

**UNIVERSIDADE DE UBERABA
ISABELLA RODRIGUES RAMIRES**

**ANÁLISE BIOQUÍMICA E HISTOLÓGICA DE RATOS *Wistar* MACHOS
SUBMETIDOS A UMA DIETA HIPERLIPÍDICA**

UBERABA-MG

2016

ISABELLA RODRIGUES RAMIRES

**ANÁLISE BIOQUÍMICA E HISTOLÓGICA DE RATOS *Wistar* MACHOS
SUBMETIDOS A UMA DIETA HIPERLIPÍDICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Uberaba, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.
Área de concentração: Biopatologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto

UBERABA-MG

2016

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

R145a Ramires, Isabella Rodrigues.
Análise bioquímica e histológica de ratos wistar machos submetidos a uma dieta hiperlipídica / Isabella Rodrigues Ramires. – Uberaba, 2016.
58 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área de Biopatologia, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto.

1. Dietas. 2. Lipídios. 3. Obesidade. 4. Rato como animal de laboratório. I. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área de Biopatologia. II. Título.

CDD 613.2

ISABELLA RODRIGUES RAMIRES

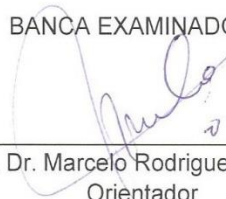
“Análise Bioquímica e Histológica de ratos Wistar machos submetidos a uma dieta Hiperlipídica”

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Mestrado da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Biopatologia

Aprovado (a) em: 14/07/2016

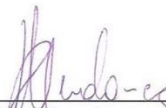
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto
Orientador
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Geraldo Thedei Júnior
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Ricardo José de Mendonça
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Maria Beatriz por estar comigo em todos os momentos que mais preciso, pela paciência, amor, carinho, ajuda e compreensão. Meu muito obrigada por proporcionar a realização de mais essa conquista.

À meu pai, José Patrício que se mostrou aberto a compartilhar mais essa etapa.

À minha irmã, Giovanna que mesmo distante está sempre presente ajudando e encorajando para seguir em frente e persistir. Companheirismo e amizade.

Nada o que eu disser vai representar a minha imensa gratidão pelo incentivo e apoio. Muito obrigada, amo muito vocês!!!

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora, por permitirem e conceder mais essa oportunidade. Por estar sempre abençoando, iluminando, seguindo meus passos e caminhos percorridos até aqui, com muita força e fé.

Ao professor Dr. Marcello Rodrigues Pinto, pela orientação e oportunidade de trabalhar com você e pelos ensinamentos ao longo dessa jornada.

À todos aqueles que direta e indiretamente colaboraram para a conclusão de mais uma vitória: familiares (avós, tias, tios e primos), amigos (Ana Luísa que me incentivou a fazer o mestrado), colegas, professores (Marcelo, Luciano, Geraldo, Cesar, Denise, Sanívia, Ruchele e João Paulo) e funcionários.

À Flávia, secretária do mestrado pela grande ajuda ao longo desse processo.

À amiga Rayane, que colaborou em diversas etapas de execução do projeto.

À todos os técnicos de laboratório, pela ajuda: Rayane, Rodolfo, Maralice, Andreia, Mariele, Luiz Fernando, Erica e Aline.

À professora Dr^a Patrícia Andressa de Almeida Buranello, pelos ensinamentos durante o experimento.

À Jenifer, aluna de Pibic Junior por sua participação.

Aos alunos de Iniciação Científica pela ajuda, companheirismo e pelos bons momentos compartilhados, Adriel, Heitor, Karen e Lucas.

Aos professores Drs. Geraldo Thedei Júnior e Luciano de Souza Gonçalves pela atenção e colaboração.

À CAPES, FAPEMIG e UNIUBE pela concessão em auxílio financeiro a pesquisa.

Às demais colegas de mestrado: Camila, Marcelly, Ranyelle, Anna Laura, Gisele, Gabriele, Fernanda, Carla e Juliana.

Aos alunos de medicina: Victor, Mateus e demais.

À todos que colaboraram e estiveram presentes nessa jornada, muito obrigada!!! Vocês foram fundamentais para uma caminhada de sucesso.

RESUMO

Obesidade é uma doença crônica de difícil manejo e está associada a fator predisponente e coexistente com doenças cardiovasculares, metabólicas e neurais, tornando-se um grave problema de saúde pública. Dietas hiperlipídicas têm sido comumente utilizadas em modelos animais com a finalidade de investigar as possíveis consequências promovidas pelo ganho de peso excessivo em seres humanos. O presente trabalho avaliou a evolução do ganho de peso, os parâmetros bioquímicos séricos, a morfologia de órgãos e tecidos como fígado, rins e mesentério em ratos da linhagem Wistar alimentados com uma dieta hiperlipídica. Para isso, vinte ratos foram separados em dois grupos. O grupo controle recebeu dieta balanceada, enquanto que o grupo experimental recebeu dieta hiperlipídica. As dietas e a água foram oferecidas *ad libitum* por um período de 11 semanas. Após o período experimental, os animais foram sacrificados para as análises bioquímicas e histológicas. De acordo com o índice de Lee, ratos do grupo experimental se tornaram obesos. Além disso, apresentaram 61% mais gordura visceral, comparado ao controle. As análises histológicas mostraram que animais do grupo experimental apresentam alterações histológicas como esteatose hepática acentuada, hialinização renal e aumento da vasculatura mesentérica. Dados bioquímicos mostraram que animais do grupo experimental apresentam níveis significativamente menores de colesterol total, LDL, HDL, uréia, TGO e TGP, quando comparado ao grupo controle. As análises de urina revelaram altos níveis de proteínas, cetonas, além de hemácias integras e leucócitos na urina do grupo experimental. Nos sedimentos urinários foram encontrados cilindros hialinos e leucocitários compatíveis com as alterações renais observadas para o grupo experimental. Os dados apresentados mostraram que ratos alimentados com a dieta hiperlipídica podem apresentar alterações bioquímicas e histológicas. Além disso, o estudo sugere que o uso prolongado de dietas ricas em lipídeos contribui para o estabelecimento de desordens metabólicas e histológicas, comprometendo a homeostase do organismo.

Palavras – chave: dieta hiperlipídica; ratos Wistar; obesidade; alterações bioquímicas e histológicas

ABSTRACT

Obesity is a chronic disease unwieldy and is associated with predisposing factor and coexisting with cardiovascular, metabolic and neural diseases, making it a major public health problem. High fat diet has been commonly used in animal models in order to investigate the possible consequences promoted by excessive weight gain in humans. In this study evaluated the evolution of weight gain, serum biochemical parameters, as well as the morphology of organs and tissues such as the liver, kidneys and mesentery in Wistar rats fed a high fat diet. For this twenty rats were separated into two groups. The control group received a balanced diet, while the experimental group received high fat diet. The diets and water were offered ad libitum for a 11 week period. After the experimental period, the animals were sacrificed for biochemical and histological analysis. According to Lee index, the experimental group mice became obese. In addition, 61% had more visceral fat compared to the control. Histological analysis showed that animals in the experimental group have marked histological changes as hepatic steatosis, renal hyaline and increased mesenteric vasculature. Biochemical data showed that animals in the experimental group had significantly lower levels of total cholesterol, LDL, HDL, urea, TGO and TGP, when compared to the control group. Urine analysis revealed high levels of proteins, ketones, addition of intact erythrocytes and leukocytes in urine in the experimental group. In urinary sediments it was found hyaline and leukocyte cylinders compatible with renal changes observed in the experimental group. The data showed that rats fed a high fat diet can provide biochemical and histological changes. Moreover, the study suggests that long term use of diets rich in lipids contributes to the establishment of metabolic and histological disorders affecting the homeostasis of the organism.

Key - words: fat diet; Wistar rats; obesity; biochemical and histological changes

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da dieta (AIN93-G)	22
Tabela 2 - Composição da dieta hiperlipídica	23
Tabela 3 - Peso corporal e Índice de Lee	31
Tabela 4 - Peso de órgãos e tecidos	34
Tabela 5 - Dosagens Bioquímicas	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução do ganho de peso ao longo de 11 semanas	30
Figura 2 - Consumo médio semanal em gramas e em quilocalorias	32
Figura 3 - Gordura visceral dos animais do grupo controle (A) e do grupo experimental (B) ao final da 11ª semana	33
Figura 4 - Peso de gordura visceral ao final da 11ª semana	33
Figura 5 - Análises do sedimento urinário de ratos alimentados com a dieta hiperlipídica	35
Figura 6 - Análises histológicas do fígado	39
Figura 7 - Análises histológicas do rim	40
Figura 8 - Análises histológicas do mesentério	41

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CPK - Creatinofosfatoquinase

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DP - Desvio Padrão

FTO - gene polimorfo associado à obesidade

HDL - Lipoproteínas de alta densidade

IL-6 - Interleucina 6

IMC - Índice de Massa Corporal

Kcal - Quilocalorias

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade

mg/dL - Miligramas por decilitro

PCR - Proteína C reativa

Rpm - Rotações por minuto

TGO - Transaminase glutâmica oxalacética

TGP - Transaminase glutâmica pirúvica

VLDL - Lipoproteínas de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	HIPÓTESE	19
3	JUSTIFICATIVA	20
4	OBJETIVOS	21
	4.1 Geral	21
	4.2 Específicos	21
5	MATERIAS E MÉTODOS	22
	5.1 Manejo dos animais	22
	5.2 Uroanálise e sedimentos urinários	24
	5.3 Índice de Lee	24
	5.4 Eutanásia e coleta de sangue	24
	5.5 Coleta e pesagem de órgãos, tecidos e gorduras	25
	5.6 Processamento Histológico	25
	5.7 Análise Bioquímica	27
	5.8 Análise estatística	28
	5.9 Formatação	29
6	RESULTADOS	30
	6.1 Evolução do ganho de peso	30
	6.2 Índice de Lee	31
	6.3 Análise do consumo - resto ingesta	31
	6.4 Peso dos órgãos, tecidos e gorduras	32
	6.5 Análise de urina (uroanálise e sedimentos)	35
	6.6 Análise bioquímica do soro	36
	6.6.1 Dosagens de Glicose	36
	6.6.2 Dosagens de Triglicerídeos	36
	6.6.3 Dosagens de Colesterol total e frações	36
	6.6.4 Dosagens de Uréia e Creatinina	37
	6.6.5 Dosagens de Proteínas totais	37

6.6.6 Dosagens de Amilase	37
6.6.7 Dosagens de Albumina	37
6.6.8 Dosagens de CPK	38
6.6.9 Dosagens de TGO e TGP	38
6.7 Análise histológica do fígado	39
6.8 Análise histológica do rim	40
6.9 Análise do mesentério	41
7 DISCUSSÃO	42
8 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO – Parecer do comitê de ética em experimentação animal	58

1 INTRODUÇÃO

Os hábitos e estilos de vida adotadas pela sociedade moderna fazem com que as pessoas optem por refeições rápidas e de alta densidade energética. Essas dietas comumente são de origem industrial e elaboradas a partir de gorduras saturadas, conservantes, sódio, açúcares dentre outros, que quando consumidos com muita frequência e em grandes quantidades podem acarretar problemas à saúde como a obesidade (BRASIL, 2014).

A obesidade é ocasionada pelo consumo excessivo de energia e diminuição do gasto energético, sendo considerada uma doença crônica, multifatorial e de baixo grau inflamatório (ISMAIL et al., 2011). Além disso, contribui para a ocorrência de doenças crônicas como hipertensão, hipercolesterolemia e diabetes tipo 2, comprometendo a qualidade e a expectativa de vida (BRASIL, 2014; ZHANG et al., 2014).

Atualmente, a obesidade tornou-se uma ameaça para a saúde pública global, pois suas consequências representam a maior taxa de morbimortalidade no mundo (ZHAO et al., 2013). Segundo o Ministério da Saúde, entre os anos de 2012 a 2014 houve uma estagnação na porcentagem de obesos no país (BRASIL, 2015). Entretanto, dados do mesmo Ministério mostram um aumento crescente nas taxas de sobrepeso dentro da população brasileira (BRASIL, 2015).

Segundo Desai et al. (2013), fatores genéticos associados a hábitos alimentares maternos podem contribuir para a obesidade na fase adulta. A predisposição genética para a obesidade ocorre pelas alterações durante a formação fetal, com mudanças em células adiposas e diferenciação das mesmas. Essas alterações geram problemas além da obesidade, como resistência à insulina e dislipidemia (DESAI et al., 2013). Por essa razão, um ambiente fetal saudável é de suma importância, na prevenção de doenças metabólicas (TARANTAL e BERGLUND, 2014).

A obesidade está relacionada com um elevado índice de massa corporal (IMC), inatividade física, fatores psicológicos, ingestão, comportamento alimentar e diferente expressão do gene polimorfo FTO (HARBRON et al., 2014). A obesidade

33 relaciona-se também a ocorrência de distúrbios endócrinos, diferentes estímulos na
34 atividade cerebral e mudança nessa estrutura neural (ZHANG et al., 2014).

35 O cérebro atua no equilíbrio do consumo de energia e controle de peso,
36 diminuindo o metabolismo e o consumo alimentar (WHITING et al., 2013). O excesso
37 do consumo dietético em animais aumenta a disfunção e degeneração do sistema
38 nervoso central, e em pessoas obesas altera as estruturas da região de
39 recompensa, modificando seu processamento e controle comportamental
40 (KARLSSON et al., 2013).

41 O consumo de dietas hipercalóricas são fatores causais para a obesidade e
42 suas comorbidades (HARBRON et al., 2014). Essas dietas levam ao acúmulo de
43 triglicerídeos intra-hepáticos, alteram o metabolismo e aumentam a probabilidade de
44 ocorrer resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2 (KOOPTMAN et al., 2014).

45 As dietas quando ricas em gorduras saturadas induzem efeitos deletérios
46 maiores em relação aos níveis de lipídeos séricos, resistência à insulina, quadros de
47 esteatose não alcoólica, ganho de peso, indicadores de estresse e imunológico de
48 células hepáticas (ZHAO et al., 2013). Essas dietas associadas a carboidratos
49 simples levam a alterações no mecanismo sacietogênico de ratos, promovendo
50 mudanças no perfil lipídico do sangue e alterações na microbiota intestinal
51 (JURGOŃSKI, JUŚKIEWICZ, ZDUŃCZYK, 2014).

52 O consumo de dietas hiperlipídicas reduz os níveis de lipoproteínas de alta
53 densidade (HDL - High-density lipoprotein), aumentam os de lipoproteína de baixa
54 densidade (LDL - Low-density lipoprotein) e colesterol, promovem o
55 desenvolvimento e progressão do câncer de próstata, aumentando o risco deste e
56 de outros carcinomas (LAWRENCE, 2013; XU, et al., 2015). Além disso podem levar
57 ao acúmulo de gordura hepática, alterar composição corporal e peso (ROSQVIST et
58 al., 2014). Entretanto, esses malefícios não são encontrados quanto ao consumo
59 elevado de gorduras insaturadas. As mesmas mostram benefícios em relação à
60 doenças crônicas e inflamatórias, reduzem a oxidação do DNA e regulam a
61 concentração sérica de colesterol e oxidação de LDL (EL-KHOLY et al., 2014).

62 As fontes lipídicas insaturadas, têm melhores resultados dos níveis
63 plasmáticos da inflamação, lipídicos e reduzem o risco de doenças cardiovasculares
64 (RUTH et al., 2013; NETTLETON; LEGRAND; MENSINK, 2015). A dieta do
65 mediterrâneo, com elevadas concentrações de lipídios insaturados, e seus efeitos

66 anti-inflamatórios, antioxidantes e sacietogênicos, auxilia no tratamento de doenças
67 cardiovasculares, funções hepáticas e na prevenção de doenças como a obesidade
68 e o diabetes (MAYNERIS-PERXACHS et al., 2014; GEORGOULIS; KONTOGIANNI;
69 YIANNAKOURIS, 2014; GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2014). Segundo Grego et al.
70 (2014), essa dieta contribuiu positivamente para redução do IMC, melhorando
71 resistência à insulina, marcadores fisiopatológicos da obesidade e sensibilidade a
72 insulina (GRECO et al., 2014). Quando associada a atividade física, e
73 suplementação de ômega 3, reduz a gordura corporal e abdominal, circunferência da
74 cintura, pressão arterial, insulina em jejum, triglicérides e IL-6 (LDUNN et al., 2014).

75 As recomendações ideais para proporções de poli-insaturados,
76 monoinsaturados e saturados, priorizando gorduras dietéticas de boa procedência e
77 em quantidade correta são importantes, pois é a fonte lipídica consumida que
78 determina a extensão e consequência gerada à saúde (LAZIC et al., 2014; MARINA
79 et al., 2014; ZHAO et al., 2013).

80 O consumo dietético pode ocasionar a obesidade, entretanto, outras causas
81 pertinentes a esta doença, desencadeiam uma série de consequências afetando
82 fígado, rim e microbiota intestinal. A microbiota intestinal, tem múltiplas funções,
83 exerce papéis importantes relacionados ao metabolismo, atividade pró-inflamatória,
84 resistência à insulina e peso corporal. A microbiota intestinal quando relacionada a
85 fatores ambientais e genéticos pode contribuir para o desenvolvimento de doenças
86 metabólicas como a obesidade (HUR e LEE, 2015; LECOMTE, et al., 2015;
87 LIVINGSTON e ZYLKE, 2012; ISMAIL et al., 2011).

88 A doença renal quando relacionada a obesidade e outras doenças crônicas
89 associadas (síndrome metabólica), pode ter um desenvolvimento e progressão
90 avançado para o estágio crônico da doença, mobilizando citocinas, reduzindo
91 adiponectina e aumentando leptina, influenciando assim o grau da inflamação
92 (NASHAR e EGAN, 2014). A obesidade contribui para alterações fisiológicas,
93 patológicas e anatômicas do rim. Essa relação, envolve fatores como sinalização de
94 mediadores metabólicos, resistência à insulina, dislipidemia, inflamação, estresse
95 oxidativo, resposta imune incorreta e alteração da hemodinâmica renal (FELIZARDO
96 et al., 2014).

97 A obesidade pode ocasionar alterações como a doença hepática não
98 alcoólica, decorrente do acúmulo de ácidos graxos, associados a dietas ricas em

99 carboidratos ou ácidos graxos saturados (GREEN e HODSON, 2014). A mesma
100 acontece pelo excesso do consumo alimentar, assim o lipídeo produzido e
101 consumido não tem uma distribuição suficiente para evitar o acúmulo no fígado,
102 levando a oxidação e logo promovendo o quadro de esteatose e resistência à
103 insulina. Outros fatores como o estresse do retículo endoplasmático e alterações em
104 vias metabólicas também são citados quanto a patogênese da esteatose
105 (BIRKENFELD e SHULMAN, 2014).

106 Diante de causas e consequências da obesidade, além da preocupação
107 existe em paralelo uma tentativa de prevenção e tratamento, com inúmeras
108 intervenções, as quais variam sua eficácia de maneira individual (MATARESE e
109 PORIES, 2014). Assim, uma orientação nutricional sobre os padrões que devem ser
110 seguidos para manutenção da saúde geral e mudança de hábitos, são fundamentais
111 (SARI-SARRAF et al., 2015).

112 O consumo adequado de carboidratos, ácidos graxos em proporções corretas
113 de saturadas e insaturadas, consumo de frutas e verduras ricos em componentes
114 antioxidantes e práticas de atividade física, reduzem níveis de inflamação e
115 expressão de PCR, conseqüentemente ajudam a reduzir os riscos associados a
116 morbimortalidade pública (NIENABER-ROUSSEAU et al., 2014).

117 O presente estudo vem mostrar as possíveis consequências promovidas pelo
118 consumo excessivo de gorduras saturadas, ampliando o debate envolvendo dietas
119 hipercalóricas, hábitos de vida e comportamentos saudáveis.

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132 **2 HIPÓTESE**

133

134

135 O uso exacerbado de gorduras saturadas pode induzir obesidade, assim
136 como alterações bioquímicas e histológicas em ratos da linhagem Wistar.

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165 3 JUSTIFICATIVA

166

167

168 A proposta está fundamentada na correlação existente entre dietas
169 hipercalóricas e ganho de peso. Além disso, pretendemos investigar as principais
170 alterações metabólicas e histológicas provocadas por uma dieta hiperlipídica em
171 ratos da linhagem Wistar, contribuindo para uma melhor compreensão do tema
172 proposto.

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198 4 OBJETIVOS

199

200

201 4.1 Geral:

202

203 Analisar as possíveis alterações bioquímicas e histológicas, provocadas por
204 uma dieta rica em lipídeos em ratos machos da linhagem *Wistar*.

205

206

207 4.2 Específicos:

208

209 Compreender e determinar o efeito da dieta hiperlipídica sobre os seguintes
210 parâmetros:

- 211 ✓ Avaliar o peso corporal, durante 11 semanas experimentais
- 212 ✓ Determinar o Índice de Massa Corporal (IMC), através do índice de Lee
- 213 ✓ Coletar e pesar órgãos e tecidos como: fígado, rins, testículos, baço, coração,
214 cérebro, timo, músculo femoral, gordura perirenal e visceral
- 215 ✓ Avaliar o consumo alimentar, pelo método de resto ingesta
- 216 ✓ Quantificar os parâmetros bioquímicos para: glicose, triglicerídeos, colesterol
217 total e suas frações, uréia, creatinina, proteínas totais, amilase, albumina,
218 CPK e transaminases (TGO e TGP)
- 219 ✓ Analisar a histologia do fígado, rim e mesentério
- 220 ✓ Analisar a urina, pelo teste rápido de uroanálise e por uma análise qualitativa
221 dos sedimentos urinários

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231 5 MATERIAS E MÉTODOS

232

233

234 5.1 Manejo de Animais

235

236 O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da
237 Universidade de Uberaba, sob o protocolo de número 036/2014 (ANEXO).

238 Para o desenvolvimento do projeto, foram fornecidos pelo Biotério Central da
239 Universidade de Uberaba, 20 ratos *Wistar* machos com peso médio inicial de 129,2g
240 \pm 0,28g. Durante todo o experimento os animais foram mantidos no Biotério, à uma
241 temperatura de 22°C a 26°C, com um ciclo de iluminação de 12 horas claro e 12
242 horas escuro, com dieta e água filtrada *ad libitum*. Os animais foram divididos em
243 dois grupos (experimental e controle) em caixas de polietileno contendo 5 animais.

244 Os grupos foram separados de acordo com a dieta oferecida. Para o grupo
245 controle foi ofertada dieta padrão balanceada AIN-93G (RHOSTER®; São Paulo;
246 Brasil) e o grupo experimental recebeu a dieta hiperlipídica.

247 A dieta do grupo controle, é uma dieta comercial (AIN-93G), que fornece
248 394,8 kcal a cada 100g consumidas.

249

250 **Tabela 1.** Composição da dieta AIN-93G

Ingredientes	Quantidade (g)	Kcal	%
Amido	39,75	251,8	63,88
Maltodextrina	13,2		
Açúcar	10		
Caseína	20	80	20,26
Óleo de soja	7	63	15,95
Fibra	5		
L-cistina	0,3		
Bitartarato de Colina	0,25		
Tert-butilhiroquinona	0,0014		
Vitamina	1		
Mineral	3,5		

251 Composição obtida a partir de informações do fabricante.

252

253 A dieta experimental foi preparada no laboratório de Biologia Celular e
254 Molecular da Universidade de Uberaba. Os ingredientes secos foram pesados em
255 balança de precisão (MARTE AL500C®; São Paulo; Brasil), com capacidade máxima
256 de 500 gramas. Após as pesagens, a banha foi colocada na batedeira industrial

257 (LIEME BP-06[®]; Gastromaq; Caxias do Sul; Rio Grande do Sul; Brasil) com
 258 capacidade de 5 quilos, para sua homogeneização por aproximadamente dois
 259 minutos. Os ingredientes secos foram adicionados gradativamente. Depois de
 260 misturar todos os ingredientes, a dieta permaneceu em movimento na batedeira por
 261 5 minutos, posteriormente foi armazenada em formas plásticas descartáveis com
 262 aproximadamente 90g de dieta. As dietas foram armazenadas à temperatura de –
 263 20°C, sendo descongeladas previamente para utilização.

264 Para o grupo experimental foi oferecido uma dieta hiperlipídica à base de
 265 banha de porco SADIA[®] (316011/108634-V71; 321891/108634-V71), caseína láctea
 266 (RHOSTER[®]), açúcar (UNIÃO[®]), fibra-celulose (RHOSTER[®]), L-cistina
 267 (RHOSTER[®]), bitartarato de colina (RHOSTER[®]), colesterol (VETEC[®]) mix
 268 vitamínico AIN-93G e mineral (RHOSTER[®]), fornecendo 721,9kcal a cada 100g.

269

270 **Tabela 2.** Composição da dieta hiperlipídica

Ingredientes	Quantidade (g)	Kcal	%
Banha de porco	68,7	618,3	85,65
Caseína	19	76	10,53
Açúcar	6,9	27,6	3,82
Fibra	0,23		
Mix Vitamínico	1,0		
Mix Mineral (AIN 93G)	3,5		
L cistina	0,3		
Bitartarato de colina	0,25		
Colesterol	0,12		

271 Composição centesimal, porcentagem e quilocalorias da dieta hiperlipídica.

272

273 O controle de peso foi realizado semanalmente, em balança digital (FILIZOLA
 274 P.3[®]; São Paulo; Brasil) com capacidade de 3 quilos. A pesagem era realizada
 275 individualmente, colocando um animal no interior de um recipiente plástico com
 276 aproximadamente 100g, esse valor era descontado do peso do animal utilizando a
 277 função tarar da balança.

278 A ingestão dietética dos animais foi acompanhada, utilizando o método de
 279 resto ingesta. A dieta, era ofertada *ad libitum*, 3 vezes por semana. Cada troca
 280 anotava-se a quantidade ofertada, desconsiderando o peso do comedouro. A cada
 281 nova oferta era realizada a higienização do recipiente, anotando o resto não
 282 consumido. A soma dessas trocas era o peso do “resto” descontado do peso
 283 “ofertado” que representa o consumo da semana dos animais.

284 **5.2 Uroanálise e sedimentos urinários**

285

286 Para as análises de urina, os animais eram mantidos em gaiola metabólica
287 por 24 horas, com oferta de água e dieta *ad libitum*. A urina coletada era transferida
288 para tubos falcon e centrifugada (CELM LS-3 PLUS®; São Caetano do Sul; São
289 Paulo; Brasil) à 1000 rpm durante 5 - 10 minutos. Em seguida com 50 µl da amostra
290 em uma lâmina, foi realizada a identificação qualitativa dos sedimentos. Para a
291 uroanálise (UROFITA 10DLU®; Alere; São Paulo; Brasil), foram utilizadas amostras
292 da 11ª semana afim de obter resultados prévios, identificando alterações presentes e
293 possíveis casuísticas.

294

295

296 **5.3 Índice de Lee**

297

298 Para análise do IMC, com os animais anestesiados, medimos toda a extensão
299 nasoanal em centímetros, para obter valores de composição corporal, com medidas
300 de peso e comprimento, utilizando assim o Índice de Lee determinado pela seguinte
301 fórmula (NOVELLI et al., 2007):

302

$$303 \text{ Índice de Lee} = \sqrt[3]{\text{peso (g)}/\text{comprimento naso anal (cm)}}$$

304

305 Os valores de referência do Índice de Lee, maiores que 0,3g/cm³ indicam
306 obesidade (BERNARDIS e PATTERSON, 1968).

307

308

309 **5.4 Eutanásia e coleta de sangue**

310

311 Ao final da 11ª semana de experimento, os animais foram mantidos em jejum
312 por 14 horas em gaiola metabólica para o sacrificio. Os animais foram sacrificados
313 por aprofundamento da anestesia na cavidade peritoneal, utilizado o anestésico
314 Thiopentax diluído em salina tamponada.

315 Após a completa anestesia os animais foram decapitados para coleta do
316 sangue em tubos específicos de dosagens e centrifugados por 10 minutos a uma

317 velocidade de 2500 rpm, com isso o soro foi aliqotado em duplicata e armazenado
318 a -20°C em eppendorf para análises bioquímicas. Em seguida, foi realizado a
319 laparotomia, retirando primeiramente o mesentério. Assim, o sistema foi “lavado”
320 com salina prosseguindo com perfusão de formol tamponado 10%, afim de explorar
321 todo o sistema para a coleta dos órgãos, tecidos e gorduras.

322

323

324 **5.5 Coleta e pesagem de órgãos, tecidos e gorduras**

325

326 Os órgãos: fígado, rins, testículos, baço, timo, coração e cérebro, o músculo
327 femoral e gorduras perirenal e visceral dos animais foram retirados e pesados em
328 balança digital (GEHAKA BG400®; São Paulo; Brasil) com precisão de 0,005
329 gramas. O peso de cada órgão foi expresso em g/100g de peso corporal do animal.
330 Todos os órgãos foram colocados em frascos previamente identificados contendo
331 formalina 10% para análises histológicas. As gorduras foram desprezadas.

332

333

334 **5.6 Processamento Histológico**

335

336 Para análises histológicas, foram utilizadas lâminas silanizadas (3-
337 aminopropyltriethoxysilane - SIGMA®) e selecionados fígado e rim esquerdo de
338 todos os animais. No fígado foi retirado do lóbulo maior, uma porção que
339 compreende do meio à extremidade, de aproximadamente 4 mm. Para os rins, um
340 corte mediano foi realizado após fixação, para evidenciar as estruturas corticais e
341 medulares do órgão. Em seguida foi realizado o processamento histológico, onde os
342 fragmentos (fígado e rins) foram lavados em água corrente por 2 horas, para retirar o
343 excesso de formol. Os fragmentos passaram por desidratação em série crescente de
344 etanol, organizados da seguinte forma: álcool (DINÂMICA QUÍMICA
345 CONTEMPORÂNEA®) 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, por nove minutos cada e
346 potência 20 no micro-ondas. Posteriormente seguiu para a etapa de diafanização em
347 Xilol (álcool xilol, xilol I, II e III) (NEON®), 25 minutos cada.

348

349 Os fragmentos foram submetidos à banho de parafina (HISTOSEC PASTILHA
MERK®) em estufa (QUIMIS Q-316.22®; Diadema; São Paulo; Brasil) a 60°C, por 2

350 horas. Em seguida esses fragmentos foram incluídos em parafina, obtendo-se o
351 bloco de parafina. Foram realizados 10 cortes seriados com 5µm de espessura, com
352 o auxílio do micrótomo (LEICA RM 2145®; Ramsey; USA). Os cortes foram
353 colocados em banho maria (CINTERQUAL BH2015®; Lupetec; Setúbal; Portugal)
354 aproximadamente a 40°C, sendo “pescados” 2 cortes em cada lâmina identificada
355 com as informações do animal e órgão. As lâminas foram transferidas para a platina
356 aquecedora (OLIDEF CZ V.V®; Ribeirão Preto; São Paulo; Brasil), onde
357 permaneceram por 1h para fixação do corte a 40°C. Para a coloração por
358 Hematoxilina e Eosina, a parafina foi eliminada com banhos sucessivos de xilol I, II,
359 III (NEON®) e em seguida hidratados com série de etanol em teor decrescente de
360 álcool absoluto I, II, III e álcool 95%(Dinâmica QUÍMICA CONTEMPORÂNEA®), até
361 a água corrente por 5 minutos cada banho, em seguida o fragmento foi corado com
362 hematoxilina (50 segundos), lavado em água corrente por 5 minutos e corados com
363 Eosina (50 segundos). Após foram desidratadas em três banhos de álcool absoluto
364 por 5 minutos cada seguido de três banhos de xilol também por 5 minutos cada
365 banho. Ao final as lâminas foram montadas usando Entelan (SIGMA®) e secaram em
366 temperatura ambiente para a análise histopatológica.

367 O mesentério retirado, foi colocado em uma placa de parafina, com auxílio de
368 alfinetes e desidratado com formol tamponado 10% por 20 minutos, logo em seguida
369 foram corados com azul de toluidina por 15 minutos. Após, o tecido foi cortado e
370 colocado em lâminas levando para secar em estufa (ODONTOBRÁS ECB3®; Santa
371 Catrina; Brasil) à 37°C - 40°C, *overnight*. Em seguida, foi retirado o excesso do
372 tecido prosseguindo com a fixação do corte, nas seguintes etapas: álcool 75% (60
373 segundos), álcool 90% (60 segundos), álcool absoluto (90 segundos) (DINÂMICA
374 QUÍMICA CONTEMPORÂNEA®; Diadema; São Paulo; Brasil), xilol 1 (1 minuto), xilol
375 2 (2 minutos) e xilol 3 (3 minutos) (NEON®; São Paulo; Brasil). Por fim, as lâminas
376 foram montadas com Entelan (SIGMA®; EUA).

377 A análise das lâminas foi realizada com auxílio de um microscópio de luz
378 (AXIOSKOT ZEISS®; Berlim; Alemanha), e as imagens foram capturadas utilizando
379 uma câmera digital Axion Cam. Para a análise dos cortes histológicos foi usado o
380 software Axion Vision Rel 4.8.2. As lâminas foram observadas em diferentes
381 aumentos, em busca da ocorrência de esteatose no caso do fígado. Para determinar
382 a porcentagem de comprometimento do órgão foi utilizado o método dos quadrantes

383 adaptado (Burlamaqui et al., 2011), adotando quatro classificações: ausência (0% de
384 comprometimento); discreta (25% - 50% de comprometimento); moderada (50% -
385 75% de comprometimento) e acentuada (mais de 75% de comprometimento). A
386 análise dos rins foi realizada mediante a presença ou ausência de alterações
387 histológicas nas amostras. Para a análise do mesentério, foi adotado uma análise
388 quantitativa com aumento de 10x, capturando imagens de 10 campos em cada
389 lâmina, no programa Image J.

390

391

392 **5.7 Análise Bioquímica**

393

394 Para realização das dosagens bioquímicas foi utilizado o equipamento de
395 automação do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Mário
396 Palmério, modelo Hitachi 917, este é utilizado para dosagem de metabólitos e
397 analitos presentes no soro humano e em sistema experimental.

398 As dosagens foram realizadas com reagentes da marca BIOTÉCNICA® - São
399 Paulo. Foi verificado junto ao fabricante que não há restrição quanto à técnica nem
400 ao procedimento analítico para amostras biológicas de ratos.

401 Em todas as dosagens foi feita uma curva de calibração com as amostras
402 fornecidas pelo fabricante.

403 **Dosagens de glicose:** foi realizada com Kit diagnóstico laboratorial,
404 empregando o método Enzimático da Glicose oxidase, segundo informações do
405 fabricante (TRINDER, 1969; BARHAM e TRINDER, 1972; WESTGARD et al., 1981;
406 YOUNG, 2000).

407 **Dosagens de triglicerídeos:** foi realizada com Kit diagnóstico laboratorial,
408 utilizando-se o sistema lipase lipoproteica/ glicerolquinase/ glicerol-3- fosfato
409 oxidase/ peroxidase (TRINDER, 1969; BUCOLO e DAVID, 1973; WESTGARD et al.,
410 1981; YOUNG, 2000; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2013).

411 **Dosagens de colesterol total e frações:** foi realizada com Kit diagnóstico
412 laboratorial, utilizando o sistema enzimático Colesterol oxidase/peroxidase, segundo
413 as indicações do fabricante.

414 O LDL-colesterol foi determinado pela fórmula de Friedwald: $LDL = (COT -$
415 $HDL) - (TG/5)$.

416 A dosagem de HDL foi realizada com Kit diagnóstico laboratorial, utilizando o
417 sistema enzimático Colesterol oxidase/ peroxidase segundo indicações do
418 fabricante.

419 A dosagem de VLDL foi realizada com Kit diagnóstico laboratorial, utilizando o
420 sistema enzimático Colesterol oxidase/ peroxidase segundo indicações do fabricante
421 (BELL et al.,1952; TRINDER,1969; BURSTEIN, SCHOLNICK, MORFIN, 1970;
422 VIRELLA et al.,1977; CASTELLI et al.,1977; KOSTNER et al.,1979; GROVE,1979;
423 WESTGARD et al., 1981; WARNICK, NGUYEN, ALBERS, 1985; BADIMON,
424 BADIMON, FUESTER,1990; YOUNG, 2000; SOCIEDADE BRASILEIRA DE
425 CARDIOLOGIA, 2001; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2013).

426 **Dosagens de Uréia, Creatinina, Proteínas Totais e Albumina:** foram
427 realizadas com Kit diagnóstico laboratorial, empregando o método Enzimático
428 colorimétrico, segundo as indicações do fabricante (JAFFÉ, 1886; GENTZKOW,
429 MASEN,1942; GORNALL, BARDAWILL, DAVID, 1949; HENRY, SOBEL,
430 BERKMAN, 1957; CHANEY, MARBACH, 1962; FABINY, ERTINGHAUSEN, 1971;
431 DOUMAS, WATSON, BIGGS, 1971; BARTELS, BÖHMER, 1971; WESTGARD et
432 al.,1981; YOUNG, 2000).

433 **Dosagens de Amilase, TGO e TGP:** foi realizada com Kit diagnóstico
434 laboratorial, empregando o método cinético contínuo, segundo as indicações do
435 fabricante (WESTGARD et al.,1981; RAUSCHER et al.,1985; WINN-DEEN et
436 al.,1988; SCIENTIFIC DIVISION, WORKING GROUP ON ENZYMES, 1999;
437 YOUNG, 2000).

438 **Dosagens de CPK:** foi realizada com Kit diagnóstico laboratorial,
439 empregando o método cinético, segundo as indicações do fabricante (WESTGARD
440 et al., 1981; WU, BOWERS, G, 1982; BURTIS, ASHWOOD, 1994; SCIENTIFIC
441 DIVISION, WORKING GROUP ON ENZYMES, 1999; YOUNG, 2000).

442

443

444 **5.8 Análise estatística**

445

446 As análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos programas
447 SigmaPlot e Origin 6.1. Para teste de normalidade das amostras foi utilizado
448 Shapiro-wilk e para o teste de variância entre as amostras o teste de Levene. A

449 avaliação da significância foi feita através do test-T em duas populações
450 independentes considerando valores de $p < 0,05$ como significativos.

451

452

453 **5.9 Formatação**

454

455 O trabalho, seguiu as normas da ABNT para formatação.

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482 6 RESULTADOS

483

484

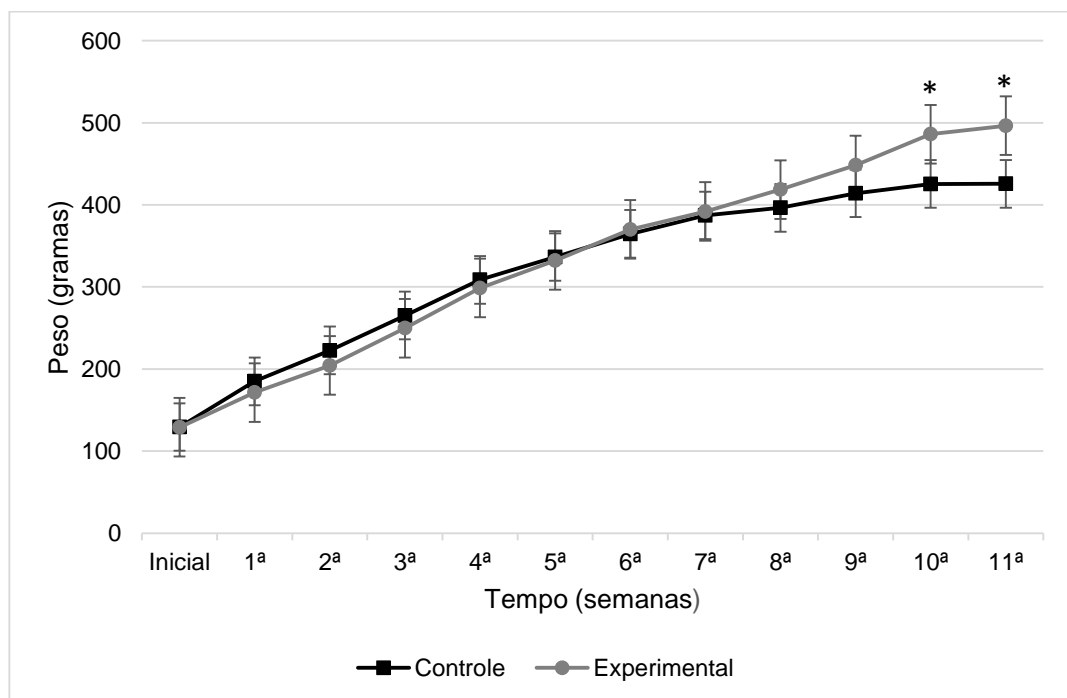
485 6.1 Evolução do ganho de peso

486

487 No início da primeira semana de experimentos, animais do grupo controle e
 488 experimental apresentavam média de peso semelhante, sendo $129,4 \pm 18,39\text{g}$ para
 489 animais do grupo controle e $129 \pm 14,64\text{g}$ para animais do grupo experimental.

490 Animais dos grupos controle e experimental não apresentaram diferenças
 491 significativas durante a evolução do ganho de peso até a nona semana de
 492 experimentos ($p > 0,05$) (figura 1). A figura 1 mostra que o grupo experimental
 493 apresentou ganho de peso significativamente maior do que o grupo controle na
 494 décima e décima primeira semanas ($p < 0,05$). No final da décima primeira semana,
 495 animais do grupo experimental apresentaram uma média de peso 14% maior ($496,4$
 496 $\pm 66,0\text{g}$) quando comparado ao grupo controle ($425,6 \pm 41,9\text{g}$) (tabela 3).

497



498

499 **Figura 1.** Evolução do peso ao longo de 11 semanas. O grupo experimental
 500 apresentou diferenças significativamente maiores do que o grupo controle a partir da
 501 10ª semana. Os resultados correspondem à média \pm desvio padrão para dois grupos
 502 independentes ($n = 10$). * Valores de $p < 0,05$.

503

504

505 6.2 Índice de Lee

506

507 O Índice de Massa Corporal (IMC) é um dos métodos antropométricos
 508 utilizados para auxiliar no diagnóstico da obesidade. Em ratos o IMC é obtido
 509 através do Índice de Lee, onde os valores superiores a $0,3\text{g/cm}^3$ indicam obesidade.
 510 Os resultados obtidos mostraram que 100% dos animais do grupo experimental
 511 apresentavam índice que indicavam obesidade. Para animais do grupo controle foi
 512 observado obesidade em 30% dos animais, enquanto que 70% apresentaram
 513 índices abaixo de $0,3\text{g/cm}^3$, sendo considerados “eutróficos” (tabela 3). Entretanto, a
 514 média dos índices obtidos colocou o grupo experimental como obeso ($0,36 \pm$
 515 $0,020\text{g/cm}^3$), enquanto o grupo controle permaneceu dentro da faixa de normalidade
 516 ($0,29 \pm 0,004\text{g/cm}^3$).

517

518 **Tabela 3.** Peso corporal e Índice de Lee

	Média de peso (g)	Índice de Lee (g/cm^3)
Grupo controle	$425,6 \pm 41,98$	$0,29 \pm 0,004$
Grupo Experimental	$496,4 \pm 66,01$	$0,36 \pm 0,020$

519 Os resultados apresentam a média de peso e o Índice de Lee obtido no final da 11ª semana de
 520 experimentos. $N = 20$.

521

522

523 6.3 Análise do consumo - resto ingesta

524

525 Análises do consumo das dietas mostraram que animais do grupo controle
 526 consomem mais dieta quando comparado com o grupo experimental. O consumo
 527 semanal médio de dieta observado para os animais do grupo controle foi de $739,40$
 528 $\pm 119,50\text{g}$, contra $542,98 \pm 64,32\text{g}$ consumidos pelo grupo experimental (figura 2). A
 529 média do consumo diário para o grupo controle foi de $105,61 \pm 17,07\text{g/dia}$, cerca de
 530 $10,56 \pm 1,71\text{g}$ por animal. Para o grupo experimental o consumo diário foi de $77,56 \pm$
 531 $9,18\text{g/dia}$, $7,76 \pm 0,92\text{g}$ por animal.

532

533 A análise da quantidade de calorias ingeridas mostrou que embora tenham
 534 consumido uma menor quantidade de dieta, animais do grupo experimental
 ingeriram mais calorias, comparado ao grupo controle. Os dados mostram que ao

535 longo de cada semana animais do grupo experimental ingeriram $3919,91 \pm 464,26$
 536 Kcal enquanto que o grupo controle $2919,45 \pm 471,73$ Kcal (figura 2).

537 O maior consumo de dieta/calorias foi observado durante o final da sexta
 538 semana de experimentos, sendo $1011,5g/3993Kcal$ para o grupo controle e
 539 $657,1g/4744Kcal$ para o grupo experimental (figura 2). Ao longo de onze semanas, o
 540 grupo experimental consumiu entre 50-60% mais calorias/semana, quando
 541 comparado ao grupo controle (figuras 2).

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

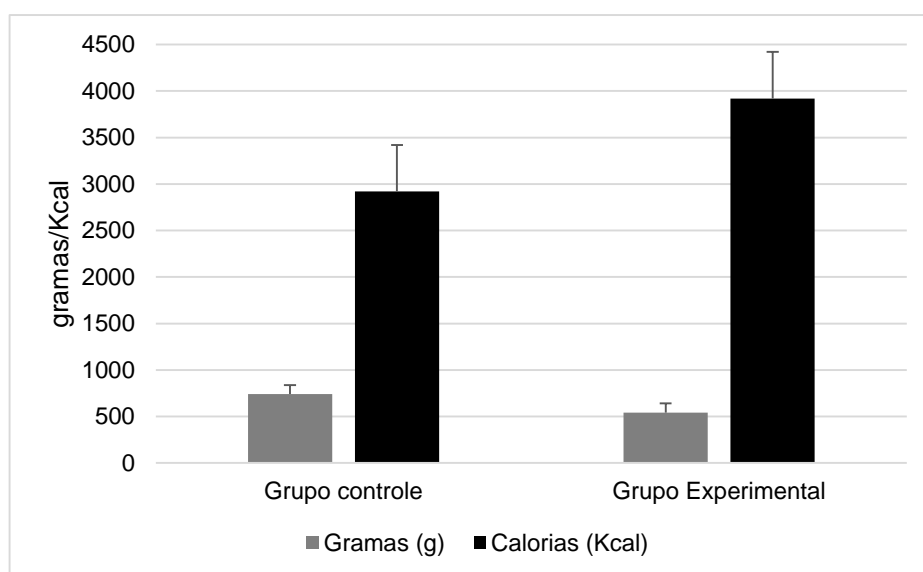
555

556

557

558

559



560

561

562

563

564

6.4 Peso dos órgãos, tecidos e gorduras

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

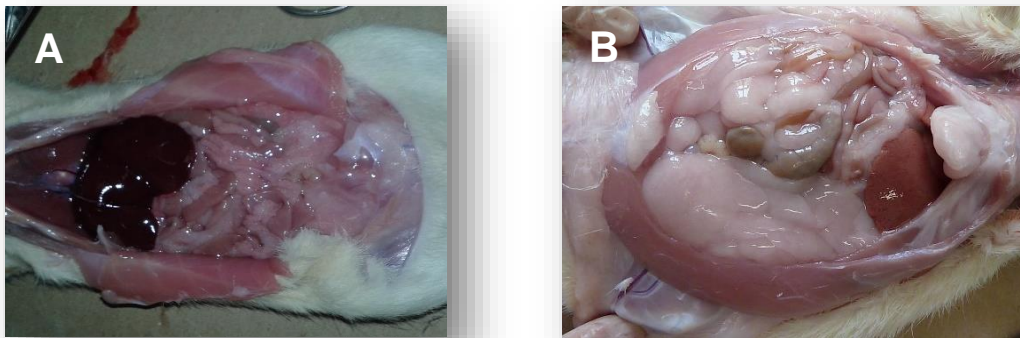
Os dados relativos à quantidade de gordura visceral mostraram que o grupo experimental acumulou 61% mais gordura ao longo do período experimental, quando comparado ao grupo controle.

As figuras (3 e 4) mostram a quantidade de gordura visceral retirada da cavidade abdominal de ratos de ambos os grupos. Os resultados mostraram que do grupo experimental foram retiradas $5,43 \pm 3,06g$ de gordura visceral, enquanto que para o grupo controle o valor foi de $3,16 \pm 1,15g$ ($p= 0,004$). A quantidade de gordura perirenal foi maior no grupo experimental ($1,71 \pm 1,53g$), comparado ao grupo controle ($1,45 \pm 1,21g$) ($p<0,05$) (tabela 4).

575 O peso do fígado, coração, rins, cérebro, testículos, timo, baço e músculo
576 femoral foram avaliados (tabela 4).

577 O peso médio do rim D ($p= 0,008$), rim E ($p= 0,002$), testículo D ($p= 0,04$),
578 testículo E ($p= 0,002$), baço ($p= 0,008$) e coração ($p= 0,04$) foram significativamente
579 maiores no grupo controle comparado ao grupo experimental ($p<0,05$). Os demais
580 órgãos avaliados não apresentam diferenças significativas ($p>0,05$).

581



582

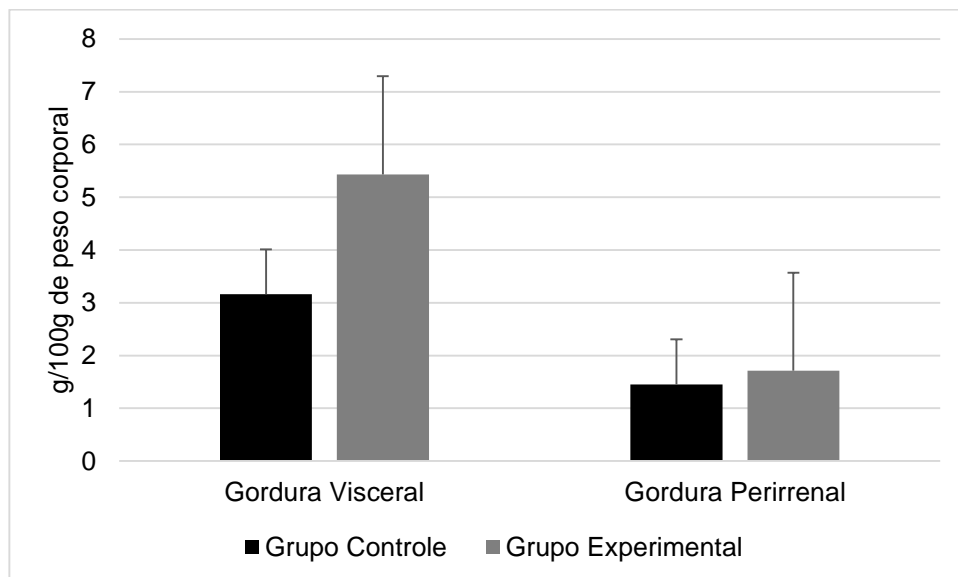
583

Figura 3. Quantidade de gordura visceral dos animais do grupo controle (A) e do grupo experimental (B) ao final da 11ª semanas.

584

585

586



587

588

Figura 4. Peso de gordura visceral obtido ao final da 11ª semana mostra uma diferença significativa entre os grupos. Os resultados apontam um aumento de 61% da gordura acumulada pelo grupo experimental.

589

590

591

592

593 **Tabela 4.** Peso de órgãos e tecidos

Órgãos e Tecidos	Grupo Controle	Grupo
	(g)	Experimental (g)
Média ± DP		
Fígado	3,23 ± 0,29	3,16 ± 0,35
Rim D*	0,37 ± 0,03	0,31 ± 0,03
Rim E*	0,36 ± 0,03	0,30 ± 0,04
Testículo D*	0,44 ± 0,07	0,36 ± 0,09
Testículo E*	0,45 ± 0,09	0,32 ± 0,06
Baço*	0,35 ± 0,07	0,25 ± 0,06
Coração*	0,40 ± 0,06	0,35 ± 0,05
Cérebro	0,43 ± 0,12	0,33 ± 0,03
Timo	0,16 ± 0,05	0,14 ± 0,06
Músculo Femoral	0,94 ± 0,16	0,78 ± 0,21
Gordura Visceral*	3,16 ± 1,15	5,43 ± 3,06
Gordura Perirenal*	1,45 ± 1,21	1,71 ± 1,53

594 Valores médio de órgãos e tecidos em 100g, dos animais após 11 semanas de experimentos. N= 20. *p<0,05.

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621 6.5 Análise de urina (uroanálise e sedimentos)

622

623 A uroanálise mostrou diferenças entre os grupos controle e experimental. No
624 grupo experimental foram detectados níveis elevados de proteínas, cetonas,
625 leucócitos e hemácias íntegras, quando comparado ao grupo controle.

626 Os resultados mostraram ausência de urubilinogênio, bilirrubina e nitritos para
627 ambos os grupos. Níveis de glicose, pH e densidade da urina não apresentaram
628 variações discrepantes entre os grupos, permanecendo na faixa de normalidade.

629 A presença de leucócitos e hemácias foi confirmada pela análise qualitativa
630 dos sedimentos (figura 5). Além disso, foram observados cilindros hialinos e cilindros
631 leucocitários no sedimento urinário de 70% dos animais do grupo experimental
632 (figura 5), enquanto que para o grupo controle não foram observadas tais estruturas.

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656 **Figura 5. Análises do sedimento urinário de ratos alimentados com a dieta**
657 **hiperlipídica.** Animais foram alimentados *ad libitum* por um período de 11 semanas.
658 O painel **A** mostra hemácias íntegras (setas); em **B** observa-se um cilindro
659 leucocitário. Os painéis **C** e **D** apresentam cilindros hialinos (cabeças de seta).
660 Imagens observadas com objetivas de 10x (**A**), 20x (**C** e **D**) e 63x (**B**).
661

662 **6.6 Análises bioquímicas do soro**

663

664

665 **6.6.1 Dosagens de Glicose**

666

667 Os dados obtidos para glicose mostrou não haver diferenças significativas
668 entre os grupos avaliados. Os valores séricos de glicose, em mg/dL, para os grupos
669 controle e experimental foram de $118,7 \pm 14,4$ e $124,7 \pm 14,3$, respectivamente
670 ($p > 0,05$) (tabela 5).

671

672

673 **6.6.2 Dosagens de Triglicerídeos**

674

675 As dosagens de triglicerídeos mostraram que animais de ambos os grupos
676 não apresentaram valores diferentes ($p > 0,05$). Os valores obtidos foram $39,9 \pm 9,5$
677 mg/dL para o grupo controle e $43,1 \pm 8,3$ mg/dL para o grupo experimental (tabela
678 5).

679

680

681 **6.6.3 Dosagens de Colesterol total e frações**

682

683 As dosagens de colesterol total mostraram que animais do grupo
684 experimental apresentaram níveis significativamente reduzidos quando comparado
685 ao grupo controle ($p < 0,05$). Os valores obtidos para o grupo experimental e controle
686 foram $31,8 \pm 7,2$ mg/dL e $53,6 \pm 19,4$ mg/dL, respectivamente (tabela 5).

687 A análise das lipoproteínas de alta densidade (HDL - *High-density lipoprotein*),
688 baixa densidade (LDL - *Low-density lipoprotein*) e muito baixa densidade (VLDL - *Very*
689 *low-density lipoprotein*), mostraram que animais do grupo experimental possuíam níveis
690 menores de LDL ($10,2 \pm 6,5$ mg/dL), quando comparados ao grupo controle ($25,6 \pm 12,4$
691 mg/dL) ($p < 0,05$) (tabela 5). Além disso, os níveis de HDL foram significativamente
692 menores para o grupo experimental ($13,1 \pm 2,2$), comparado ao grupo controle ($20,1 \pm 6,3$
693 mg/dL) ($p < 0,05$) (tabela 5).

694 Os valores de VLDL foram semelhantes entre os grupos experimental ($8,6 \pm 1,7$
695 mg/dL) e controle ($7,9 \pm 1,9$ mg/dL) ($p>0,05$) (tabela 5).

696

697

698 **6.6.4 Dosagens de Uréia e Creatinina**

699

700 Os dados obtidos para uréia sérica mostraram que o grupo experimental
701 apresentou níveis menores deste composto ($13,2 \pm 2,9$ mg/dL), quando comparado
702 ao grupo controle ($30,2 \pm 1,8$ mg/dL) ($p<0,05$) (tabela 5).

703 As análises relativas à creatinina mostraram que não houve diferenças
704 significativas em seus níveis entre os grupos experimental ($0,45 \pm 0,05$ mg/dL) e
705 controle ($0,40 \pm 0,08$ mg/dL) ($p>0,05$) (tabela 5).

706

707

708 **6.6.5 Dosagens de Proteínas totais**

709

710 As dosagens obtidas para proteínas totais mostraram que não houve
711 diferenças significativas em seus níveis séricos entre os grupos experimental ($3,2 \pm$
712 $0,5$ g/dL) e controle ($3,8 \pm 0,7$ g/dL) ($p>0,05$) (tabela 5).

713

714

715 **6.6.6 Dosagens de Amilase**

716

717 As dosagens para amilase não mostraram diferenças significativas nos níveis
718 desta enzima entre os grupos controle ($352,4 \pm 72,3$ U/L) e experimental ($341,1 \pm$
719 $33,9$ U/L) ($p>0,05$) (tabela 5).

720

721

722 **6.6.7 Dosagens de Albumina**

723

724 As dosagens para albumina não mostraram diferenças significativas nos
725 níveis desta enzima entre os grupos controle ($2,6 \pm 0,2$ g/dL) e experimental ($2,4 \pm$
726 $0,3$ g/dL) ($p>0,05$) (tabela 5).

727 **6.6.8 Dosagens de CPK**

728

729 As dosagens para a creatinofosfoquisase não mostraram diferenças
730 significativas nos níveis desta enzima entre os grupos controle ($3788,8 \pm 2803,3$ U/L)
731 e experimental ($3849,9 \pm 2575,7$ U/L) ($p > 0,05$) (tabela 5).

732

733

734 **6.6.9 Dosagens de TGO e TGP**

735

736 As dosagens para as transaminases mostraram que animais do grupo
737 experimental apresentam níveis séricos significativamente menores para TGO e
738 TGP, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Os valores séricos obtidos
739 para TGO nos grupos controle e experimental foram $92,78 \pm 25,35$ U/L e $63,0 \pm 16,2$
740 U/L, respectivamente (tabela 5); enquanto os dados obtidos para TGP foram de $19,0$
741 $\pm 0,5$ para o grupo controle e de $11,3 \pm 6,1$ U/L para o grupo experimental (tabela 5).

742

743 **Tabela 5. Dosagens Bioquímicas**

	Grupo Controle	Grupo Experimental
	Média \pm DP	
Glicose (mg/dL)	$118,67 \pm 14,72$	$124,7 \pm 14,32$
Triglicerídeos (mg/dL)	$39,89 \pm 9,47$	$43,1 \pm 8,28$
Colesterol (mg/dL)*	$53,56 \pm 19,37$	$31,8 \pm 7,16$
LDL (mg/dL)*	$25,58 \pm 12,37$	$10,18 \pm 6,52$
HDL (mg/dL)*	$20 \pm 6,32$	$13 \pm 2,21$
VLDL (mg/dL)	$7,98 \pm 1,89$	$8,62 \pm 1,66$
Uréia (mg/dL)*	$30,22 \pm 1,79$	$13,2 \pm 2,97$
Creatinina (mg/dL)	$0,45 \pm 0,05$	$0,40 \pm 0,08$
Proteínas Totais (g/dL)	$3,83 \pm 0,67$	$3,285 \pm 0,50$
Amilase (U/L)	$352,38 \pm 72,31$	$341,1 \pm 33,95$
Albumina (g/dL)	$2,6 \pm 0,24$	$2,37 \pm 0,27$
CPK (U/L)	$3788,8 \pm 280$	$3849,9 \pm 257$
TGO (U/L)*	$92,78 \pm 25,35$	$63 \pm 16,23$
TGP (U/L)*	$19 \pm 8,05$	$11,3 \pm 6,06$

744 Os resultados apresentam média e desvio padrão. N = 20. * $p < 0,05$.

745

746

747

748

749 6.7 Análise histológica do fígado

750

751 As análises histológicas do fígado mostraram que 80% dos ratos alimentados
752 com a dieta hiperlipídica desenvolveram um quadro de esteatose acentuada (figura
753 6D e E), enquanto que o restante (20%) desenvolveu um grau moderado de
754 esteatose. Dentre os animais do grupo controle, apenas 20% apresentaram
755 esteatose discreta (figura 6B).

756

757

758

759

760

761

762

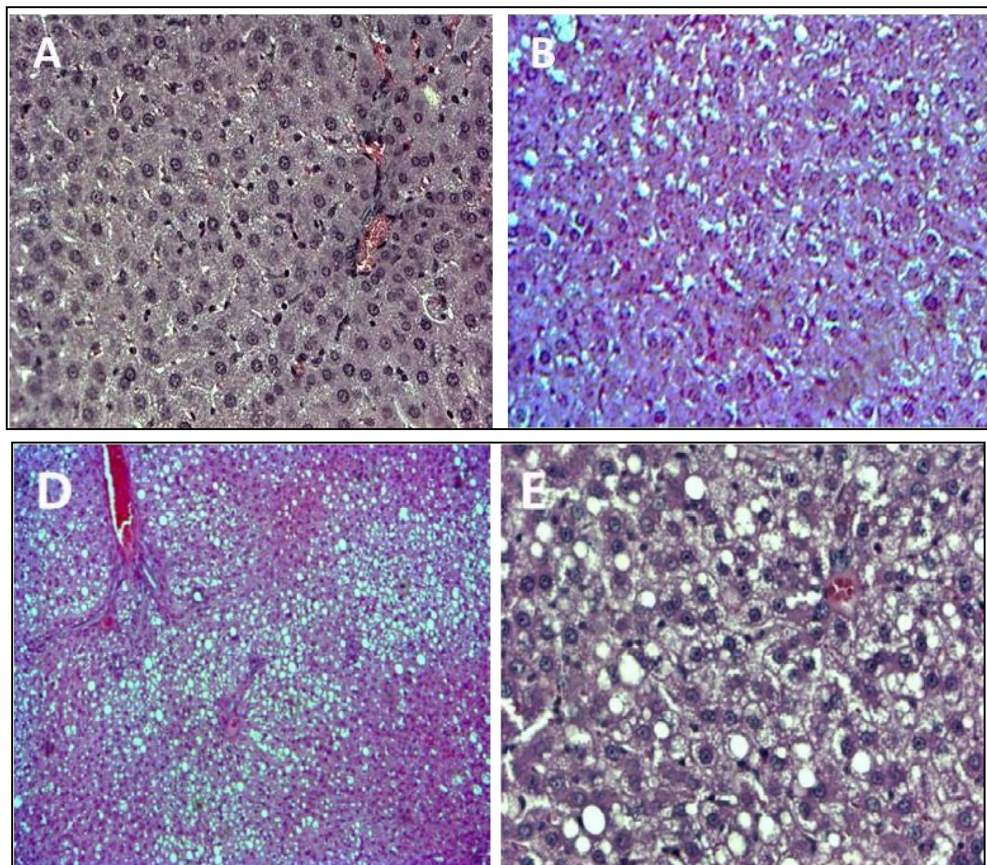
763

764

765

766

767



768

769

770 **Figura 6. Análises histológicas do fígado.** Animais do grupo controle foram
771 alimentados com a dieta balanceada AIN 93G enquanto animais do grupo
772 experimental foram alimentados com a dieta hiperlipídica por um período de 11
773 semanas. O painel **A** mostra um padrão histológico compatível com ausência de
774 esteatose. O corte histológico apresentado no painel **B** mostra o discreto
775 comprometimento do tecido hepático por lipídeos (25-50% comprometimento). Os
776 painéis **D** e **E** mostram um padrão histológico compatível com esteatose de grau
777 acentuado (mais de 75% de comprometimento). A forma macrovesicular fica
778 evidente nas imagens apresentadas. Coloração HE; objetivas de 10x e 63x.

779

780

781

782

783

784 6.8 Análise histológica do rim

785

786 Os dados histológicos obtidos a partir da análise dos rins mostraram que 30%
787 dos animais do grupo experimental apresentaram algum tipo de alteração
788 morfológica em pelo menos um dos rins (figura 7 C e D). As análises apontam para
789 áreas de hialinização e vacuolização, além da presença de cilindros hialinos em
790 formação alojados nos túbulos renais (figura 7 C e D). Animais do grupo controle
791 não apresentaram alterações histológicas nos rins (figura 7 A e B).

792

793

794

795

796

797

798

799

800

801

802

803

804

805

806

807

808

809

810

811

812

813

814

815

816

817

818

819

820

821

822

823

824

825

826

827

828

829

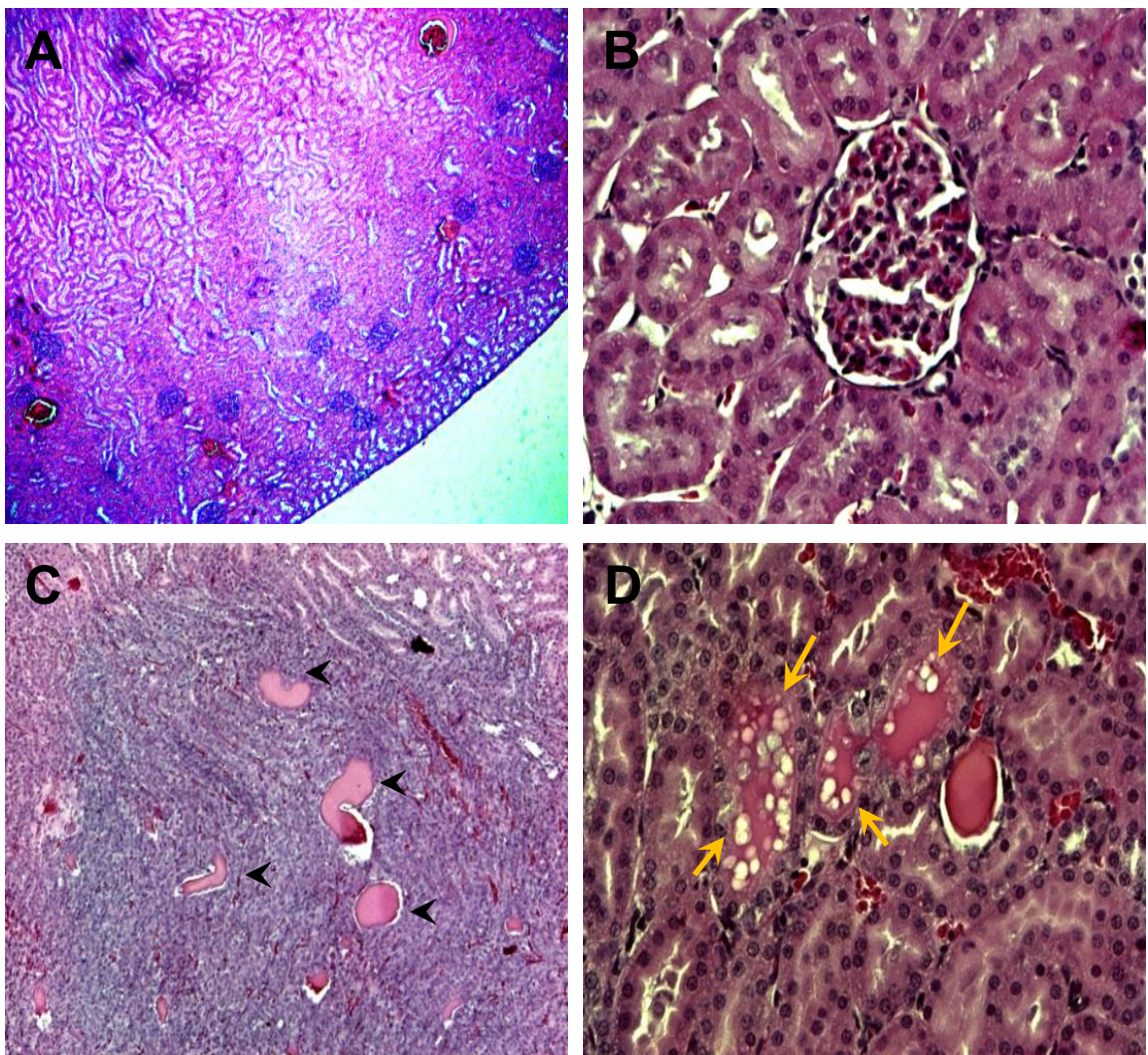


Figura 7. Análises histológicas do rim de ratos do grupo controle e experimental. Os painéis **A** e **B** mostram a morfologia do rim de animais do grupo controle. O padrão histológico é compatível com um rim normal. **C** e **D** mostram a morfologia do rim de ratos do grupo experimental. Os rins apresentam extensas áreas de hialinização (cabeças de setas) (**C**). Áreas de vacuolização próximas às zonas de hialinização estão presentes (setas amarelas) (**D**). Coloração HE; objetivas de 10x (**A** e **C**) e 63x (**B** e **D**).

830 6.9 Análise do mesentério

831

832 As análises histológicas do mesentério mostraram que 60% dos animais do
833 grupo experimental apresentaram aumento no número e no diâmetro dos vasos
834 sanguíneos mesentéricos. A figura 8 (C e D) mostra o mesentério de um dos ratos
835 do grupo experimental corado com azul de toluidina, onde podemos observar o
836 aumento da vascularização, quando comparado com o grupo controle (A e B).
837 Análises macroscópicas do mesentério mostraram depósitos de gordura ao redor
838 dos vasos mesentéricos maiores nos ratos do grupo experimental, enquanto que o
839 grupo controle não apresentou tais acúmulos.

840

841

842

843

844

845

846

847

848

849

850

851

852

853

854

855

856

857

858

859

860

861

862

863

864

865

866

867

868

869

870

871

872

873

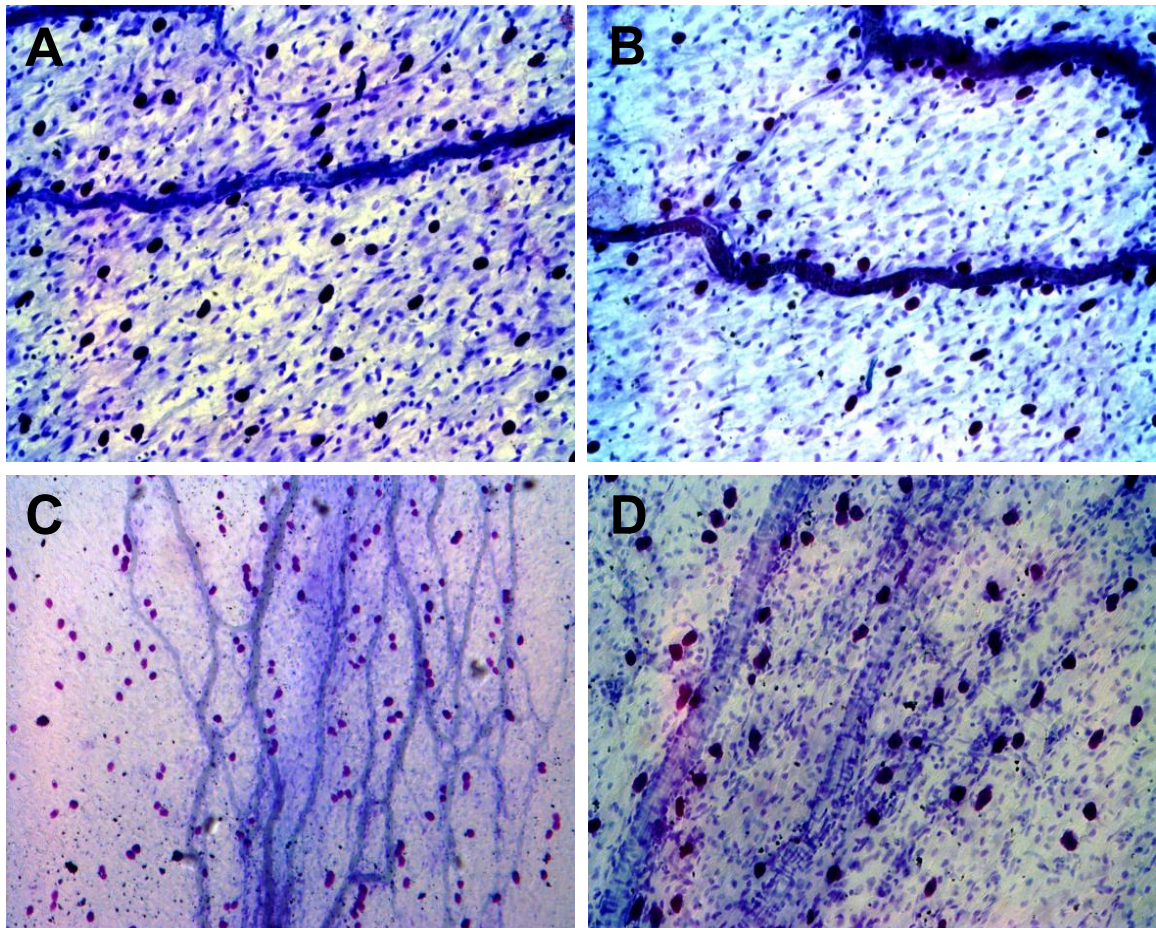


Figura 8. Análises histológicas do mesentério de ratos do grupo controle e experimental. Animais de ambos os grupos foram alimentados *ad libitum* por um período de 11 semanas. Os painéis **A** e **B** mostram o mesentério de animais do grupo controle. O padrão histológico é compatível com um mesentério normal. **C** e **D** mostram o mesentério de ratos do grupo experimental. O mesentério apresenta maior número de vasos (**C**) com ligeiro aumento na vasculatura (**D**). Coloração azul de toluidina; objetivas de 10x (**C**) e 63x (**A**, **C** e **D**).

874 7 DISCUSSÃO

875

876

877 O ponto de partida para o desenvolvimento do presente trabalho foi a
878 hipótese de que dietas ricas em gorduras saturadas promoveriam além do ganho de
879 peso, alterações bioquímicas e histológicas em ratos machos da linhagem *Wistar*.

880 O consumo excessivo de calorias aliado a diminuição do gasto energético é
881 considerado um fator predisponente para obesidade. O grau de obesidade, ou até
882 mesmo a própria condição é avaliada através do índice de Lee, em ratos, onde
883 valores a partir de 0,3g/cm³ indicam obesidade (BERNARDIS e PATTERSON,
884 1968).

885 Os dados encontrados mostram que a dieta hiperlipídica induz obesidade em
886 ratos após onze semanas de exposição à mesma, corroborando com os dados
887 obtidos por outros grupos de pesquisa (ZHAO et al., 2013; LIM et al., 2016;
888 TUOMINEN et al., 2013; WANG et al., 2011; BORBA et al., 2011). Contudo, foi
889 observado que 30% dos animais alimentados com a dieta balanceada atingiram
890 índices que os enquadram como obesos. Todavia, tal condição pôde ser alcançada
891 mediante a rotina de alimentação, *ad libitum*, e pela ausência de atividade física.
892 Essa, por sua vez influencia positivamente o metabolismo de lipídeos e glicose,
893 melhoram níveis de inflamação, aumentam gasto energético mantendo o peso
894 corporal, reduzem ingestão alimentar e peroxidação lipídica e melhoram a atividade
895 de enzimas antioxidantes (NASHAR e EGAN, 2014; EMANI et al, 2016).

896 O consumo excessivo de calorias associado ao sedentarismo, são fatores que
897 podem contribuir para aumento do ganho de peso. Contudo, a quantidade de
898 calorias ingeridas não necessariamente se refere à quantidade de alimento
899 consumido. De fato, nossos dados mostram que embora não houvessem diferenças
900 significativas entre a quantidade de dieta ingerida para os grupos, 100% dos ratos
901 alimentados com a dieta hiperlipídica apresentaram índices superiores a 0,3g/cm³.

902 Em recente estudo foi observado que ratos passam a ingerir maiores
903 quantidades de dieta quando esta apresenta como fonte de lipídeos a banha de
904 porco (JURGONSKI, JUSKIEWICZ, E ZDUNCZYK, 2014). Estes dados
905 aparentemente contradizem nossos achados, contudo, no referido estudo a
906 quantidade de banha utilizada perfaz 16% da dieta, enquanto que nossos

907 experimentos utilizam 68,7%, sugerindo que a quantidade de calorias ingeridas
908 limita a busca pelo alimento.

909 A saciedade está diretamente relacionada à quantidade de energia disponível.
910 Estudos indicam que o controle da quantidade de gordura corporal está associado à
911 leptina, um hormônio sacietogênico produzido pelo tecido adiposo (ZHANG et al.,
912 1994; KLOK et al., 2007). Esta molécula é capaz de reduzir o apetite a partir da
913 inibição da formação de neuropeptídeos relacionados ao apetite, como o
914 neuropeptídeo Y, além de estimular o aumento da expressão de neuropeptídeos
915 anorexígenos (FRIEDMAN e HALAAS, 1998). Dessa forma, embora não tenhamos
916 investigado a influência da leptina sobre ratos alimentados com a dieta hiperlipídica,
917 nossos dados sugerem que a alta quantidade de calorias ingeridas pode contribuir
918 para a saciedade dos animais.

919 Nossos dados mostram que embora a dieta hiperlipídica ofereça mais
920 calorias, ratos alimentados com esta apresentaram ganho de peso
921 significativamente maior nas décima e décima primeira semanas de experimentos.
922 Entretanto, foi observado que mesmo não existindo grandes variações no peso
923 absoluto entre os grupos, ratos alimentados com a dieta hiperlipídica apresentam
924 mais gordura visceral e perirenal, comparado ao grupo controle. Esse acúmulo de
925 gordura, além de promover o ganho de peso, pode contribuir para instauração de
926 doenças crônicas como diabetes mellitus tipo 2, assim como problemas
927 cardiovasculares. (TUOMINEN et al., 2013; TAKAHASI et al., 2013).

928 Vários estudos têm associado o uso de certas dietas, sobretudo as ricas em
929 gorduras, com a prevalência de patologias como esteatose hepática
930 (CHARBONNEAU et al., 2007; LIEBER et al., 2004; FESTI et al., 2004). A esteatose
931 é considerada a forma mais leve da entidade patológica conhecida como doença
932 hepática gordurosa não alcóolica (DHGNA) seguida pela esteato-hepatite, fibrose e
933 cirrose hepáticas, e constitui importante fator de risco para o diabetes mellitus tipo 2
934 e a síndrome metabólica (ADAMS et al., 2009). Além disso, estudos em humanos
935 obesos mostraram que a esteatose pode evoluir para quadros avançados de fibrose,
936 cirrose, inflamação, culminando em carcinoma hepatocelular (FESTI et al., 2004).

937 Nossos dados mostraram que animais submetidos a uma dieta rica em
938 lipídeos apresentaram esteatose mais evidente, e em grau mais acentuado (figura

939 8), quando comparados com animais alimentados com a dieta balanceada. As
940 análises histológicas mostraram que 100% dos animais alimentados com a dieta
941 hiperlipídica apresentaram esteatose, onde 80% destes com grau acentuado, o que
942 reforça a hipótese de que o processo patológico está intimamente ligado aos hábitos
943 alimentares.

944 O acúmulo de gordura em ratos alimentados com a dieta hiperlipídica não
945 refletiu no aumento de peso do fígado, o qual pode ocorrer mediante o acúmulo de
946 gordura intra-hepática, favorecendo a condição de esteatose não alcoólica
947 decorrente do stress oxidativo e inflamação crônica induzida por ácidos graxos
948 (WANG et al., 2011; KOOPMAN et al., 2014; GREEN e HODSON, 2014;
949 BIRKENFELD e SHULMAN, 2014).

950 A prevalência de pacientes que fazem diálise e tem IMC acima de 35 kg/m²
951 aumentou em 64% na última década (KRAMER e LUKE, 2007). Recentes estudos
952 tem mostrado a relação entre complicações renais e obesidade (VAN DER
953 HEIJDEN et al., 2015; D'AGATI et al., 2016; SARATHY et al., 2016). Como visto
954 anteriormente, o acúmulo de gorduras pode contribuir para o surgimento do diabetes
955 mellitus tipo 2 e da hipertensão arterial (TUOMINEN et al., 2013; TAKAHASI et al.,
956 2013). Estas condições são consideradas como agentes causais da doença renal
957 crônica (DRC), sugerindo que a obesidade possa atuar como fator causal de DRC.
958 De fato, estudos tem mostrado que tanto animais quanto humanos obesos
959 apresentam alterações na fisiologia renal como vasodilatação da arteríola aferente,
960 aumento do fluxo sanguíneo renal, hipertensão intraglomerular e hiperfiltração renal,
961 com consequente aumento da reabsorção tubular proximal de sódio (CHAGNAC et
962 al., 2000; HALL et al., 1993). Além disso, foi observado que a obesidade prolongada
963 contribui para alterações histológicas associadas com o aumento do volume
964 glomerular como glomeruloesclerose segmentar focal e espessamento das
965 membranas basais glomerulares e tubulares (HENEGAR et al., 2001; KAMBHAM et
966 al., 2001).

967 Em nossas investigações foram observadas alterações histológicas nos rins
968 de ratos obesos. As análises histológicas apontam extensas áreas de hialinização
969 associadas a deformações no diâmetro dos túbulos renais. Estes achados
970 associados à presença de hemácias íntegras e leucócitos no sedimento urinário
971 sugerem lesão renal. Além disso, podemos sugerir que o aumento de gordura

972 visceral e perirenal exerçam uma compressão mecânica sobre os rins favorecendo a
973 deposição de matriz extracelular na medula renal com conseqüente aumento da
974 pressão intersticial e reabsorção de sódio pelos túbulos renais, o que contribuiria
975 para um aumento da pressão arterial.

976 Obesos podem apresentar quadros de microalbuminúria e proteinúria, devido
977 um quadro de hiperfiltração glomerular decorrente do aumento da pressão arterial
978 (RIBSTEIN et al., 1995; WESSON et al., 1985). Embora não tenhamos avaliado a
979 pressão arterial, os ratos considerados obesos apresentaram níveis
980 significativamente altos de proteína na urina, reforçando a hipótese de lesão renal.
981 De fato, estudos em cães obesos mediante uma dieta rica em gorduras mostram
982 que, em cinco semanas após o início da dieta, ocorre uma elevação de 30% da
983 filtração glomerular em relação ao período basal. Além disso, os animais
984 apresentam balanço positivo de sódio, hipertensão arterial e microalbuminúria
985 (PAULA et al., 2004). Danos renais como proteinúria, hiperfiltração glomerular e
986 insuficiência renal, podem também aumentar a incidência pelo consumo de dietas
987 com redução de carboidratos e proteínas elevadas. (FRIEDMA et al; 2012).

988 Dietas com alto teor de gorduras podem induzir distúrbios metabólicos em
989 roedores, se assemelhando com a síndrome metabólica observada em humanos
990 (BUETTNER et al., 2007). Vários estudos são controversos no sentido de definir
991 valores de referência para roedores (DANTAS et al., 2006; SANTOS et al., 2010;
992 MELO et al., 2012; LIMA et al., 2014). Entretanto, nossos achados mostraram que
993 ratos alimentados com a dieta hiperlipídica não apresentam níveis aumentados dos
994 parâmetros avaliados, exceto a glicose em jejum que apresentou elevada par ambos
995 os grupos.

996 Estudos relatam que a substituição de fontes energéticas como gorduras e
997 proteínas e a redução de carboidratos, melhoram níveis plasmáticos de lipídeos
998 (WESTMAN et al., 2007). Além disso, estudos que associam dietas com redução de
999 carboidratos e aumento da quantidade de gorduras, mostraram redução dos níveis
1000 de triglicerídeos e colesterol em ratos (VOLEK et al., 2008; CHEN et al., 2015). Estes
1001 dados corroboram com nossos achados onde as análises bioquímicas do soro
1002 mostraram que animais do grupo experimental apresentam níveis significativamente
1003 menores de colesterol total, LDL, HDL, uréia, TGO e TGP. Contudo, existem estudos
1004 onde a redução de carboidratos na dieta influencia negativamente o metabolismo

1005 lipídico, promovendo um aumentando nos níveis de colesterol e LDL no modelo
1006 murino (BAUMANN et al., 2013; TORRES –VILALLOBOS, 2015).

1007 Os níveis de colesterol são comumente associadas a proteção contra doença
1008 cardiovasculares, trombose e acidente vascular cerebral (AVC), existem
1009 especulações sugerindo que níveis de colesterol baixo (<180mg/dL) pode estar
1010 associados a uma piora da condição cardíaca e cerebral (SINGH et al., 1998;
1011 EPSTEIN, 1992; IRIBARREN et al., 1995). Dessa forma, valores de colesterol total e
1012 frações significativamente menores em ratos alimentados com a dieta hiperlipídica
1013 não podem ser considerados como benefício de uma dieta rica em gorduras
1014 saturadas.

1015 O aumento de TGO está comumente associada a cirrose e fibrose hepática,
1016 sendo menos frequente quando associada a esteatose (ANGULO et al., 1999).
1017 Contudo, não existe relação expressa entre o grau de esteatose hepática não
1018 alcóolica e elevação de transaminase hepáticas (BROWNING et al., 2004). Assim,
1019 os níveis reduzidos das transaminases hepáticas podem sugerir infecção no trato
1020 urinário, e indicar azotemia relacionada a algum dano renal. Contudo, não foram
1021 observados níveis aumentados para uréia e creatinina. Esses condizem com o
1022 estudo de Xu et al. (2015), onde afirmam que uma restrição calórica diminui níveis
1023 de creatinina e uréia, reduzindo a incidência de doenças renais e aumentando a taxa
1024 de sobrevivida em modelos de roedores (XU et al., 2015).

1025 Nossos dados mostraram que dietas ricas em gordura podem contribuir para
1026 um possível efeito angiogênico nos vasos mesentéricos. Este aumento da
1027 vascularização sugere, em princípio, uma melhoria na capacidade de absorção de
1028 nutrientes. No entanto, existem relatos que a angiogênese tem um papel importante
1029 no desenvolvimento, crescimento e metástase tumoral, nas alterações dos vasos e
1030 na arquitetura vascular com aumento da densidade de pequenos vasos, como
1031 observado no carcinoma colorretal e lesões intestinais (KITAHARA et al., 2014;
1032 TIWARI et al., 2011). Tanto a angiogênese (crescimento de novos vasos a partir de
1033 vasos já existentes), quanto linfangiogênese (crescimento de novos vasos), estão
1034 relacionados não só a metástase de tumor e inflamação, mas com quadros
1035 fisiológicos de reparação tecidual (KITAHARA et al., 2014). Em estudo Sweat, et al.
1036 (2012) avaliaram que existe uma associação entre angiogênese e linfangiogênese

1037 mesentérica em ratos, sob o estímulo de inflamação (SWEAT et al., 2012). Contudo,
1038 mais esforços estão sendo aplicados para investigar este efeito no modelo murino.

1039 Diante do exposto, os achados obtidos contribuem para as investigações que
1040 visam associar hábitos alimentares com quadros patológicos como obesidade;
1041 auxiliando para a compreensão das alterações fisiológicas decorrentes de tais
1042 condições.

1043

1044

1045

1046

1047

1048

1049

1050

1051

1052

1053

1054

1055

1056

1057

1058

1059

1060

1061

1062

1063

1064

1065

1066

1067

1068

1069

1070 **8 CONCLUSÃO**

1071

1072

1073 O presente trabalho mostrou que dieta rica em gordura saturada provoca
1074 alterações relacionadas a:

1075 ✓ Ganho de peso

1076 ✓ Obesidade

1077 ✓ Aumento da gordura visceral

1078 ✓ Diminui peso de rins, testículos, baço e coração

1079 ✓ Alterações bioquímicas (TGO, TGP, Colesterol, LDL, HDL e uréia)

1080 ✓ Alterações nos parâmetros urinários (Cetona, proteínas, hemácias íntegras e
1081 leucócitos)

1082 ✓ Alterações histológicas no fígado, com grau acentuado de esteatose

1083 ✓ Alterações histológicas do rim, por extensas áreas de hialinização tubular

1084 ✓ Alterações histológicas do mesentério, com possível efeito angiogênico

1085

1086

1087

1088

1089

1090

1091

1092

1093

1094

1095

1096

1097

1098

1099

1100

1101

1102

REFERÊNCIAS

- 1103
- 1104
- 1105
- 1106 ADAMS, L.A.; WATERS, O.R.; KNUIMAN, M.W.; et al. NAFLD as a risk factor for the
1107 development of diabetes and the metabolic syndrome: an eleven-year follow-up
1108 study. **The American Journal of Gastroenterology**, v.104, p.861-867, 2009.
- 1109
- 1110 ANGULO, P.; KEACH, J.C.; BATTS, K.P.; LINDOR, K.D. Independent predictors of
1111 liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 30, n.6,
1112 1999.
- 1113
- 1114 BADIMON, J. J.; BADIMON L.; FUESTER, V. Regression of Atherosclerotic Lesions
1115 by High-Density Lipoprotein Plasma Fraction in the Cholesterol-Fed Rabbit. **Journal**
1116 **of Clinical Investigation**, v. 85, 1990.
- 1117
- 1118 BARHAM D.; TRINDER P. An improved colour reagent for the determination of blood
1119 glucose by oxidase system. **Analyst**, v.27, 1972.
- 1120
- 1121 BARTELS, H.; BÖHMER, M. Micro-determination of creatinine. **Clinica Chimica**
1122 **Acta**, v.32, 1971.
- 1123
- 1124 BAUMANN, M; et al. Lipidprofil ved lavkarbokosthold hos friske. **Tidsskrift for Den**
1125 **norske Legeforening**, 2013.
- 1126
- 1127 BELL, L. L. et al. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum
1128 and demonstration of its specificity. **Journal of Biological Chemistry**, v.195, 1952.
- 1129
- 1130 BERNARDIS, L.L.; PATTERSON, B.D. Correlation between 'Lee index' and carcass
1131 fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of**
1132 **Endocrinology**, v.40, n. 527, 1968.
- 1133
- 1134 BIRKENFELD, A.L.; SHULMAN, G.I. Non Alcoholic Fatty Liver Disease, Hepatic
1135 Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. **Hepatology**, v.59, n.2, p.713–723, 2014.
- 1136
- 1137 BUCOLO, G.; DAVID, H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use
1138 of enzymes. **Clinical Chemistry**, v.19, 1973.
- 1139
- 1140 BORBA, A.J.; et al. Dieta hiperlipídico-proteica utilizada para emagrecimento induz
1141 obesidade em ratos. **Revista de Nutrição**, v. 24, p.519-528, 2011.
- 1142
- 1143 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de
1144 Atenção Básica. **Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica:**
1145 **obesidade**. Brasília, 2014. 212p.
- 1146
- 1147 BRASIL. **Metade dos brasileiros está com excesso de peso**. Disponível em:<
1148 [http://www.brasil.gov.br/saude/2015/04/metade-dos-brasileiros-esta-com-excesso-](http://www.brasil.gov.br/saude/2015/04/metade-dos-brasileiros-esta-com-excesso-de-peso)
1149 [de-peso](http://www.brasil.gov.br/saude/2015/04/metade-dos-brasileiros-esta-com-excesso-de-peso)> Acesso: 20 abr. 2016.
- 1150

- 1151 BROWNING, J.D.; et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the
1152 United States: Impact of ethnicity. **Hepatology**, v. 40, n.6, 2004.
- 1153
- 1154 BUETTNER, R., SCHOLMERICH, J., BOLLHEIMER, L.C. High-fat diets: modeling
1155 the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity (Silver Spring)**, v.15,
1156 p.798-808, 2007.
- 1157
- 1158 BURLAMAQUI, I. M. et al. Hepatic and biochemical repercussions of a
1159 polyunsaturated fat-rich hypercaloric and hyperlipidic diet in Wistar rats. **Arquivos de**
1160 **Gastroenterologia**, São Paulo, v. 48, N. 2, p. 153-158, 2011.
- 1161
- 1162 BURSTEIN, M.; SCHOLNICK, H. R.; MORFIN, R. Rapid method for the isolation of
1163 lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. **The Journal of**
1164 **Lipid Research**, v.11, 1970.
- 1165
- 1166 BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. Tietz textbook of clinical chemistry. **Philadelphia:**
1167 **W.B.Saunders**, 1994.
- 1168
- 1169 CHAGNAC, A.; et al. Glomerular hemodynamics in severe obesity. **American**
1170 **journal of physiology: Renal physiology**, v. 278, 2000.
- 1171
- 1172 CASTELLI, W. P.; et al; Cholesterol and other lipids in coronary heart Disease.
1173 **Circulation**, v. 55, 1977.
- 1174
- 1175 CHANEY, A. L.; MARBACH, E. P. Modified reagents for determination of urea and
1176 ammonia. **Clinical Chemistry**, v.8, 1962.
- 1177
- 1178 CHARBONNEAU, A.; UNSON, C.G.; LAVOIE, J.M. High-fat diet-induced hepatic
1179 steatosis reduces glucagonreceptor content in rat hepatocytes: potential interaction
1180 with acute exercise. **The Journal of Physiology**, v.579, p 255–267, 2007.
- 1181
- 1182 CHEN, J.H; et al. A Moderate Low-Carbohydrate Low-Calorie Diet Improves Lipid
1183 Profile, Insulin Sensitivity and Adiponectin Expression in Rats. **Nutrients**, v.7, n.6,
1184 2015.
- 1185
- 1186 D'AGATI, V.D.; et al. Obesity-related glomerulopathy: clinical and pathologic
1187 characteristics and pathogenesis. Nature reviews. **Nephrology**, 2016.
- 1188
- 1189 DANTAS, J.A.; et al. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de
1190 ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná.
1191 **Scientia plena**, v.28, n.2, p.165-170, 2006.
- 1192
- 1193 DESAI, M.; BEALL, M.; ROSS, M.G. Developmental Origins of Obesity: Programmed
1194 Adipogenesis. **Currents Diabetes Reports**, v.1, n.13, p.27–33, 2013.
- 1195
- 1196 DOUMAS, B. T.; WATSON, W. A.; BIGGS, H. G. Albumin standards and the
1197 measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clinica Chimica Acta**, v.
1198 31, n.1, 1971.

- 1199 EL-KHOLY, T.A.; et al. The Effect of Extra Virgin Olive Oil and Soybean on DNA,
1200 Cytogenicity and Some Antioxidant Enzymes in Rats. **Nutrients**, v.6, p.2376-2386,
1201 2014.
- 1202
- 1203 EMAMI, S.R.; et al. Impact of eight weeks endurance training on biochemical
1204 parameters and obesity – induced oxidative stress in high fat diet – fed rats. **Journal**
1205 **of Exercise Nutrition & Biochemistry**, v.1, n. 20, 2016.
- 1206
- 1207 EPSTEIN, F.H. Low serum cholesterol, cancer and other non cardiovascular
1208 disorders. **Atherosclerosis**, v.94, p.1-12,1992.
- 1209
- 1210 FABINY, D. L.; ERTINGHAUSEN, G. Automated reaction-rate method for
1211 determination of serum creatinine with the Centrif. **Clinical Chemistry**, v.17, 1971.
1212
- 1213 FELIZARDO, R.J.F.; SILVA, M.B.; AGUIAR, C.F.; CÂMARA, N.O.S. Obesity in
1214 kidney disease: A heavyweight opponent. **World Journal of Nephrology**, v.3, n.3,
1215 p.50-6, 2014.
- 1216
- 1217 FESTI, D.; et al. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic
1218 significance. **Obesity Reviews**, v. 5, p. 27-42, 2004.
- 1219
- 1220 FRIEDMAN, A.N.; et al. Comparative Effects of Low-Carbohydrate High-Protein
1221 Versus Low-Fat Diets on the Kidney. **Clinical Journal of the American Society of**
1222 **Nephrology**, v.7, n.7, 2012.
- 1223
- 1224 FRIEDMAN, J.M., HALAAS, J.L. Leptin and the regulation of body weight in
1225 mammals. **Nature**, v.395, p.763-770, 1998.
- 1226
- 1227 GARCÍA-FERNÁNDEZ, E.; et al. Mediterranean Diet and Cardio Diabetes: A
1228 Review. **Nutrients**, v.6, p.3474-3500, 2014.
- 1229
- 1230 GENTZKOW, C. J.; MASEN, J. M. An accurate method for the determination of blood
1231 urea nitrogen by direct nesslerization. **The Journal of Biological Chemistry**,
1232 v.143,1942.
- 1233
- 1234 GEORGOULIS, M.; KONTOGIANNI, M.D.; YIANNAKOURIS, N. Review:
1235 Mediterranean Diet and Diabetes: Prevention and Treatment. **Nutrients**, v.6, p.1406-
1236 1423, 2014.
- 1237
- 1238 GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins
1239 by means of the biuret reaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v.177,1949.
- 1240
- 1241 GRECO, M.; et al. Early Effects of a Hypocaloric, Mediterranean Diet on Laboratory
1242 Parameters in Obese Individuals. **Mediators of Inflammation**, 2014.
- 1243
- 1244 GREEN, C.J.; HODSON, L. Review: The Influence of Dietary Fat on Liver Fat
1245 Accumulation. **Nutrients**, v.6, p.5018-5033, 2014.
- 1246

- 1247 GROVE, T. H. Effect of reagent pH on determination of high-density lipoprotein
1248 cholesterol by precipitation with sodium phosphotungstate-magnesium. **Clinical**
1249 **Chemistry**, v.25, 1979.
1250
- 1251 HALL, J.E.; et al. Obesity-induced hypertension. Renal function and systemic
1252 hemodynamics. **Hypertension**, v.22, p.292-299, 1993.
1253
- 1254 HARBRON, J.; et al. Fat Mass and Obesity-Associated (FTO) Gene Polymorphisms
1255 Are Associated with Physical ctivity, Food Intake, Eating Behaviors, Psychological
1256 Health, and Modeled Change in Body Mass Index in Overweight/Obese Caucasian
1257 Adults. **Nutrients**, v.6, p. 3130-3152, 2014.
1258
- 1259 HENEGAR, J.R.; et al. Functional and structural changes in the kidney in the early
1260 stages of obesity. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v.12,
1261 p.1211-1217, 2001.
1262
- 1263 HENRY, R. J.; SOBEL, C.; BERKMAN, S. Interferences with biuret me thods for
1264 serum proteins. Use of Benedict's qualitative glucose reagent as a biuret reagent.
1265 **Analytical Chemistry**, v.29, 1957.
1266
- 1267 HUR, K.Y.; LEE, M.S. Gut Microbiota and Metabolic Disorders. **Diabetes**
1268 **Metabolism Journal**, v.39, p.198-2039, 2015.
1269
- 1270 IRIBARREN, C.; et al. Low serum cholesterol and mortality. Which is the cause and
1271 which is the effect? **Circulation**, v.92, p.2396-2403, 1995.
1272
- 1273 ISMAIL, N.A.; et al. Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in
1274 obese and normal weight Egyptian children and adults. **Achives of Medical**
1275 **Science**, v.3, 2011.
1276
- 1277 JAFFÉ, M. Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harnerzeugt
1278 und über eine neue reaktion des kreatinins. **Physiological Chemistry**, v.10,1886.
1279
- 1280 JURGOŃSKI, A.; JUŚKIEWICZ, J.; ZDUŃCZYK, Z. A High-Fat Diet Differentially
1281 Affects the Gut Metabolism and Blood Lipids of Rats Depending on the Type of
1282 Dietary Fat and Carbohydrate. **Nutrients**, v.6, p.616-626, 2014.
1283
- 1284 KAMBHAM, N.; et al.Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. **Kidney**
1285 **international**, v.59, p. 1498-1509, 2001.
1286
- 1287 KARLSSON, H.K.; et al. Obesity Is Associated with White Matter Atrophy: A
1288 Combined Diffusion Tensor Imaging and Voxel-Based Morphometric Study. **Obesity**
1289 **biology and integrated physiology**, v.21, p.2530-2537, 2013.
1290
- 1291 KITAHARA, S.; et al. Vasohibin-2 modulates tumor onset in the gastrointestinal tract
1292 by normalizing tumor angiogenesis. **Molecular cancer**, v. 13, n.99, 2014.
- 1293 KLOK, M.D., JAKOBSDOTTIR, S., DRENT, M.L. The role of leptin and ghrelin in the
1294 regulation of food intake and body weight in humans: a review. **Obesity reviews : an**

- 1295 **official journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 8, p.
1296 21-34. 2007.
- 1297
- 1298 KOOPMAN, K.E.; et al. Hypercaloric Diets With Increased Meal Frequency, but Not
1299 Meal Size, Increase Intrahepatic Triglycerides: A Randomized Controlled Trial.
1300 **HEPATOLOGY Official Journal of the American Association for the Study of**
1301 **Liver Diseases**, 2014.
- 1302
- 1303 KOSTNER, G.M. et al. Determination of high-density lipoproteins: screening methods
1304 compared. **Clinical Chemistry**, v.25, n.6, 1979.
- 1305
- 1306 KRAMER, H.; LUKE, A. Obesity and kidney disease: a big dilemma. **Current**
1307 **opinion in nephrology and hypertension**, v.16, p.237-241, 2007.
- 1308
- 1309 LAWRENCE, G.D. Dietary Fats and Health: Dietary Recommendations in the
1310 Context of Scientific Evidence. **Advances in Nutrition an International Review**
1311 **Journal**, v.4, p.294–302, 2013.
- 1312
- 1313 LAZIC, M.; et al. Reduced Dietary Omega-6 to Omega-3 Fatty Acid Ratio and 12/15-
1314 Lipoxygenase Deficiency Are Protective against Chronic High Fat Diet-Induced
1315 Steatohepatitis. **PloS one**, v.9, n.9, 2014.
- 1316
- 1317 LDUNN, S.; SIU, W.; FREUND, J.; HBOUTCHER, S. The effect of a lifestyle
1318 intervention on metabolic health in young women. **Diabetes, Metabolic Syndrome**
1319 **and Obesity: Targets and Therapy**, v.7, p.437– 444, 2014.
- 1320
- 1321 LECOMTE, V.; et al. Changes in Gut Microbiota in Rats Fed a High Fat Diet
1322 Correlate with Obesity-Associated Metabolic Parameters. **PloS one**, 2015.
- 1323
- 1324 LIEBER, C.S.; et al. Model of non alcoholic steatohepatitis. **The American Journal**
1325 **of Clinical Nutrition**, v.79, p.502–509, 2004.
- 1326
- 1327 LIM S. M, et al. Germinated brown rice ameliorates obesity in high-fat diet
1328 induced obese rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16,
1329 n.140, 2016.
- 1330
- 1331 LIMA, C. M.; et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos
1332 (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade
1333 Tiradentes. **Scientia Plena**, v.10, n .3, 2014.
- 1334
- 1335 LIVINGSTON, E.H.; ZYLKE, J.W. Progress in Obesity Research Reasons for
1336 Optimism. **JAMA**, v.308, n.11, 2012.
- 1337
- 1338 MARINA, A.; et al. Effects of Dietary Fat and Saturated Fat Content on Liver Fat and
1339 Markers of Oxidative Stress in Overweight/Obese Men and Women under Weight-
1340 Stable Conditions. **Nutrients**, v.6, n.11, p. 4678-4690, 2014.
- 1341
- 1342 MATARESE, L.E.; PORIES, W.J. Adult weight loss diets: metabolic effects ad
1343 outcomes. **Nutrition in Clinical Prattice**, v. 29, n.6, p.759 – 767, 2014.
- 1344

- 1345 MAYNERIS-PERXACHS, J.; et al. Effects of 1-Year Intervention with a
1346 Mediterranean Diet on Plasma Fatty Acid Composition and Metabolic Syndrome in a
1347 Population at High Cardiovascular Risk. **PloS one**, v.9, n.3, 2014.
1348
- 1349 MELO, M.G.D.; DÓRIA, G.A.A.; SERAFINI, M.R.; ARAÚJO, A.A.S. Valores de
1350 referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem
1351 Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe.
1352 **Scientia Plena**, v.8, n.4, 2012.
1353
- 1354 NASHAR, K.; EGAN, B.M. Relationship between chronic kidney disease and
1355 metabolic syndrome: current perspectives. **Metabolic Syndrome and Obesity:
1356 Targets and Therapy**, v.7, p.421–435, 2014.
1357
- 1358 NETTLETON, J.A.; LEGRAND, P.; MENSINK, R.P. ISSFAL 2014 Debate: It Is Time
1359 to Update Saturated Fat Recommendations. **Annals Nutrition & Metabolism**, v.66,
1360 p.104–108, 2015.
1361
- 1362 NIENABER-ROUSSEAU, C.; et al. Interactions between C-Reactive Protein
1363 Genotypes with Markers of Nutritional Status in Relation to Inflammation. **Nutrients**,
1364 v.6, p.5034-5050, 2014.
1365
- 1366 NOVELLI, E.L.B.; et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats.
1367 **Labotatory Animals**, v.41, 2007.
1368
- 1369 PAULA, R.B., DA SILVA, A.A., HALL, J.E.,. Aldosterone antagonism attenuates
1370 obesity-induced hypertension and glomerular hyperfiltration. **Hypertension**, v. 43,
1371 p.41-47, 2004.
1372
- 1373 RAUSCHER, E. et al. Optimized conditions for determining activity concentration of
1374 α -amylase in serum, 1,4- α -D-4-nitrophenylmaltoheptoside as substrate. **Clinical
1375 Chemistry**, v.31, n.1, 1985.
1376
- 1377 RIBSTEIN, J., DU CAILAR, G., MIMRAN, A. Combined renal effects of overweight
1378 and hypertension. **Hypertension**, v.26, p.610-615, 1995.
1379
- 1380 ROSQVIST, F.; et al. Overfeeding Polyunsaturated and Saturated Fat Causes
1381 Distinct Effects on Liver and Visceral Fat Accumulation in Humans. **Diabetes**, v.63
1382 p.2356–2368, 2014.
1383
- 1384 RUTH, M.R.; et al. Consuming a hypocaloric high fat low carbohydrate diet for 12
1385 weeks lowers C-reactive protein, and raises serum adiponectin and high density
1386 lipoprotein-cholesterol in obese subjects. **Metabolism: clinical and experimental**,
1387 v.62, n.12, 2013.
1388
- 1389 SANTOS, M.R.V.; et al. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos
1390 (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da
1391 Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v.6, n.10, 2010.
1392
- 1393 SARATHY, H.; et al. Abdominal Obesity, Race and Chronic Kidney Disease in Young
1394 Adults: Results from NHANES 1999-2010. **PloS one**, 2016.

- 1395 SARI-SARRAF; et al. Acombined continuous and interval aerobic training improves
1396 metabolic syndrome risk factors in men. **International Journal of General**
1397 **Medicine**, v.8, p.203–210, 2015.
- 1398
1399 SETIAN, N. Efeitos anoréticos do PYY na obesidade. **Revista da Associação**
1400 **Médica Brasileira**, v. 50, n. 3, 2004.
- 1401
1402 SCIENTIFIC DIVISION, WORKING GROUP ON ENZYMES. International Federation
1403 of Clinical Chemistry IFCC methods for measurement of catalytic concentration of
1404 enzymes. **Clinica Chimica Acta**, v. 281, v.1-2,1999.
- 1405
1406 SINGH, R.B.; et al. Serum cholesterol and coronary artery disease in populations
1407 with low cholesterol levels: the Indian paradox. **International journal of cardiology**,
1408 v.65, p.81-90, 1998.
- 1409
1410 SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diretrizes Brasileiras Sobre
1411 Dislipidemias e Diretrizes de Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de**
1412 **Cardiologia**, v.77, supl. III p.1-48, 2001.
- 1413
1414 SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diretrizes Brasileiras Sobre
1415 Dislipidemias e Diretrizes de Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de**
1416 **Cardiologia**, v.101, supl. 1 p.1-22, 2013.
- 1417
1418 SWEAT, R.S; STAPOR, P.C; MURFEE, W.L. Relationships between
1419 lymphangiogenesis and angiogenesis during inflammation in
1420 rat mesenterymicrovascular networks. **Plos one**, v.7, n.9, 2012.
- 1421
1422 TARANTAL, A.F.; BERGLUND, L. Review: Obesity and Lifespan Health—
1423 Importance of the Fetal Environment. **Nutrients**, v.6, p. 725-1736, 2014.
- 1424
1425 TAKAHASHI, H.; HOSONO, K.; ENDO, H.; NAKAJIMA, A. Colon epithelial
1426 proliferation and carcinogenesis in diet-induced obesity. **Journal of**
1427 **Gastroenterology and Hepatology**, v.4 n. 41-7 2013.
- 1428
1429 TIWARI, A.K.; et al. Neo-Angiogenesis and the Premalignant Micro-Circulatory
Augmentation of Early Colon Carcinogenesis. **Cancer letter**, v. 2, n. 306, 2011.
- 1430
1431 TORRES-VILLALOBOS, G.; et al. Combined high-fat diet and sustained high
1432 sucrose consumption promotes NAFLD in murine model. **Annals of Hepatology**,
1433 v.14, n.4, 2015.
- 1434
1435 TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an
1436 alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**, v.6, 1969.
- 1437
1438 TUOMINEN, I.; et al. Diet-Induced Obesity Promotes Colon Tumor Development in
1439 Azoxymethane-Treated Mice. **PloS one**, v.8, n.4, 2013.
- 1440
1441 VAN DER HEIJDEN R.A., et al. Obesity-induced chronic inflammation in high fat
1442 diet challenged C57BL/6J mice is associated with acceleration of age-dependent
renal amyloidosis. **Scientific Reports**, 2015.

- 1443 VOLEK, J.S; et al. Carbohydrate Restriction has a More Favorable Impact on the
1444 Metabolic Syndrome than a Low Fat Diet. **Springer Link**, v. 44, n. 4, 2008.
1445
- 1446 VIRELLA, M.F.L. et al. Cholesterol determination in high-density lipoproteins
1447 separated by three different methods. **Clinical Chemistry**, v.23, 1977.
1448
- 1449 XU, H.; et al. Research Article Proinflammatory Cytokines in Prostate Cancer
1450 Development and Progression Promoted by High-Fat Diet. **BioMed Research
1451 International**, 2015.
1452
- 1453 XU, XIAO-MENG; et al. Beneficial Effects of Caloric Restriction on Chronic Kidney
1454 Disease in Rodent Models: A Meta-Analysis and Systematic Review. **Plos one**, v.
1455 10, n.12, 2015.
1456
- 1457 YOUNG, D.S. Effects of drugs on clinical laboratory tests - vol. 2, 5 ed. **Washington
1458 DC: AACC Press**, 2000.
1459
- 1460 WANG, X.; et al. Liver fatty acid composition in mice with or without nonalcoholic fatty
1461 liver disease. **Lipids in Health and Disease**, v.10, n. 234, 2011.
1462
- 1463 WARNICK, R.G.; NGUYEN, T.; ALBERS, A. A. Comparison of Improved Precipitation
1464 Methods for Quantification of High-Density Lipoprotein Cholesterol. **Clinical
1465 Chemistry**, v.2, 1985.
1466
- 1467 WESSON, D.E., KURTZMAN, N.A., FROMMER, J.P. Massive obesity and nephrotic
1468 proteinuria with a normal renal biopsy. **Nephron**, v.40, p.235-237, 1985.
1469
- 1470 WESTGARD, J. O. et al. A multi-rule shewhart chart quality control in clinical
1471 chemistry. **Clinical Chemistry**, v.27, 1981.
1472
- 1473 WESTMAN, E.C.; et al. Low-carbohydrate nutrition and metabolism¹:²:³. **The
1474 American Journal of Clinical Nutrition**, v. 86, n.2, 2007.
1475
- 1476 WHITING, D.M.; et al. Lateral hypothalamic area deep brain stimulation for refractory
1477 obesity: a pilot study with preliminary data on safety, body weight, and energy
1478 metabolism. **Journal of Neurosurgery**, v.119, p.56–63, 2013.
1479
- 1480 WINN-DEEN, E.S. et al. Development of a direct assay for α -amylase. **Clinical
1481 Chemistry**, v.34, n.10, 1988.
1482
- 1483 WU, A.H ; BOWERS, JR., G.N. Evaluation and comparison of immunoinhibition and
1484 immunoprecipitation methods for differentiating MB and BB from macro forms of
1485 creatine kinase isoenzymes in patients and healthy individuals. **Clinical Chemistry**,
1486 v.28, 1982.
1487
- 1488 ZHANG, Y.; et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human
1489 homologue. **Nature**, v.372, p.425-432, 1994.
1490
- 1491 ZHANG, Y.; et al. Obesity: Pathophysiology and Intervention. **Nutrients**, v.6, p.5153-
1492 5183, 2014.

1493 ZHAO, M.; et al. Differential Responses of Hepatic Endoplasmic Reticulum Stress
1494 and Inflammation in Diet-Induced Obese Rats with High-Fat Diet Rich in Lard Oil or
1495 Soybean Oil. **Plos one**, v.8, n.11, 2013.

1496

1497

~~1498~~

1500

1501

1502

1503

1504

1505

1506

1507

1508

1509

1510

1511

1512

1513

1514

1515

1516

1517

1518

1519

1520

1521

1522

1523

1524

1525

1526

1527

1528

1529

1530

1531

1532

1533

1534

1535

1536

1537

1538

1539

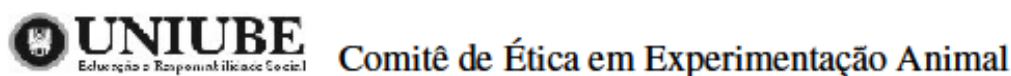
1540

1541

1542

1543
1544
1545

ANEXO



Ofício CEEA-061/2015

Uberaba, 25 de maio de 2015.

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 036/2014 relativo ao projeto intitulado "*Análise bioquímica e histológica de ratos wistar jovens submetidos a uma dieta hiperlipídico-proteica*" que tem como responsável **Prof. Marcelo Rodrigues Pinto**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei nº 11.794/08.

CERTIFICATE

We hereby certify that the protocol nº 036/2014 related to the project entitled "*Biochemical and histological analysis of Wistar rats subjected to a young hyperlipidic determining protein- diet*", under the supervision of Prof. Marcelo Rodrigues Pinto, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEA/UNIUBE) according to the law nº 11.794/08.

Atenciosamente,

Prof. Joly Ferraz Figueiredo Bittar
Coordenadora do CEEA-UNIUBE