UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E SAÚDE

JÉSSIKA BUTCOVSKY BOTTO SARTER KOBI

# INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TIPOS DE DIETAS HIPERCALÓRICAS SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS, INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO

VITÓRIA

2019

JÉSSIKA BUTCOVSKY BOTTO SARTER KOBI

# INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TIPOS DE DIETAS HIPERCALÓRICAS SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS, INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde (PPGNS) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Nutrição e Saúde na área de concentração Adaptações Bioquímicas e Fisiológicas em Modelos de Intervenção Nutricional.

**Orientador:** Prof. Dr. André Soares Leopoldo.

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Ana Paula Lima Leopoldo.

VITÓRIA

2019

JÉSSIKA BUTCOVSKY BOTTO SARTER KOBI

# INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TIPOS DE DIETAS HIPERCALÓRICAS SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS, INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO

Aprovada em ____ de _____ de 2019.

## BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. André Soares Leopoldo
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)
**Orientador**

_____
Profa. Dra. Ana Paula Lima Leopoldo
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)
**Co-orientadora**

_____
Prof. Dr. Fabiano Kenji Haraguchi
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)
**Membro Interno**

_____
Prof. Dra. Camila Renata Corrêa
Universidade Estadual Paulista (UNESP)
**Membro Externo**

_____
Prof. Dr. Rogério Graça Pedrosa
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)
**Suplente Interno**

_____
Prof. Dra. Márcia Holanda da Cunha
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)
**Suplente Externo**

*Dedicatória*

*Com amor e gratidão, dedico este trabalho à minha família. Aos meus pais, Heliomar e Rosiléia, minha irmã, Mariana e meu esposo, Erick.*

# *Agradecimentos*

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, pela proteção e saúde. Àquele que me abençoa e ilumina meu caminho, tornando possível alcançar mais uma realização profissional. Sou grata a Ti!

Àqueles que são minha base, inspiração e exemplos a serem seguidos: minha família. Aos meus amados pais, Heliomar e Rosileia, e à minha amada irmã, Mariana. Esta vitória não seria possível sem vocês ao meu lado. Sou grata a Deus, todos os dias, pela família que me deu. Eu amo vocês, profundamente!

Ao meu esposo, Erick. Agradeço por compreender minha ausência em muitos momentos especiais, ainda recém-casados; por me dar forças, não permitindo que eu desistisse quando por inúmeras vezes considerei fazê-lo; por andar ao meu lado e por querer crescer junto; e principalmente por me admirar como profissional e expressar de maneira tão orgulhosa meus feitos. Você é um dos meus principais motivadores e sem dúvidas, fez parte desta conquista. Eu amo você, meu parceiro de vida!

Ao meu orientador Prof. Dr. André Soares Leopoldo pela disponibilidade em educar. Agradeço por acreditar em mim e em meu potencial para o desenvolvimento deste trabalho. Guardarei, com carinho e gratidão, seus ensinamentos durante a pós-graduação, em especial a compreensão de que as dificuldades na realização de uma pesquisa servem para nosso amadurecimento acadêmico.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Ana Paula Lima Leopoldo, prestativa e paciente, pelo auxílio no aprendizado e execução da técnica de ELISA. Agradeço, ainda, as contribuições e incentivo ao longo desses dois anos.

À banca examinadora, Prof. Dr. Fabiano Kenji Haraguchi e Profa. Dra. Camila Renata Corrêa, pelas ricas contribuições à minha dissertação. Agradeço o aceite do convite e a disponibilidade em construir, em conjunto, um trabalho de qualidade.

À Profa. Dra. Camila Renata Corrêa e equipe, por me receberem na UNESP, em Botucatu-SP, com tanta gentileza e pela disponibilidade em ensinar e executar as técnicas relacionadas ao estresse oxidativo. Profa. Camila, Corina e Jéssica, agradeço, sinceramente, por suas contribuições, ensinamentos e paciência durante as duas semanas que estive no laboratório.

À Paula Grippa, Vinicius Dorini, Mailon e Cacau, família que me recebeu com tanto carinho em sua casa em Botucatu-SP durante duas semanas. Sou imensamente grata e jamais esquecerei de tudo que fizeram por mim. Vocês têm minha gratidão e amizade! Desejo vê-los, em breve e por muitas vezes, aqui em Vitória-ES.

À técnica de laboratório Luciene (Laboratório Histoquímico), ao Prof. Dr. Breno Valentim e aos colegas do LUCCAR pela paciência e auxílio na execução das técnicas de histologia. Agradeço em especial a Arícia, por ir além e me oferecer uma boa companhia e incentivo durante as análises. Arícia, você é uma pessoa ímpar!

Aos professores, alunos e colaboradores do LAFIBE, LAFEX e LAFEC, pelo convívio e troca de experiências. Guardarei com carinho os nossos momentos.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde (PPGNS), por compartilharem conhecimento, vivência e experiências, e aos meus queridos colegas da turma 2017/1 pelo companheirismo e crescimento acadêmico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, que inegavelmente me deu suporte para maior dedicação à pesquisa.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*"Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade. Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível."*

*Charles Chaplin*

# RESUMO

**Introdução:** A obesidade é considerada epidemia mundial e um grave problema de saúde pública do século XXI. O consumo de dietas hipercalóricas pode ser o principal contribuinte para a atual epidemia de sobrepeso, obesidade e suas comorbidades em todo o mundo. O excesso de tecido adiposo afeta o metabolismo mitocondrial, contribuindo para o desenvolvimento de estresse oxidativo. Outro aspecto importante é a relação entre obesidade e doenças metabólicas com estado crônico de inflamação. **Objetivo:** Investigar a influência de três tipos de dietas hipercalóricas sobre parâmetros metabólicos, inflamatórios e de estresse oxidativo em modelo experimental. **Material e Métodos:** Este estudo foi aprovado pela Comissão Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (08/2016). Ratos *Wistar* (n=40), com 30 dias de idade, foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: controle (C), hiperglicídico rico em sacarose (HS), hiperlipídico (HL), hiperlipídico com sacarose (HLS) por 20 semanas. Os perfis nutricional, metabólico, hormonal e bioquímico, bem como as análises histológicas dos tecidos adiposo e hepático foram avaliados. A inflamação foi avaliada por meio da análise dos níveis séricos de marcadores inflamatórios, como a interleucina 6 (IL-6) e adiponectina. A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no soro e os biomarcadores de estresse oxidativo no soro e homogenatos de tecido adiposo visceral e epididimal (malondialdeído - MDA e proteínas carboniladas) foram determinados. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média ou mediana ± intervalo interquartil, sendo submetidos à análise de variância (ANOVA) uma via (dieta) para amostras independentes e duas vias (dieta e tempo) para o modelo de medidas repetidas, complementadas com o teste *post hoc* de Tukey e/ou Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi 5%. **Resultados:** O HL promoveu obesidade com elevação significativa do peso corporal final (HL: 658 ± 43 *vs.* C: 525 ± 17 e HS: 543 ± 16, $p<0,05$), gordura corporal (HL: 71 ± 7 *vs.* C: 44 ± 2 e HS: 44 ± 4, $p<0,05$) e índice de adiposidade (HL: 11 ± 1 *vs.* C: 8,4 ± 0,3 e HS: 7,9 ± 0,5, $p<0,05$) em relação aos grupos C e HS. As comorbidades associadas à obesidade foram a intolerância à glicose visualizada por maior área sob a curva glicêmica (ASC) nos grupos HL e HLS que o C (HL = 1521 ± 57 e HLS = 1460 ± 45 *vs.* C = 1234 ± 65, $p<0,05$). Em adição, foi visualizado hipertensão arterial em todos os grupos experimentais quando comparados ao C. Em relação aos parâmetros hormonais e bioquímicos, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. Os grupos experimentais apresentaram aumento na deposição de gotículas de gordura no tecido hepático quando comparados ao grupo C, embora as áreas dos adipócitos tenham sido similares. As concentrações dos biomarcadores de estresse oxidativo (MDA e proteínas carboniladas) no soro e tecido adiposo visceral e epididimal foram similares entre os grupos. Além disso, não houve diferença significativa para a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no soro. Os marcadores inflamatórios (IL-6 e adiponectina) também apresentaram resultados similares entre os grupos. **Conclusão:** O modelo hiperlipídico isoladamente foi eficaz no desencadeamento da obesidade e comorbidades associadas, contudo todos os modelos experimentais de dietas hipercalóricas foram incapazes de promover estresse oxidativo e inflamação.



**Palavras-chaves:** Obesidade. Dietas Hipercalóricas. Inflamação. Estresse Oxidativo.

# ABSTRACT

**Introduction:** Obesity is considered a worldwide epidemic and a serious public health problem of the 21st century. The consumption of hypercaloric diets can be the main contributor to the current epidemic of overweight, obesity and comorbidities in all over the world. Excess adipose tissue affects the mitochondrial metabolism, contributing to the development of oxidative stress. Another important aspect is the relationship between obesity and metabolic diseases with chronic state of inflammation. **Objective:** Investigate the influence of three types of hyper caloric diets on metabolic parameters, inflammatory and oxidative stress in experimental model. **Material and Methods:** This study was approved by the Ethical Commission on the Use of Animals of the Federal University of Espírito Santo (08/2016). Thirty-day-old male *Wistar* rats (n = 40) were randomized into four groups: control (C), high-sucrose (HS), high-fat (HF) and high-fat with sucrose (HFS) for 20 weeks. Nutritional, metabolic, hormonal and biochemical profiles as well as the histological analyzes of adipose and hepatic tissues were performed. Inflammation was assessed by serum levels of inflammatory markers such as interleukin 6 (IL-6) and adiponectin. Activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in serum and biomarkers of oxidative stress in serum and homogenates of visceral and epididymal adipose tissue (malondialdehyde (MDA) and carbonylated proteins) were determined. Data were expressed as mean ± standard error of the mean or median ± interquartile range, and were submitted to analysis of variance (ANOVA) one-way for independent samples (diet) and two-way (diet and time) for the repeated measures model, complemented with the Tukey's and/or Kruskal-Wallis *post hoc* test. The level of significance was 5%. **Results:** HF promoted obesity with a significant increase in final body weight (HF: 658 ± 43 *vs.* C: 525 ± 17 and HS: 543 ± 16, $p<0.05$), body fat (HF: 71 ± 7 *vs.* C: 44 ± 2 and HS: 44 ± 4, $p<0.05$) and adiposity index (HF: 11 ± 1 *vs.* C: 8.4 ± 0.3 and HS: 7.9 ± 0.5, $p<0.05$) in relation to C and HS. The comorbidities associated with obesity were the glucose intolerance visualized by higher area under the glycemic curve (AUC) in the HF and HFS groups than C (C = 1234 ± 65 *vs.* HF = 1521 ± 57 and HFS = 1460 ± 45, $p <0.05$). In addition, hypertension was visualized in all experimental groups when compared to C. In relation to the hormonal and biochemical parameters, there was no significant difference between the experimental groups. The experimental groups showed increased fat droplets deposition in the hepatic tissue when compared to group C, although the adipocyte areas were similar. The concentrations of oxidative stress biomarkers (MDA and carbonylated proteins) in serum and visceral and epididymal adipose tissue were similar between the groups. In addition, there was no significant difference for the activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT in the serum. Inflammatory markers (IL-6 and adiponectin) also showed similar results between groups. **Conclusion:** The hyperlipid model was effective in triggering obesity and comorbidities associated, but all experimental models of hypercaloric diets were unable to promote oxidative stress and inflammation.



**Keywords:** Obesity. Hypercaloric Diets. Inflammation. Oxidative Stress.

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| ADP | Adenosina Difosfato |
| AGL | Ácido Graxo Livre |
| ANOVA | Análise de Variância |
| ANT | Translocador de Nucleotídeos de Adenosina |
| ASC | Área sob a Curva |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| C | Grupo Controle |
| CA | Consumo Alimentar |
| CAT | Catalase |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| CETP | Proteína de Transferência de Colesterol Esterificado |
| CONCEA | Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal |
| CT | Colesterol Total |
| DHGNA | Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| DNPH | Derivatizador 2,4-Dinitrofenil-hidrazina |
| EA | Eficiência Alimentar |
| ELISA | Ensaio Imunoenzimático |
| EPM | Erro Padrão da Média |
| ERN | Espécies Reativas de Nitrogênio |
| ERO | Espécies Reativas de Oxigênio |
| FADH | Flavina Adenina Dinucleotídeo |
| FC | Frequência Cardíaca |
| FCO | Farinha de Carne e Ossos |
| GC | Gordura Corporal |
| GLUT4 | Transportador de Glicose 4 |
| GSH | Glutationa Reduzida |
| GSH-Rd | Glutationa Redutase |
| GSH-Px | Glutationa Peroxidase |
| G6PC | Glicose-6-Fosfatase |
| HDL | Lipoproteínade Alta Densidade |
| HE | Hematoxilina-Eosina |
| HL | Grupo Hiperlipídico |
| HLS | Grupo Hiperlipídico com Sacarose |
| HOMA-IR | Homeostatic Model Assessment - Insulin Resistance |
| HS | Grupo Hiperglicídico |
| IA | Índice de Adiposidade |
| IC | Ingestão Calórica |
| IL-1 | Interleucina 1 |
| IL-2 | Interleucina 2 |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-8 | Interleucina 8 |

| | |
|---|---|
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IMC | Índice de Massa Corporal |
| LDL | Lipoproteína de Baixa Densidade |
| LPS | Lipopolissacarídeos |
| MDA | Malondialdeído |
| NADH | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato |
| NADPH | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido |
| NO | Óxido Nítrico |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PA | Pressão Arterial |
| PAD | Pressão Arterial Diastólica |
| PAI-1 | Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1 |
| PAS | Pressão Arterial Sistólica |
| PBS | Tampão Fosfato de Sódio |
| PC | Peso Corporal |
| PCF | Peso Corporal Final |
| PCI | Peso Corporal Inicial |
| PCR | Proteína C Reativa |
| POF | Pesquisa de Orçamento Familiar |
| RMSE | Ressonância Magnética de Spin Eletrônico |
| RNAm | RNA Mensageiro |
| SOD | Superóxido Dismutase |
| TAB | Tecido Adiposo Branco |
| TAM | Tecido Adiposo Marrom |
| TBA | Ácido Tiobarbitúrico |
| TBARS | Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico |
| TCA | Ácido Tricloroacético |
| TG | Triglicerídeos |
| TNF-α | Fator de Necrose Tumoral Alfa |
| TLR4 | Toll Like-4 Receptors |
| TTG | Teste de Tolerância à Glicose |
| UNIPEX | Unidade de Pesquisa Experimental |

# LISTA DE QUADROS

**Quadro 1 -** Classificação e Nomenclatura das Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio ..... 22

**Quadro 2 -** Composição das Dietas Experimentais ..... 48

**Quadro 3 -** Composição de Macronutrientes e Densidade Calórica das Rações ..... 48

# LISTA DE FIGURAS

**Figura 1 -** Cadeia Transportadora de Elétrons ..... 24

**Figura 2 -** Redução Tetravalente da Molécula de $O_2$ na Mitocôndria ..... 24

**Figura 3 -** Potenciais Mecanismos Envolvidos na Geração de Estresse Oxidativo na Patogênese da Obesidade e o Papel do Estresse Oxidativo no Desenvolvimento de Riscos para a Saúde Associados à Obesidade..... 27

**Figura 4 -** Componentes do TAB ..... 35

**Figura 5 -** Marcadores Inflamatórios e Proteínas de Fase Aguda Secretadas pelo TAB ..... 36

**Figura 6 -** Representação Esquemática do Protocolo Experimental ..... 46

**Figura 7 -** Depósitos de Gordura Epididimal, Retroperitoneal e Visceral..... 49

**Figura 8 -** Representação Esquemática do Protocolo de Aferição da Pressão Arterial ..... 50

**Figura 9 -** Evolução Semanal do Peso Corporal dos Grupos Experimentais ..... 59

**Figura 10 -** Glicemia Basal e Área sobre a Curva Glicêmica..... 63

**Figura 11 -** Pressão Arterial e Frequência Cardíaca ..... 64

**Figura 12 -** Efeito da Ingestão de Diferentes Dietas Hipercalóricas na Indução de Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica de Ratos *Wistar* após 20 Semanas..... 65

**Figura 13 -** Efeito da Ingestão de Diferentes Dietas Hipercalóricas no Tamanho do Adipócito Visceral de Ratos *Wistar* após 20 Semanas..... 66

# LISTA DE FIGURAS

**Figura 14 -** MDA e Proteínas Carboniladas ..... 68

# LISTA DE TABELAS

**Tabela 1 -** Características Gerais.....61

**Tabela 2 -** Características Alimentares .....62

**Tabela 3 -** Parâmetros Metabólicos e Hormonais .....63

**Tabela 4 -** Biomarcadores Séricos de Estresse Oxidativo e Atividade de Enzimas Antioxidantes.....67

**Tabela 5 -** Perfil Inflamatório .....69

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO ..... 16**

**2 REVISÃO DE LITERATURA ..... 20**

2.1 OBESIDADE ..... 20

2.2 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO ..... 21

2.3 OBESIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO ..... 26

2.4 DIETAS HIPERCALÓRICAS E ESTRESSE OXIDATIVO ..... 31

2.5 INFLAMAÇÃO ..... 33

2.6 OBESIDADE E INFLAMAÇÃO ..... 35

2.6.1 Marcadores Inflamatórios na Obesidade ..... 37

2.6.1.1 TNF-α ..... 37

2.6.1.2 IL-6 ..... 39

2.6.1.3 Leptina ..... 40

2.6.1.4 Adiponectina ..... 40

**3 OBJETIVO ..... 43**

**4 MATERIAL E MÉTODOS ..... 45**

4.1 ANIMAIS ..... 45

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL ..... 46

4.3 FORMULAÇÃO E COMPOSIÇÃO DAS DIETAS ..... 47

4.3.1 Formulação ..... 47

4.3.2 Composição ..... 47

4.4 AVALIAÇÃO NUTRICIONAL ..... 49

4.5 COMORBIDADES ..... 49

4.5.1 Pressão Arterial ..... 49

4.5.2 Teste de Tolerância à Glicose ..... 50

4.5.3 Perfil Lipídico ..... 51

4.5.4 Dosagem Sérica de Leptina ..... 51
4.6 ANÁLISES HISTOLÓGICAS ..... 52
4.6.1 Tecido Hepático ..... 52
4.6.2 Tecido Adiposo Visceral ..... 52
4.7 BIOMARCADORES OXIDANTES E ANTIOXIDANTES ..... 53
Procedimentos Técnicos ..... 53
4.7.1 MDA ..... 54
4.7.2 Proteínas Carboniladas ..... 55
4.7.3 Determinação da Atividade Sérica de SOD ..... 55
4.7.4 Determinação da Atividade Sérica de CAT ..... 56
4.8 PERFIL INFLAMATÓRIO ..... 56
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA ..... 56
**5 RESULTADOS ..... 59**
5.1 EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL ..... 59
5.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS ..... 60
5.3 COMORBIDADES ..... 62
5.4 ANÁLISES HISTOLÓGICAS ..... 64
5.5 BIOMARCADORES OXIDANTES E ANTIOXIDANTES ..... 67
5.6 PERFIL INFLAMATÓRIO ..... 69
**6 DISCUSSÃO ..... 71**
**7 CONCLUSÃO ..... 88**
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS ..... 126
APROVAÇÃO DE SOLICITAÇÃO DE ADENDO DE INCLUSÃO A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS ..... 127

# Introdução