	H	HN	
HP nmol/gtec	147,9±18,21a	130,8±19,34a	285,2±23,05b	148,8±20,11a	<0.0001
CAT micromol/gtec	44,25±7,97a	46,31±8,38a	44,98±4,77a	47,22±5,51a	0,8216
SOD nmol/mgproteína	6,74±0,95c	7,03±1,10c	3,71±0,39a	5,46±0,69b	<0.0001
GSH-Px nmol/mgtec	33,48±4,62c	29,60±3,73c	11,57±2,32a	22,05±3,03b	<0.0001

Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos. C= dieta normocalórica (controle); N= dieta normocalórica e tratamento com naringenina; H= dieta hipercalórica; HN=dieta hipercalórica e tratamento com naringenina.

Figura 10 – Resultados médios obtidos para a concentração de HP (A), atividade da CAT (B), SOD (C) e da GSH-Px (C) para os diferentes grupos experimentais.



A Tabela 5 apresenta os parâmetros que avaliam os biomarcadores do estresse oxidativo no tecido cardíaco. A concentração de hidroperóxido de lipídio aumentou em animais submetidos somente à dieta hipercalórica (H) em relação aos demais grupos. Salienta-se diminuição nesse parâmetro àqueles animais que receberam dieta hipercalórica tratados com naringenina (HN) (Figura 10A).

A atividade da catalase não demonstrou diferença significativa entre os grupos experimentais (Figura 10B). Enquanto a atividade da superóxido dismutase e da glutatona peroxidase diminuiu significativamente no grupo submetido à dieta hipercalórica (H). O tratamento com naringenina aumentou a atividade dessas enzimas no grupo que recebeu dieta hipercalórica (HN). No entanto, o maior valor observado para atividade da superóxido dismutase foi obtido para os animais tratados

com naringenina (N), e para atividade da glutathiona peroxidase foi obtido para o grupo controle (C) (Figura 10C e D).

DISCUSSÃO

Dados epidemiológicos revelaram que a obesidade já alcançou índices alarmantes com alta prevalência, sendo considerada problema de saúde pública. A obesidade e o excesso de peso atingem um terço da população mundial. Estudos estimam que se a prevalência continuar pelos próximos anos, em 2030 cerca de 38% da população adulta terá sobrepeso, enquanto, 20% será obesa. No Brasil, o custo com a saúde pública em 2010 foi de 2,1 bilhões de dólares, considerando pacientes internos e externos. Sendo que, 68,4% são apenas com hospitalizações. Estima-se ainda, que uma redução de 5% no índice de massa corporal da população brasileira pode economizar 57 bilhões de dólares (HRUBY & HU, 2015). Dentre o estilo de vida inadequado, de grande parte da população mundial, o consumo de dietas hipercalóricas e desbalanceadas, contribui para aumentar o número de pessoas com sobrepeso e/ou obesidade. Para a prevenção e tratamento, vários modelos de obesidade experimental têm sido propostos com o objetivo de investigar aspectos metabólicos que estão associados a suas causas e consequências (JURDAK & KANAREK, 2009).

No presente estudo, apesar de o grupo H ter obtido um ligeiro aumento na ingestão hídrica, não houve diferença em comparação aos grupos C e N (Tabela 1).

Desde que a ingestão alimentar pelos animais do grupo H não diferiu significativamente do grupo controle, o peso corporal e o ganho de peso no final do período experimental, observados nesses animais, foram associados ao elevado teor energético da dieta hipercalórica (352,61Kg/100g), comparada à dieta padrão (269,79kg/100g) (Tabela 1). Resultados são concordantes com a literatura ao demonstrar que animais alimentados com dieta hipercalórica por aproximadamente oito meses apresentaram aumento no peso corporal (YAN et al., 2014). A indução da obesidade foi evidenciada em animais mantidos com dieta rica em sacarose (SOUZA et al., 2008). De maneira geral, quando há desequilíbrio metabólico, onde a energia ingerida excede o gasto energético (balanço energético positivo), provoca um aumento no acúmulo de lipídios no tecido adiposo caracterizando a obesidade (PAN; GAO; TU, 2016).

A dieta ocidental está relacionada à obesidade, pois é composta pelo alto consumo de açúcar refinado, ácido graxo saturado, ácido graxo trans, elevada razão de ácido graxo poliinsaturado n-6:n-3, e menor ingestão de vegetais, peixes e cereais (LACROIX et al., 2012).

A obesidade apresenta um elevado teor de tecido adiposo branco, responsável por estocar ácidos graxos na forma de triacilgliceróis, associado a intolerância à glicose e a redução da saciedade (FERREIRA et al., 2016).

Devido ao excesso de lipídio na obesidade ocorre um aumento de ácido graxo livre sérico, prejudicando o metabolismo da glicose, com isso o acúmulo de substrato energético é estocado no fígado, músculo e tecido adiposo (MARSEGLIA et al., 2014). Há evidências que dieta rica em colesterol induz ativação de fatores de transcrição inflamatórios (CHTOUROU et al., 2015). Citocinas geradas pelo tecido adiposo na obesidade como fator de necrose tumoral (TNF α) podem aumentar a lipogênese hepática e prejudicar a sinalização de insulina (MARSEGLIA et al., 2014).

A hiperglicemia foi evidenciada no grupo H (Tabela 1 – Figura 6). Estes resultados estão de acordo com Kannappan e Anuradha (2010) ao mostrarem que animais alimentados com dieta rica em frutose aumentou a glicose sérica, devido a diminuição de glicose disponível no tecido em virtude de dano na ação de insulina.

Citocinas inflamatórias como TNF α e interleucina (IL-6) podem levar à uma resistência insulínica e aumento da glicemia devido à uma disfunção do receptor periférico dos tecidos respondíveis à insulina. Assim como, a dieta hipercalórica é outro fator que pode exacerbar citocinas inflamatórias resultando em resistência insulínica e conseqüentemente a hiperglicemia (ALAM et al., 2014).

O sobrepeso ou a obesidade provoca uma desregulação do tecido adiposo e glicotoxicidade tanto nas células hepáticas como nas ilhotas pancreáticas, predispondo à disfunção das células β pancreáticas e resistência insulínica (MARSEGLIA et al., 2014).

Neste estudo, a suplementação com naringenina diminuiu a ingestão hídrica e alimentar em animais submetidos a dieta hipercalórica (HN), obtendo valores menores àqueles observados nos grupos controle (C) e naringenina (N). Houve também redução tanto no peso corporal final como no ganho de peso corporal de animais do

grupo hipercalórico tratado (HN), porém sem atingir valores próximos ao grupo controle (C) (Tabela 1).

Os flavonóides possuem efeito anti-obesidade atuando sobre receptores β_3 como agonista adrenérgico conhecido como octapamina e sinefrina (agonista α adrenérgico e β adrenérgico), efeito semelhante à epinefrina e norepinefrina. Esta ação aumenta a termogênese e conseqüentemente eleva a β oxidação dos ácidos graxos que estão esterificados em triacilgliceróis, controlando de certa forma, o peso corporal, o que resulta em menor ganho de peso (RUPASINGHE et al., 2016). Além disso, estudos demonstraram que polifenóis podem utilizar o estoque de lipídio do tecido adiposo como fonte de energia através do aumento da atividade mitocondrial e de forma recíproca o impedimento da lipogênese (FERREIRA et al., 2016).

O mecanismo de ação da naringenina na perda de peso pode ser explicado pela super expressão em níveis de receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR α), proteína envolvida na β oxidação. Também reduz a adiposidade, aumenta a CPT-1 e atenua o processo inflamatório (ALAM et al., 2014). O estímulo da expressão de genes associados a lipólise permite reduzir o acúmulo de tecido adiposo visceral e subcutâneo, genes de expressão inflamatórios do tecido adiposo e a hipertrofia adiposa (MULHIVILL; BURKE; HUFF, 2016).

A proteína relacionada com a diferenciação de adipócitos (ADRP) estimula o acúmulo de lipídio e a formação de partículas de lipídio. O polifenol diminui a expressão gênica da proteína, sugerindo um efeito positivo na prevenção da obesidade (PAN; GAO; TU, 2016).

Neste estudo, a hiperglicemia foi atenuada com a suplementação de naringenina no grupo hipercalórico (HN), no entanto, não foi possível atingir valores semelhantes ao grupo controle (C) e naringenina (N) (Tabela 1 – Figura 6). Corroborando com Roslan et al. (2016) ao comprovar o efeito hipoglicêmico da quercetina em ratos diabéticos.

Um mecanismo proposto pela naringenina em reduzir a glicemia e aumentar a secreção de insulina é a redução da expressão de receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) e a atividade da enzima glicoquinase, enzima responsável pela utilização de glicose (TESTAI; CALDERONE, 2017). O receptor

nuclear PPAR γ é crucial na regulação do estoque de lipídio, adipogênese e na lipólise. A obesidade induzida por resistência insulínica está conectada à uma desregulação do PPAR γ (PANIAGUA, 2016).

A naringenina possibilita a melhora da resistência insulínica por aumentar a oxidação de ácido graxo hepático e a utilização da glicose pelos tecidos periféricos, em especial, o músculo (MULVIHILL; HUFF, 2012). Dessa forma, estudos mostram relação entre a melhora da tolerância à glicose, resistência insulínica hepática e sensibilidade insulínica com a ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) hepático em animais alimentados com dieta hipercalórica ou dieta rica em sacarose (MULVIHILL; BURKE; HUFF, 2016).

Outro efeito hipoglicêmico dos polifenóis é promover um aumento no aporte de glicose pelos adipócitos e músculos esqueléticos translocando a proteína transportadora de glicose (GLUT4) para membrana plasmática. Além de inibir a proliferação e diferenciação dos adipócitos (FERREIRA et al., 2016).

O principal fator associado à obesidade e desordem metabólica é a dislipidemia que compreende elevação dos níveis séricos de triacilgliceróis e LDL-colesterol e diminuição dos níveis séricos de HDL-colesterol. Estes fatores apresentam relação com esteatose hepática, disfunção de células β do pâncreas e principalmente estão associados à fatores importantes de alto risco para o desenvolvimento da aterosclerose (ALAM et al., 2014; IGLESIA et al., 2016).

No presente estudo, os animais do grupo hipercalórico (H) apresentaram hiperlipidemia, obtendo níveis séricos elevados de colesterol total, LDL-colesterol, triacilgliceróis e VLDL-colesterol (Tabela 2 – Figuras 7 A, B, C, D) e concentração sérica diminuída de HDL (Tabela 2 – Figura 7 E). Esses resultados são respaldados com literatura. Kannappan e Anuradha (2010) observaram elevação de triacilgliceróis em ratos alimentados com dieta hipercalórica rica em frutose. Enquanto Belguith-Hadriche et al. (2010) comprovaram a hiperlipidemia em ratos alimentados com dieta suplementada com colesterol.

Sabe-se que dietas hipercalóricas aumentam a expressão hepática de enzimas lipogênicas como ACC1 (ácido 1-carboxílico-aminociclopropano), FAZ (ácido graxo sintase), SCD-1 (estearoil-CoA desaturase), HMG-CoA redutase (hidroximetilglutaril

CoA), SREBP1c (proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol) e assim podem influenciar o perfil lipídico no plasma sanguíneo. A ACC1 atua na fase inicial da síntese de ácido graxo, ou seja, na carboxilação do acetil-CoA convertendo-se em malonil-CoA, a FAS na fase final na lipogênese *de novo* e a SCD-1 produz ácidos graxos monoinsaturados que são esterificados em triacilgliceróis, os quais podem ser estocados patologicamente no fígado, ou incorporados em VLDLs-colesterol e lançados na corrente sanguínea. E finalmente, a SREBP1c tem papel reguladora na expressão dessas enzimas e, portanto, no controle da biossíntese hepática de ácidos graxos (YAN et al., 2014). Além disso, a ingestão excessiva de açúcares simples favorece a biossíntese de ácidos graxos e glicerol, e conseqüentemente de triacilgliceróis, o que pode estar atrelado ao aumento de triacilgliceróis sérico (TASKINEM & BÓREN, 2015).

Contudo, os lipídios provenientes da dieta são incorporados em quilomícrons e transportados para os tecidos adiposo e muscular, incluindo o cardíaco. Nesses tecidos, sob atuação da lipase lipoproteica, os triacilgliceróis são hidrolisados em ácidos graxos, os quais são internalizados pela célula, onde podem ser oxidados ou reesterificados em triacilgliceróis (TASKINEM & BÓREN, 2015; PAN; GAO; TU, 2016).

Tanto os triacilgliceróis endógenos, os sintetizados, como os exógenos, provenientes da dieta, são incorporados no fígado em VLDLs e liberadas para a corrente sanguínea, assim quanto maior a biossíntese e ingestão de lipídios maior será a concentração plasmática de VLDLs (WU & PARHOFER, 2014).

A literatura demonstra que o principal mecanismo envolvido na dislipidemia é a superprodução de VLDL-colesterol, desde que a formação desta lipoproteína depende da velocidade de síntese de triacilgliceróis (BÓREN et al., 2013).

Considerando que a LDL-colesterol é derivada da VLDL-colesterol, um desbalanço entre a produção de VLDL e o clearance pode aumentar a concentração de LDL-colesterol no plasma sanguíneo (ROBERTS et al., 2002; VARBO; BENN; NORDESTGAARD, 2014).

A hipercolesterolemia induz a modificação e oxidação de LDL pelo radical ânion superóxido gerados pelo excesso desta lipoproteína. Na camada subendotelial, os macrófagos captam as LDL oxidadas e se transformam em células espumosas que

estão relacionadas com a formação da placa de ateroma. Além disso, essas células produzem citocinas, marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, levando ao rompimento na homeostase do endotélio e conseqüentemente à disfunção endotelial. O início da aterosclerose se dá ao acúmulo de éster de colesterol, presente nas LDLs-colesterol, na artéria intimal (ADEGBOLA et al., 2017).

Além disso, a expressão da HMG-CoA redutase (enzima chave da biossíntese de colesterol) é estimulada pela insulina, liberada no estado absorptivo, assim há contribuição significativa para aumentar o nível plasmático de LDL-colesterol (ROBERTS et al., 2002; ALAM et al., 2014).

Por sua vez, as HDLs-colesterol são afetadas pelo aumento tanto de VLDL-colesterol como pela CEPT (proteína de transferência do colesterol esterificado), ambos os fatores favorecidos na presença de dietas hipercalóricas. As alterações na composição e funcionalidade originam HDLs-colesterol menores e densas, cujo catabolismo é acelerado, o que provoca queda na concentração sérica dessas lipoproteínas (TASKINEM & BÖREN, 2015). Além disso, baixos níveis de HDL-colesterol estão associados à resistência insulínica e anormalidades na homeostasia da glicose (WU & PARHOFER, 2014).

Wu & Parhofer (2014) e Taskinem & Bören (2015) relacionaram hipertrigliceridemia e a resistência insulínica com a redução da HDL e o aumento da LDL, fatores que caracterizam a dislipidemia.

No presente estudo, a naringenina atenuou a dislipidemia em animais do grupo hipercalórico (HN) reduzindo as concentrações séricas de colesterol total, LDL-colesterol, triacilgliceróis e VLDL-colesterol (Tabela 2 – Figura 7 A, B, C, D). No entanto, apenas os valores para triacilgliceróis e VLDL-colesterol atingiram valores próximos aos obtidos pelos animais dos grupos C e N.

Esses resultados corroboram com os obtidos por Belguith-Hadrich et al. (2010) ao constatarem melhora na dislipidemia com a administração de flavonóides. Os autores atribuíram à redução do nível de colesterol devido tanto ao aumento da formação e excreção de ácidos biliares como pela diminuição na esterificação de colesterol.

Estudos mostraram que a suplementação de naringenina foi eficiente em diminuir a atividade da HMG-CoA, SREBP1c e a lipogênese hepática. Com a redução da síntese de triacilgliceróis no tecido hepático, ocorre conseqüentemente melhora na dislipidemia, pois há queda na concentração sérica tanto de triacilgliceróis como de VLDL-colesterol e LDL-colesterol (ALAM et al., 2014). Além disso, foi verificado que a produção de quilomícrons foi diminuída na presença do polifenol, indicando menor absorção de triacilgliceróis e de colesterol provenientes da dieta (TASKINEM & BÓREN, 2015).

Observou-se também que a naringenina foi eficiente em aumentar a oxidação de ácidos graxos concomitantemente à ativação de PPAR, o qual também foi responsável por aumentar os níveis de HDL-colesterol, sensibilidade insulínica e diminuir a adiposidade (ASSINI; MULVIHILL; HUFF, 2013; ORHAN et al., 2015).

O efeito hipolipemiante da naringenina também pode ser atribuído à inibição da atividade tanto da acetil-CoA carboxilase como da HMG-CoA redutase, responsáveis, respectivamente, pela síntese de triacilgliceróis e colesterol, através da proteína AMPK que regula a síntese desses lipídios (PAN; GAO; TU, 2016).

Adicionalmente, Orhan et al. (2015) descreveram que a habilidade da naringenina em reduzir o colesterol e o triacilglicerol pode ser devido a sua ação inibitória em carrear carboidratos ao intestino delgado, desta forma, menos precursores biossintéticos. Os mesmos autores relataram que a naringenina reduziu a infiltração de macrófago, marcadores de inflamação, formação de células espumosas na camada subendotelial, diminuindo a probabilidade de desenvolvimento da aterosclerose (ORHAN et al., 2015).

Neste estudo, o tratamento com naringenina em animais submetidos a dieta hipercalórica e tratados com naringenina (HN) demonstrou aumento na concentração sérica de HDL-colesterol (Tabela 2 – Figura 7 E).

A HDL é considerada uma fração lipoproteica antiaterogênica, devido a sua função no transporte reverso de colesterol, é anti-inflamatória e protege contra a modificação da partícula de LDL-colesterol, garantindo a sua internalização celular (GRUNDY, 2004). Além disso, a atuação de polifenóis em receptores nucleares

previne o acúmulo de colesterol, por estimular o transporte reverso de colesterol e a conversão do colesterol em ácido biliar pelo fígado (PAN; GAO; TU, 2016).

De maneira geral os flavonoides cítricos demonstraram um conjunto de ações antiaterogênicas, incluindo inibição da expressão de moléculas de adesão vascular intercelular e da proteína quimioatrativa de monócito, além de inibir oxidação de LDL-colesterol e reduzir a atividade da ACAT (acil colesterol transferase) (ALAM et al., 2014; TESTAI & CALDERONE, 2017).

Portanto a combinação de obesidade (em especial a abdominal), hiperglicemia e a dislipidemia (IGLESIA et al., 2016), são fortes fatores que induzem dano cardíaco. E os flavonoides se mostram promissores em reduzir danos ou restaurar as condições desfavoráveis e amenizar os fatores de risco para os acidentes cardiovasculares.

A enzima lactato desidrogenase catalisa a conversão do piruvato em lactato, dependente de NAD na via glicolítica anaeróbica (WASHINGTON et al., 2014). Apesar da dieta rica em colesterol induzir alteração na atividade da lactato desidrogenase no miocárdio (CHTOUROU et al., 2015). Considerando que esta enzima é um biomarcador de dano cardíaco (KHATUA et al., 2012), no presente estudo não foi observada diferença significativa na atividade da lactato desidrogenase no tecido cardíaco entre os grupos analisados (Tabela 3 – Figura 8 A). Estes dados sugerem que o tecido cardíaco não está utilizando o metabolismo anaeróbio para obtenção de energia.

A citrato sintase é uma enzima marcadora do ciclo do ácido cítrico e, portanto, também é frequentemente utilizada para verificar o metabolismo energético aeróbico. Esta enzima catalisa a condensação do acetil CoA com o oxaloacetato. Desde que o tecido cardíaco é essencialmente aeróbico, a análise catalítica desta enzima torna-se importante, além da atividade da enzima β hidroxil acil CoA, marcadora do processo mitocondrial a β - oxidação, pois o coração obtém 70% de ATP através da oxidação de ácido graxo (PARIHAR & PARIHAR, 2016).

No presente estudo, a atividade tanto da citrato sintase como da β hidroxil acil CoA desidrogenase aumentaram no tecido cardíaco dos animais pertencentes ao grupo hipercalórico (H) (Tabela 3 – Figura 8 B e C).

Sabe-se que a oxidação excessiva de ácidos graxos, proveniente de dieta hipercalórica promove desregulação do ciclo de ácido cítrico e da fosforilação oxidativa. Desta forma, há comprometimento da respiração mitocondrial do coração e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs produzidas podem ativar as vias da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e fator nuclear Kappa Beta (NF-Kb), que estão associadas ao estresse oxidativo e inflamação (YAN et al., 2014).

Estudo envolvendo animais alimentados com dieta hipercalórica demonstrou baixa regulação de genes associados a β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos, acompanhada por elevada β oxidação, além de alterações nas vias do PPARs, vias PGCs e proteínas de desacoplamento entre transporte de elétrons e fosforilação da ADP + Pi (VALDECANTOS et al., 2011).

Desde que a função sistólica e diastólica do coração depende de ATP, decréscimo no metabolismo energético, com queda na produção de ATP, provoca uma insuficiência cardíaca. Visto que, prejuízos na bioenergética indicam agravamento no mecanismo funcional do órgão, levando à várias patologias que podem acometer o miocárdio (PARIHAR & PARIHAR, 2016).

A suplementação de naringenina em animais que receberam dieta hipercalórica (HN) reduziu a atividade tanto da citrato sintase como da β hidroxil acil CoA desidrogenase no tecido cardíaco, revelando que o flavonóide foi eficiente em regular a atividade desta enzimas e conseqüentemente o metabolismo aeróbico.

Estudos prospectivos (WANG et al., 2014) demonstraram que os polifenóis reduzem a ingestão de alimento, melhoram o processo inflamatório, inibem a síntese de triacilgliceróis, aumentam a lipólise e a β -oxidação. Os autores ainda relataram que os flavonóides apresentam a capacidade de inibir a diferenciação de pré-adipócitos e, portanto, diminuir a proliferação de adipócitos. Assim reduzem o tamanho e o número de adipócitos, melhorando a porcentagem de massa adiposa. No presente estudo, a redução da atividade da citrato sintase e da β hidroxil acil CoA desidrogenase com a suplementação de naringenina, indica que houve diminuição da oxidação de substrato energético (glicose e ácidos graxos), os quais foram provenientes da dieta hipercalórica. Acrescenta-se, que esses animais (HN) também apresentaram menor ingestão alimentar, indicando menos substratos oxidáveis disponíveis no miocárdio.

Devido a consequências derivadas de alterações do metabolismo energético, estudos utilizando polifenóis tem despertado grande interesse na pesquisa, em virtude a sua capacidade de afetar e modular diretamente a atividade da cadeia respiratória (SANDOVAL-ACUNA; FERREIRA; SPEISKY, 2014).

Destaca-se o direcionamento dos flavonóides sobre atuação às proteínas alvos de genes adipogênicos e lipogênicos como PPAR γ , SREBP-1, CCAAT (enhancer binding protein α - C/EBP α), ácido graxo sintase (FAS) e acetil coenzima CoA carboxilase (ACC) (WANG et al., 2014). Todas essas enzimas/proteínas estão relacionadas diretamente com o controle do catabolismo e biossíntese do metabolismo de lipídios.

A literatura descreve vários mecanismos de ação dos flavonóides sobre o metabolismo energético através da inibição ou ativação de certas proteínas específicas. A adipogênese pode ser inibida pela quercetina ao ativar a proteína quinase, a qual é ativada pelo AMP (AMPK), e diminuindo a expressão de CCAAT (enhancer binding protein α - C/EBP α), PPAR γ e SREBP-1 (IGLESIA et al., 2016). Isto poderia culminar com a redução da citrato sintase, verificada no presente estudo, e consequentemente baixa atividade do ciclo do ácido cítrico.

A AMPK é reguladora tanto do processo catabólico, ou seja, oxidação de ácido graxo e glicólise, como também do processo anabólico, por exemplo, a lipogênese. A função mitocondrial pode ser aumentada através da modulação da atividade desta proteína, bem como, da expressão da SIRT1 (ILKUN & BOLDINA, 2013). A AMPK na forma fosforilada, inibe a acetil CoA carboxilase, enzima limitante na síntese de malonil CoA e, portanto, causa diminuição da síntese de ácido graxo (CAO et al., 2015).

A suplementação da naringenina em camundongos alimentados com dieta hipercalórica apresentou uma redução na expressão hepática de gene de SREBP1c, FAS, ACC, PPAR γ , e aumento na expressão de PPAR α , CTP-1 α , SCD-1, através do aumento da expressão de AMPK. Demonstrando que a síntese de ácido graxo esta inibida, enquanto a β oxidação está estimulada (PU et al., 2012).

Por outro lado, foi verificado que os polifenóis atuam aumentando a atividade de AMPK, levando ao conseqüente controle da β -oxidação, simultaneamente a

regulação da expressão da carnitina palmitoiltransfera 1 (CPT-1) e inibindo a produção de malonil-CoA. Esta regulação se dá ao prevenir a degradação intracelular de adenosina mono fosfato cíclico (AMPc) através da inibição da enzima fosfodiesterase (WANG et al., 2014; RUPASINGHE et al., 2016;).

No momento que a AMPK é ativada e fosforilada pelo polifenol, se liga em PGC-1 α , que foi ativado pela SIRT1 através do aumento de cAMP. A PGC-1 α é reguladora da função e biogênese mitocondrial (WANG et al., 2014).

Os efeitos evidenciados, a partir desses mecanismos celulares, resultam na efetividade dos flavonóides em melhorar a disfunção cardíaca, tal como, hipertrofia ventricular, deposição de colágeno, pressão arterial, disfunção diastólica, infiltração de células inflamatórias e acúmulo de lipídios cardíaco, mesmo no dano induzido por hipercolesterolemia (ILKUN & BOLDINA, 2013; CSONKA et al., 2015;). Também, a literatura demonstra melhora na atividade do complexo enzimático respiratório IV e nas demais enzimas do ciclo do ácido cítrico, em especial na funcionalidade da citrato sintase (FORBES-HERNANDEZ et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016).

O glicogênio é estocado na forma de polímeros de moléculas de glicose no músculo e fígado. Esse estoque ocorre por meio da captação de glicose através da translocação de transportadores GLUT4 pela membrana plasmática, processo mediado pela insulina. A glicose é fosforilada em glicose-6-fosfato e metabolizada pela glicogênio sintase (GREENBERG et al., 2006).

O glicogênio é uma fonte rápida de glicose para o tecido cardíaco para manter sua homeostasia. A degradação do glicogênio é catalisada pela glicogênio fosforilase que cliva a ligação α 1-4 da cadeia para remover moléculas de glicose (GREENBERG et al., 2006; MILUTINOVIC; ZORC-PLESKOVIC, 2012;).

Embora a literatura tenha relatado que dietas hipercalóricas e ricas em carboidratos possam diminuir significativamente o glicogênio cardíaco (NOVELLI et al., 2009; MANSOR et al., 2013; LIU; LLOYD, 2013), no presente estudo, não houve diferença na concentração de glicogênio cardíaco entre os grupos experimentais (Tabela 4 – Figura 9 A). Mostrando assim que o miocárdio não está utilizando as moléculas de glicose provenientes do glicogênio como fonte principal de energia.

Por outro lado, sabe-se que no jejum há disponibilidade de glicose do glicogênio cardíaco para a via glicolítica, além de aumento na oxidação de ácido graxo. O excesso de glicogênio pode causar danos estruturais e fisiológicos, mudança de pH, desbalanço iônico e o estímulo de vias que resultam em hipertrofia (MILUTINOVIC & ZORC-PLESKOVIC, 2012).

É evidente que alterações de vias metabólicas no miocárdio podem ser determinantes para o desenvolvimento de doenças metabólicas e a elevação do risco de insuficiência cardíaca (DERVISEVIK et al., 2014).

Manifestações clínicas comumente observadas como alteração de tamanho, massa, geometria e função cardíaca compõem o resultado do remodelamento proveniente de uma agressão ou condição de sobrecarga ao coração. Acompanhado também de modificações celulares, moleculares e intersticial (MARTINS et al., 2015).

Contudo, a literatura demonstra que a adiposidade e obesidade está fortemente associada ao aumento de massa do ventrículo esquerdo. Ocasionado pelo aumento na deposição de colágeno intersticial e conseqüentemente levando ao remodelamento concêntrico deste (LEOPOLDO et al., 2010; REIS et al., 2014).

Neste estudo, também não houve diferença na concentração de proteínas totais no tecido cardíaco (Tabela 4 – Figura 9 B), mostrando que apesar das alterações bioquímicas, que possivelmente alteram a função cardíaca, não ocorreram alterações na massa proteica e conseqüentemente na estrutura. Estes resultados corroboram com as observações de Novelli et al. (2009).

Outro fator associado às doenças cardiovasculares é estado de estresse oxidativo (CHTOUROU et al., 2015).

Nos processos aeróbicos, durante a fosforilação oxidativa, eventualmente uma pequena fração de elétrons pode escapar dos complexos respiratórios I e III e reduzir parcialmente o oxigênio molecular e formar as espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente ânions superóxidos, que posteriormente, convertem em peróxidos de hidrogênio (CHEN et al., 2013). A produção de EROs é proporcional a quantidade de coenzimas reduzidas liberadas durante os processos oxidativos celulares (10 NADH:2 FADH para glicose e 12 NADH:6 FADH para ácido graxo de seis átomos de carbono) (LEVERVE, 2007).

O superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o óxido nítrico (NO) são espécies reativas produzidas fisiologicamente, que combinadas entre si geram espécies altamente reativas como radical hidroxil, peroxinitrito, e oxigênio singlete. Estes podem atacar lipídios, proteínas e DNA (MAHJOUB & MASROUR-ROUDSARI, 2012).

A oxidação tanto da glicose como de ácidos graxos também pode ativar a produção de EROs pela via NADPH oxidase.

A concentração de hidroperóxido de lipídio no tecido cardíaco do grupo H foi maior, comparativamente aos demais grupos (Tabela 5, Figura 10A). O hidroperóxido de lipídio é formado na fase de propagação da lipoperoxidação, quando ocorre oxidação dos lipídios. Os ácidos graxos insaturados são vulneráveis a ação das EROs, devido a maior exposição dos átomos de hidrogênio (AHMED, 2005; JENEY et al., 2005). Portanto, o alvo do ataque de ERO e da peroxidação lipídica são os lipídios presentes em membranas celulares (MAHJOUB & MASROUR-ROUDSARI, 2012). Além disso, o acúmulo de gordura visceral induz a peroxidação lipídica através do excesso de ácido graxo livre e de citocinas que estimulam o dano oxidativo (MARSEGLIA et al., 2015).

Desde que a peroxidação lipídica é marcada pelo elevado nível de hidroperóxido de lipídio (RAMESH & PUGALENDI, 2005), estes resultados comprovam de certa forma, o estabelecimento do estresse oxidativo em animais submetidos a dieta hipercalórica (rica em carboidrato e lipídio).

Este resultado corrobora com Chtourou et al. (2015) que observaram aumento da taxa de espécies reativas de oxigênio intracelular correlacionado com o aumento da peroxidação lipídica em ratos alimentados com dieta rica em colesterol, acompanhada por disfunção cardíaca.

O tratamento com naringenina normalizou a concentração de hidroperóxido de lipídio no tecido cardíaco do grupo HN, obtendo valores próximos ao grupo C. Pode-se observar que a naringenina foi eficiente em atenuar o estresse oxidativo provocado por dieta hipercalórica. Considerando que o hidroperóxido de lipídio é um biomarcador de estresse oxidativo.

Devido a ação de sequestrar radicais livres, a naringenina pode prevenir o ataque em aminoácidos diminuindo assim a produção de grupos carbonil. Sua natureza polar confere uma maior aderência na bicamada lipídica, facilitando a proteção de membrana e reduzindo a produção de radicais livres (JAYARAMAN; VEERAPPAN; NAMASIVAYAM, 2009).

Quando a produção de EROS excede a capacidade antioxidante, leva ao estresse oxidativo, que provoca danos às macromoléculas, comprometendo a função celular e tecidual (LACROIX, 2012).

As células para a remoção das EROs dispõem de sistemas antioxidantes enzimáticos endógenos que neutralizam a ação dos radicais livres (BRYAN et al., 2013). Este sistema é representado pela superóxido dismutase, que constitui a primeira linha de defesa contra a ação de ERO e catalisa a dismutação do ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), primeira ERO formada a partir da redução parcial do oxigênio, em H_2O_2 , o qual é reduzido a H_2O pela glutatona peroxidase e catalase (TSUTSUI; KINUGAWA; MATSUSHIMA, 2011; POHJOISMAKI & GOFFART, 2017).

Embora a catalase seja importante por catalisar a redução do H_2O_2 , com a finalidade de gerar um produto não tóxico à célula, no caso o H_2O (TSUTSUI; KINUGAWA; MATSUSHIMA, 2011) e assim proteger as células contra os efeitos da peroxidação lipídica (JAYARAMAN; VEERAPPAN; NAMASIVAYAM, 2009), ratos alimentados com dieta rica em colesterol apresentaram queda na atividade da catalase (CHTOUROU et al., 2015). Enquanto, no presente estudo não houve qualquer alteração na atividade da catalase entre os grupos experimentais.

Animais pertencentes ao grupo H apresentaram menor atividade tanto da superóxido dismutase como da glutatona peroxidase (Tabela 5 - Figura 10 C e D)

Indivíduos obesos apresentam maior risco para danos oxidativos devido à baixa atividade de antioxidantes enzimáticos como superóxido dismutase, glutatona peroxidase, catalase e antioxidantes não enzimáticos (MARSEGLIA et al., 2015).

Estudos demonstraram diminuição no sistema antioxidante endógeno (SOD, GSH-Px e CAT) na doença cardiovascular com consequente o aumento da peroxidação lipídica em conjunto com a produção de EROs (ADEGBOLA et al., 2017).

Além disso, tanto a inflamação como o estresse oxidativo são processos patológicos que desencadeiam a aterosclerose, evoluindo para doenças cardiovasculares (TESTAI & CALDERONE, 2017). As EROs encontram-se aumentadas pelas células endoteliais, adventícias, e do músculo liso vascular no processo da aterosclerose. Considerando a importante atuação do estresse oxidativo na aterosclerose, os antioxidantes apresentam uma estratégia terapêutica. Assim a naringenina, um flavonóide, se apresenta com potente ação antioxidante e anti-inflamatória (ORHAN et al., 2015).

A atividade enzimática da SOD no tecido cardíaco mostrou-se diminuída em animais do grupo H. Esses resultados estão de acordo com Chtourou et al. (2015) ao observar queda na atividade da SOD em ratos alimentados com dieta rica em colesterol. Os autores demonstraram alteração no sistema antioxidante endógeno causado pela dieta hipercalórica, sendo que o equilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes é importante para a proteção celular contra os efeitos deletérios das EROs. A inibição na atividade da superóxido dismutase eleva o efluxo de ânion superóxido no compartimento celular (JAYARAMAN; VEERAPPAN; NAMASIVAYAM, 2009).

Adicionalmente Majithiya & Balaraman (2005) associaram o decréscimo da SOD à hiperglicemia, devido ao processo de glicação da enzima, podendo alterar a estrutura e a catálise enzimática, exacerbando, deste modo, o estresse oxidativo.

A administração de naringenina em animais submetidos a dieta hipercalórica (grupo HN) elevou a atividade enzimática da SOD no tecido cardíaco, porém, sem atingir valores próximos ao grupo C (Tabela 5 - Figura 10 C). Estes resultados sugerem que a naringenina recuperou, de certo modo, a atividade enzimática da SOD necessária ao combate do estresse oxidativo. Além disso, este aumento pode ser considerado como uma resposta protetora adaptativa da célula na tentativa de controlar os danos oxidativos mediados pela EROs.

Estes resultados sugerem menor produção de H_2O_2 e simultaneamente maior conversão destes peróxidos de hidrogênio em H_2O , indicando estabilização no processo de lipoperoxidação, como pode ser verificado pelos valores obtidos para HP nestes animais

A atividade enzimática da GSH-Px no tecido cardíaco reduziu no grupo H. Resultados semelhantes foram encontrados por Chtourou et al. (2015) e são respaldados por Klepac; Rudes; Klepac (2006) ao observarem diminuição na atividade da GSH-PX e possível falha no sistema endógeno, tornando assim insuficiente para compensar a produção excessiva de EROs.

O tratamento com naringenina foi eficiente em aumentar a atividade enzimática da glutathiona peroxidase no tecido cardíaco de animais pertencentes ao grupo HN, no entanto, não foi possível atingir valores próximos ao grupo C. Estes resultados comprovam a ação antioxidante da naringenina, desde que a glutathiona peroxidase catalisa a redução do H_2O_2 em H_2O . Estes resultados sugerem maior remoção de H_2O_2 com maior conversão destes peróxidos de hidrogênio em H_2O , indicando estabilização no processo de lipoperoxidação, como pode ser verificado pelos valores obtidos para hidroperóxido de lipídio nestes animais.

Em outro estudo realizado com camundongos, foi observado super expressão da atividade da glutathiona peroxidase, o que torna os animais menos suscetíveis ao estresse oxidativo no tecido cardíaco, e também à remodelação e insuficiência cardíaca (TSUITSUI; KINUGAWA; MATSUSHIMA, 2011).

Os flavonóides além de possuírem a ação de sequestrar radicais livres, como superóxido e o hidroxil, e prevenir a célula da peroxidação lipídica, atuam também inibindo a atividade da xantina oxidase, a qual é considerada uma promissora na geração de ânion superóxido (ALAM et al., 2014). Especificamente a naringenina elimina o radical livre doando elétron através do 4' grupo hidroxil do anel B, contribuindo no controle do estresse oxidativo (ORHAN et al., 2015).

Estudos utilizando modelos de dano cardíaco induzido por toxicidade e suplementados com flavonóide observaram um aumento das enzimas do ciclo do ácido cítrico e da cadeia de transporte de elétrons, melhora na peroxidação lipídica, além da atuação em genes de transcrição que mediam a via do estresse oxidativo, aumentando a defesa antioxidante (FORBES-HERNANDEZ et al., 2014). Assim preservando as funções do ciclo do ácido cítrico e da cadeia de transporte de elétrons em oxidar e regenerar NADH ou FADH, respectivamente. Como também, mantendo a integridade da cadeia de transporte de elétrons, prevenindo o dano oxidativo.

CONCLUSÕES

Conclui-se que o consumo de dieta hipercalórica causou dislipidemia, hiperglicemia, prejudicou o metabolismo energético e provocou conseqüentemente estresse oxidativo no miocárdio. A análise da glicemia e perfil lipídico demonstrou que a suplementação de naringenina foi eficiente em atenuar esses parâmetros em animais submetidos à dieta hipercalórica. A oxidação exacerbada de ácidos graxos e o estresse oxidativo no tecido cardíaco, provocados pela dieta hipercalórica, foram controlados pela administração de naringenina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer, H.U, editor. Methods of enzymatic analysis. Academic. New York: Academic Press; 1974. p.673-677.
- Adegbola P, Aderibigde I, Hammed W, Omotayo T. Antioxidant and anti-inflammatory medicinal plants have potential role in the treatment of cardiovascular disease: a review. *Am J Cardiovasc Dis.* 2017;7(2):19-32.
- Ahmed RG. The physiological and biochemical effects of diabetes on the balance between oxidative stress and antioxidant defense system. *Med J Islamic World Acad Sci.* 2005;15:31-42.
- Alam MA, Subhan N, Rahman MM, Uddin SJ, Reza HM, Sarker SD. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Adv Nutr.* 2014;5(4):404-17.
- Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinae N. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetina intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J. Nutr.* 2000; (130): 2243-50.
- Assini JM, Mulvihill EE, Huff MW. Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2013;24(1):34-40.
- Bass A., Brdiczka D, Eyer P, Hofer S, Pette, D. Metabolic differentiation of distinct muscle at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem.* 1969; (10): 198-206.
- Beckman K, Ames B. Free radical theory of aging natures. *Physiol Rev.* 1998; (8): 547-81.
- Belguith-Hadriche O, Bouaziz M, Jamoussi K, Feki AE, Sayadi S, Makni-Ayedi F. Lipid-Lowering and Antioxidant Effects of an Ethyl Acetate Extract of Fenugreek Seeds in High-Cholesterol-Fed Rats. *J Agric Food Chem.* 2010;58:2116-22.
- Belhin G, Sendão MC, Francescato HDC, Antunes L.M.G, Bianchi MLP. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alim. Nutr.* 2004; (15): 285-92.
- Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* 2017;135(10):e146-e603.
- Biesalski HK. The role of antioxidants in nutritional support. *Nutrition.* 2000; (16): 593-96.
- Bonnefont-Rousselot D. The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications. *Treat in Endocrinol.* 2004; (3): 41-52.
- Boren J, Taskinen M-R, Olofsson S-O, Levin M. Ectopic lipid storage and insulin resistance: a harmful relationship. *J Intern Med.* 2013; 274:25-40.
- Bruce-Chertow, JC. Advances in Diabetes for the millennium: vitamins and oxidant stress in Diabetes and its complications. *Medscape Gen. Med.* 2004; (6): 124-30.

- Brunzell JD, Davidson M, Furberg CD, Ronald R, Goldberg BG, Howard BV, et al. Lipoprotein management in patients with cardiometabolic risk. Consensus statement from the American Diabetes Association and the American College of Cardiology Foundation Diabetes Care. 2008; (31): 811-22.
- Bryan S, Baregzay B, Spicer D, Singal PK, Khaper N. Redox-inflammatory synergy in the metabolic syndrome. *Can J Physiol Pharmacol*. 2013;91(1):22-30.
- Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2004;33(2):351-75, table of contents.
- Carmona MC, Lefebvre P, Galinier A, Benani A, Jeanson Y, Louche K, et al. Coadministration of coenzyme Q prevents rosiglitazone-induced adipogenesis in ob/ob mice. *Int J Obesity*. 2009; (33): 204-11.
- Cao K, Xu J, Pu W, Dong Z, Sun L, Zang W et al. Punicalagin, an active component in pomegranate, ameliorates cardiac mitochondrial impairment in obese rats via AMPK activation. *Sci Rep*. 2015;5:14014.
- Chen C, Jiang X, Hu Y, Zahng ZZ. The protective role of resveratrol in the sodium arsenite-induced oxidative damage via modulation of intracellular GSH homeostasis. *Biol Trace Elem Res*. 2013;27:124-36.
- Chong MF, Felding BA, Frayn KN. Mechanisms for the acute effect of fructose on postprandial lipemia. *Am J Clin Nutr*. 2007; (85): 1511-20.
- Chtourou Y, Slima AB, Makni M, Gdoura R, Fetoui H. Naringenin protects cardiac hypercholesterolemia-induced oxidative stress and subsequent necroptosis in rats. *Pharmacological Reports*. 2015;67:1090-97.
- Cohn RM, Roth KS. Lipid and lipoprotein metabolism. In: __. *Biochemistry and disease*. Baltimore: Williams and Wilkins Publishers; 1996. p.280.
- Costa NMB, Aalker AF, Low AG. The effect of graded inclusion of baked beans (*Phaseolus vulgaris*) on plasma and liver lipids in hypercholesterolaemic pigs given a Western – type diet. *Br J Nutr*. 1993; (70): 515-24.
- Crouch RK, Gandy SC, Klsey G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes*. 1981; (30): 235-41.
- Csonka C, Sarkozy M, Pipicz M, Dux L, Csont T. Modulation of Hypercholesterolemia-Induced Oxidative/Nitrative Stress in the Heart. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;1-23.
- Dervisevik M, Dinevska-Kovkarovska S, Dimitrovska M, Cipanovska N, Miova B. High dose of aspirin moderates diabetes-induced changes of heart glycogen/glucose metabolism in rats. *J Physiol Sci*. 2014;64:411-20.
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drug. *Life Sciences*. 1999; (65): 337-53.

- Diniz YS, Burneiko RC, Seiva FRF, Almeida FQ, Galhardi CM, Novelli Filho JLVB, et al. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. *Int J Cardiol.* 2008; (124):592-9.
- Diniz YS, Santos PP, Assalin HB, Souza GA, Rocha KKHR, Ebaid GMX, et al. Conjugated linoleic acid and cardiac health: Oxidative stress and energetic metabolism in standard and sucrose-rich diets. *European Journal of Pharmacology.* 2008; (579): 318-25.
- Doenst T, Nguyen TD, Abel ED. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ Res.* 2013;113(6):709-24.
- Dorna, WC et al. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 2007; (28):.214-9.
- Duffey KJ, Pereira RA, Popkin BM. Prevalence and energy intake from snacking in Brazil: analysis of the first nationwide individual survey. *European Journal of Clinical Nutrition.* 2013; (40): 1–7.
- Ferreira MA, Silva DM, Morais AC, Mota JF, Botelho PB. Therapeutic potential of green tea on risk factors for type 2 diabetes in obese adults – a review. *Obes Rev.* 2016; 17(12):1316-28.
- Fernandes AAH, Novelli ELB, Okoshi K, Okoshi MP, Dimuzio BP, Guimarães JFC, et al. Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2010; (64): 214-9.
- Fillmore N, Mori J, Lopaschuk GD. Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy. *Br J Pharmacol.* 2014;171(8):2080-90.
- Finck BN, Han X, Courtois M, Amond F, Nerbonne JM, Kovacs A. A critical role for PPAR α -mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: Modulation by dietary fat content *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003; (100):226-31.
- Forbes-Hernandez TY, Giampieri F, Gasparini M, Mazzoni L, Quiles JL, Alvarez-Suarez JM, et al. The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: A focus on apoptotic mechanisms. *Food Chem Toxicol.* 2014;68:154-82.
- Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Experim Biology.* 1998; 201: 1203-9.
- Friedman MI. Fuel partitioning and food intake. *Am J Clin Nutr.* 1998; (67): 513-8.
- Galati, G. Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology.* 2002; (177): 91-104.
- Gami AS, Witt BJ, Howard DE, Erwin PJ, Gami LA, Somers VK, et al: Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Coll Cardiol.* 2007; (49): 403-14.
- Greenberg CC, Jurczak MJ, Danos AM, Brady MJ. Glycogen branches out: new perspectives on the role of glycogen metabolism in the integration of metabolic pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291:E1-E8.

Gregory S, Kelly ND Quercetin. *Altern. Med. Rev.* 2011; (16): 172-94.

Grundey SM. Obesity, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(6):2595-2600.

Grundey SM. Metabolic syndrome: connecting and reconciling cardiovascular and diabetes worlds. *J Am Coll Cardiol.* 2006; (47): 1093–1100.

Hill JO. Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. *Endocr Rev.* 2006; (27): 750-61.

Hruby A, Hu FB. The epidemiology of obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics.* 2015; 33(7):673-89.

Iglesia R, Loria-Kohen V, Zulet MA, Martinez JA, Reglero G, Molina AR. Dietary Strategies Implicated in the Prevention and Treatment of Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(11):1877.

Ilkun O, Boudina S. Cardiac Dysfunction and Oxidative Stress in the Metabolic Syndrome: an Update on Antioxidant Therapies. *Curr Pharm Des.* 2013; 19:4806-4817.

Jayaraman J, Veerappan M, Namasivayam N. Potential beneficial effect of naringenin on lipid peroxidation and antioxidant status in rats with ethanol-induced hepatotoxicity. *J Pharm Pharmacol.* 2009;61(10):1383-90.

Jeney V, Ithoh S, Wendt M, Gradek Q, Fukai MU, Harrison D, et al. Role of antioxidant in extracellular superoxide dismutase function and expression. *Am Heart Assoc.* 2005;96:723-26.

Jiang ZY, Woolard ACS, Wolf SP. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. *Lipids.* 1991; (24): 861-9.

Jurdak N, Kanarek RB. Sucrose-induced obesity impairs novel recognition learning in Young rats. *Physiol Behav.* 2009;96:1-5.

Kahraman, A. Erkasap N, Köken T, Serteser M, Aktepe F, Erkasap S. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesion. *Toxicology.* 2003; (183): 133-42.

Kannappan S, Anuradha CV. Naringenin enhances insulin-stimulated tyrosine phosphorylation and improves the cellular actions of insulin in a dietary model of metabolic syndrome. *Eur J Nutr.* 2010;49:101-09.

Kelley DE, Goodpaster B, Wing RR, Simoneau JA. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol.* 1999; (277): 1130–41.

Khatua TN, Padiya R, Karnewar S, Kuncha M, Agawane SB, Kotamraju S, et al. Garlic provides protection to mice heart against isoproterenol-induced oxidative damage: Role of nitric oxide. *Nitric Oxide.* 2012; 27:9-17.

Klepac N, Rudes Z, Klepac R. Effects of melatonin on plasma oxidative stress in rats with streptozotocin induced diabetes. *Biom Pharmacoth.* 2006;69:32-5.

Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal.* 2013;2013:162750

Lacroix S, Rosiers CD, Tardif JC, Nigam A. The role of oxidative stress in postprandial endothelial dysfunction. *Nutr Res Rev.* 2012;25(2):288-301.

Lewin TM, Coleman RA. Regulation of myocardial triacylglycerol synthesis and metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 2003; (1634): 63-75.

Leopoldo AS, Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, Do Nascimento AF, Luvizotto RAM, Campos DHS, et al. Cardiac remodeling in a rat model of diet-induced obesity. *Can J Cardiol.* 2010;26(8):423-29.

Leverve XM. Mitochondrial function and substrate availability. *Crit Care Med.* 2007;35:S454-S-60.

Liu J, Lloyd S. G. High fat, low-carbohydrate diet alters myocardial oxidative stress and impairs recovery of cardiac function following ischemia and reperfusion in obese rats. *Nutr Res.* 2013;33(4):311-21.

Lopaschuk GD, Folmes CDL, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Cir Res.* 2007; (101): 335-47.

Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CDL, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol. Rev.* 2010; (90): 207-58.

Lopes MJ, Perez MP, Marin C. Postprandial lipoprotein metabolism, genes and risk of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipid.* 2008; (17): 132-8.

Lopes-Virella MF, Stone P, Ellis S. Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by different methods. *Clin. Chem.* 1977; (13): 882-4.

Lopez-Revuelta A, Sánchez-Gallego JI, Hernández-Hernández A, Sánchez-Yagüe J, Llanillo M. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. *Chem. Biol. Interact.* 2006; (161): 79-91.

Mahjoub S, Masrour-Roudsari J. Role of oxidative stress in pathogenesis of metabolic syndrome. *Caspian J Intern Med.* 2012;3(1):386-96.

Majithiya JB, Balaraman R. Time-dependent changes in antioxidant enzymes and vascular reactivity of aorta in streptozotocin-induced diabetic rats treated with curcumin. *J Cardiovas Pharmacol.* 2005;46:697-705.

Mallet RT, Sun J, Knott EM, Sharma AB, Yurvati AHO. Metabolic cardioprotection by pyruvate: recent progress. *Exp Biol Med.* 2005; (230): 435-43.

Martins F, Campos DHS, Pagan LU, Martinez PF, Okoshi K, Okoshi MP, Padovani CR, et al. High-fat Diet Promotes Cardiac Remodeling in an Experimental Model of Obesity. *Arq Bras Cardiol.* 2015;105(5):479-86.

Manach C, Morand C, Demigné C, Texier O, Régéat F, Rémésy C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett.* 1997;409(1):12-6.

Mann, J. Secondary metabolism. Oxford: Clarendon Press, 1987. 374p.

Mansor LS, Gonzalez ER, Cole MA, Tyler DJ, Beeson JH, Clarke K, et al. Cardiac metabolism in a new rat model of type 2 diabetes using high-fat diet with low dose streptozotocin. *Cardiovascular Diabetology.* 2013;12:136.

Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, et al. Oxidative stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 2015;16:378-400.

Martim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: are views. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology.* 2003; (17): 24-38.

Matheus ASM, Cobas RA, Gomes MB. Dislipidemias no Diabetes melito tipo 1: abordagem atual. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 2008; (52): 334-426.

Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism.* 2008; (57): 1071-7.

Milutinovic A, Zorc-Pleskovic R. Glycogen accumulation in cardiomyocytes and cardiotoxic effects after 3NPA treatment. *Bosn J Basic Med Sci.* 2012;12(1):15-19.

Moura RA. Técnicas de laboratório. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1982.

Mulvihill EE, Huff MW. Protection from Metabolic Dysregulation, Obesity, and Atherosclerosis by Citrus Flavonoids: Activation of Hepatic PGC1 α -Mediated Fatty Acid Oxidation. *PPAR Res.* 2012;2012:857142.

Mulvihill EE, Burke AC, Huff MW. Citrus Flavonoids as Regulators of Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. *Annu Rev Nutr.* 2016;36:275-99.

Nakamura M, Hojoda S, Hayashi K. Purification and properties of rats liver glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1974; (358): 251-61.

Nelly JR, Morgan HE. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Ann Rev Physiol.* 1974; (36): 413-61.

Nishiyama Y, Haramaki n, Yoshida N, Imaizumi T. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J.* 1998; (135): 115-20.

Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Mani F. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim.* 2007; (41): 111-9.

Novelli ELB, Souza GA, Ebaid GMX, Rocha KKHR, Seiva FRF, Mani F. Energy expenditure and oxygen consumption as novel biomarkers of obesity-induced cardiac disease. *Obesity*. 2010; (18): 1754-61.

Novelli ELB. *Nutrição e vida saudável – estresse oxidativo e metabolismo energético*. Ribeirão Preto: Tecmed; 2005.

Novelli ELB, Santos PP, Assalin HB, Souza G, Rocha K, Ebaid GX, et al. N-acetylcysteine in high-sucrose diet-induced obesity: Energy expenditure and metabolic shifting for cardiac health. *Pharmacol Res*. 2009;59(1):74-9.

Oliveira MWS, Minotto JB, Zanotto-Filho A, Behr GA, Rocha RF, Moreira JC, et al. Scavenging and antioxidant potential of physiological taurine concentrations against different reactive oxygen/nitrogen species. *Pharmacol. Rep*. 2010; (62): 185-93.

Oliveira MR, Nabavi SM, Braidy N, Setzer WN, Ahmed T, Nabavi SF. Quercetin and the mitochondria: A mechanistic view. *Biotech Adv*. 2016;34(5):532-49.

Orhan IE, Nabavi SF, Daglia M, Tenore GC, Mansouri K, Nabavi SM. Naringenin and Atherosclerosis: A Review of Literature. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2015;16 (3):245-51.

Paniagua JA. Nutrition, insulin resistance and dysfunctional adipose tissue determine the different components of metabolic syndrome. *World J Diabetes*. 2016;7(19):483-514.

Pan H, Gao Y, Tu Y. Mechanisms of Body Weight Reduction by Black Tea Polyphenols. *Molecules*. 2016;21(12):1659.

Panchal SK, Poudyal H, Nazer B, Kauter K, Brown L. High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011; (57): 611-24.

Parihar P, Parihar MS. Metabolic enzymes dysregulation in the heart failure: the prospective therapy. *Heart Fail Rev*. 2016;22(1):109-21.

Peltonen M, Lindroos AK, Torgerson JS. Musculoskeletal pain in the obese: a comparison with a general population and long-term changes after conventional and surgical obesity treatment. *Pain*. 2003; (104): 549–57.

Pereira B, Costa-Rosa LFBP, Bechara EJH, Newsholme P. Changes in the TBARs content and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs and skeletal muscles adrenomedullated rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1998; (31): 827-33.

Perseghin G, Cobelli FD, Esposito A, Belloni E, Lattuada G, Canu T, et al. Left ventricular function and energy metabolism in middle-aged men undergoing long-lasting sustained aerobic oxidative training. *Heart*. 2009; (95): 630-5.

Pietilainen KH, Korkeila M, Bol LH, Westerterp KR, Ykijarvinen H, Kaprio J. Inaccuracies in food and physical activity diaries of obese subjects: complementary evidence from doubly labeled water and co-twin assessments. *Int J Obes*. 2010; (34): 437-45.

Pietta, G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod*. 2000; (63): 1035-42.

Pohjoismäki JL, Goffart S. The role of mitochondria in cardiac development and protection. *Free Radic Biol Med*. 2017;106:345-54.

Popkin BM. The nutrition transition and obesity in the developing world. *J Nutr*. 2001; (131): 871-3.

Pu P, Gao DM, Mohamed S, Chen J, Zhang J, Zhou XY, et al. Naringin ameliorates metabolic syndrome by activating AMP-activated protein kinase in mice fed a high-fat diet. *Arch Biochem Biophys*. 2012;518:61-70.

Ramesh B, Pugalendi KV. Impact of umbelliferone on erythrocyte redox status in STZ-diabetic rats. *Yale J Biol Med*. 2005;78:131-38.

Rupasinghe HPV, Loodu-Sekhona S, Mantso T, Panayiotidis MI. Phytochemicals in regulating fatty acid β -oxidation: Potential underlying mechanisms and their involvement in obesity and weight loss. *Pharmacology and Therapeutics*. 2016;165:153-63.

Quiles JL, Ochoa JJ, Huertas JR, Mataix J. Coenzymes Q supplementation protects from age-related DNA double-strand breaks and increases lifespan in rats in a PUPA-rich diet. *Exp Gerontol*. 2004; (39): 189-94.

Reeves PG. Components of the AIN-93 diets. *J Nutr*. 1997; (127): 838S-41S.

Roberts CK, Barnard RJ, Liang KH, Vaziri ND. Effect of diet on adipose tissue and skeletal muscle VLDL receptor and LPL: implications for obesity and hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 2002; 161:133-41.

Reis JP, Allen N, Gibbs BB, Gidding SS, Lee JM, Lewis CE, et al. Association of the Degree of Adiposity and Duration of Obesity with Measures of Cardiac Structure and Function: The CARDIA Study. *Obesity (Silver Spring)*. 2014;22(11):2434-40.

Roehrig K, Allred JB. Direct enzymatic for the determination of liver glycogen. Analytical and flavonoids after oral and intravenous administration. *Free Radic Biol Med*. 1974; (27): 278-86.

Ross SA, Ziska DS, Zhao K, ElSohly MA. Variance of common flavonoids by brand of grapefruit juice. *Fitoterapia*. 2000;71(2):154-61.

Roslan J, Giribabu N, Karim K, Salleh N. Quercetin ameliorates oxidative stress, inflammation and apoptosis in the heart of streptozotocin-nicotinamide-induced adult male diabetic rats. *Biomed Pharmacother*. 2017; 86:570-82.

Rutledge AC, Adeli K. Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms. *Nutr Rev*. 2007; (65): 13-23.

Sandoval-Acuna C, Ferreira J, Speisky H. Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. *Arch Biochem Biophys*. 2014; 559:75-90.

Sato A, Kawano H, Notsu T, Ohta M, Nakakuki M, Mizuguchi K, et al. Antiobesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. *Diabetes*. 2010;59(10):2495-504.

Seiva FRF, Amauchi JF, Fujihara J, Rocha KKHR, Souza GA, Ebaid GM, et al. Effects of N-acetylcysteine on alcohol abstinence and alcohol induced adverse effects in rats. *Alcohol*. 2009; (43): 127-35.

Silva, M. Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab*. 2011; (55): 56-63.

Soloni, F.G. Simplified manual micromethod for determination of serum triglycerides. *Clin. Chem*. 1971; (17): 531-4.

Souza GA, Ebaid GX, Seiva FRF, Rocha KHR, Galhardi CM, Mani F, et al. N-acetylcysteine in Allium plant compound improves high-sucrose diet-induced obesity and related effects. *CAM Adv Access*. 2008;11:1-7.

Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*. 2005; (10): 1093-29.

Stanley WC, Sabbah HN. Metabolic therapy for ischemic disease. *Heart Fail Rev*. 2005; (10): 275-9.

Stanhope KL, Havel PJ. Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol*. 2008;19 (1):16-24.

Stranahan AM, Cutler RG, Button C, Telljohann R, Mattson MP. Diet-induced elevations in serum cholesterol are associated with alterations in hippocampus lipid metabolism and increased oxidative stress. *Journal of Neurochemistry*, 2011; (118): 611-5.

Strohl KP, Thomas AG, Jean PST, Achlenker EH, Koletsky RJ, Schork NJ. Ventilation and metabolism among rats strains. *J Appl Physiol*. 1997; (82): 317-23.

Taskinem M-R, Boren J. New insights into the pathophysiology of dyslipidemia in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2015; 239:483-95.

Testai L, Calderone V. Nutraceutical Value of Citrus Flavanones and Their Implications in Cardiovascular Disease. *Nutrients*. 2017;9 (5).

Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(6):H2181-90.

Valdecantos MP, Matute-Pérez P, González-Muniesa P, Prieto-Hontoria PL, Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA. Lipoic acid administration prevents nonalcoholic steatosis linked to long-term high-fat feeding by modulating mitochondrial function. *J Nutr Biochem*. 2012; 23:1676-84.

Varbo A, Benn M, Nordestgaard BG. Remnant cholesterol as a cause of ischemic heart disease: Evidence, definition, measurement, atherogenicity, high risk patients, and present and future treatment. *Pharmacology and Therapeutics*. 2014; 141:358-67.

Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, Joubert F. Bioenergetics of the failing heart. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(7):1360-72.

Wan R, Camandola S, Mattson MP. Intermittent food deprivation improves cardiovascular and neuroendocrine responses to stress in rats. *Nutr Neurosc*. 2003; (55): 1921-9.

Wang S, Moustaid-Moussa N, Chen L, Mo H, Shastri A, Su R, et al. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *J Nutr Biochem*. 2014;25(1):1-18.

Washington TA, Healey JM, Thompson RW, Lowe LL, Carson JA. Lactate dehydrogenase regulation in aged skeletal muscle: Regulation by anabolic steroids and functional overload. *Exp Gerontol*. 2014;57:66-74.

Whitney, N.E. Nutrition and of the blood vessels, heart, and lungs. In: ROLFES, S.R.; PINNA, K.; Whitney, E.N. *Understanding normal & clinical nutrition*. Minneapolis: West Publishing Company. 1997; (4): 879-909.

Wilkinson, J.H. *Introducción al diagnóstico enzimático*. 3.ed. Buenos Aires: Ediciones Toray, 1965. 310p.

World Health Organization. *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases*. Report of a joint FAO/WHO expert Consultation. Geneva: WHO/FAO; 2003.

World Health Organization (WHO). *Global Database on Body Mass Index*; WHO: Geneva, Switzerland, 2011.

Wu L, Parhofer KG. Diabetic dyslipidemia. *Metabolism Clinical and Experimental*. 2014; 63:1469-79.

Yan S-L, Yang H-T, Lee Y-J, Lin C-C, Chang M-H, Yin M-C. Asiatic Acid Ameliorates Hepatic Lipid Accumulation and Insulin Resistance in Mice Consuming a High-Fat Diet. *J Agric Food Chem*. 2014; 62:4625-31.

Yeum KJ, Russel RM, Krinsky NI, Aldini G. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Arch Biochem Biophys*. 2004; (430): 97-103.

Yoshida M, Kimura H, Kyuki K, Ito M. Effect of combined vitamin E and insulin administration on renal damage in diabetic rats fed a high cholesterol diet. *Biol. Pharm. Bull.*, 2005; (28):.2080-6.

Zar, J.H. *Bioestatistical analysis*. 4.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996. 929p.