

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Gabriela Niches da Silva

**Efeito da obesidade sobre a resposta metabólica de ratas  
Wistar de diferentes idades**

Porto Alegre  
2016

Gabriela Niches da Silva

**Efeito da obesidade sobre a resposta metabólica de ratas  
Wistar de diferentes idades**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Comissão de Graduação do curso de Nutrição da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial e obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Nutrição.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Flávia Marques Ribeiro  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia Cecconelo

Porto Alegre  
2016

### CIP - Catalogação na Publicação

da Silva, Gabriela Niches  
Efeito da obesidade sobre a resposta metabólica de  
ratas Wistar de diferentes idades / Gabriela Niches  
da Silva. -- 2016.  
27 f.

Orientador: Maria Flavia Marques Ribeiro.  
Coorientador: Ana Lúcia Ceconello.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade  
de Medicina, Curso de Nutrição, Porto Alegre, BR-RS,  
2016.

1. obesidade. 2. envelhecimento. 3. fêmeas. 4.  
dieta hipercalórica. I. Ribeiro, Maria Flavia  
Marques, orient. II. Ceconello, Ana Lúcia,  
coorient. III. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais que não mediram esforços para me dar a oportunidade de chegar até aqui.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela minha vida e por sempre me dar força, mesmo que minha fé tenha falhado em alguns momentos. Agradeço também por ter me dado uma família muito melhor do que eu poderia desejar.

À toda minha família, meus amores, meu escudo, minha base. Às minhas avós, tios, tias, primos e primas. Aos meus pais, Licia e Paulo, que são meus maiores exemplos de vida, obrigada por estarem ao meu lado em tempo integral, nos dias em que tudo parecia estar fora do lugar vocês foram a minha luz no fim do túnel, meu porto seguro e, nos melhores dias, a minha companhia para sorrir e comemorar a alegria de viver. À minha mana Renata, por ser meu modelo desde que me entendo por gente, obrigada por me ouvir, aconselhar, guiar e proteger. Ao meu cunhado Vinicius, que já deixou de ser cunhado e virou irmão há muito tempo, obrigada por todas as conversas, caronas, puxões de orelha e ensinamentos e, acima de tudo, obrigada por, junto da mana, me dar o maior presente do mundo: o Léo. Agradeço também a ele, Leonardo, que acabou de chegar a minha vida e já deu um sentido totalmente novo a ela, meu pequeno príncipe que cresce a cada dia e me ensina um pouco mais sobre o amor incondicional.

Ao amor da minha vida, Rodrigo, que foi muito mais do que um namorado nos últimos seis anos, foi amigo, foi companheiro, foi colega de estudo, foi banca de apresentações, foi parceiro de laboratório, foi estatístico, foi orientador, se desdobrou em mil pra me ajudar a chegar aqui. Obrigada por ter me apoiado durante a jornada de estudo para o vestibular, por ter comemorado comigo a nossa vitória ao ver aquele *listão* em 2012, por me ouvir falar durante dias, semanas, meses, anos sobre o que aprendi em cada aula, em cada nova descoberta, enquanto eu me apaixonava por essa profissão, que agora poderei exercer, me apaixonava ainda mais por ti. Aos meus sogros, Marta e Alex, por me receberem como uma filha e me apoiarem durante essa jornada, pelos cafés e conversas e por terem criado esse homem maravilhoso com quem quero dividir a vida.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação profissional, em especial, à professora Maria Flavia Marques Ribeiro, minha orientadora e minha “mãe” da ciência, com a senhora aprendi a pensar de um modo totalmente diferente, amar a fisiologia, amar a pesquisa e amar este laboratório que foi minha terceira casa durante os últimos dois anos.

Aos meus colegas do Laboratório de Interação Neuro-Humoral: Claudia Vieira Marques, Felipe Schuler, Rafael Fabres e Priscila Zanini, muito obrigada por todos os ensinamentos, seminários e discussões que auxiliaram no meu crescimento e na produção deste trabalho. Um agradecimento especial à Claudinha por ser minha companheira nesse processo final de escrita, me motivando quando mais precisei. À minha co-orientadora, Ana Lúcia Cecconello, por toda ajuda com o desenho experimental, pelo ensino das técnicas de laboratório, pela paciência com as minhas inúmeras perguntas e pelos fins de semana de trabalho, conversas e diversão.

Aos meus presentes da UFRGS: Christy Hannah Belin, Deisi Schmitz, Emanuelle Fróes, Laura Fraga, Natália Averbuch e Priscila Zanini, minhas pois lindas, que fizeram com que a minha graduação fosse muito mais feliz, aprendi, ri, chorei e cresci com vocês, minha eterna gratidão. Sobretudo, quero agradecer à minha melhor amiga, Priscila, por ser minha confidente e parceira, obrigada pelos sábados, domingos e feriados de trabalho, eles foram muito mais fáceis por que tu estavas comigo.

Aos meus amigos que entenderam minha ausência, escutaram meus desabafos, comemoram minhas vitórias e me acompanharam durante toda a vida: César Augusto Reolon, Jessica Policarpo, Daniela Marques e Rita Quadros. À minha prima Camila Niches, que sempre foi muito mais que isso, é minha irmã, minha prima-gêmea, a minha primeira melhor amiga, sou a grata a Deus por ter crescido ao teu lado e por te ter sempre comigo, mesmo que não presencialmente.

E por último, mas não menos importante, à minha turma de formatura pela parceria nessa reta final, em especial, ao meu grupo amado que tem feito essa espera mais divertida e todos os preparativos mais emocionantes: Alessandra Behar, Chaiane Quevedo, Mayara Maciel e Thaiana Lindemann.

Todos vocês fizeram com que essa batalha valesse a pena, mas a guerra nunca termina e os quero sempre ao meu lado!

“Se o dinheiro for a sua esperança de independência, você jamais a terá. A única segurança verdadeira consiste numa reserva de sabedoria, de experiência e de competência.”

(Henry Ford)

## RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da obesidade, induzida por uma dieta hipercalórica, sobre a resposta metabólica de ratas Wistar em diferentes idades. Ratas Wistar de 2 e 15 meses, no início do experimento, foram tratadas por 21 semanas, com dieta padrão (2,95 kcal/g) ou dieta hipercalórica (3,44 kcal/g). Após a morte dos animais por decapitação, foi coletado o sangue troncular para análises bioquímicas e dois pequenos fragmentos de fígado foram coletados: um para análise histopatológica e o outro para extração e quantificação de lipídeos. A técnica de coloração utilizada para a histopatologia foi hematoxilina-eosina. As concentrações séricas de glicose, colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos, bem como as concentrações hepáticas de lipídeos foram dosadas por método colorimétrico e a concentração sérica de insulina por ELISA. A análise estatística destas concentrações foi realizada por ANOVA de duas vias, seguida por Tukey-Kramer ( $p < 0,05$ ). Os dados histopatológicos foram analisados por frequência simples. As ratas que consumiram dieta hipercalórica tiveram maior consumo alimentar tanto em gramas, quanto em calorias e também um maior ganho de peso quando comparados às que receberam dieta padrão, independente da idade. A dieta hipercalórica provocou aumento da glicemia apenas nas ratas jovens. Tanto a dieta hipercalórica quanto o envelhecimento provocaram aumento da concentração sérica de triglicerídeos. As ratas velhas apresentaram redução na concentração de HDL quando comparadas com as ratas jovens. Não foram observadas alterações significativas na concentração de insulina e colesterol total. Quanto ao conteúdo hepático de lipídeos, as ratas velhas apresentaram maiores concentrações de colesterol total e triglicerídeos, mas não houve alterações significativas na concentração de HDL entre os grupos. As ratas velhas que receberam dieta hipercalórica apresentaram maior percentual de degeneração hepatocelular microvacuolar. Conclui-se que a dieta hipercalórica foi eficaz para induzir um modelo de obesidade independente da idade. As ratas velhas se apresentam mais resistentes às complicações decorrentes da obesidade no metabolismo glicídico, no entanto, são mais suscetíveis às alterações no perfil lipídico, tanto sérico quanto hepático. Em vista da complexidade do metabolismo e do próprio envelhecimento, é necessário realizar outros estudos para investigar os mecanismos envolvidos nestes resultados e na fisiologia do metabolismo no envelhecimento, buscando esclarecer as adaptações metabólicas dos indivíduos mais velhos ao meio em que se encontram.

**Palavras-chave:** Obesidade. Envelhecimento. Fêmeas. Dieta hipercalórica.



## ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the effect of obesity induced by a high calorie diet on the metabolic response of Wistar rats at different ages. Two and 15 months-old female Wistar rats were treated for 21 weeks with standard diet (2.95 kcal/g) or hypercaloric diet (3.44 kcal/g). After the death of the animals by decapitation, the truncal blood for biochemical analysis and two small liver fragments were collected: one for histopathologic analysis and the other for extraction and quantification of lipids. The staining technique was used for histopathology hematoxylin-eosin. Serum concentrations of glucose, total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides and liver lipidic concentrations were measured by a colorimetric method and serum insulin by ELISA. The statistical analysis of these concentrations was performed by two-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ). Histopathological data were analyzed by simple frequency. The female rats that consumed high calorie diet had higher food consumption both in grams, as in calories and also a greater weight gain compared to that received standard diet, regardless of age. The high calorie diet caused increased blood glucose only in young rats. Both calorie diet and aging caused an increase in serum triglycerides. The old rats showed a reduction in the concentration of HDL when compared with young rats. No significant changes were observed in insulin concentration and total cholesterol. The hepatic lipid content, the old rats had higher total cholesterol and triglyceride concentrations, but there were no significant changes in HDL concentration between groups. Old rats given high calorie diet showed higher percentage of microvacuolar hepatocellular degeneration. We conclude that the high calorie diet was effective to induce an independent obesity model of age. Old rats are presented more resistant to complications of obesity in glucose metabolism; however, they are more susceptible to changes in lipid profile, both as serum liver. In view of the complexity of metabolism and aging itself, it is necessary to conduct further studies to investigate the mechanisms involved in these results and metabolic physiology in aging, seeking to clarify the metabolic adaptations of older individuals to the environment they are in.

**Keywords:** Obesity. Aging. Females. High calorie diet.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Consumo alimentar.....	pág. 23
<b>Figura 2.</b> Peso corporal.....	pág. 24
<b>Figura 3.</b> Índice lipossomático.....	pág. 24
<b>Figura 4.</b> Perfil glicídico.....	pág. 25
<b>Figura 5.</b> Perfil lipídico.....	pág. 26
<b>Figura 6.</b> Conteúdo hepático de lipídeos.....	pág. 27
<b>Figura 7.</b> Histopatologia hepática.....	pág. 28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DCNT= doenças crônicas não transmissíveis.

DHGNA= doença hepática gordurosa não alcoólica.

EHNA = esteato-hepatite não alcoólica.

HE= hematoxilina-eosina.

IL-6= interleucina-6.

ILS= índice lipossomático.

RI= resistência à insulina.

SM= síndrome metabólica.

TNF- $\alpha$ = fator de necrose tumoral alfa.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 HIPÓTESE</b> .....	17
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	17
3.1 GERAL.....	17
3.2 ESPECÍFICOS.....	17
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	18
4.1 LOCAL.....	18
4.2 ANIMAIS.....	18
4.3 DIETA .....	18
4.4 CONSUMO ALIMENTAR E GANHO DE PESO .....	19
4.5 FASES DO CICLO ESTRAL.....	19
4.6 EUTANÁSIA, OBTENÇÃO DOS TECIDOS E DESCARTE DE RESÍDUOS ...	20
4.7 DOSAGENS SÉRICAS.....	21
4.8 CONTEÚDO HEPÁTICO DE LIPÍDEOS.....	21
4.9 HISTOPATOLOGIA HEPÁTICA .....	21
4.10 HOMA-IR .....	22
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
<b>5 RESULTADOS</b> .....	23
5.1 CONSUMO ALIMENTAR, GANHO DE PESO E ILS.....	23
5.2 PARÂMETROS SÉRICOS.....	25
<b>5.2.1 Perfil glicídico</b> .....	25
<b>5.2.2 Perfil lipídico</b> .....	26
5.3 PARÂMETROS HEPÁTICOS .....	27
<b>5.3.1 Conteúdo hepático de lipídeos</b> .....	27
<b>5.3.2 Histopatologia hepática</b> .....	28
6 DISCUSSÃO .....	30
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	36
REFERÊNCIAS.....	37

## 1 Introdução

A obesidade é um distúrbio multifatorial, e seu início e progressão têm sido atribuídos a fatores genéticos, ambientais, comportamentais e socioeconômicos (HAUSMAN, 2001). Sabe-se que sua prevalência vem aumentando consideravelmente nos últimos anos. Segundo dados da última Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2008-2009), cerca de 15% dos adultos brasileiros apresentam obesidade e aproximadamente metade da população maior de 20 anos apresenta excesso de peso (IBGE, 2010). O que mais chama a atenção nessa epidemia é a velocidade com que ela aumentou nas últimas décadas. Em 1975 (IBGE, 1976) a obesidade estava presente em 2,8% dos homens e 7,8% das mulheres; já em 2009 (IBGE, 2010), a prevalência de obesidade era de 12,5% entre homens e de 16,9% entre as mulheres.

Este aumento da obesidade na população tem em uma de suas bases fatores ambientais como, por exemplo, um padrão alimentar inadequado, também conhecido como dieta “ocidental”, sendo esta caracterizada por uma alta densidade calórica, ingestão de carnes em excesso (especialmente carnes vermelhas e processadas) e de gordura, uma alta ingestão de carboidratos refinados e um baixo consumo de frutas, legumes, fibras e fitonutrientes (WILLCOX et al., 2014).

No Brasil, as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são as principais causas de óbitos em adultos, sendo a obesidade um dos fatores de maior risco para o adoecimento neste grupo (SCHMIDT et al., 2011). Um dos exemplos de DCNT é a síndrome metabólica (SM), caracterizada pelo agrupamento de fatores de risco cardiovascular como obesidade central, resistência à insulina (RI), hipertensão arterial e dislipidemia (LDL-colesterol alto, triglicerídeos alto e HDL-colesterol baixo) (ALBERTI et al., 2009). Além desses fatores, como principal manifestação hepática desta síndrome, temos o acúmulo de lipídeos no fígado (DE WIT et al., 2012). Não há somente um mecanismo patogênico universalmente aceito para a síndrome metabólica, no entanto, várias explicações fisiopatológicas são propostas (DUQUE et al., 2015).

Sabe-se que a localização abdominal da gordura (obesidade central) se mostra mais associada a distúrbios metabólicos e risco cardiovascular, visto que está correlacionada com o tecido adiposo visceral (DESPRÉS, 2006). Os mecanismos fisiopatogênicos pelos quais a gordura visceral associar-se-ia à

síndrome metabólica são motivo de controvérsia, questionando-se, inclusive, se a primeira seria, de fato, causa ou consequência das anormalidades que compõem a síndrome (RIBEIRO-FILHO et al., 2006).

Uma das teorias de que a obesidade central seria causadora das disfunções que são encontradas na síndrome metabólica está relacionada ao seu mecanismo capaz de gerar resistência à insulina: depósitos viscerais de triglicerídeos possuem *turnover* mais acelerado que o de outras regiões, aumentando a oferta de ácidos graxos livres no sistema porta, que estimulam a gliconeogênese e inibem a depuração hepática da insulina, contribuindo para elevar a glicemia, a insulinemia e a resistência insulínica, e devido a este último, ocorre uma diminuição da degradação da apolipoproteína B e aumento da produção de lipoproteínas ricas em triglicerídeos, gerando um perfil dislipidêmico (LERARIO et al., 2002).

Outras teorias têm associado a resistência à insulina relacionada à adiposidade intra-abdominal com a atividade inflamatória subclínica. O adipócito é capaz de secretar diversas citocinas, como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que, por sua vez, interferem na sinalização intracelular da insulina (ITO et al., 2009). A expressão aumentada de RNAm de TNF no tecido adiposo é induzida pela obesidade, e é maior no tecido adiposo visceral em relação ao subcutâneo (MAURY e BRICHARD, 2010). O TNF provavelmente está envolvido no desenvolvimento da síndrome metabólica, tendo em vista que altos níveis foram observados em indivíduos com esta disfunção (BALISTRERI et al., 2010).

Em contraponto, existem hipóteses de que o acúmulo excessivo de gordura abdominal seria apenas um marcador de um tecido adiposo disfuncional incapaz de armazenar adequadamente o excesso de energia. De acordo com este modelo, a capacidade do organismo para lidar com o excesso de calorias, resultante de um consumo alimentar superior ao gasto energético e de um estilo de vida sedentário, pode determinar a suscetibilidade do indivíduo para desenvolver a síndrome, ou seja, se a energia adicional é canalizada para o tecido adiposo subcutâneo sensível à insulina, embora haja um balanço energético positivo, o risco de desenvolvimento de comorbidades é menor; já se o tecido adiposo tem uma capacidade limitada para armazenar o excesso de energia, o excedente de triglicerídeos vai ser depositado em locais indesejados como, por exemplo, coração, músculo esquelético, tecido adiposo visceral e fígado (DESPRÉS e LEMIEUX, 2006). O depósito ectópico de adipócitos vem ganhando destaque na fisiopatologia da SM, haja vista que as

consequências metabólicas dessa incapacidade de gerir em qual tipo de tecido irá se acumular o excesso de energia resulta em obesidade visceral, resistência à insulina, dislipidemia, deposição de gordura hepática e na composição de um perfil inflamatório, sendo estas características definidoras dessa DCNT.

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) está se tornando um sério problema de saúde global, uma vez que sua prevalência tem aumentado rapidamente. A DHGNA abrange um espectro de condições do fígado cuja característica dominante é o acúmulo abundante de gordura hepática. Na ausência de inflamação e dano hepatocelular, esta condição é denominada esteatose, podendo se apresentar tanto na forma macrovacuolar, quanto microvacuolar (HAAS et al., 2016). Quando encontramos esteatose macrovacuolar e processo inflamatório no lóbulo, podendo haver ou não, associadamente, corpúsculos de Mallory, fibrose ou cirrose, temos um quadro de esteato-hepatite não alcoólica (EHNA). Quanto à evolução, 10% a 50% dos pacientes com EHNA apresentam risco para desenvolver fibrose e, entre esses, 10% desenvolvem cirrose (MINCIS et al., 2008). A progressão de EHNA para carcinoma hepatocelular também tem sido documentada na literatura e observa-se que idade e fibrose avançada foram fatores de risco para o desenvolvimento do carcinoma em indivíduos com EHNA (COTRIM, 2009). O aumento de triglicerídeos séricos e da glicemia, componentes da síndrome metabólica, está associado ao desenvolvimento da DHGNA e, apesar de não fazer parte dos fatores diagnósticos da síndrome metabólica, esta doença está frequentemente associada à mesma (SBC, 2005). Estudos demonstraram que sua prevalência aumenta com o envelhecimento (COTRIM et al., 2011).

Atualmente, observa-se também um crescimento do ritmo de envelhecimento populacional; dados de 2010 apontam mais de 20 milhões de brasileiros idosos, ou seja, com 60 anos ou mais (BRASIL, 2011). Com o aumento da longevidade, ocorrem também mudanças no estado nutricional da população. No Brasil, Tavares & Anjos (1999), analisando os dados de idosos de todas as regiões do país, registraram uma prevalência geral de obesidade de 5,2% e 18,2% entre homens e mulheres, respectivamente. Quando analisados apenas os idosos da região sul, a obesidade foi encontrada em 9,2% dos homens e em 23,3% das mulheres. Silveira et al. (2009) analisaram 596 idosos acima de 60 anos da região de Pelotas-RS, encontraram 30,8% e 17,4% de obesidade em mulheres e homens, respectivamente. Observa-se, então, um maior número de idosos obesos,

principalmente entre as mulheres (VASCONCELOS et al., 2010; MARQUES et al., 2005).

À medida que envelhecemos, a chance de desenvolver distúrbios metabólicos sobe (LADABAUM et al., 2014). Isto ocorre porque o envelhecimento é um acontecimento importante na vida de mamíferos, incluindo os seres humanos, durante o qual alterações metabólicas e hormonais acontecem. Nas ratas velhas, por exemplo, a concentração de estrogênio e progesterona circulantes diminuem com a idade conduzindo a vários problemas de saúde, tais como diabetes, complicações cardiovasculares, osteoporose e outros (BAQUER et al., 2009). Esta estatística, juntamente com o aumento do percentual de obesidade observada na população idosa, cria o potencial para taxas exponencialmente mais elevadas de doenças neste grupo populacional. Tendo em vista que o envelhecimento é caracterizado por progressiva deterioração de funções fisiológicas e processos metabólicos (VANDERVOORT et al., 1990), supõem-se que os idosos sejam ainda mais vulneráveis aos malefícios da obesidade.

Levando-se em consideração o aumento da obesidade, do envelhecimento populacional e de todas as comorbidades que o indivíduo pode apresentar devido a uma alimentação inadequada, além de que existem poucos estudos em modelos animais que avaliem estes efeitos em fêmeas com idade avançada, tendo em vista que a maioria dos pesquisadores pré-clínicos evita estudar roedores fêmeas devido à complexidade adicional aos métodos de pesquisa (KLEIN et al., 2015), torna-se interessante investigar qual é a resposta dos animais em diferentes idades a uma dieta hipercalórica para (1) definir melhor como essas condições interagem, (2) analisar as consequências a longo prazo e (3) buscar estabelecer as diferenças decorrentes da idade nas respostas aos desafios metabólicos.



## **2 Hipótese**

A hipótese do presente trabalho é que a obesidade induzida pela dieta hipercalórica irá provocar diferentes respostas metabólicas relacionadas ao desenvolvimento de SM, de acordo com a idade dos animais.

## **3 Objetivos**

### **3.1 Geral**

Avaliar o efeito da obesidade, induzida pela dieta hipercalórica, sobre a resposta metabólica de ratas Wistar de diferentes idades.

### **3.2 Específicos**

Avaliar o efeito de uma dieta hipercalórica e comparar os grupos de diferentes idades em relação aos seguintes parâmetros:

- Obesidade, evidenciada pelo ganho de peso total e índice lipossomático, e alteração no consumo alimentar;
- Resistência periférica à insulina, verificada pela glicemia, insulinemia e HOMA-IR;
- Dislipidemia, avaliada pelos níveis séricos de colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos;
- Esteatose hepática, analisada pelo conteúdo de lipídeos no fígado e histopatologia.

## **4 Materiais e Métodos**

### **4.1 Local**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Interação Neuro-Humoral (LINH) do Departamento de Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

### **4.2 Animais**

Foram utilizadas 60 ratas Wistar fêmeas jovens e velhas, sendo os animais jovens de 2 meses e os velhos de 15 meses no início do tratamento, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS. Os animais foram separados em grupos de, no máximo, cinco por caixa, com livre acesso à dieta e à água, e permaneceram em ambiente com temperatura controlada entre  $22^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ , com ciclo claro/escuro de 12 horas (das 6 às 18h). Quanto aos grupos experimentais, as ratas foram divididas em quatro grupos: jovens que recebiam dieta padrão (controle jovens), jovens que recebiam dieta hipercalórica (dieta jovens), velhas que recebiam dieta padrão (controle velhas) e velhas que recebiam dieta hipercalórica (dieta velhas). O tempo de duração do tratamento foi de 21 semanas, sendo baseada em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório. Os procedimentos experimentais seguiram as normas éticas brasileiras (GOLDIM, 1997) e a Lei nº 11.794/2008 (Arouca) (BRASIL, 2008). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA), sob número 19788.

### **4.3 Dieta**

A dieta padrão oferecida aos animais do grupo controle foi a ração de biotério (NUVILAB CR-1), com composição de 4,5% de lipídios, 22% de proteínas e 55% de carboidratos. A dieta experimental escolhida é uma dieta palatável hipercalórica (produzida em nosso laboratório e analisada pelo Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia - UFRGS) composta de aproximadamente 5,1% de

lipídios, 18,4% de proteínas e 68,9% de carboidratos. Essa dieta foi disponibilizada à vontade, todos os dias, aos animais do grupo dieta, sendo oferecida, além disso, dieta padrão. Todos os animais tiveram livre acesso à água.

**Tabela 1. Composição da dieta hipercalórica.**

Ingredientes	Medida
Ração triturada	1 kg
Caseína	150 g
Maisena	500 g
Açúcar	300 g
Banha de porco	50 g
Agi sal	7,4 g
Carboximetilcelulose (CMC)	20 g
Água destilada	1 L

#### **4.4 Consumo alimentar e ganho de peso**

A ração era oferecida diariamente e pesada antes de ser fornecida aos animais. Vinte e quatro horas após o fornecimento da ração era realizada a pesagem da ração restante. A medida do consumo foi calculada pelo peso da ração fornecida menos o peso da ração restante. Os animais foram pesados, individualmente, no início do experimento, quinzenalmente e no dia da decapitação, para posteriores cálculos de variação de peso.

#### **4.5 Fases do ciclo estral**

Após 19 semanas de dieta, o lavado vaginal das fêmeas foi analisado diariamente. A coleta era realizada com auxílio de uma pera de borracha conectada a uma ponteira contendo soro fisiológico, introduzida no canal vaginal da fêmea, onde foi feito o lavado. O líquido era depositado sobre uma lâmina e analisado a fresco no microscópio óptico. Pela análise da composição celular do esfregaço, inferia-se em qual fase do ciclo estral o animal se encontrava.

O ciclo estral de ratas Wistar é dividido em 4 fases: proestro, quando o lavado é composto principalmente de células epiteliais; estro, quando o lavado é composto principalmente de células epiteliais cornificadas; metaestro, quando o lavado é composto de células epiteliais corneificadas e leucócitos, e diestro, quando o lavado é composto principalmente por leucócitos. Essa técnica é importante, haja visto que os animais deveriam estar na mesma fase do ciclo estral no dia da morte, para que não ocorresse interferência dos hormônios nas análises realizadas.

#### **4.6 Eutanásia, obtenção dos tecidos e descarte de resíduos**

Ao final de 21 semanas do início do experimento, quando as fêmeas estavam no período do diestro do ciclo estral, os animais foram mortos por decapitação em guilhotina para roedores, sem anestesia, para obtenção do sangue total e dos tecidos para posterior realização das análises. O método escolhido para eutanásia baseia-se no fato deste ser um método eficaz e rápido que produz mudanças fisiológicas mínimas nos tecidos. A morte dos animais sob anestesia, apesar de desejável, é incompatível com nossos experimentos porque todos os anestésicos comumente utilizados em estudos com animais experimentais levam a uma intensa hiperglicemia em roedores (BROWN et al., 2005; SAHA et al., 2005).

Os animais foram decapitados no período da manhã, para evitar a ação do cortisol sobre as células estudadas, em ambiente exclusivamente destinado à morte dos animais, com exaustão e higienização completa de todo o material entre a morte de um animal e outro.

Após a morte, o sangue troncular foi coletado em tubos de ensaio contendo gel separador e após aproximadamente 2 horas, o sangue era centrifugado por 15 minutos a 1000xg. O soro foi coletado, separado em alíquotas, e estocado a -20°C até o momento das análises bioquímicas. Dois pequenos fragmentos de fígado foram retirados: um foi imerso em solução de formaldeído 10% para posterior análise histológica e o outro foi estocado a -20°C para extração de lipídeos. O tecido adiposo visceral foi retirado e pesado para cálculo do índice lipossomático (ILS), onde o peso da gordura visceral é dividido pelo peso corporal do animal.

As carcaças e demais resíduos biológicos foram colocados em sacos plásticos identificados com o símbolo de risco biológico e congelados em freezer (-20°C) para

serem posteriormente encaminhados para coleta e eliminação adequada por empresa especializada.

#### **4.7 Dosagens séricas**

As concentrações de glicose, colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos no soro foram dosadas com kits enzimáticos (da marca Labtest) por espectrofotometria, de acordo com as instruções do fabricante. A dosagem sérica de insulina foi realizada pela técnica de ELISA, de acordo com as orientações do fabricante do kit (Millipore).

#### **4.8 Conteúdo hepático de lipídeos**

As amostras de fígado foram descongeladas em gelo e homogeneizadas em solução salina (proporção 20:1) para a dosagem hepática de lipídeos. Os conteúdos de triglicerídeos e de colesterol total foram medidos no homogenizado utilizando kits de ensaio disponíveis comercialmente (Labtest). Para a dosagem de colesterol HDL, acrescentou-se 200 µL de ácido tricloroacético (TCA-50%) ao homogenizado e, após a centrifugação a 2000 rpm durante 10 minutos, o precipitado ficou na capela para secagem durante um dia. A seguir, foram adicionados 800 µL de clorofórmio metanol (2:1) e o sobrenadante foi retirado e colocado em um frasco de vidro para secagem durante três dias. Após, adicionou-se 500 µL de álcool isopropílico e as amostras foram agitadas em vórtex e utilizadas para a dosagem de colesterol HDL por meio de um kit de ensaio disponível (Labtest) para esse fim, seguindo as orientações do fabricante.

#### **4.9 Histopatologia hepática**

As amostras de tecido hepático para análise histológica permaneceram 48 horas em formaldeído 10% e, posteriormente, foram embebidas em parafina. Na etapa seguinte, os blocos de parafina foram fixados ao Micrótopo no qual realizaram cortes com três micrômetros de espessura (3µm). Na fase de desidratação, as

estruturas passaram por três recipientes com álcool absoluto e por dois de xilol. Na fase de coloração, as lâminas foram mergulhadas nos corantes hematoxilina-eosina (HE) durante cinco minutos cada uma, intermediadas por um banho de água corrente. Para a lamínula se fixar sobre a lâmina, utilizou-se o Bálsamo do Canadá, finalizando, assim, o processo de preparação. Após a preparação das lâminas, ocorreu a análise histopatológica pela equipe de patologistas do Departamento de Patologia Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

#### **4.10 HOMA-IR**

A fim de mensurar a possível resistência à insulina dos animais, fez-se o cálculo do índice do HOMA (modelo de avaliação da homeostase) proposto por Matthews (MATTHEWS et al., 1985), a partir dos valores de glicose e de insulina séricos ( $[\text{glicemia em mmol/L} \times \text{insulinemia em mU/L}] / 22,5$ ).

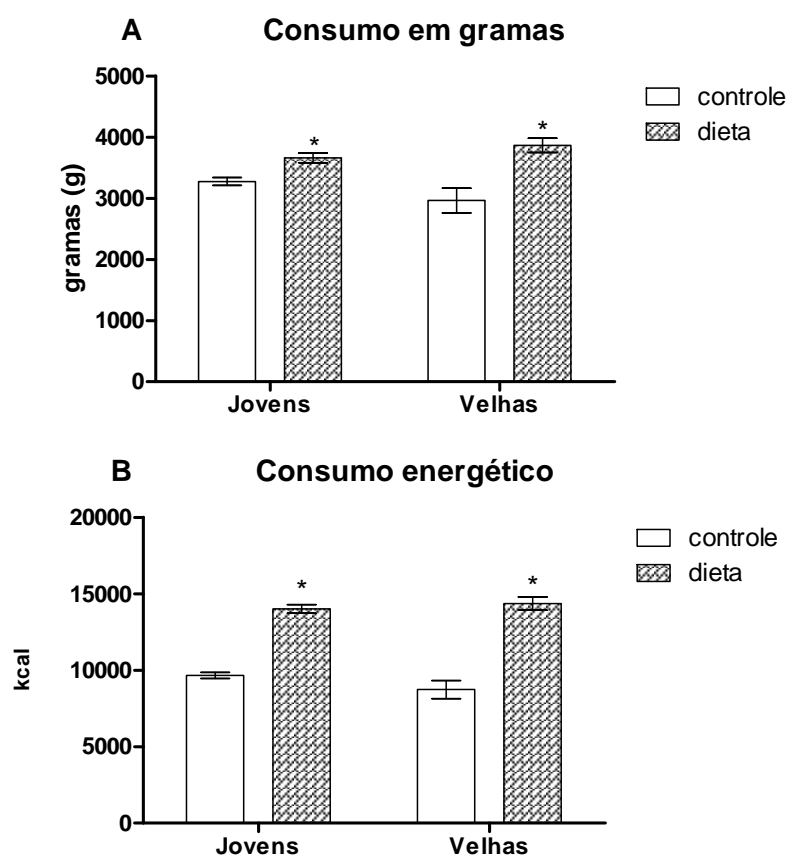
#### **4.11 Análise estatística**

Os dados obtidos, com exceção da histopatologia, foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Tukey-Kramer quando necessário e expressos pela média  $\pm$  erro padrão. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas para valores de  $p < 0,05$ . Em relação à histopatologia hepática, os dados foram analisados por frequência simples (porcentagem dos animais com presença de degeneração hepatocelular microvacuolar em relação ao número total de animais do grupo). Foi utilizado o software GraphPad Prism®.

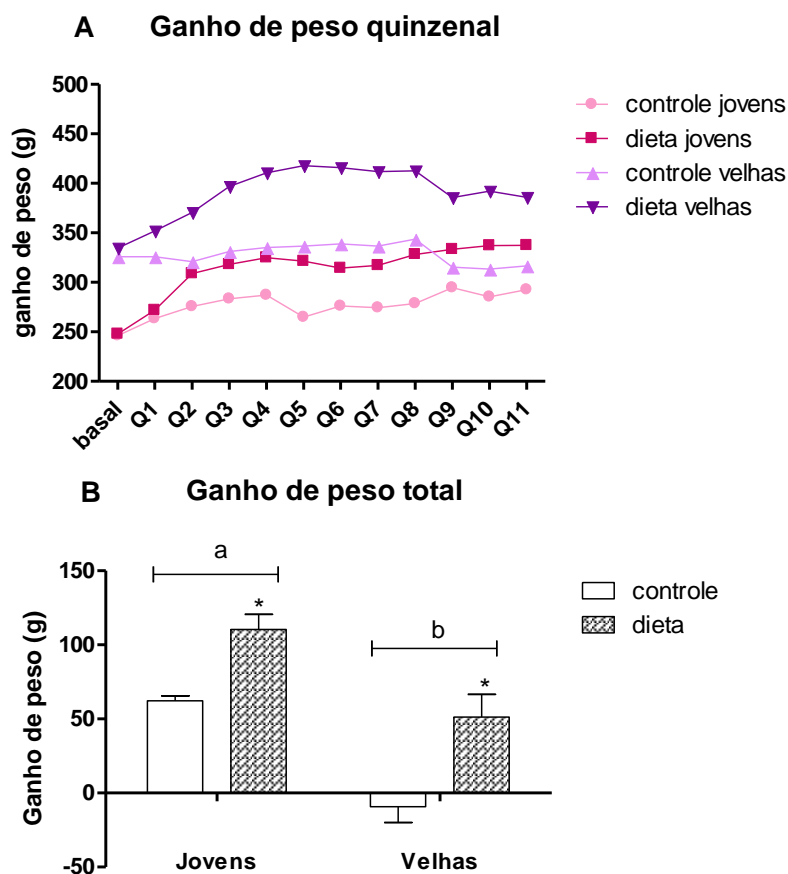
## 5 Resultados

### 5.1 Consumo alimentar, ganho de peso e ILS

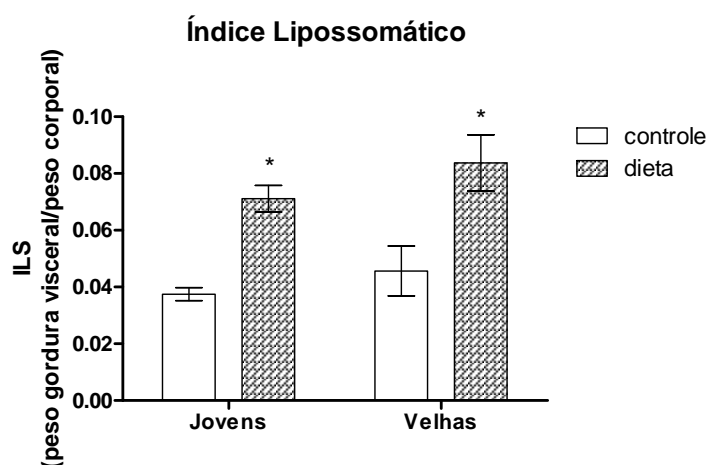
Os animais que consumiram a dieta hipercalórica tiveram um maior consumo em gramas ( $p=0,0001$ ) e em calorias ( $p=0,0001$ ) em relação aos alimentados com a dieta padrão, independente da idade, como ilustrado na Figura 1. Observamos ao longo do experimento um maior ganho de peso nos animais que receberam a dieta hipercalórica (2A). Conseqüentemente, a dieta hipercalórica provocou um maior ganho de peso total em ambos os grupos ( $p=0,0001$ ), entretanto o peso absoluto dos animais velhos foi menor que o dos animais jovens ( $p=0,0001$ ), como mostra a Figura 2B. Além disso, observamos na Figura 3, que os grupos que receberam dieta hipercalórica apresentaram maior ILS ( $p=0,0001$ ) em relação aos animais que consumiram a dieta padrão.



**Figura 1.** Consumo alimentar. **A) Consumo em gramas:** os animais do grupo dieta consumiram maior quantidade em gramas do que o grupo controle em ambos os grupos ( $p=0,0001$ ;  $n=15$ ). **B) Consumo energético em kcal:** os animais do grupo dieta consumiram mais calorias em relação ao grupo controle, independente da idade ( $p=0,0001$ ;  $n=15$ ). Dados analisados por ANOVA de duas vias.



**Figura 2.** Peso corporal. **A) Ganho de peso quinzenal.** Houve interação entre os fatores dieta e tempo de tratamento ( $p < 0,001$ ), efeito da dieta ( $p < 0,001$ ) e do tempo de tratamento ( $p < 0,001$ ). Dados analisados por ANOVA de medidas repetidas. **B) Ganho de peso total.** O peso dos animais velhos foi menor que o dos animais jovens (a,b:  $p=0,0001$ ). A dieta hipercalórica provocou um aumento de peso em ambos os grupos ( $*p=0,0001$ ).  $n=12-16$  por grupo. Dados analisados por ANOVA de duas vias.



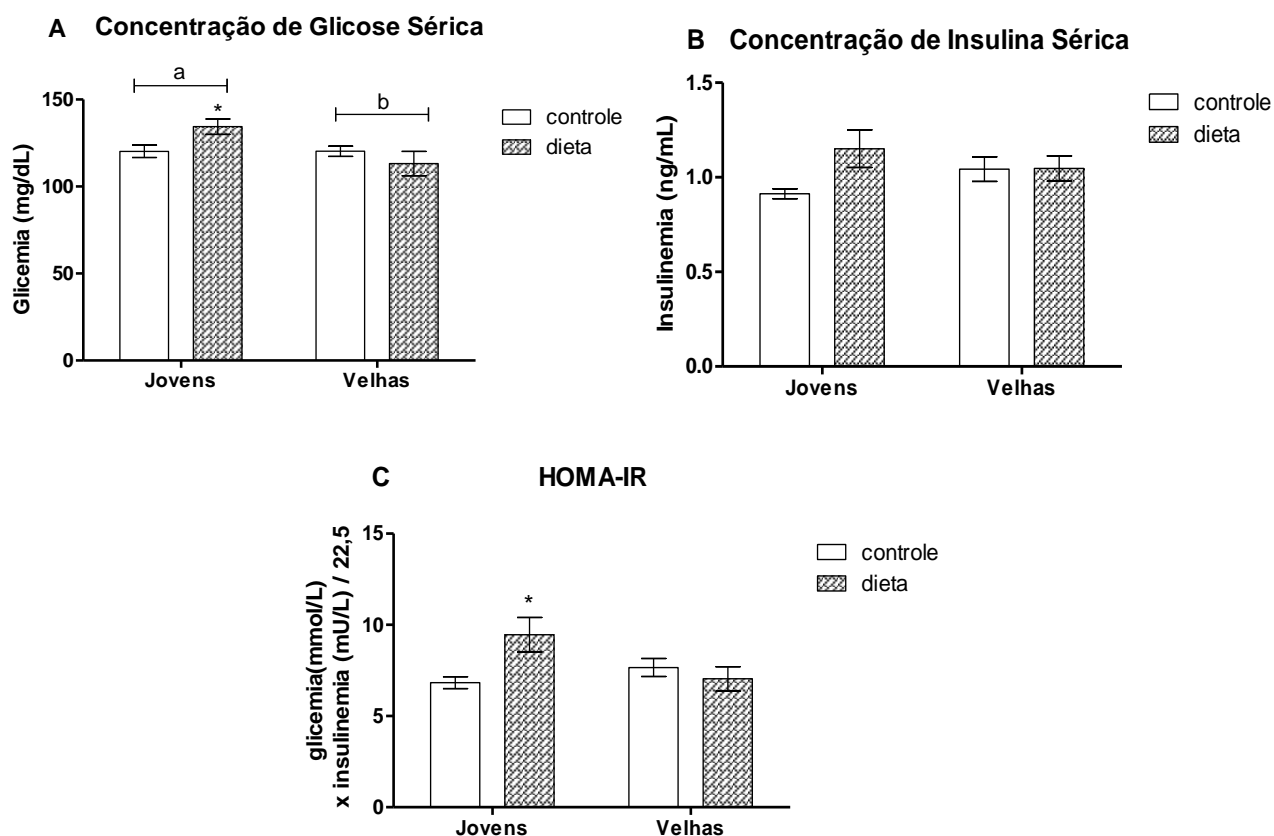
**Figura 3.** A dieta hipercalórica provocou um aumento no ILS em ambos os grupos. ( $p=0,0001$ ;  $n=12$ ). Dados analisados por ANOVA de duas vias.



## 5.2 Parâmetros séricos

### 5.2.1 Perfil glicídico

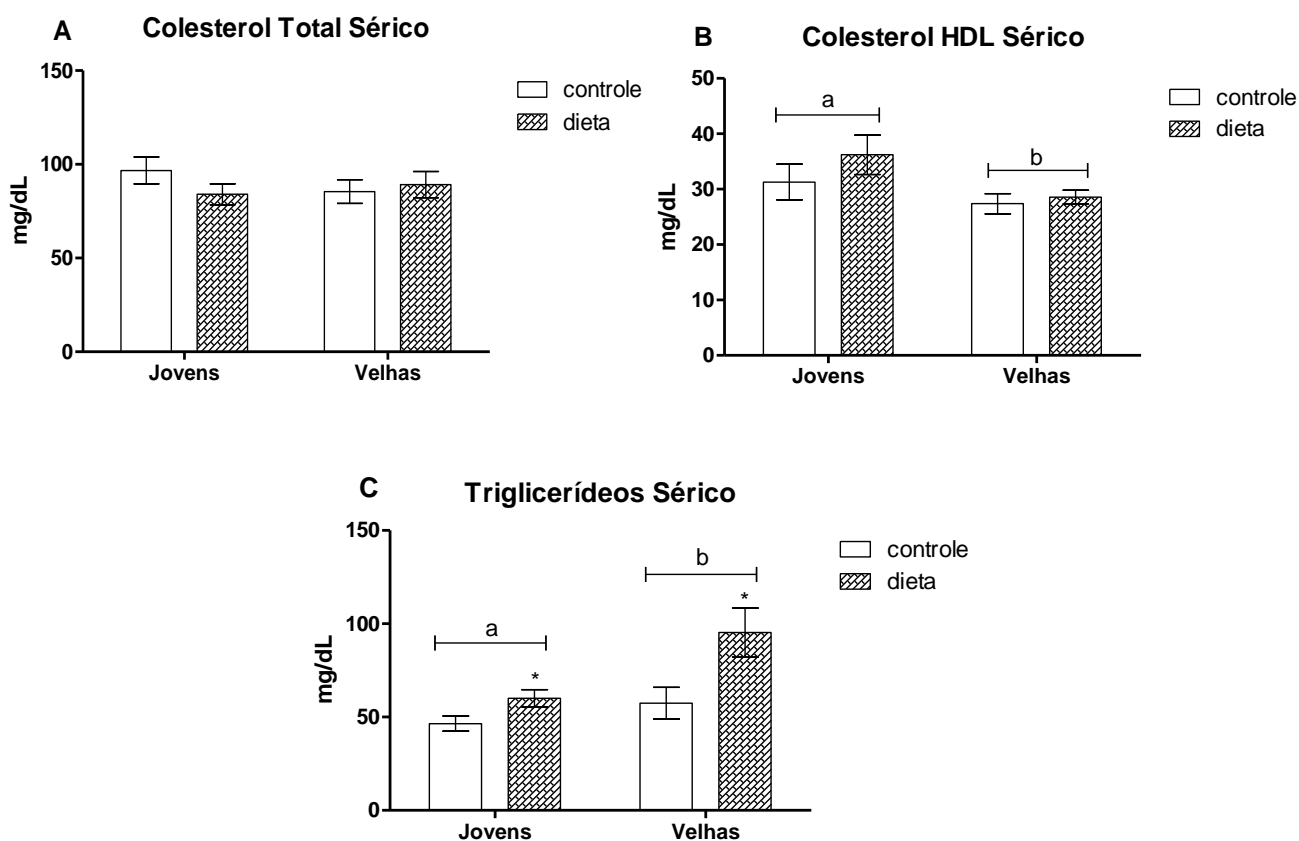
A dieta hipercalórica provocou um aumento na glicemia somente nos animais jovens ( $p=0,0354$ ) e o envelhecimento causou uma diminuição neste parâmetro ( $p=0,0363$ ), como mostra a figura 4A. Não houve diferença significativa nas concentrações de insulina (Figura 4B). Em relação ao índice HOMA, houve interação entre os fatores dieta e idade ( $p=0,0225$ ), onde os animais jovens que receberam dieta hipercalórica apresentaram maiores valores do índice, mas não foram encontrados efeitos significativos da dieta e da idade (Figura 4C).



**Figura 4.** Perfil glicídico. **A) Glicemia sérica.** O envelhecimento causou uma diminuição na glicemia (a,b: letras diferentes representam  $p=0,0363$ ). A dieta hipercalórica provocou um aumento de glicemia somente nos animais jovens ( $*p=0,0354$ ). **B) Insulina sérica.** Não houve diferença significativa entre os grupos. **C) HOMA-IR.** A dieta hipercalórica provocou um aumento no índice de HOMA somente nos animais jovens ( $*p=0,0225$ )  $n=8-9$ . Dados analisados por ANOVA de duas vias.

### 5.2.2 Perfil lipídico

A dieta hipercalórica produziu um aumento nos triglicerídeos séricos ( $p=0,0046$ ) em ambos os grupos (Figura 5C). O envelhecimento causou uma diminuição no colesterol HDL ( $p=0,0346$ ), além de um aumento nos triglicerídeos ( $p=0,0102$ ), observado nas Figuras 5B e 5C, respectivamente. Não houve diferença significativa nas concentrações de colesterol total (Figura 5A).

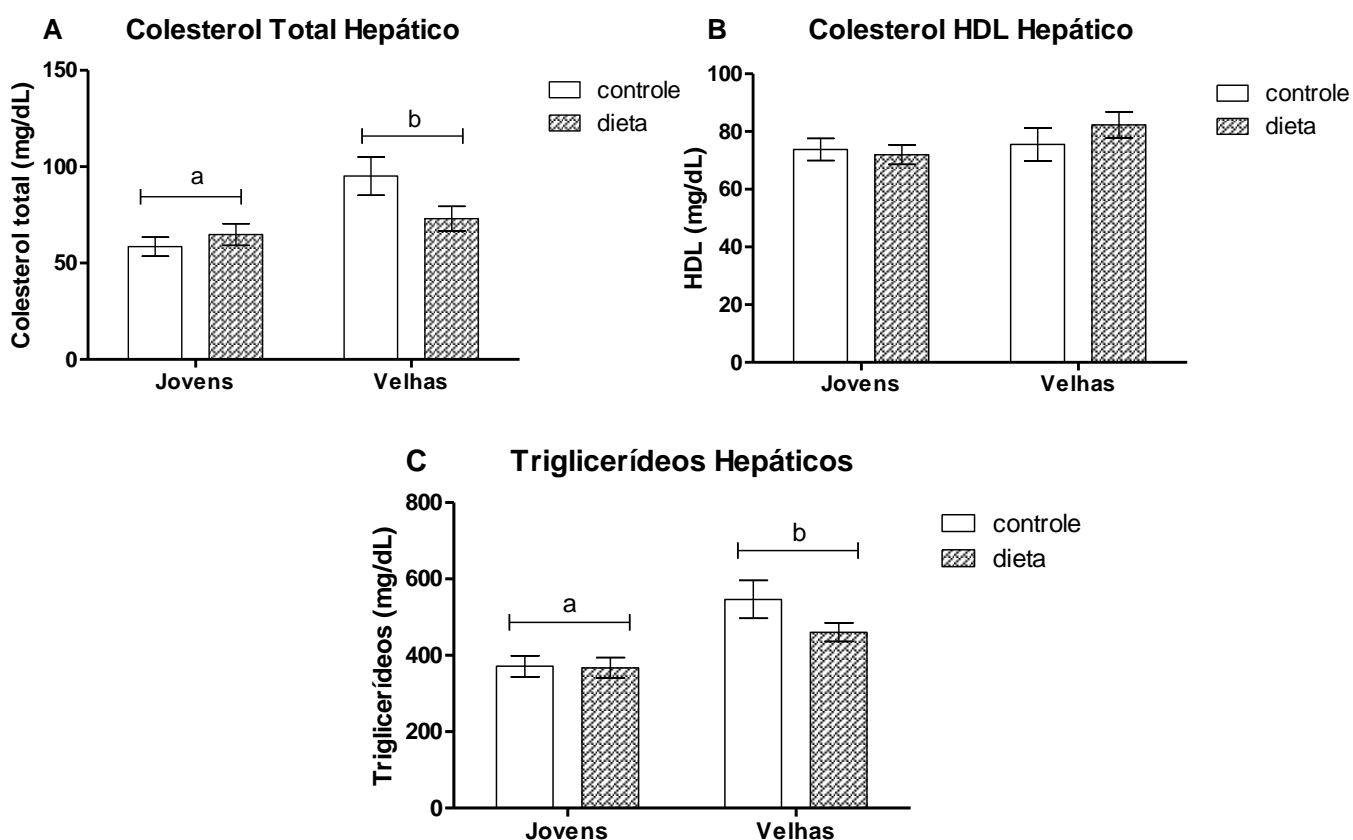


**Figura 5.** Perfil lipídico. **A) Colesterol total sérico.** Não houve diferença significativa entre os grupos. **B) Colesterol HDL sérico.** As ratas velhas apresentaram redução na concentração de HDL quando comparadas com as ratas jovens, independente da dieta ( $p=0,0346$ ). **C) Triglicerídeos sérico.** O envelhecimento causou um aumento na concentração de triglicerídeos (a,b:  $p=0,0102$ ). A dieta hipercalórica provocou um aumento nos triglicerídeos em ambos os grupos (\*  $p=0,046$ ).  $n= 11-12$  por grupo. Dados analisados por ANOVA de duas vias.

## 5.3 Parâmetros hepáticos

### 5.3.1 Conteúdo hepático de lipídeos

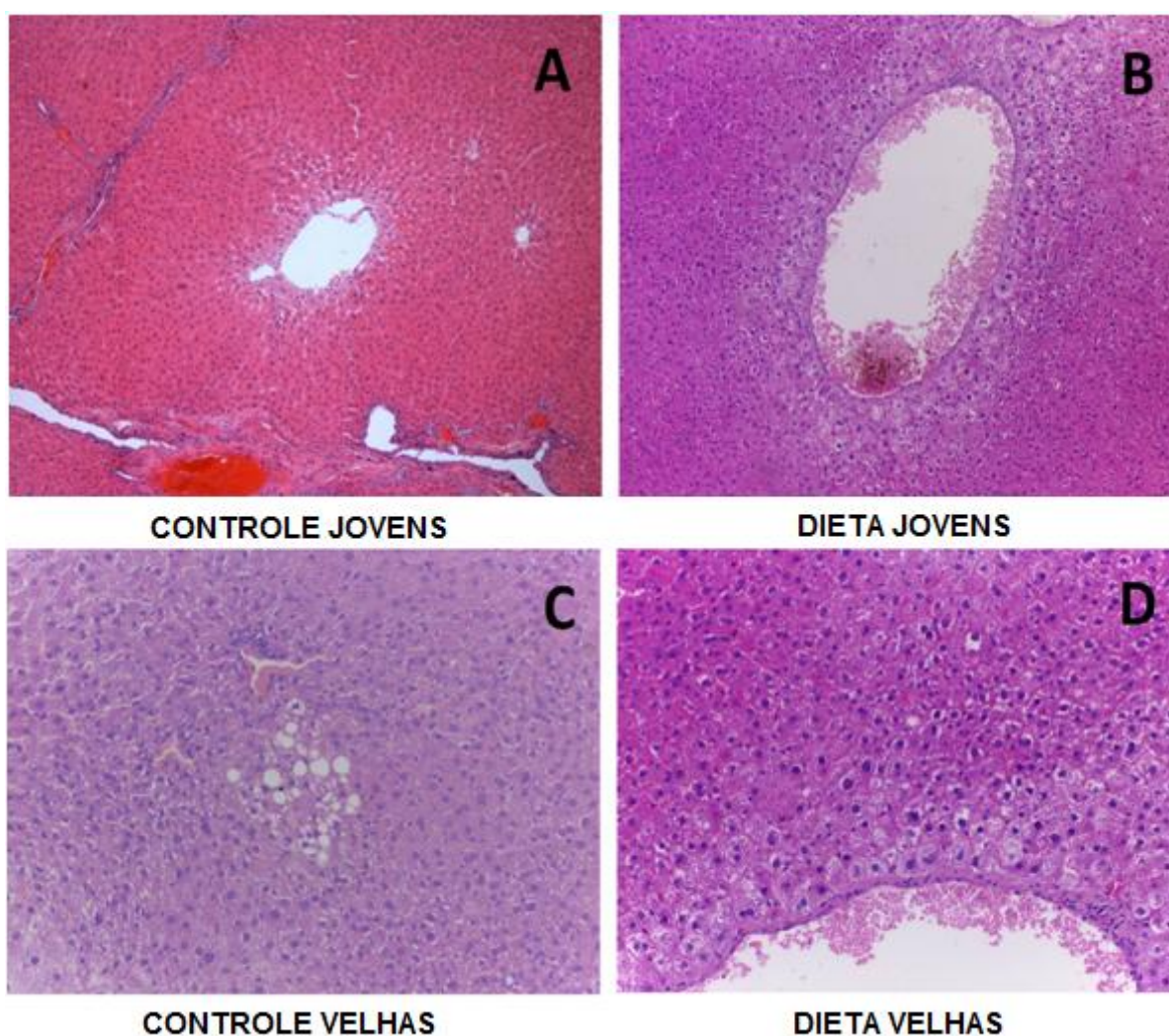
A dieta hipercalórica não provocou nenhuma diferença significativa nos lipídeos hepáticos, porém o envelhecimento provocou um aumento nas concentrações de colesterol total ( $p=0,0067$ ) e de triglicerídeos ( $p=0,0003$ ), como podemos observar na Figura 6A e 6C, respectivamente. Não houve diferença significativa nas concentrações de colesterol HDL (Figura 6B).

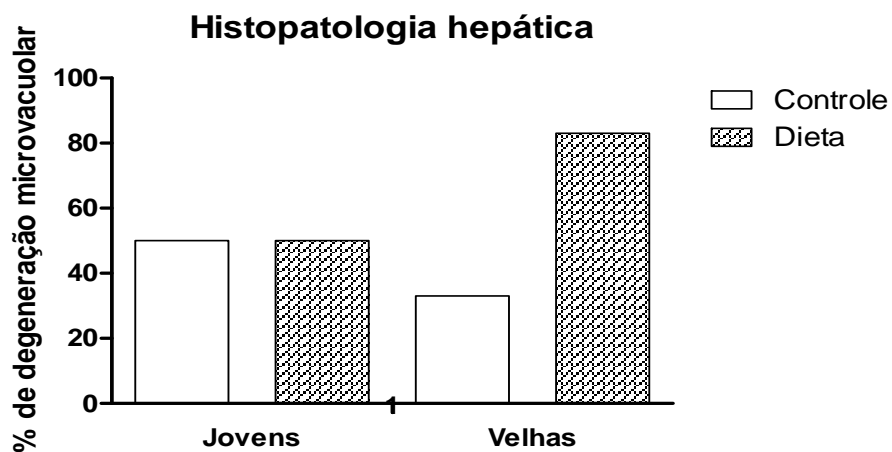


**Figura 6.** Conteúdo hepático de lipídeos. **A) Colesterol total:** O envelhecimento causou um aumento na concentração de colesterol total (a,b:  $p= 0,0067$ ). **B) Colesterol HDL:** Não houve diferença significativa entre os grupos. **C) Triglicerídeos:** O envelhecimento provocou um aumento na concentração de triglicerídeos (a,b:  $p=0,0003$ ).  $n= 6-8$  por grupo. Dados analisados por ANOVA de duas vias.

### 5.3.2 Histopatologia hepática

A dieta hipercalórica não causou alterações no percentual de degeneração hepatocelular microvacuolar nos animais jovens, todavia as ratas velhas submetidas a esse tratamento apresentaram um maior percentual de animais com degeneração. Não houve avaliação da intensidade da alteração hepática estrutural e sim da presença ou não da alteração histopatológica. Além disso, as ratas velhas que receberam dieta hipercalórica também apresentaram moderado infiltrado inflamatório multifocal em região periportal, entretanto isto não foi visto em nenhum dos grupos dos animais jovens.





**Figura 7.** Histopatologia hepática. **A=** grupo controle jovens (50%); **B=** grupo dieta jovens (50%); **C=** grupo controle velhas (33%); **D=** grupo dieta velhas (83%) (lâminas coradas com HE). As ratas velhas que receberam dieta hipercalórica apresentaram maior percentual de degeneração hepatocelular microvacuolar. Dados analisados por frequência simples.

## 6 Discussão

Este estudo mostrou que os animais que receberam dieta hipercalórica, independente da idade, consumiram uma maior quantidade de ração em gramas e em calorias e, apresentaram ao longo do tratamento um ganho de peso semelhante em ambos os grupos, resultando no aumento do peso corporal do mesmo modo nas diferentes idades. Embora não houvesse uma diferença grande na quantidade de calorias oferecidas pela dieta hipercalórica usada neste estudo (controle: 2,95/kcal/g; dieta: 3,44/kcal/g), ela apresentava alta palatabilidade e o tempo de tratamento foi relativamente grande (21 semanas), o que provavelmente foi um fator importante para induzir a diferença encontrada no ganho de peso obtido nos animais jovens e velhos que foram alimentados com essa dieta.

Observa-se entre os idosos uma redução da acuidade dos órgãos dos sentidos (visão, audição, olfato, gustação e tato), o que pode levar ao desinteresse pela alimentação (GUEDES et al., 2008). Estudos realizados com humanos mostram um quadro importante de anorexia nos idosos, ou seja, uma diminuição ou perda do apetite, ocasionando a redução da ingestão de alimentos (ACUÑA e CRUZ, 2004). No presente estudo, os animais velhos iniciaram a dieta aos 15 meses de idade e não verificamos diminuição da quantidade de alimento ingerido pelos ratos mais velhos, contrariando os estudos citados. Em outro estudo realizado em nosso laboratório, no qual ratas Wistar iniciaram o tratamento 3 meses depois dos animais usados no presente estudo (18 meses) e foram submetidas à dieta de cafeteria durante 12 semanas, não foi observada diminuição no consumo, entretanto o ganho de peso e o ILS foram menores nos animais velhos (TEIXEIRA, 2014), mostrando que o momento de introdução da dieta, o tempo de tratamento e o tipo de dieta podem influenciar diretamente esses parâmetros.

Todavia, o grupo de animais velhos que recebeu a dieta padrão sofreu uma perda de peso ao longo do experimento. Portanto, apesar de haver um ganho de peso aproximadamente igual (~80%) nos animais que receberam a dieta, o peso absoluto dos animais velhos é menor do que o dos jovens. Também se deve considerar que os ratos velhos iniciaram o experimento com 15 meses e ao final da dieta eles estavam com 20 meses, o que é uma idade bastante avançada em ratos. Desse modo, embora eles tenham ganhado peso com a dieta, eles apresentavam peso absoluto menor do que os jovens. Uma possível explicação para esse

resultado é a sarcopenia causada pelo envelhecimento, sendo que esta descreve uma perda muscular esquelética (ROSENBERG, 1989), ou seja, uma diminuição da massa magra nos idosos, o que se reflete em um quadro de perda de peso nesta população. Apesar disso, esses animais responderam à dieta hipercalórica de modo semelhante aos animais jovens e ganharam peso do mesmo modo que os jovens.

Além do aumento do peso dos animais, a dieta hipercalórica contribuiu para a deposição de tecido adiposo visceral em ambos os grupos, avaliado pelo ILS, o qual é associado a vários prejuízos à saúde, tanto de indivíduos jovens, quanto de idosos, bem como para a manifestação de sinais de síndrome metabólica. Sendo assim, esta dieta foi capaz de induzir um quadro de obesidade tanto nos animais jovens quanto nos velhos de modo semelhante. Por outro lado, os animais mais velhos sem dieta não apresentaram ILS diferente dos jovens controle. Esse resultado contrariou estudos que mostram que o envelhecimento fisiológico está associado a um aumento progressivo da massa adiposa em mulheres, que pode ser associado ou não ao ganho de peso (ZAMBONI et al., 1997; FANTIN et al., 2007).

Já está descrito na literatura que a obesidade pode levar a um quadro de resistência à insulina, observada pelo aumento da glicemia e da insulinemia. Dietas ocidentais, devido ao alto teor de gorduras e de carboidratos, estão associadas à resistência à insulina, principalmente por causa dos ácidos graxos saturados e das gorduras trans (BRAY et al., 2002). Neste trabalho, a dieta hipercalórica utilizada continha 5,1% de lipídeos e 68,9% de carboidratos, e apesar de ter mais calorias, a concentração de lipídeos não era tão alta como em algumas dietas de cafeteria, as quais são semelhantes às dietas ocidentais que contêm um alto teor de gordura. A dieta usada aqui levou a uma hiperglicemia apenas nos ratos jovens, mostrando uma interação entre os efeitos da dieta e da idade na glicemia. Surpreendentemente, os animais velhos apresentaram uma menor concentração de glicose sérica em relação aos jovens.

Entretanto, não foram detectadas alterações significativas na insulinemia nos animais que receberam a dieta hipercalórica. Apesar disso, pode-se dizer que houve uma tendência de aumento no grupo dieta jovens. Apesar de não haver diferença significativa na insulinemia, as ratas jovens que receberam a dieta hipercalórica apresentaram hiperglicemia, e constatamos então, uma possível RI nos animais jovens que consumiram a dieta, evidenciado pelo HOMA-IR neste grupo. Em humanos, a determinação da resistência à insulina por esse índice tem sido utilizada

tanto na prática clínica, quanto em estudos epidemiológicos (SALGADO et al., 2010). Como para este indicador não há ponto de corte para animais assim como há para humanos, apenas podemos comparar o valor encontrado entre os grupos. Sendo assim, parece que os animais jovens que consumiram este tipo de dieta podem estar no início do desenvolvimento de resistência à insulina, onde os níveis de glicose estão elevados, mas os de insulina ainda não.

Quando analisamos a concentração sérica de TNF- $\alpha$  neste grupo de animais (dados não publicados), observamos um aumento devido à dieta hipercalórica em ambos os grupos. Sabendo que o TNF pode mediar a resistência à insulina, uma vez que induz a fosforilação de um resíduo de serina do substrato para receptor de insulina 1 (IRS-1) pela cJun-quinase NH<sub>2</sub>-terminal e, que isto determina a inibição da fosforilação adequada de tirosina do IRS-1 e, conseqüentemente, inadequada sinalização da insulina (BALISTRERI et al. 2010). Apesar de ambos os grupos apresentaram aumento nas concentrações de TNF, somente os jovens apresentaram resistência à insulina. Visto isso, pode-se sugerir que as ratas velhas são mais resistentes do que as jovens aos malefícios da obesidade, quando foi avaliada a resistência periférica à insulina, uma vez que a concentração de glicose sérica desse grupo de animais se apresenta menor que a dos jovens e não houve alterações na insulinemia, apesar da obesidade e do aumento da concentração sérica de TNF.

Sabe-se que o envelhecimento é acompanhado por uma diminuição da massa magra e atividade física e que estes, juntos, predispõem para aumento da gordura total e da RI (LOVRE et al., 2016). Além disso, quando a concentração de estrogênio circulante começa a diminuir nas mulheres, ou seja, na menopausa, elas se tornam mais resistentes à insulina (MAUVAIS-JARVIS, 2015). Apesar das ratas velhas utilizadas neste estudo não terem ciclos estrais regulares, não foram dosados os níveis séricos de estradiol e, portanto, não podemos avaliar sua participação neste resultado.

Em nosso laboratório, quando utilizada a dieta de cafeteria por 12 semanas, os animais que receberam a dieta apresentaram resistência à insulina, independente da idade (TEIXEIRA, 2014). Provavelmente, o alto teor de lipídeos (40%) da dieta de cafeteria em comparação com o percentual de lipídeos da dieta usada no presente estudo (5,1%) seja o principal responsável por essa diferença. Também se deve considerar, que no presente trabalho não foram avaliados outros parâmetros que



poderiam contribuir para definir se há resistência à insulina, tais como marcadores da via PI3K/Akt, uma das principais vias de sinalização da insulina (CARVALHEIRA et al., 2009). De qualquer modo, o resultado encontrado aqui de que as velhas poderiam ser mais resistentes à dieta hipercalórica deve ser melhor explorado, aumentando o número de animais, alterando a dieta e as idades estudadas, e avaliando também em outros modelos experimentais, na busca de encontrar a confirmação desse dado e, se possível, o mecanismo responsável por isso. Por outro lado, as ratas velhas não apresentaram melhor perfil lipídico do que as jovens, mostrando que seu melhor desempenho metabólico frente à dieta foi apenas no metabolismo glicídico, o que também sugere que se deveria realizar mais estudos pré-clínicos em animais velhos, especialmente nas fêmeas.

Outro fator que caracteriza a síndrome metabólica é a dislipidemia. A dislipidemia é caracterizada por uma modificação da quantidade de lipídeos circulantes no sangue, incluindo o aumento de colesterol total, LDL, triglicerídeos e diminuição de HDL (GOWDY e FESSLER, 2012). No presente estudo, esta alteração foi encontrada nos animais de ambas as idades, sendo que nos jovens houve um aumento da concentração de triglicerídeos no grupo que consumiu a dieta e, nos velhos, um aumento desta concentração em decorrência da idade e da dieta, ou seja, eles apresentavam mais triglicerídeos séricos que os jovens e, quando, submetidos à dieta esse aumento era ainda maior. Os animais mais velhos também apresentaram uma menor concentração de colesterol HDL em relação aos jovens. Não houve diferença significativa nas concentrações de colesterol total, nem devidas à dieta nem à idade. Seguindo na comparação com o estudo prévio que utilizou a dieta de cafeteria, nossos resultados foram semelhantes tanto no parâmetro colesterol total, quanto no HDL, mas os triglicerídeos apresentaram interação dieta e idade.

Já foi descrito que os níveis séricos de triglicerídeos em resposta a uma dieta hipercalórica dependem da idade dos ratos (CHUFFA E SEIVA, 2013). Identificamos, nesse caso, que também variam de acordo com a dieta empregada, sendo a de cafeteria muito mais calórica e hiperlipídica do que a utilizada no presente estudo. A elevação dos níveis de triglicerídeos tem sido associada de forma independente com o aumento de risco de eventos cardiovasculares (HOKANSON e AUSTIN, 1996). Além disso, recentemente associou-se seu aumento com a diminuição do colesterol HDL (TENENBAUM et al., 2014). No presente

trabalho, essa relação foi encontrada somente nos animais velhos, uma vez que estes animais apresentaram maiores concentrações de TG e menores de HDL. Isso também está de acordo com estudos realizados tanto em humanos (TADDEI et al., 1997) quanto em ratos (ZAGAYKO et al., 2013), onde os indivíduos de maior idade tinham menores concentrações de HDL. Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2013), as dislipidemias secundárias são mais frequentes nos idosos, podendo se originar a partir de diabetes melito, intolerância à glicose, síndrome nefrótica, obesidade, alcoolismo ou uso de medicamentos. No entanto, observamos que as ratas velhas apresentaram um quadro de dislipidemia mesmo quando não foram submetidas à dieta e, por consequência, não apresentavam um quadro de obesidade, evidenciando uma dislipidemia devido ao envelhecimento. Ainda não se sabe exatamente quais os mecanismos envolvidos neste distúrbio em indivíduos mais velhos, mas já está descrito que os idosos são o grupo da população com maior prevalência de eventos cardiovasculares (RIGO et al., 2009), sendo a dislipidemia um dos fatores responsáveis por isso.

A dislipidemia que acompanha os quadros de obesidade pode ser acompanhada por alterações hepáticas relacionadas com o acúmulo de gordura corporal. A DHGNA é a doença hepática crônica mais comum no mundo, representando a manifestação hepática da SM (DEMIR et al., 2015). A esteatose hepática, caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura nos hepatócitos, é considerada o estágio inicial da DHGNA (ADAMS E LINDOR, 2007). Há evidências sugerindo que a esteatose hepática está estreitamente associada à obesidade, resistência à insulina e dislipidemia (LECLERCQ et al., 2007). No presente estudo, foi encontrado um aumento do conteúdo de lipídeos no fígado devido à idade dos animais, ou seja, as ratas velhas apresentaram uma maior concentração hepática de colesterol total e de triglicerídeos. Entretanto, não foram detectadas alterações neste acúmulo devido apenas à dieta, ou seja, independente da idade. Provavelmente isso se deve ao baixo teor de lipídeos da dieta usada neste estudo.

Quando realizada a análise histopatológica, a degeneração hepática microvacuolar é mais frequente nas ratas velhas que consumiram a dieta, embora os animais velhos que não receberam a dieta tivessem frequência de alteração histopatológica igual aos jovens. Na DHGNA, o acúmulo intra-hepático de lipídeos pode ser considerado a resultante das anormalidades do metabolismo lipídico, tais como, aumento da lipólise periférica, da absorção de ácidos graxos livres pelo

fígado, da síntese de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), bem como redução da oxidação dos ácidos graxos livres e liberação de triglicerídeos (ALMEDA-VALDES et al., 2015). Em suma, esse conjunto de alterações hepáticas encontradas neste estudo sugerem que as ratas velhas foram mais suscetíveis às alterações no perfil lipídico tanto sérico quanto hepático, sendo que o primeiro pode estar influenciando diretamente nos resultados do segundo, criando um ambiente propício à esteatose devido à dieta. Desse modo, a dieta hipercalórica parece ser mais danosa aos animais velhos do que aos jovens quanto ao perfil lipídico, considerando a dieta usada neste estudo e a idade avaliada.

Por outro lado, os animais que apresentaram obesidade não tiveram uma maior retenção de lipídeos no fígado e não houve associação entre o teor hepático de lipídeos e a resistência à insulina. Possivelmente, isso é devido ao tipo de dieta usada neste estudo. Porém, os animais que receberam essa dieta hipercalórica tiveram aumento dos triglicerídeos séricos e entre os jovens houve aumento da glicemia e no índice HOMA-IR, indicando resistência à insulina.

## 7 Considerações finais

Pode-se concluir que a dieta hipercalórica utilizada foi eficaz para induzir um modelo de obesidade independente da idade, uma vez que tanto as ratas jovens, quanto as velhas a consumiram em quantidades semelhantes e apresentaram um aumento do ganho de peso do mesmo modo.

Quando analisados os parâmetros diagnósticos da síndrome metabólica, encontrou-se em ambos os grupos, jovens e velhas, obesidade visceral, evidenciada pelo aumento da proporção de tecido adiposo visceral em relação ao peso corporal, sendo esta, determinante desta síndrome. Houve diferença nas respostas entre os animais de diferentes idades, as ratas velhas se apresentam mais resistentes às complicações decorrentes da obesidade no metabolismo glicídico, no entanto, são mais suscetíveis às alterações no perfil lipídico, tanto sérico quanto hepático.

Observamos que apesar das respostas diferentes, não necessariamente os animais mais velhos apresentam pior desempenho fisiológico. Em vista da complexidade do metabolismo e do próprio envelhecimento, é necessário realizar outros estudos para investigar os mecanismos envolvidos nestes resultados e na fisiologia do metabolismo no envelhecimento, buscando esclarecer as adaptações metabólicas dos indivíduos mais velhos ao meio em que se encontram.

## Referências

- ACUÑA, K., CRUZ, T. Avaliação do estado de adultos e idosos e situação nutricional da população brasileira. **Arq. Bras. Endocrinol Metab.** v.48, n.3, 2004.
- ADAMS, L.A., LINDOR, K.D. Nonalcoholic fatty liver disease. **Ann Epidemiol.** v. 17, p. 863–869, 2007.
- ALBERTI, K.G., ECKEL, R.H., GRUNDY, S.M., ZIMMET, P.Z., CLEEMAN, J.I., DONATO, K.A. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation.** v. 120, n. 16, pg 1640-5, 2009.
- ALMEDA-VALDES, P., ALTAMIRANO-BARRERA, A., MÉNDEZ-SÁNCHEZ, N. Insights in non-alcoholic fatty liver disease pathophysiology with lipidomic analyses. **Ann Hepatol.** v.14, n. 4, p. 567–569, 2015.
- BALISTRERI, C. R., CARUSO, C., CANDORE, G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. **Mediators Inflamm.** 2010.
- BAQUER, N.Z., TAHA, A., KUMAR, P., MCLEAN, P., COWISK, S.M., KALE, R.K., SINGH, R., SHARMA, D. A metabolic and functional overview of brain aging linked to neurological disorders. **Biogerontology.** v. 10, p. 377-413, 2009.
- BRASIL. **Lei nº 11.794.** Regulamenta o inciso VII, do § 1º, do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638/1979; e dá outras providências. DOU de 9.10.2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. **DATASUS.** 2011.
- BRAY, G. A., LOVEJOY, J. C., SMITH, S. R., DELANY, J. P., LEFEVRE, M., HWANG, D., RYAN, D. H., YORK, D. A. The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation. **J Nutr.** v. 132, p. 2488-91, 2002.
- BROWN, E.T., UMINO, Y., LOI, T., SOLESSIO, E., BARLOW, R. Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice. **Visual Neuroscience.** v. 22, p. 615-618, 2005.
- CARVALHEIRA, J.B.C, ZECCHIN, H.G., SAAD, M.J.A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CHUFFA, L. G., SEIVA, F. R. Combined effects of age and diet-induced obesity on biochemical parameters and cardiac energy metabolism in rats. **Indian J Biochem Biophys.** v. 50, p. 40-7, 2013.

COTRIM, H.P. Doença hepática gordurosa não-alcóolica: história natural. **Gaz. méd.** v. 79, supl. 2, p.46-47, 2009.

COTRIM, H.P., PARISE, E.R., OLIVEIRA, C.P.M.S., LEITE, N., MARTINELLI, A., GALIZZI, J. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil, clinical and histological profile. **Ann Hepatol.** v. 10, p. 33-7, 2011.

DE WIT, N., DERRIEN, M., BOSCH-VERMEULEN, H., OOSTERINK, E., KESHTKAR, S., DUVAL, C., DE VOGEL-VAN DEN BOSCH, J., KLEEREBEZEM, M., MÜLLER, M., VAN DER MEER, R. Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** v. 303, p. 589-599, 2012.

DEMIR, M., LANG, S., STEFFEN, H.M. Nonalcoholic fatty liver disease – current status and future directions **J Dig Dis.** v. 16, n. 10, p. 541–557, 2015.

DESPRÉS, J. P. Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? **Ann. Med.** v. 38, p. 52–63, 2006.

DESPRÉS, J.P, LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature.** v. 444, p. 881-887, 2006.

DUQUE, P.A.O, A, LÓPEZ-ZAPATA, D.F., GIRALDO, J.C.T. Síndrome metabólico: enfoque fisiopatológico. **Investigaciones Andina.** v. 17, n. 31, p. 1328-1342, 2015.

FANTIN, F., DI FRANCESCO, V., FONTANA, G., ZIVELONGHI, A., BISSOLI, L., ZOICO, E., ROSSI, A., MICCIOLO, R., BOSELLO, O. & ZAMBONI, M. Longitudinal body composition changes in old men and women: interrelationships with worsening disability. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** v. 62, p. 1375-81, 2007.

GOLDIM, J.R. RAYMUNDO, M.M. Pesquisa em saúde e direito dos animais. 2ª edição, **HCPA**, Porto Alegre, RS, 1997.

GOWDY, K.M., FESSLER, M.B. Emerging roles for cholesterol and lipoproteins in lung disease. **Pulm Pharmacol Ther.** v. 15, 2012.

GUEDES, A.C.B., GAMA, C.R., TUSSI, A.C.R. Avaliação nutricional subjetiva do idoso: Avaliação Subjetiva Global (ASG) versus Mini-Avaliação Nutricional (MAN). **Com. Ciências Saúde.** v.19, n.4, p.377-384, 2008.

HAAS, J.T., FRANQUE, S., STAELS, B. Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Annu. Rev. Physiol.** v. 78, p. 181-205, 2016.

HAN, T.S., WU, F.C.W., LEAN, M.E.J. Obesity and weight management in the elderly: A focus on men. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 27, p. 509-525, 2013.

HOKANSON J.,E., AUSTIN, M.A. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. **J Cardiovasc Risk**. v. 3, n. 2, p. 213-9, 1996.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 – POF**. Rio de Janeiro, 2010.

IBGE– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estudo **Nacional da Despesa Familiar – Endef**. Rio de Janeiro, 1976.

ITO, Y., DAITOKU, H., FUKAMIZU, A. Foxo1 increases pro-inflammatory gene expression by inducing C/EBP $\beta$  in TNF- $\alpha$ -treated adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 378, n.2, p. 290 - 295, 2009.

KLEIN, S.L., SCHIEBINGER, L., STEFANICK, M.L., CAHILL, L., DANSKA, J. Opinion: sex inclusion in basic research drives discovery. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 112, p. 5257–5258, 2015.

LERARIO, D.D.G., GIMENO, S.G., FRANCO, L.J., IUNES, M., FERREIRA, S.R.G. Excesso de peso e gordura abdominal para a síndrome metabólica em nipo-brasileiros. **Rev Saúde Pública**. v. 36, p. 4-11, 2002.

LADABAUM, U., MANNALITHARA, A., MYER, P.A., SINGH, G. Obesity, abdominal obesity, physical activity, and caloric intake in US adults: 1988 to 2010. **Am J Med**. v. 127, p. 717–727, 2014.

LECLERCQ, I.A., DA SILVA MORAIS, A., SCHROYEN, B., VAN HUL, N., GEERTS, A. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: Mechanisms and consequences. **J Hepatol**. v. 47, p. 142–156, 2007.

LOVRE, D., LINDSEY, S.H., MAUVAIS-JARVIS, F. Effect of menopausal hormone therapy on components of the metabolic syndrome. **Ther Adv Cardiovasc Dis**. p. 1-11, 2016.

MARQUES, A. P. O., ARRUDA, I. K. G., SANTO, A. C. G. E., RAPOSO, M. C. F., GUERRA, M. D., SALES, T. F. C. Prevalência de obesidade e fatores associados em mulheres idosas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**. v. 3, p. 441-448, 2005.

MATTHEWS, D.R., HOSKER, J.P., RUDENSKI, A.S., NAYLOR, B.A., TREACHER, D.F., TURNER, R.C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**. v. 28, p. 412-19, 1985.

MAURY, E., BRICHARD, S.M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. **Mol Cell Endocrinol.** v. 314, n. 1, p. 1-16, 2010.

MAUVAIS-JARVIS, F. Sex differences in metabolic homeostasis, diabetes, and obesity. **Biol Sex Differ.** p. 6-14, 2015.

MINCIS, M. Esteatose e esteato-hepatite não-alcoólicas. **Gastroenterologia & Hepatologia.** 4º Ed. São Paulo, Casa Lemos Editorial p. 873-882, 2008.

RIBEIRO-FILHO, F.F., MARIOSIA, L.S, FERREIRA, S.R.G., ZANELLA, M.T. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 50, p. 230-238, 2006.

RIGO, J.C., VIEIRA, J.L., DALACORTE, R.R., REICHERT, C.L. Prevalência de Síndrome Metabólica em Idosos de uma Comunidade: Comparação entre Três Métodos Diagnósticos. **Arq Bras Cardiol.** v. 93, n.2, p. 85-9, 2009.

ROSENBERG, I.H. Summary comments. **Am J Clin Nutr.** 50: 12313, 1989.

SALGADO, A.L.F.A., CARVALHO, L., OLIVEIRA, A.C., SANTOS, V.N., VIEIRA, J.G., PARISE, E.R. Insulin resistance index (HOMA-IR) in the differentiation of patients with non-alcoholic fatty liver disease and healthy individuals. **Arq Gastroenterol.** v. 47, n. 2, p. 165-169, 2010.

SAHA, J.K., XIA, J., GRONDIN, J.M., ENGLE, S.K., JABUBOWSKI, J.A. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. **Exp Biol. Med.** v. 230, n. 10, p. 777-84, 2005.

SCHMIDT M. I., DUNCAN, B. B., SILVA, G. A., MENEZES, A. M., MONTEIRO, C. A., BARRETO, S. M., CHOR, D., MENEZES, P. R. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **Lancet.** v. 377, n. 9781, p. 1949-1961, 2011.

SILVEIRA, E. A.; KAC, G.; BARBOSA L. S. Prevalência e fatores associados à obesidade em idosos residentes em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil: classificação da obesidade segundo dois pontos de corte do índice de massa corporal. **Cadernos de Saúde Pública.** v. 25, n. 7, p. 1569-1577, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA - SBC. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia.** v. 84, suplemento I, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA – SBC. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq Bras Cardiol.** 2013.

TADDEI, C. F. G., RAMOS, L. R., MORAES, J. C. D., WAJNGARTEN, M., LIBBERMAN, A., SANTOS, S. C., SAVIOLI, F., DIOGUARDI, G. & FRANKEN, R. Estudo multicêntrico de idosos atendidos em ambulatórios de cardiologia e



geriatria de instituições brasileiras. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 69, p. 327-333, 1997.

TAVARES, E.L., ANJOS, L.A. Perfil antropométrico da população idosa brasileira. Resultados da Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição. **Cad Saúde Pub**. v. 15, n. 4, p. 759-68, 1999.

TEIXEIRA, D. Resposta inflamatória no sistema nervoso central induzida por obesidade em ratas Wistar de diferentes idades. 2014. 71 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre.

TENENBAUM, A., KLEMPFNER, R., FISMAN, E.Z. Hypertriglyceridemia: a too long unfairly neglected major cardiovascular risk factor. **Cardiovasc Diabetol**. 13:159, 2014.

VANDERVOORT, A.A., KRAMER, J.F., WHARRAM, E.R. Eccentric knee strength of elderly females. **J Geront**. v. 45, n. 4, p. 125-128, 1990.

VASCONCELOS, F. A. G., CORDEIRO, B. A., RECH, C. R., PETROSKI, E. L. Sensitivity and specificity of the body mass index for the diagnosis of overweight: obesity in elderly. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 26, p. 1519-1527, 2010.

WILLCOX, D.C., SCAPAGNINI, G., WILLCOX, B.J. Healthy aging diets other than the Mediterranean: a focus on the Okinawan diet. **Mech Ageing Dev**. 2014.

ZAGAYKO, A. L., KRAVCHENKO, G. B., KRASILNIKOVA, O. A. & OGAI, Y. O. Grape polyphenols increase the activity of HDL enzymes in old and obese rats. **Oxid Med Cell Longev**. 2013.

ZAMBONI, M., ARMELLINI, F., HARRIS, T., TURCATO, E., MICCIOLO, R., BERGAMO-ANDREIS, A., BOSELLO, O. Effects of age on body fat distribution and cardiovascular risk factors in women. **Am J Clin Nutr**. v. 66, p. 111-115, 1997.