

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENFERMAGEM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**

JÉSSICA MASCHIO

**EFEITOS DO ESTRESSE DE ISOLAMENTO EM RATOS SUBMETIDOS À DIETA
HIPERLIPÍDICA**

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENFERMAGEM

JÉSSICA MASCHIO

**EFEITOS DO ESTRESSE DE ISOLAMENTO EM RATOS SUBMETIDOS À DIETA
HIPERLIPÍDICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito de obtenção do diploma no curso de Bacharelado de Enfermagem pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Kucharski.

Co-orientador: Prof. Dra. Juliana Petri Tavares.

Porto Alegre

2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais e ao meu irmão que sempre estiveram presentes e me apoiaram durante essa jornada.

As minhas incríveis colegas de apartamento, Daniela e Jokasta, por sempre me apoiarem nos momentos bons e ruins.

Aos doutorandos, mestrandos e bolsistas do LaMEC pela ajuda e ensinamentos, sem vocês esse trabalho certamente não existiria.

Aos meus mestres, principalmente aos meus orientadores, Prof. Luiz e Prof. Juliana por me ensinarem e orientarem, sempre com calma e gentileza durante todo esse processo.

Por fim, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a Escola de Enfermagem que me ensinaram a ser profissional e pesquisadora.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

RESUMO

Introdução: A obesidade é uma doença multifatorial e amplamente encontrada na sociedade atual, sendo uma epidemia em todos os países do mundo e podendo, então, ser considerada um problema de saúde pública, visto a sua relação com o desenvolvimento de doenças cardíacas, neurológicas e metabólicas. A síndrome metabólica (SM), uma das condições geradas pela obesidade, é uma condição clínica complexa definida por um conjunto de alterações metabólicas, determinada pela presença de obesidade, dislipidemia, hipertensão arterial e resistência insulínica. Já o estresse está constantemente presente em nossa população, tanto em indivíduos saudáveis, quanto em pessoas em situação de hospitalização. Desta forma, os fatores estressores podem ser de diferentes naturezas e podem influenciar de diversas formas o indivíduo, expressando sintomas físicos e/ou psíquicos e, com isso, podendo provocar alterações metabólicas e hormonais no organismo.

Objetivo: Identificar os efeitos do estresse sobre parâmetros metabólicos em ratos Wistar submetidos ao modelo de dieta hiperlipídica.

Materiais e Métodos: Trata-se de um estudo experimental, com abordagem quantitativa, realizada com 32 ratos da espécie *Rattus norvegicus*, que foram submetidos a um modelo de dieta hiperlipídica e, também, ao estresse de isolamento.

Resultados: observou-se o aumento da ingesta do alimento palatável e elevação do consumo alimentar, posterior a duas semanas de estresse ($p < 0,0001$). Após, o uso crônico da dieta hiperlipídica houve maior acúmulo de gordura abdominal, retroperitoneal ($p < 0,01$) e visceral ($p < 0,02$; $p < 0,007$), aumento do tecido cardíaco ($p < 0,0001$), além de elevar os níveis de colesterol ($p < 0,001$) e triglicerídeos plasmáticos ($p < 0,001$), assim como aumentar a concentração de triglicerídeos ($p < 0,0002$) e de glicogênio ($p < 0,02$) no tecido hepático e, elevar as reservas de glicogênio no fígado, devido ao estresse ($p < 0,001$).

Conclusão: A dieta induziu efeitos sobre parâmetros morfológicos, sorológicos, sobre as reservas de carboidratos e de lipídios no fígado e na gordura visceral e retro peritoneal. Contudo, apesar do aumento da ingesta do alimento palatável e elevação do consumo alimentar, posterior a duas semanas de estresse, não foram observados grandes impactos do isolamento sobre os dados coletados, inferindo que o tempo ou a severidade do agente estressor não foram suficientes.

Palavras-chave: estresse fisiológico; obesidade; dieta hiperlipídica.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Obesidade	10
1.2 Síndrome Metabólica	12
1.3 Estresse	13
2 OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Delineamento do Estudo	18
3.2 Campo	18
3.3 Animais	18
3.4 Dieta hiperlipídica	19
3.5 Estresse dos animais	20
3.6 Consumo de ração	21
3.7 Eutanásia	21
3.8 Coleta de órgãos/tecidos	22
3.9 Técnicas Laboratoriais	23
3.9.1 Morfometria: relação tecido/peso corporal total	23
3.9.2 Dosagens séricas	23
3.9.3 Concentração de Glicogênio	23
3.9.4 Concentração de triglicerídeos	24
3.11 Análise dos dados	24
3.12 Aspectos éticos	24
4 RESULTADOS	25
4.1 Consumo de dieta e água semanal	25
4.1.1 Consumo de dieta	25
4.2 Peso Corporal (PC)	26
4.3 Parâmetros Morfométricos	27
4.4.1. Glicose	29
4.4.2 Triglicerídeos	31
4.4.3 Colesterol	32
4.6 Quantidade de triglicerídeos nos tecidos	33

4.7 Glicogênio no Tecido Hepático	35
4 DISCUSSÃO	37
5 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	41
ANEXOS	49
ANEXO I. Aprovação para realização de pesquisa da Comissão de Pesquisa da Enfermagem-UFRGS.	49
ANEXO II. Carta de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.	50

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

TABELAS

Tabela 1. Classificação de peso pelo IMC adaptada das Diretrizes Brasileiras de Obesidade (Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2009/2010).

Tabela 2. Composição da dieta hiperlipídica, composição calórica referente a preparação de 2Kg de dieta.

Tabela 3. Consumo de dieta ao longo do experimento.

Tabela 4. Efeito do estresse sob parâmetros morfométricos em ratos submetidos ao modelo de dieta hiperlipídica.

Tabela 5. Efeito do modelo de dieta hiperlipídica sobre o peso dos tecidos coletados em ratos submetidos ao estresse de isolamento

Tabela 6. Efeito do estresse sob triglicerídeos nos tecidos em ratos submetidos ao modelo de dieta hiperlipídica.

FIGURAS

Figura 1. Exemplo da regulação da liberação de cortisol pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

Figura 2. Desenho de método experimental.

Figura 3. Desenho experimental de todas as etapas do experimento.

Figura 4. Efeito do modelo de dieta hiperlipídica sobre o ganho total de peso em ratos submetidos ao estresse de isolamento.

Figura 5. Efeito do modelo de dieta hiperlipídica sobre a glicemia plasmática em ratos

Figura 6. Efeito do modelo de dieta hiperlipídica sobre a glicemia plasmática em ratos submetidos ao estresse de isolamento

Figura 7. Efeito do modelo de dieta hiperlipídica sobre o triglicerídeo plasmático em ratos submetidos ao estresse de isolamento.

Figura 8. Efeito do modelo de dieta hiperlipídica sobre o colesterol plasmático em ratos submetidos ao estresse de isolamento

Figura 9. Efeito do modelo de dieta hiperlipídica sobre a quantidade de triglicerídeos no tecido hepático em ratos submetidos ao estresse de isolamento.

Figura 10. Efeito do modelo de dieta hiperlipídica sobre a quantidade de glicogênio no tecido hepático em ratos submetidos ao estresse de isolamento.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico hipofisário

AGL: ácidos graxos livres

ANOVA: Análise de Variância

CB: carboidratos

CEUA: Comissão de Uso de Animais

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CREAL: Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

CRH: hormônio regulador de corticotrofina

CTR-estressados: controle-estressados

CTR: controle

DHL-estressados: dieta hiperlipídica-estressados

DHL: dieta hiperlipídica

EHHA: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

G6P: glicose-6-fosfato

GC: glicocorticoides

GLP-1: hormônio peptídeo semelhante a glucagon 1

ICBS: Instituto de Ciência Básicas de Saúde

IMC: índice de massa corporal

HL: hiperlipídica

LaMEC: Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada

LDL: lipoproteína de baixa densidade

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCT: peso corporal total

SM: síndrome metabólica

SNA: sistema nervoso autônomo:

SNC: sistema nervoso central

TAR: tecido adiposo retroperitoneal

TAV: tecido adiposo visceral

TG: triglicerídeos

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

VLDL: *very low density lipoprotein*

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença multifatorial e amplamente encontrada na sociedade atual, sendo uma epidemia em todos os países do mundo e podendo, então, ser considerada um problema de saúde pública, visto a sua relação com o desenvolvimento de doenças cardíacas, neurológicas e metabólicas (OMS, ROBERTS et al, 2018). A síndrome metabólica (SM), uma das condições geradas pela obesidade, é uma condição clínica complexa definida por um conjunto de alterações metabólicas, determinada pela presença de aumento de tecido adiposo visceral, dislipidemia, hipertensão arterial e resistência insulínica. Assim, para que um indivíduo seja diagnosticado com SM é necessário que três ou mais desses fatores existam em conjunto (*National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III*, 2001).

Já o estresse está constantemente presente em nossa população, tanto em indivíduos saudáveis, quanto em pessoas em situação de hospitalização. Desta forma, os fatores estressores podem ser de diferentes naturezas e podem influenciar de diversas formas o indivíduo, expressando sintomas físicos e/ou psíquicos e, com isso, podendo provocar alterações metabólicas e hormonais no organismo (RIBEIRO et al, 2015; MACEDO, 2010).

Diariamente, depara-se no contexto hospitalar com pacientes em situação de estresse elevado, por consequência da mudança de ambiente, isolamento social e pelo enfrentamento do estado de saúde deficiente e, também, profissionais com alta demanda psicológica ocupacional e sobrecarga de trabalho, gerando o estresse físico e psicológico (GARBARINO, MAGNAVITA, 2015; RIBEIRO et al, 2015; HERDMAN et al, 2015).

Pesquisas realizadas isoladamente em determinadas populações, no território brasileiro, mostram que cerca de 55% dos indivíduos desenvolvem a SM, sendo em sua maioria mulheres com faixa etária acima de 60 anos (LEÃO, BARROS, KOIFAM, 2010; NETO et al, 2016; VIEIRA, PEIXOTO, SILVEIRA, 2014; LAKKA, 2002). Além disso, pesquisadores já identificaram a relação entre estresse e síndrome metabólica e, também, associação entre o estresse, hipertensão arterial e obesidade (MARMOT, BRUNNER, 2005; ALVES et al., 2004).

Com isso, considera-se importante conhecer o impacto que o estresse apresenta em um organismo metabolicamente desequilibrado, como ocorre em um sistema acometido pela obesidade. Sendo assim, questiona-se: qual é o efeito do estresse no metabolismo de ratos submetidos ao modelo de dieta hiperlipídica?

1.1 Obesidade

A obesidade, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é definida por um acúmulo anormal ou excessivo de gordura capaz de impactar negativamente a saúde do indivíduo, podendo ser diagnosticada pelo cálculo de índice de massa corporal (IMC) e, estratificar o agravo da doença, também, de acordo com o seu resultado, conforme mostra a tabela 1 (Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 2009). O IMC é o resultado entre a razão do peso em quilogramas pelo quadrado da altura em metros ($IMC = \text{peso}/(\text{altura})^2$), sendo de fácil e ampla utilização, apesar de não estabelecer informações sobre a composição e distribuição da gordura corporal (YAO et al., 2002).

Tabela 1. Classificação de peso pelo IMC adaptada das Diretrizes Brasileiras de Obesidade (2009).

CLASSIFICAÇÃO	IMC (Kg/m²)	RISCO DE COMORBIDADES
BAIXO PESO	< 18,5	Baixo
PESO NORMAL	18,5-24,9	Médio
SOBREPESO	≥ 25	-
PRÉ-OBESO	25,0 a 29,9	Aumentado
OBESO I	30,0 a 34,9	Moderado
OBESO II	35,0 a 39,9	Grave
OBESO III	≥ 40,0	Muito grave

Fonte: Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 2009.

Além disso, considera-se que seja a principal doença crônica não transmissível, que se encontra em diversos países do mundo, gerando um maior risco para doenças metabólicas, cardíacas e neurológicas e, tornando-se, um problema de saúde pública (ROBERTS et al, 2018). No Brasil estima-se que cerca de 32% da população adulta possua algum nível de sobrepeso ou obesidade, sendo que 25% destes apresentam uma condição grave da doença (OMS, 2010). Segundo Monteiro, Conde e Popkin (2001) os países com maiores índices de prevalência de obesidade são os que apresentam um maior grau de pobreza e menor nível de escolaridade, visto que essas condições viabilizam o maior consumo de alimentos de grande densidade energética e maior palatabilidade, compostas basicamente de carboidratos e gorduras, pelo seu baixo custo (DREWNOWSKI, SPECTER, 2004).

O desenvolvimento da obesidade é o resultado do desequilíbrio progressivo do balanço energético, sendo consequência da maior ingesta de energia que o gasto dela, resultando no armazenamento excedente em forma de gordura no organismo (RUTTERS et al, 2012). Assim, os principais locais de deposição desta gordura variam conforme o sexo do indivíduo, tendo seu maior armazenamento nos quadris e nas coxas nas mulheres (obesidade gínóide) e na região abdominal nos homens (obesidade andróide), sendo que a obesidade andróide é mais comumente associada ao desenvolvimento de doenças secundárias, visto a proximidade anatômica dessa gordura ao sistema porta hepático, podendo, então levar a uma aceleração do desenvolvimento da esteatose hepática (HELPERN, RODRIGUES, COSTA, 2004; MONTEIRO, CONDE, POPKIN, 2001).

Com isso, atualmente, sabe-se que o tecido adiposo além de ter como função o armazenamento de energia, também, atua como órgão endócrino, produzindo substâncias que agem de forma sistêmica no organismo. O principal hormônio secretado pelo tecido adiposo é a leptina, substância que atua iniciando uma cascata de sinalização celular nos receptores expressos no hipotálamo que controlam o apetite, fazendo com que o indivíduo sintase saciado e pare de ingerir alimentos (AGUIAR, MANINI, 2013). Além disso, esse hormônio é liberado em correlação direta com a quantidade de gordura armazenada, ou seja, quanto mais tecido adiposo o indivíduo apresenta maior é a sua liberação, porém quanto maior for a circulação desse hormônio na corrente sanguínea, menor é o efeito de saciedade produzida pelo SNC. Ademais, o excesso desse tecido faz com que haja a produção de proteínas inflamatórias que, também, bloqueiam esse sinal, impedindo o controle da saciedade (HELPERN, RODRIGUES, COSTA, 2004).

Além da leptina, a insulina, também liberada em quantidade proporcional ao tecido adiposo no organismo, é um importante coadjuvante na regulação do apetite. Produzida e secretada pelas células β pancreáticas, esse hormônio atua de forma anabólica, fazendo com que haja aumento da captação de glicose pelas células do corpo e, gerando uma diminuição da glicose circulante, aumentando, então o apetite. Ademais, a insulina também age na secreção do hormônio peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1), que aumenta o tempo do esvaziamento gástrico, criando uma sensação de saciedade prolongada para o indivíduo (HELPERN, RODRIGUES, COSTA, 2004).

Podemos observar que a obesidade se estende além dos hábitos alimentares, gerando prejuízo fisiológico ao organismo e repercutindo de forma negativa em fatores hormonais, metabólicos e emocionais. Além disso, o estudo da obesidade e da ingesta de alimentos

altamente calóricos, mostra-se necessário frente ao cenário atual do Mundo, em que grande parte da população apresenta, pelo menos, sobrepeso.

1.2 Síndrome Metabólica

A síndrome metabólica é discutida desde os anos 80, quando o cientista Gerald Reaven descreveu pela primeira vez a associação do desenvolvimento da resistência à insulina com a obesidade, hipertensão arterial e dislipidemia, associando essas alterações fisiopatológicas com a evolução de doenças cardiovasculares (REAVEN, 1985; REAVEN, 1993; FREITAS et al., 2008).

Atualmente, no Brasil, a Sociedade Brasileira de Cardiologia interpreta que um indivíduo pode ser diagnosticado com síndrome metabólica quando há presença de três ou cinco dos seguintes componentes: triglicerídeos maior ou igual a 150 mg/dL; HDL-colesterol menor que 40 mg/dL para homens e menor que 50 mg/dL para as mulheres; pressão arterial maior ou igual a 130/85 mmHg; circunferência abdominal maior que 102 cm para homens e menor que 88 cm para as mulheres e glicose de jejum maior ou igual à 110 mg/dL (NCEP-ATP III, 2005; FREITAS et al, 2008). Foi evidenciado em estudos que a soma destes fatores aumenta significativamente a ocorrência de doenças cardiovasculares, podendo elevar a taxa de mortalidade em até 2,5 vezes em comparação a indivíduos sem a síndrome (LAKKA et al, 2002).

Ademais, existem poucos estudos populacionais indicando a prevalência da SM, consequência da diversidade de fatores causais da doença, como raça, etnia, sexo e idade, acarretando na dificuldade de comparação entre diferentes populações (FRANCO, 2009). Um trabalho realizado em Cuiabá-MT, com 120 indivíduos, constatou uma prevalência de SM de 70,8%, com predomínio entre as mulheres e sem diferenças entre adultos e idosos (FRANCO, 2009). Já em um estudo transversal realizado na cidade de Salvador, com um subgrupo populacional de 1439 adultos, verificou-se a prevalência de SM em 19% dos indivíduos (BARBOSA, 2006). Além disso, Ramires et al (2018) realizou uma análise secundária da Pesquisa Nacional de Saúde de 2013, com representatividade nacional da população adulta brasileira, com uma amostra total de 59.402 pessoas, constatando prevalência de 8,9% de SM na amostra populacional.

Ainda que a fisiopatologia da SM não seja bem compreendida, sabe-se que o estilo de vida e os hábitos alimentares dos indivíduos impactam no desenvolvimento desta comorbidade. Sendo assim, a inatividade física e o consumo de dietas ricas em gorduras

aumentam o depósito da gordura abdominal e, progressivamente, o desenvolvimento da resistência insulínica (KAUR, 2014).

O excesso de tecido adiposo faz com que haja a liberação constante de ácidos graxos livres (AGL) no organismo, fazendo com que sua presença nos tecidos resulte em mudanças no metabolismo do corpo. No pâncreas, por exemplo, a alta exposição das células β -pancreáticas aos AGL pode gerar diminuição da sua função, causando, por consequência, uma redução da liberação de insulina no organismo, podendo levar ao desenvolvimento do *Diabetes mellitus* tipo II (ABBASI et al., 2002; KAUR, 2014; SIRTORI et al., 2017). Desta forma, verifica-se que a obesidade pode ser considerada o principal fator para o desenvolvimento da SM, por desencadear alterações nos níveis séricos de lipídeos e gerar a resistência insulínica (VON DENTZ, 2018).

Com isso, observa-se que o desenvolvimento da síndrome metabólica está diretamente relacionado com a obesidade, pois o tecido adiposo, além de ser uma reserva de gordura, também atua como um órgão endócrino, realizando a liberação de metabólitos, como as adipocinas, que podem regular o metabolismo energético, a coagulação sanguínea e as respostas inflamatórias, de forma a acelerar o surgimento de doenças cardiovasculares (KERSHAW, FLIER, 2004; KAUR, 2014; SIRTORI et al., 2017; VON DENTZ, 2018).

1.3 Estresse

Selye (1956) definiu pela primeira vez estresse como um conjunto de reações sistêmicas e não específicas que ocorrem quando o organismo está exposto a algum agente agressor. Essa reação ficou conhecida como “Síndrome da Adaptação Geral”, em que o corpo desenvolve um conjunto de respostas que podem progredir em três fases: 1. reação de alarme, no qual o corpo reconhece o estressor e ativa o sistema nervoso autônomo; 2. fase de resistência, que ocorre horas após a exposição e gera a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal; e 3. fase de exaustão, na qual o corpo desenvolve uma patologia associada à condição estressante (FIGUEIRAS, HIPPERT, 2002).

Segundo Pinheiro e Estarque (2000), o estresse pode ser definido como “um conjunto de reações orgânicas e psíquicas de aclimatação que o organismo apresenta quando é exposto a qualquer estímulo que excite, irrite, amedronte ou o faça muito feliz”. Já, para Chiavenato (1999), “estresse é um conjunto de reações físicas, químicas e mentais de uma pessoa a estímulos ou estressores no ambiente”.

Diariamente, nos deparamos no contexto hospitalar com pacientes em situação de estresse, por consequência da mudança de ambiente, isolamento social e pelo enfrentamento e

estado de saúde deficiente e, por outro lado, também observamos profissionais da saúde com uma alta demanda psicológica ocupacional e sobrecarga de trabalho, gerando o estresse físico e psicológico (GARBARINO, MAGNAVITA, 2015; RIBEIRO et al., 2015; HERDMAN et al, 2015). Com isso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) trata o estresse como uma epidemia global e estima que cerca de 35% dos trabalhadores ocupados tenham algum tipo de transtorno mental relacionado ao estresse agudo ou crônico (PANIZZON, LUZ, FENSTERSEIFER, 2008; JACQUES, 2004).

A resposta do organismo a fatores estressores ocorre por meio de dois mecanismos fisiológicos: pelo sistema nervoso autônomo (SNA) e pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, com ações complementares disseminadas por todo o organismo. O SNA é responsável pela resposta imediata ao agente agressor, em que ocorre a liberação de adrenalina pela medula da glândula suprarrenal e noradrenalina pelas fibras ganglionares para a corrente sanguínea, gerando aumento da frequência cardíaca, respiratória e da pressão arterial, contração do baço, liberação de glicose pelo fígado, redistribuição sanguínea e dilatação das pupilas (AIRES, 2012; SANTOS, SANTOS, 2005; HALL, GUYTON, 2017).

Já o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal altera os níveis de glicocorticóides, como o aumento do cortisol e a diminuição da adrenalina, na circulação sanguínea. A liberação desses hormônios ocorre na fase de resistência, quando o corpo já se aclimatou à presença do agente estressante, o que pode ocorrer horas ou dias após a exposição.

Sendo assim, a liberação do cortisol se dá na zona fasciculada da glândula adrenal e sua produção ocorre quando há estímulo do hormônio adrenocorticotrófico hipofisário (ACTH), que por sua vez é regulado pelo hormônio regulador de corticotrofina (CRH) produzido pelos neurônios paraventriculares do hipotálamo (conforme figura 1). Seu ciclo de liberação e inibição ocorre, basicamente, pelo ritmo circadiano próprio de cada indivíduo, sendo que a duração de horas-luz, ciclo de alimentação, horas de sono, estresse, entre outros podem afetar sua liberação. Normalmente, a produção de cortisol é maior pela manhã, com níveis menores de circulação no período da tarde e ao anoitecer e, aumentando novamente durante o sono (GUYTON, 2017; AYALA, 2002).

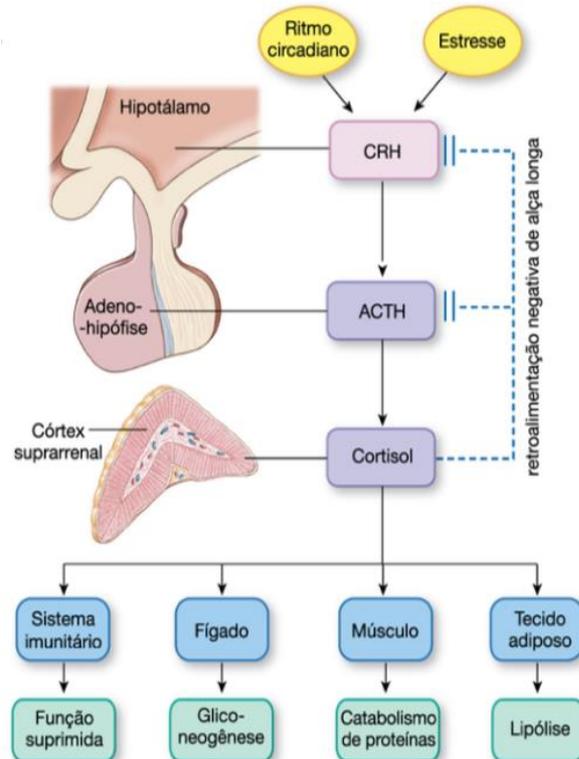


Figura 1. Exemplo da regulação da liberação de cortisol pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (CONSTANZO, 2014).

A atuação desse hormônio é sistêmica e, em um organismo em desequilíbrio, o aumento do cortisol pode ter repercussões no fígado, aumentando a gliconeogênese; no tecido ósseo gerando catabolismo; nos músculos causando proteólise e levando a um quadro de fraqueza e mialgia; no tecido adiposo, promovendo lipólise e aumentando a quantidade de triglicerídeos e LDL circulantes e um aumento da deposição de gordura nas vísceras; nos tecidos linfóides causando efeitos imunossupressores; no aparelho digestório aumentando a motilidade gastrointestinal e, conseqüentemente, o aumento do apetite; e no sistema nervoso levando a falha e prejuízo da memória (SILVERTHORN, 2017; ANDREWS, WALKER, 1999; KOEPPEN, STANTON, 2009; SOARES, ALVES, 2006; ROSA, ALBIOL, SALVADOR, 2009; REIS et al, 2007; AIRES, 2012; SANTOS, SANTOS, 2005; HALL, GUYTON, 2017).

Além disso, segundo Adam e Epel (2007) a exposição ao estresse crônico, tanto em estudos com humanos quanto em animais, pode levar ao aumento da ingestão de alimentos altamente palatáveis e, conseqüentemente elevar a deposição de gordura, em decorrência da ativação do sistema de recompensa no cérebro pela alta exposição do organismo ao cortisol

circulante. Porém, o aumento da ingesta alimentar durante o estresse pode depender de alguns fatores como o tipo de fator estressante, o sexo do indivíduo, o sobrepeso e a dieta consumida no dia-a-dia (GREENO, WING, 1994).

Diante do exposto, verifica-se que o estresse apresenta um impacto significativo em alterações no metabolismo do organismo, podendo influenciar de forma negativa o desenvolvimento e/ou agravamento da obesidade, visto que indivíduos acometidos por essa patologia já apresentam fatores predisponentes de alterações em seu metabolismo. Além disso, pesquisadores já mostraram associação entre o estresse, hipertensão arterial e obesidade e, também, entre estresse e síndrome metabólica (MARMOT, BRUNNER, 2005; ALVES et al., 2004).

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar os efeitos do estresse sobre parâmetros metabólicos em ratos Wistar submetidos ao modelo de dieta hiperlipídica.

2.2. Objetivos específicos

Identificar os efeitos da dieta hiperlipídica e do estresse sobre parâmetros morfológicos;

Verificar os efeitos da dieta hiperlipídica e do estresse sobre a bioquímica de parâmetros sorológicos;

Analisar os efeitos da dieta hiperlipídica e do estresse sobre as reservas de carboidratos e de lipídios no fígado;

Avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica e do estresse sobre as reservas de lipídios na gordura visceral e retro peritoneal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento do Estudo

Trata-se de um estudo experimental, o qual é definido por “determinar um objeto de estudo, selecionar as variáveis que seriam capazes de influenciá-lo, definir as formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz no objeto”, sendo considerada a forma mais controlada de pesquisa no meio científico (GIL, 2008).

O estudo teve abordagem metodológica quantitativa, o qual enfatiza o raciocínio dedutivo, a regra da lógica e variáveis mensuráveis de experimentos, em que se adota estratégias objetivas e rigorosas para gerar o conhecimento (LACERDA, COSTENARO, 2016).

3.2 Campo

Todas as etapas necessárias para a realização da pesquisa aconteceram no Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC), localizado no Instituto de Ciências Básicas de Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), na cidade de Porto Alegre. O projeto apresentou viabilidade de concretização pela disponibilidade de uso das dependências do LaMEC para as análises bioquímicas e manutenção dos animais no biotério da Farmacologia do ICBS.

3.3 Animais

Para a realização do estudo foram utilizados 32 ratos Wistar da espécie *Rattus norvegicus* machos, adultos com 30 dias de idade. Todos os animais foram cedidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os ratos foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Farmacologia da UFRGS, localizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), sob condições padrões: ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada (21°C), umidade relativa do ar de 70%, ração e água à vontade. As caixas de polipropileno utilizadas tinham como medidas 340 mm de largura x 410 mm de comprimento x 200 mm de altura, sendo que ocorreram três trocas de caixas por semana, com aproximadamente 03 cm de cama de maravalha, previamente autoclavada. A lotação de cada caixa foi de 4 animais no grupo controle sem dieta hiperlipídica, 3 animais no grupo que recebeu dieta hiperlipídica e de 1 animal para o grupo de ratos em isolamento social. Os

animais receberam ração comercial para roedores (Nuvilab CR1®) ou ração modificada durante todo o período experimental.

Os pesquisadores envolvidos no manuseio dos animais possuíam treinamento para este fim, sendo que, também, eram treinados para identificar o desconforto/sofrimento de animais de laboratório pelas características físicas e comportamentais, visando preservar, principalmente, o seu bem-estar.

As instalações utilizadas apresentam-se em conformidade com a Lei Arouca nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 e apresentam credenciamento e acompanhamento do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.4 Dieta hiperlipídica

Após o período de aclimação, os animais foram divididos, aleatoriamente, em dois grupos: ratos controle (CTR) e ratos submetidos ao modelo de ingesta de dieta hiperlipídica (DHL). Assim, para a indução de obesidade e SM, os animais do grupo DHL receberam dieta hiperlipídica artesanal preparada conforme tabela 2, semanalmente, no próprio laboratório, sendo ela composta por 508,71 cal/100g (49% carboidrato, 8% de proteína e 31% de lipídios) (VON DENTZ, 2018), por um período de 48 dias, sendo que após 30 dias foi realizada a dosagem de triglicerídeos plasmáticos e da glicemia. Já, os animais controles receberam ração padrão Nuvilab CR1®, composta por 347,24 cal/100g, sendo 65% de carboidratos, 12% de proteína e 5% de gordura (VON DENTZ, 2018).

Tabela 2. Composição da dieta hiperlipídica, composição calórica referente a preparação de 2Kg de dieta.

INGREDIENTE	QUANTIDADE
Ração padrão moída	750g
Banha	400g
Margarina	200g
Manteiga	100g
Sal	8g
Espessante (CMC)	20g
Amido de milho	50g
Caseína	150g
Açúcar	350g

Fonte: VON DENTZ, 2018.

A dieta hiperlipídica foi realizada até o final do experimento, assim como os animais controle receberam ração padrão ao longo de todo o período experimental. Segundo a diretiva europeia 86/609/EEC, que classifica os graus de severidade dos procedimentos laboratoriais com animais, caracteriza este procedimento como abaixo do limiar inferior de dor, por não levar a sensação de dor.

3.5 Estresse dos animais

Após o período de indução de obesidade e provável síndrome metabólica, os animais foram novamente divididos, formando, então, quatro grupos distintos: ratos controle sem estresse (CTR), ratos com dieta hiperlipídica e sem estresse (DHL), controles com estresse (CTR-estressados) e ratos com dieta hiperlipídica e submetidos ao estresse (DHL-estressados), como ilustrado na figura 2, sendo que cada grupo continha um total de oito roedores.

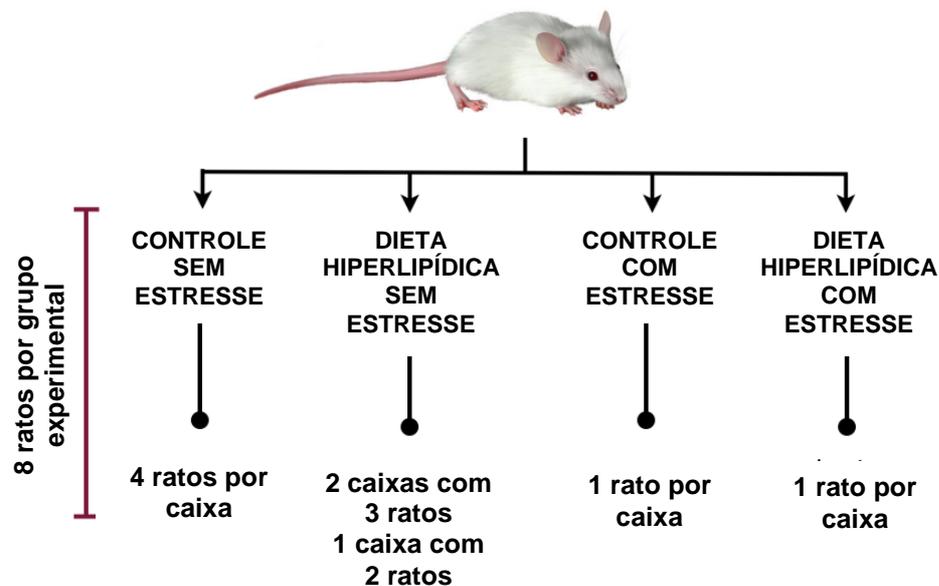


Figura 2. Desenho de método experimental.

Os animais que foram submetidos ao modelo de estresse foram retirados de seus respectivos alojamentos, onde havia de quatro a três animais por caixa, sendo colocados isoladamente em novas habitações, totalizando um animal por alojamento. O isolamento ocorreu em um período de 18 dias, sendo que durante toda essa etapa foram realizadas avaliações para identificar se houve alterações comportamentais ou de bem-estar. Esse experimento foi categorizado como um procedimento como abaixo do limiar inferior de dor,

por não levar a sensação de dor, conforme diretiva europeia 86/609/EEC. Sendo assim, ilustra-se na Figura 3 o experimento, levando em consideração as duas etapas do experimento.

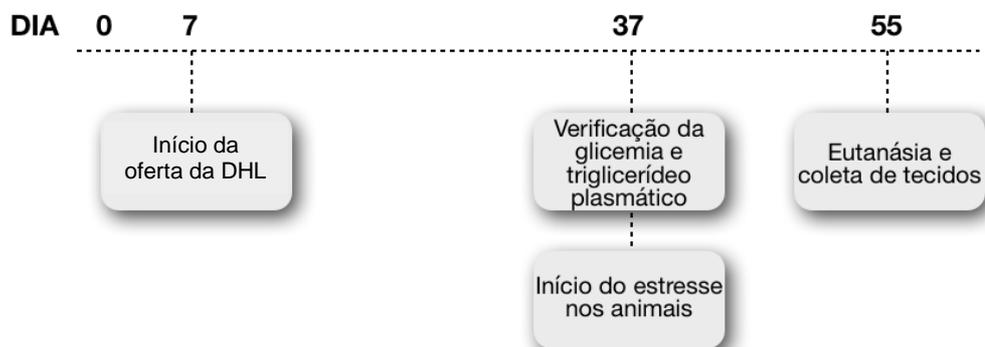


Figura 3. Desenho do período experimental com as diferentes atividades executadas.

3.6 Consumo de ração

Semanalmente, realizou-se a pesagem da ração oferecida para os animais para posterior cálculo de consumo médio em um período de 24 horas. Para isso, a pesagem aconteceu por seis semanas, todas as quartas e quintas feiras, sendo que, era ofertado uma quantidade proporcional de alimento ao número de ratos por caixa, em cada alojamento. Para o cálculo médio de consumo, subtraiu-se a pesagem do primeiro dia pelo segundo e, após, foi dividido pelo número de ratos do alojamento.

3.7 Eutanásia

Os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina para roedores após 48 dias de experimento, sem anestesia, para obtenção do sangue total e dos tecidos para análise. O método escolhido baseia-se em ser um meio eficaz que produz mínimas alterações fisiológicas nos tecidos. Considerando a necessidade de obtenção de sangue troncular para realização de análises bioquímicas, nenhum anestésico ou substância injetável foi utilizada. A morte dos animais sob anestesia, apesar de desejável, é incompatível com nossos protocolos, pois todos os anestésicos comumente utilizados em estudos com animais levam a uma intensa hiperglicemia em roedores, o que se torna um viés para o estudo (BROWN et al., 2005; SAHA *et al.*, 2005).

O procedimento de eutanásia ocorreu em ambiente exclusivo, com exaustão e higienização completa de todo o material entre a morte de um animal e outro. Ainda, os

procedimentos estão conforme o guia de eutanásia da associação americana de medicina veterinária (AVMA, 2013).

Segundo a diretiva europeia 86/609/EEC, que classifica os graus de severidade dos procedimentos laboratoriais com animais, o procedimento de eutanásia é definido como sem recuperação.

3.8 Coleta de órgãos/tecidos

Logo após a eutanásia coletou-se sangue, rins, suprarrenais, tecido adiposo retroperitoneal e visceral, fígado, testículos e coração. As técnicas utilizadas estão listadas a seguir.

Sangue: perfil bioquímico dos animais pela dosagem das concentrações séricas de colesterol total, triglicerídeos e glicose;

Rins: relação tecido/peso corporal total;

Suprarrenais: relação tecido/peso corporal total;

Tecido adiposo retroperitoneal e visceral: relação tecido/peso corporal total e concentração de triglicerídeos;

Fígado: relação tecido/peso corporal total e concentração de glicogênio e triglicerídeos;

Testículos: relação tecido/peso corporal total;

Coração: relação tecido/peso corporal total.

Além disso, os roedores foram pesados uma vez a cada de 15 dias na primeira etapa do experimento e, uma vez por semana após o início do estresse, para avaliação de ganho de peso e, posteriormente, para análise quantitativa dos dados coletados.

O tratamento e manipulação realizadas nos animais ocorreram somente pela autora do projeto. Já os processos relacionados à eutanásia, coleta de tecidos e sangue aconteceu com o auxílio de colaboradores do LaMEC. As análises dos parâmetros morfológicos, bioquímicos e metabólicos foi realizado pela autora do projeto, pelo uso de protocolos embasados na literatura científica e, já utilizados no LaMEC.

3.9 Técnicas Laboratoriais

Neste tópico estão descritas as técnicas, previamente protocoladas no laboratório, que foram utilizadas nos tecidos coletados para a avaliação do metabolismo e de parâmetros bioquímicos.

3.9.1 Morfometria: relação tecido/peso corporal total

Os tecidos dos animais foram retirados, secados e pesados para a determinação da relação entre o peso do órgão/tecido e o peso do animal. Os índices teciduais foram calculados conforme a fórmula (peso total do substrato/peso total do animal) x 100 (TAYLOR; PHILLIPS, 1996).

3.9.2 Dosagens séricas

O sangue foi coletado em tubo de coleta contendo gel separador e ativador de coágulo (Vacutube®) e, após centrifugação para separação do soro, mediu-se os parâmetros pelo uso de kits enzimáticos comerciais: Glicose Liquiform, Triglicérides Liquiform e Colesterol Liquiform (LABTEST Diagnóstica, Brasil), com leitura espectrofotométrica de 505 nm, 505 nm e 500 nm, respectivamente.

3.9.3 Concentração de Glicogênio

O fígado, tecido destinado a essa técnica, foi previamente pesado e, após colocado em tubos falcon contendo 2 mL de KOH 30% e, então, fervido em banho de água a 100°C, durante uma hora. Após, adicionou-se aos tubos 2 mL de etanol 96°G e 50 µL de Na₂SO₄ 35% para a precipitação do glicogênio (VAN HANDEL, 1965).

As amostras, foram centrifugadas a 3000xg por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em água destilada. Para a hidrólise do glicogênio, acrescentou-se 300 µL de HCl 4N e as amostras foram fervidas novamente em banho de água a 100°C, durante uma hora. Após, foi acrescentado aos tubos 300 µL de Na₂CO₃ 2M para reestabelecimento do pH e, a concentração de glicose das amostras pode ser determinada pelo kit enzimático comercial Glicose Liquiform (LABTEST Diagnóstica, Brasil), com leitura espectrofotométrica de 505 nm (VAN HANDEL, 1965).

3.9.4 Concentração de triglicerídeos

As amostras do tecido foram homogeneizadas em salina 0,9% na proporção 1:10 e, a concentração foi medida pelo kit enzimático comercial Triglicérides Liquiform (LABTEST Diagnóstica, Brasil), com leitura espectrofotométrica de 505 nm (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom, UK).

3.10 Cálculo do número de animais

O cálculo do n amostral teve como objetivo determinar o número mínimo de animais necessários para a observação dos desfechos. Com isso, para o cálculo, foi utilizado o *Computer Programs for Epidemiologists* (PEPI – versão 4,04X), para isso foi considerado probabilidade de erro $\alpha = 0,05$ e poder do teste estatístico igual a 0,80. Também, utilizou-se como base para cálculo, os resultados de protocolos experimentais do laboratório e de outros grupos de pesquisa que utilizaram protocolos semelhantes (Pedroso *et al.*, 2010; Resende *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2011). Sendo assim, o cálculo amostral estimou um n total de 32 animais para o experimento em questão.

3.11 Análise dos dados

Com base nos resultados das análises calculou-se as médias e os desvios padrões da média para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. A normalidade dos resultados foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk.

Após, para a comparação de dados paramétricos entre os grupos foi aplicado análise de variância (ANOVA) de duas vias, complementada com o teste de Tukey. Para dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis ou teste de Friedman, seguido do teste de Dunn. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise apresentou $p < 0,05$. Para o tratamento estatístico foi utilizado o software GraphPad Prism, versão 8.0.

3.12 Aspectos éticos

Essa pesquisa foi aprovada pela Comissão de Pesquisa de Enfermagem da Universidade Federal do Rio Grande do Sul: projeto n°. 36788; pela Comissão de Pesquisa de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul: projeto n°. 37345 e posteriormente, pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA-UFRGS).

4 RESULTADOS

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos durante o experimento, juntamente com as amostras que resultaram em diferenças significativas entre os grupos.

4.1 Consumo de dieta semanal

Durante todo o experimento, pesou-se, semanalmente a quantidade de alimento consumido dentro de 24h das caixas dos animais para determinar os efeitos do modelo e do estresse propostos.

4.1.1 Consumo de dieta

A comparação dos resultados deu-se através da análise de dados dentro do mesmo grupo ao longo do tempo, conforme a Tabela 3. Com isso, segundo as comparações no grupo controle (CTR) inferiu-se que, era esperado que houvesse um aumento significativo do consumo de alimento após transcorridas cinco semanas de acompanhamento. Porém, os ratos expostos ao modelo de dieta (DHL) tiveram acréscimo significativo da ingesta de ração após, apenas, quatro semanas recebendo o alimento calórico.

Já os animais estressados, que recebiam dieta padrão (CTR-estressados), não tiveram diferenças significativas no consumo do alimento ao longo do experimento. Ademais, no grupo DHL-estressado houve aumento significativo do consumo entre a primeira semana e a terceira, indicando aceitação da dieta modificada e, também, houve elevação na ingesta após duas semanas de isolamento.

Tabela 3. Consumo da dieta (g) ao longo do período experimental.

	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	ANOVA
CTR	24,63 (24/25) ^a	28,2 (28/28) ^{a, b}	28,9 (28/29) ^{a, b}	29,5 (27/31) ^{a, b}	34,1 (33/34) ^b	33,6 (33/34) _{a, b}	p < 0.0001
CTR- estressado	25,5 (24/26)	28,0 (16/40)	28,4 (27/29)	31,0 (28/33)	22,5 (20/27)	31,0 (27/47)	p > 0,05
DHL	14,6 (13/17) ^a	14,3 (12/15) _{a, b}	17,0 (17/18) ^{a, b}	12,7 (10/15) ^b	25,3 (21/28) _{a, b}	18,3 (17/20) _{a, b}	p < 0.0001
DHL- estressado	13,6 (13/13) ^a	15,6 (15/16) _{a, b, c}	17,3 (15/18) ^b	15,5 (12/17) _{a, b, c}	16,0 (13/16) _{a, b, c}	21,0 (17/21) _{a, c}	p < 0.0001

Os dados não paramétricos foram avaliados por teste de Friedman seguido por teste de Dunn e são apresentados como mediana (percentil 25/percentil 75), sendo que as fontes de variação estão representadas através da diferença entre as letras (a), (b) e (c). Considera-se diferença significativa quando $p < 0.05$. $n=8$ por grupo. **S** representa as semanas avaliadas.

4.2 Peso Corporal (PC)

Para verificação do efeito da dieta hiperlipídica e do estresse sobre o peso dos animais, verificou-se essa variável durante o experimento a cada quinze dias antes do início do período de isolamento e, posteriormente, por pesagens semanais. Com isso, foi possível calcular o ganho total de peso dos animais, subtraindo-se o peso final do peso inicial, dentro de cada grupo.

Constatou-se então, como mostra na figura 4, que o PC dos animais do modelo de dieta ($p < 0,03$) e da interação dieta-estresse ($p < 0,0001$) foi significativamente mais baixo quando comparados com o grupo CTR-estressado, dessa forma compreende-se que a dieta hiperlipídica não gera alteração no ganho total do peso dos animais. Contudo, não houve diferença estatística quando combinado resultados dentro dos mesmos grupos, inferindo que o peso corporal total, também, não está relacionado com o isolamento dos animais.

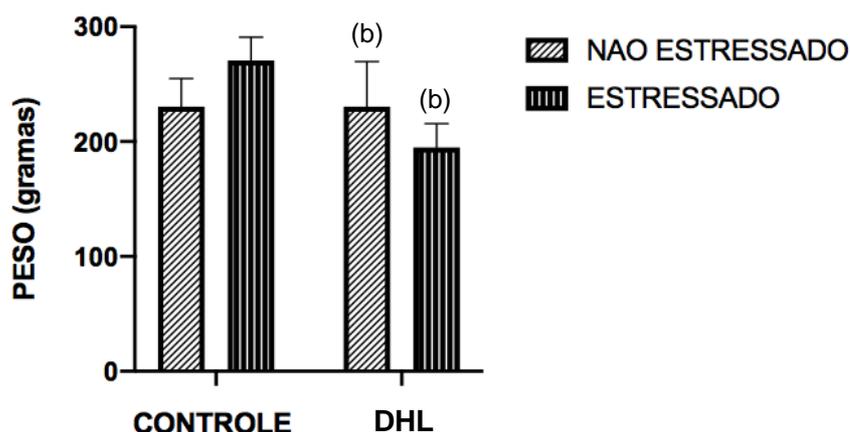


Figura 4. Efeito do modelo de dieta hiperlipídica sobre o ganho total de peso em ratos submetidos ao estresse de isolamento. Os dados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguido de Tukey e são apresentados como média \pm desvio padrão, sendo (b) CTR-Estressado. Considera-se diferença significativa quando $p < 0,05$. $n=8$ por grupo.

4.3 Parâmetros Morfométricos

Na Tabela 4 podemos observar os dados morfométricos coletados logo após a eutanásia. Para isso, utilizou-se o peso corporal total (PCT) de cada animal para calcular a sua relação com o peso dos tecidos coletados. Dessa forma, foi possível encontrar o índice entre o peso de cada um dos tecidos pelo peso corporal total do roedor.

Com isso, no índice do tecido adiposo retroperitoneal (peso TAR/PCT) foi encontrada variação significativa entre o modelo de dieta e o grupo controle estressado ($p < 0,01$), demonstrando aumento da proporção tecido/peso total nos animais que receberam a dieta hiperlipídica. Já o índice tecido adiposo visceral (peso TAV/PCT), evidenciou um aumento significativo da proporção do peso do tecido dos grupos DHL e DHL-estressado quando comparados ao grupo CTR-estressados ($p < 0,02$ e $p < 0,007$, respectivamente), explicitando o impacto do consumo da dieta no tecido.

No tecido hepático (Tabela 4) nota-se que o estresse apresenta um impacto no tamanho do órgão, visto a diferença significativa entre o grupo CTR e CTR-estressado ($p < 0,01$), em que houve aumento da quantidade de tecido nos animais isolados. Ademais, há significância quando comparado o CTR-estressado com o grupo DHL e DHL-estressado ($p < 0,0009$ e $p < 0,02$, respectivamente), inferindo que o isolamento, novamente, gera a alteração na relação tecido/peso corporal.

No rim (Tabela 4) foi encontrada diferença estatística entre os grupos CTR e DHL ($p < 0,001$) e CTR-estressado e DHL ($p < 0,0002$), demonstrando que a ingesta da dieta calórica

resultou em uma diminuição do tecido renal dos animais. Não foi observado resultados significativos quando comparado animais controles e roedores estressados, concluindo que o isolamento não altera a quantidade de tecido no rim.

Ademais, no tecido cardíaco (Tabela 4) infere-se que a dieta hiperlipídica cause aumento do peso do coração, visto que verificou-se diferença significativa entre o grupo CTR e DHL ($p < 0,0001$), entre os animais DHL e CTR-estressados ($p < 0,01$) e, também entre os animais controle e DHL-estressados ($p < 0,04$). Por fim, no índice da glândula suprarrenal e dos testículos não foram encontradas diferenças significativas (Tabela 5).

Tabela 4. Efeito do estresse sob parâmetros morfométricos em ratos submetidos ao modelo de dieta hiperlipídica.

	CTR	CTR - Estressado	DHL	DHL - Estressado	ANOVA
Índice Adrenal	0,015 ± 0,0005	0,0153 ± 0,001	0,0128 ± 0,003	0,0148 ± 0,001	p > 0,05
Índice CORAÇÃO	0,25 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,30 ± 0,02 ^{a, b}	0,29 ± 0,01 ^a	# (p < 0,0001) * (p < 0,0011) & (p < 0,0440)
Índice FÍGADO	3,41 ± 0,25	3,70 ± 0,20 ^a	3,33 ± 0,09 ^b	3,44 ± 0,06 ^b	# (p < 0,0102) * (p < 0,0009) & (p < 0,0226)
Índice RIM	0,61 ± 0,02	0,62 ± 0,01	0,55 ± 0,03 ^{a, b}	0,59 ± 0,03	# (p < 0,0019) * (p < 0,0002)
Índice TAR	0,12 ± 0,03	0,10 ± 0,03	0,18 ± 0,07 ^b	0,165 ± 0,04	# (p < 0,0113)
Índice TAV	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01 ^b	0,087 ± 0,01 ^b	# (p < 0,0288) & (p < 0,0075)
Índice Testículos	0,99 ± 0,07	0,94 ± 0,05	0,99 ± 0,09	0,10 ± 0,09	p > 0,05

Os dados paramétricos foram avaliados por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Tukey, sendo as fontes de variação representadas por (#) modelo, (*) intervenção, (&) interação modelo e intervenção e (NS) variação não significativa. Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão, sendo (a) diferença em relação ao grupo CTR e (b) CTR-Estressado. São consideradas significativas as diferenças com $p \leq 0,05$. n=8 por grupo experimental.

4.4 Parâmetros Sorológicos

4.4.1. Glicose

O conhecimento da glicemia dos animais é de extrema importância para determinar se a alimentação com dieta hiperlipídica, ou se o estresse pode causar alterações em seus níveis, visto que, quando aumentado, pode ser considerado um indicativo de resistência insulínica, podendo acarretar no desenvolvimento da síndrome metabólica e, posteriormente, da diabetes mellitus tipo 2. A quantidade de glicose no soro dos animais foi medida em dois momentos;

no primeiro, antes do início da etapa de estresse, para verificação da resistência insulínica em decorrência da dieta hiperlipídica e, posteriormente entre os quatro grupos, levando também em consideração o estresse gerado nos animais.

No primeiro momento, como ilustrado na figura 5, o modelo mostrou-se ineficaz para o desenvolvimento da resistência insulínica após os trinta dias de tratamento, uma vez que não houve diferença significativa entre a glicemia do plasma do grupo controle e do grupo que recebia a DHL.

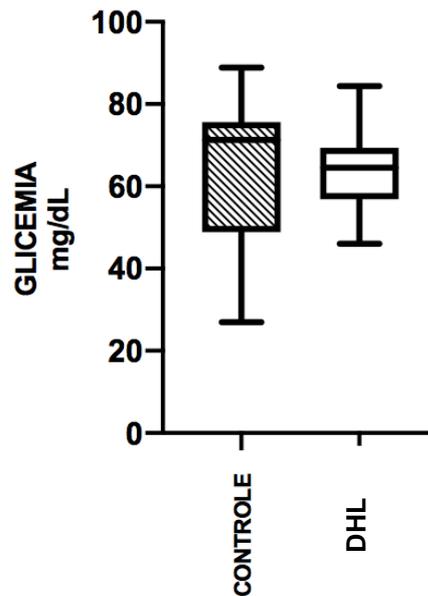


Figura 5. Efeito do modelo de dieta hiperlipídica sobre a glicemia plasmática em ratos. Os dados foram avaliados por teste T e são apresentados como média \pm desvio padrão. Considera-se diferença significativa quando $p < 0,05$. $n=8$ por grupo.

Já na segunda dosagem, após a indução do estresse (figura 6), observou-se aumento significativo da glicemia dos animais do grupo DHL-estressados em comparação aos animais controle ($p < 0,04$). Sendo assim, observou-se que somente o estresse, ou apenas a DHL, não são, sozinhos, suficientes para gerar alterações na glicemia durante o período proposto de experimentação, visto que houve necessidade da presença da mudança da dieta e do isolamento para possibilitar o aumento dos níveis de glicose.

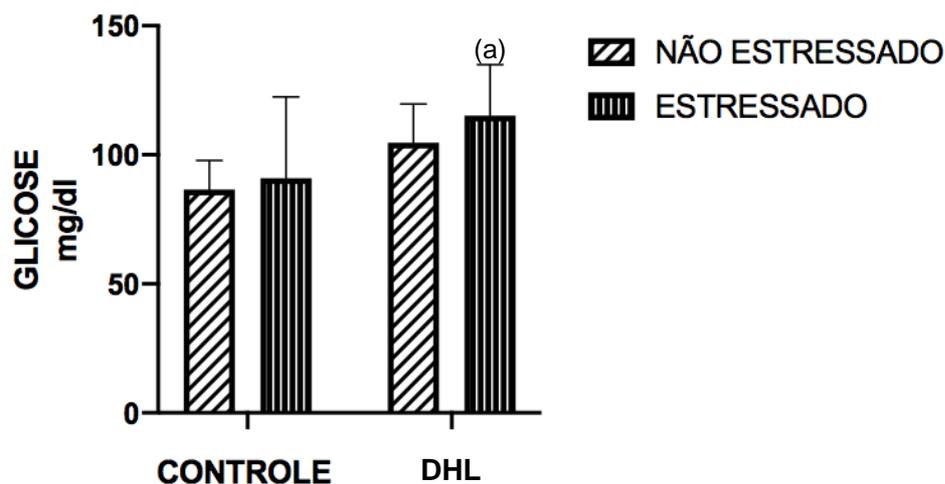


Figura 6. Efeito do modelo de dieta hiperlipídica sobre a glicemia plasmática em ratos submetidos ao estresse de isolamento. Os dados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguido por teste de Tukey e são apresentados como média \pm desvio padrão, sendo (a) diferença em relação ao grupo CTR. Considera-se diferença significativa quando $p < 0,05$. $n=8$ por grupo.

4.4.2 Triglicerídeos

Em decorrência do modelo de dieta com alto teor calórico em que os animais foram expostos, fez-se necessária a medida de triglicerídeos (TG) circulantes no organismo, posto que alimentos com uma grande quantidade de gordura tendem a fazer com que o valor desse parâmetro se altere. Sendo assim, como demonstra a figura 7, quando comparado o grupo controle ao grupo que consumia a dieta HL foi obtida uma elevação dos níveis de triglicerídeos plasmáticos ($p < 0,001$), demonstrando que a dieta foi responsável pelo aumento desse composto no organismo. Houve, também, diferença significativa quando relacionamos o grupo CTR-estressado com o DHL-estressado ($p < 0,01$), mostrando um aumento significativo dos níveis de TG, resultante, novamente, do consumo da dieta hiperlipídica. Além disso, essa mesma relação é observada entre o grupo CTR x DHL-estressado ($p < 0,02$) e CTR-estressado com o grupo DHL ($p < 0,001$). Não houve diferença estatística quando comparado resultados entre controle e intervenção, inferindo que o aumento dos triglicerídeos não apresentou relação com o isolamento dos animais.

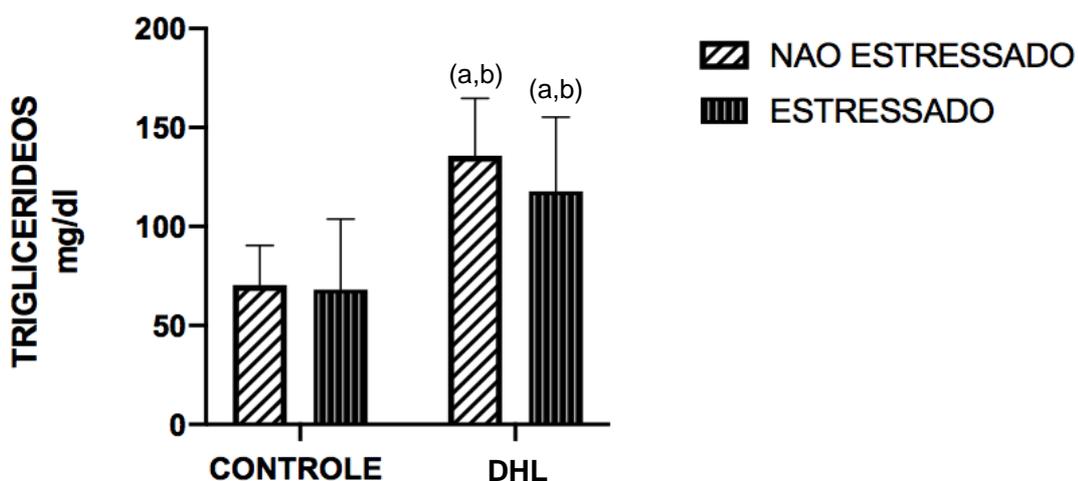


Figura 7. Efeito do modelo de dieta hiperlipídica sobre o triglicerídeo plasmático em ratos submetidos ao estresse de isolamento. Os dados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguido por teste de Tukey e são apresentados como média \pm desvio padrão, sendo (a) diferença em relação ao grupo CTR e (b) CTR-estressado. Considera-se diferença significativa quando $p < 0,05$. $n = 8$ por grupo.

4.4.3 Colesterol

O aumento do colesterol, assim como os triglicerídeos, está relacionado com o consumo de dietas ricas em gordura, sendo considerado um dos fatores determinantes para o desenvolvimento da síndrome metabólica. Sendo assim, como mostra a figura 8, foi encontrada diferença estatística entre o grupo CTR e DHL ($p < 0.001$), em que podemos perceber uma elevação significativa dos níveis do colesterol nos animais que ingeriram a dieta com alta teor calórico, inferindo que o modelo proposto é efetivo para o desenvolvimento do desequilíbrio desse parâmetro no organismo. Além disso, quando comparados os grupos CTR-estressado x DHL-estressado ($p < 0.005$); CTR x DHL-estressado ($p < 0.02$) e CTR-estressado com o grupo DHL ($p < 0.002$), observamos níveis de colesterol mais elevados nos grupos que ingeriram a dieta hiperlipídica, demonstrando novamente o efeito do modelo.

Ademais, não houve diferença estatística quando comparado resultados entre controle e intervenção, inferindo que o aumento do colesterol não apresenta relação com o isolamento dos animais.

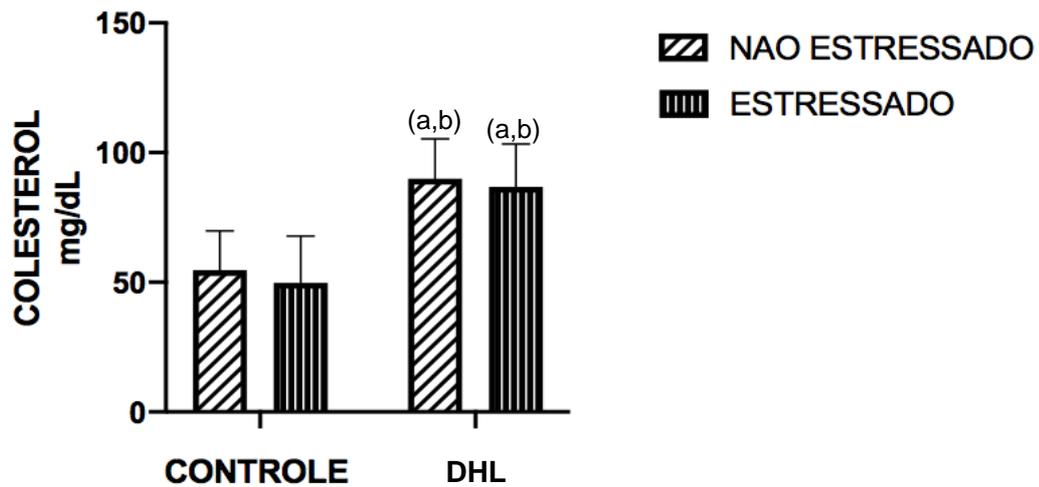


Figura 8. Efeito do modelo de dieta hiperlipídica sobre o colesterol plasmático em ratos submetidos ao estresse de isolamento. Os dados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguido por teste de Tukey e são apresentados como média \pm desvio padrão, sendo (a) diferença em relação ao grupo CTR e (b) CTR-estressado. Considera-se diferença significativa quando $p < 0,05$. $n=8$ por grupo.

4.6 Quantidade de triglicerídeos nos tecidos

Para verificação da quantidade de triglicerídeos nos tecidos, após a eutanásia foram coletados o fígado, o tecido adiposo retro peritoneal e o tecido adiposo visceral, tendo em vista a determinação da quantidade desse lipídio no órgão. Como mostra a Tabela 5, em ambos os tecidos adiposos não foi constatada alterações significativas entre nenhum dos grupos.

Tabela 5. Efeito do estresse nos triglicerídeos (TG) no tecido adiposo retroperitoneal (TAR), no tecido adiposo visceral (TAV) e no fígado (FIG) de ratos submetidos ao modelo de dieta hiperlipídica e estresse.

	CTR	CRT - Estressado	DHL	DHL - Estressado	ANOVA
TG TAR (mg/g)	0,47 ± 0,068	0,39 ± 0,11	0,39 ± 0,11	0,47 ± 0,07	p > 0,05
TG TAV (mg/g)	7,10 ± 1,67	6,65 ± 1,25	5,49 ± 1,15	6,66 ± 0,99	p > 0,05
TG FIG (mg/g)	4,32 (4,3/5,8)	5,52 (2,8/6,5)	12,55 (9,9/35,8) a, b	27,87 (8,6/61,2) a, b	p < 0,0002

Os dados paramétricos foram avaliados por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Tukey, sendo as fontes de variação representadas por (#) modelo, (*) intervenção, (&) interação modelo e intervenção e (NS) variação não significativa. Os dados não paramétricos foram submetidos a avaliação pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. A diferença entre as medianas foi destacada como presente (sim) ou ausente (não). Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão ou mediana (percentil 25/percentil 75), sendo (a) diferença em relação ao grupo CTR e (b) CTR-Estressado. São consideradas significativas as diferenças com $P \leq 0,05$. n=8 por grupo experimental.

Já no tecido hepático, como observamos na figura 9, infere-se que a dieta gere um aumento dos triglicerídeos no fígado pela presença de diferença estatística entre o grupo CTR e DHL ($p < 0,01$) e, também, entre os controles estressados com os roedores do grupo DHL-estressados ($p < 0,005$). Ademais, não houve diferença estatística quando comparado resultados entre controle e intervenção, inferindo que a elevação do TG no tecido hepático não apresenta relação com o isolamento dos animais.

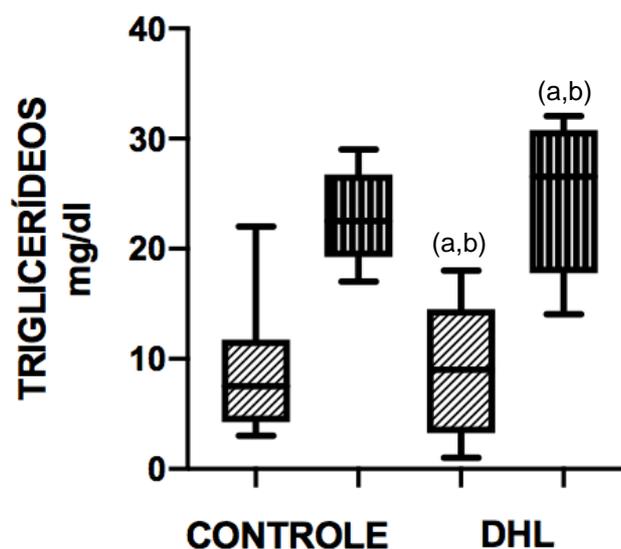


Figura 9. Efeito do modelo de dieta hiperlipídica sobre a quantidade de triglicerídeos no tecido hepático em ratos submetidos ao estresse de isolamento. Os dados foram avaliados por Kruskal-Willis seguido por teste de Dunn e são apresentados como média \pm desvio padrão, sendo (a) diferença em relação ao grupo CTR e (b) CTR-estressado. Considera-se diferença significativa quando $p < 0,05$. $n=8$ por grupo. Variação referente à intervenção no grupo (*).

4.7 Glicogênio no Tecido Hepático

O glicogênio é uma forma de armazenamento energético que pode ser encontrado, principalmente, no fígado e nos músculos, sendo assim, com o aumento de energia fornecida para os animais através de uma dieta com alto teor calórico, esperava-se uma diferença na quantidade de glicogênio (mg) do tecido hepático (g) nos grupos com intervenções. Com isso, como mostra a figura 10, foi observado um aumento significativo da quantidade desse polissacarídeo nos animais que receberam a DHL, fato constatado pela presença de diferença estatística entre o grupo controle e os animais expostos ao modelo de dieta ($p < 0,02$) e, também entre os grupos CTR-estressado e DHL-estressado ($p < 0,05$).

Além disso, o estresse dentro do grupo que recebia dieta, também, causou o aumento significativo dos níveis de glicogênio, alteração verificada pela diferença estatística do grupo DHL com o DHL-estressados ($p < 0,001$), demonstrando que o isolamento pode acarretar alterações no metabolismo da formação do glicogênio.

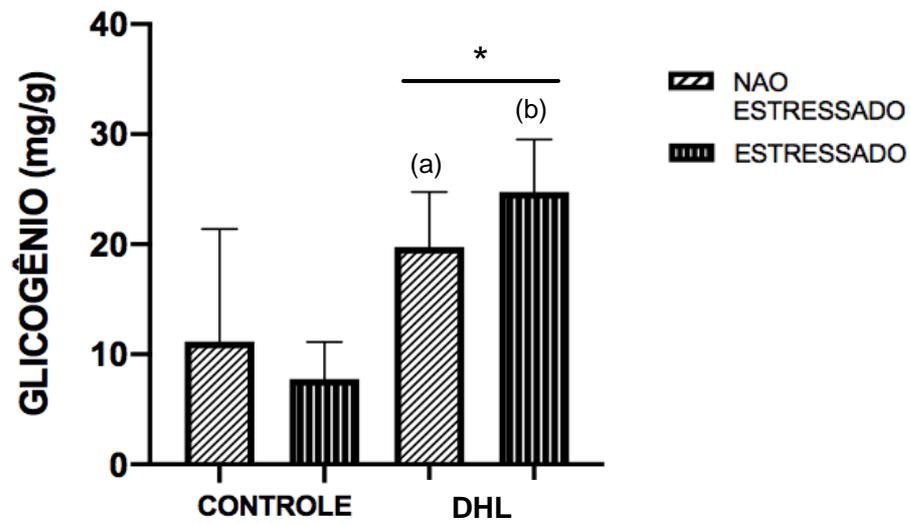


Figura 10. Efeito do modelo de dieta hiperlipídica sobre a quantidade de glicogênio no tecido hepático em ratos submetidos ao estresse de isolamento. Os dados foram avaliados por Kruskal-Willis seguido por teste de Dunn e são apresentados como média \pm desvio padrão, sendo (a) diferença em relação ao grupo CTR e (b) CTR-estressado. Considera-se diferença significativa quando $p < 0,05$. $n=8$ por grupo. Variação referente ao estresse dentro do grupo dieta DHL (*).

4 DISCUSSÃO

Os principais achados do presente trabalho consistiram em: (1) aumento da ingesta do alimento palatável e (2) elevação do consumo alimentar após duas semanas de estresse, porém (3) o peso corporal total dos animais não foi alterado com nenhuma das intervenções propostas. Entretanto, após o uso crônico da dieta hiperlipídica houve (4) maior acúmulo de gordura abdominal (retroperitoneal e visceral) e aumento do tecido cardíaco, além de (5) elevar os níveis de colesterol e triglicerídeos plasmáticos, assim como (6) aumentar a concentração de triglicerídeos e de glicogênio no tecido hepático e (7) devido ao estresse, elevar as reservas de glicogênio no fígado.

Com isso, compreende-se que, a relação entre o aumento ou diminuição do consumo de dieta e a formação de adiposidade esta associada com o tipo, a duração e a severidade do estresse ao qual organismo é exposto (ADAM, EPEL, 2007). Segundo Marcolin (2014), que submeteu ratos neonatos à exposição crônica de alimentos palatáveis, houve aumento da ingesta alimentar no grupo que recebia dieta de cafeteria, quando comparado aos roedores que ingeriam dieta padrão. Além disso, a presença de maiores níveis de glicocorticoides na corrente sanguínea, como ocorre no estresse, pode acarretar no aumento do consumo de comidas com alto teor de gordura e açúcar, como medida de conforto e, também gerar elevação da adiposidade visceral, que atuaria como uma retroalimentação negativa ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, em uma tentativa do organismo de reduzir a percepção do estresse (DALLMAN et al, 2005; PECORARO et al 2006; CUNHA, 2015).

Ainda, à exposição ao estresse social faz com que haja um aumento da circulação de grelina, peptídeo responsável pela sensação de fome, desenvolvendo sintomas como hiperfagia e aumento de peso corporal no organismo (CHUANG et al, 2011). Ademais, ainda contrapondo os resultados do presente estudo, a exposição a uma dieta hiperlipídica durante um período de três meses gerou um aumento, aproximado, de até duas vezes na massa corporal de ratos Wistar submetidos a uma dieta hipercalórica, quando comparado ao grupo controle (ROSINI, SILVA, MORAES, 2012).

Porém, sabe-se que a idade dos animais pode influenciar no ganho de peso, visto que ratos mais jovens, normalmente, em decorrência do seu metabolismo, tendem a ter um ganho maior de massa magra e, conseqüentemente, menor deposição de gordura (ROSINI, SILVA, MORAES, 2012). Ainda, há evidências de que ratos adultos, quando expostos à uma condição de estresse repetido ou de longa duração, reduzam sua ingesta alimentar e parem de

crescer e, por consequência, apresentam uma diminuição do ganho de peso (DALLMAN; PECORARO; FLEUR, 2005).

Contudo, mesmo não havendo aumento do peso corporal total nesse estudo, observou-se um perfil bioquímico dislipidêmico, ou seja, houve elevação dos níveis de colesterol e triglicerídeos plasmáticos ao final do experimento, dado semelhante ao encontrado por Marcolin (2014) ao expor roedores à uma dieta hipercalórica. Sendo que, a elevação desses metabólitos é uma das principais características encontradas em indivíduos com obesidade, favorecendo o processo de aterogênese nos vasos sanguíneos e de outras comorbidades (FALUDI et al, 2017).

Além disso, estudos epidemiológicos relacionam o aumento dos níveis de colesterol com o crescimento linear na mortalidade em jovens adultos, por doença coronariana, infarto do miocárdio e choque cardiogênico, o que se agrava quando associado a fatores de risco prévios (FREIBERG et al, 2008). Já a hipertrigliceridemia, também está fortemente relacionada ao desenvolvimento de problemas cardíacos e, sua forma grave, pode levar a outras complicações, como pancreatite aguda e hepatoesplenomegalia (NORDESTGAARD; VARBO, 2014).

Adicionalmente, observou-se nesse estudo aumento do peso do coração em relação ao peso corporal total nos animais que eram alimentados com dieta hiperlipídica, fato possivelmente ocasionado pela presença de maiores níveis de lipídeos circulantes no sangue, entretanto não foram encontradas evidências científicas na literatura que corroborem com essa teoria.

O aumento da quantidade de tecido adiposo retroperitoneal e visceral, encontrados ao final desse experimento, deveu-se à ingesta da dieta hiperlipídica, resultado semelhante ao encontrado em outros estudos com roedores que receberam uma alimentação hipercalórica (ARCEGO et al, 2014; SHALEV et al., 2010; AUBERVAL et al, 2014). Com isso, sabe-se que o aumento da quantidade do tecido adiposo no organismo tem, por consequência, uma elevação nos níveis de leptina na circulação sanguínea, sendo ela responsável pela sensação de saciedade (SHALEV et al., 2010). Porém, essa alta concentração circulante é responsável pela inibição da sua atuação no SNC, ou seja, esse hormônio para de produzir seu efeito de saciedade no organismo, podendo influenciar no aumento do consumo de alimento, que pode vir a produzir uma maior deposição de gordura (HELPERN, RODRIGUES, da COSTA, 2004).

Ainda, segundo Arcego (2014), o consumo de dieta com altos níveis calóricos aumenta a quantidade de tecido adiposo nos animais, sendo que ao expor os roedores ao

estresse de isolamento logo ao nascer elevou, ainda mais, a deposição de gordura abdominal, levando à uma obesidade mais severa. No presente estudo, não foram encontradas alterações significativas no aumento da adiposidade nos animais em estresse, provavelmente pela idade avançada dos roedores ao se iniciar o período de isolamento.

Além disso, no fígado, também, foi evidenciado altos níveis de concentração de triglicerídeos, devido a dieta hiperlipídica fornecida aos animais. Sendo assim, o TG no tecido hepático pode ser proveniente tanto da dieta que consumimos como, também, produto do próprio metabolismo. Quando ingerido pela alimentação, os TG são, primeiramente, emulsificados pelos ácidos biliares e, após, absorvidos pelo intestino, onde formam-se quilomícrons que são enviados até a corrente sanguínea, através do sistema linfático. Uma vez no plasma, a maior parte desses triglicerídeos são absorvidos pelos tecidos muscular e adiposo, visto que, neles há, na superfície da membrana, lipoproteínas que os captam (ALVES-BEZERRA; COHEN, 2018).

Com isso, somente o TG remanescente é captado por endocitose no fígado, que sob condições normais, sintetiza e o reenvia em forma de VLDL, para serem captados pelos músculos e pelo tecido adiposo, porém esse mecanismo pode ser afetado pelo estado nutricional do indivíduo (ALVES-BEZERRA; COHEN, 2018). Sendo assim, com um aumento de TG plasmático, juntamente com a exposição a um estado nutricional desequilibrado, obtém-se uma maior concentração dessa molécula no tecido hepático, o que pode levar ao desenvolvimento da esteatose hepática não alcoólica, condição relacionada ao consumo de dietas de baixo custo, com alta palatabilidade e com grande teor calórico (RUSS et al, 2015; BARBOSA, ALMEIDA, 2019).

Além do aumento de lipídeos, foi observado uma elevação significativa na quantidade de glicogênio hepático nos animais que receberam DHL, resultado também obtido por Auberval et al (2014) em ratos expostos à alimentação hipercalórica durante dois meses, contrapondo os resultados encontrados por Gauthier e colaboradores (2007) que observaram uma diminuição dos níveis de glicogênio no fígado de ratos, ao ofertar uma dieta com uma quantidade discretamente menor de carboidratos (42%).

O glicogênio é um polissacarídeo formado pela glicogênese no tecido hepático e, pode ser considerado a principal forma de armazenamento de energia do organismo, responsável por manter o nível glicêmico normal no plasma em momentos de jejum (SOARES FILHO; KANAAN; GUZMAN-SILVA, 2011). A exposição a dieta com altos níveis de carboidrato (CB) (49%), como no caso desse estudo, eleva a quantidade de CB absorvidos pelo intestino, causando um aumento da conversão de glicose em glicogênio no fígado e, conseqüentemente,

umentando suas reservas (GAUTHIER; FAVIER; LAVOIE, 2006). Sendo assim, essa elevação pode acarretar em hepatomegalia, contudo não foram encontradas diferenças significativas no peso do tecido hepático ao final desse experimento, por mais que a concentração de glicogênio tenha se elevado nos ratos com DHL.

Não foram encontrados estudos atuais que relacionam aumento ou diminuição dos níveis de glicogênio hepático com o estresse, nem mesmo com o tamanho do órgão, porém sabe-se que os glicocorticoides (GC), como o cortisol, influenciam na gliconeogênese no fígado e, diminuem a captação de glicose pelo músculo esquelético e tecido adiposo (DALMAZI et al, 2012). Além disso, os GC também agem aumentando as reservas de glicogênio no tecido hepático (KUO et al, 2015), dado que pode ser verificado com a elevação significativa da concentração de glicogênio nesse experimento, ao comparar o grupo DHL com os ratos DHL-estressados.

Provavelmente, a elevação das reservas de glicogênio está relacionada, também, com o processo de gliconeogênese, que consiste no aumento do precursor imediato da síntese de glicogênio, a glicose-6-fosfato (G6P). Sendo que, as principais formas de síntese desse composto são pela captação de glicose da circulação e de fluxos gliconeogênicos, decorrentes de substratos como lactato, aminoácidos e glicerol (RADZIUK; PYE, 2001), que podem ser estimulados pela presença da corticosterona. Com o aporte de carboidratos e lipídeos da dieta e da atividade gliconeogênica, provavelmente, induziu-se o fígado a uma maior produção de G6P, levando ao aumento das reservas de glicogênio.

Os resultados obtidos pelos experimentos apresentaram algumas limitações, pois, provavelmente, o tempo que os animais foram submetidos ao estresse não foi longo o suficiente para que pudéssemos observar alterações significativas no soro e nos tecidos. Assim como em relação as avaliações dos níveis hormonais, como de corticosterona, insulina, leptina, HDL e LDL. Porém, estes resultados poderão servir de base para outros projetos que tenham como avaliar e aprofundar os conhecimentos do metabolismo de animais submetidos a dieta em uma situação de estresse.

5 CONCLUSÃO

Com esse estudo podemos concluir que a dieta hiperlipídica gera alterações principalmente no fígado e nos tecidos adiposos retroperitoneal e visceral. Além disso, apresenta influência sobre os padrões de colesterol e triglicérides no soro. Com isso, pode-se afirmar que a dieta induziu efeitos sobre parâmetros morfológicos, sorológicos, sobre as reservas de carboidratos e de lipídios no fígado e na gordura visceral e retroperitoneal. Sendo assim, induziu-se um estado de desequilíbrio no organismo, resultando em um modelo de obesidade e, possível síndrome metabólica, caso o experimento tivesse uma maior duração.

Contudo, apesar do aumento da ingesta do alimento palatável e elevação do consumo alimentar, posterior a duas semanas de estresse, não foram observados grandes impactos do isolamento sobre os dados coletados, inferindo que o tempo, a severidade ou a qualidade do agente estressor não foram suficientes. Ressalta-se que mais estudos sejam necessários para avaliarmos o efeito do estresse, visto a escassa literatura encontrada sobre o efeito dele no metabolismo.

Além disso, esse estudo mostra-se importante para a área da Enfermagem visto o grande número de pacientes que apresentam diversos graus de obesidade, além de estarem em constante estado de estresse no ambiente hospitalar, tanto pelas modificações estressoras causadas pela própria doença, quanto pela mudança de ambiente e isolamento da sociedade. Sendo assim, o conhecimento dos enfermeiros sobre as possíveis alterações metabólicas geradas por ambos os fatores estudados nesse experimento é importante para promover um cuidado mais qualificado e baseado em evidências científicas.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, Fahim et al. Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. **Journal of the American College of Cardiology**. California, v.5, n.40, p.937–943, 2002.
- ADAM, Tanja C.; EPEL, Elissa S. Stress, eating and the reward system. **Physiology & Behavior**, San Antonio, v. 91, n. 4, p.449-458, jul. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938407001278?via%3Dihub>>. Acesso em: 10 nov. 2019.
- AIRES, Margarida de Mello. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 1352 p.
- ALVES-BEZERRA, Michele; COHEN, David E. Triglyceride Metabolism in the Liver. **Comprehensive Physiology**, Rockville, p.1-22, 12 dez. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29357123>>. Acesso em: 20 nov. 2019.
- ALVES, Márcia Guimarães de Mello et al. Versão resumida da “job stress scale”: adaptação para o português. **Rev Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 2, p.164-71, jan. 2004. Disponível em: <www.revistas.usp.br/rsp/article/viewFile/31697/33584>. Acesso em: 30 set. 2018.
- ANDREWS, Robert C.; WALKER, Brian R.. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. **Clinical Science**, Londres, v. 96, n. 5, p.513-523, 16 abr. 1999. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/cs0960513>.
- ARCEGO, Danusa Mar et al. Isolation during the prepubertal period associated with chronic access to palatable diets: Effects on plasma lipid profile and liver oxidative stress. **Physiology & Behavior**, v. 124, p.23-32, jan. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24184408>>. Acesso em: 19 nov. 2019.
- AUBERVAL, Nathalie et al. Metabolic and oxidative stress markers in Wistar rats after 2 months on a high-fat diet. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, New York, v. 6, n. 1, p.130-138, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4424531/>>. Acesso em: 20 nov. 2019.
- AVMA. **Guidelines for the Euthanasia of Animals**: 2013 Edition. American Veterinary Medical Association, Version 2013.0.1, 2013.
- BARBOSA, Paulo José Bastos et al. Critério de obesidade central em população brasileira: impacto sobre a síndrome metabólica. **Arq Bras Cardiol**. São Paulo, n. 87, p. 407-14, 2006.
- AYALA, Alejandro R.. Antagonistas do hormônio liberador da corticotrofina: atualização e perspectivas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 46, n. 6, p.619-625, dez. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004-27302002000600004&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 25 out. 2019.
- BARBOSA, Francielle da Silva; ALMEIDA, Martha Elisa Ferreira. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica: um problema global de caráter reversível. **Journal Of Health & Biological Sciences**, Fortaleza, v. 7, n. 3, p.305-311, 27 jun. 2019. Disponível em: <<https://periodicos.unichristus.edu.br/jhbs/article/view/2259/877>>. Acesso em: 20 nov. 2019.

BRASIL. **Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008.** Regulamenta O Inciso VII do § 1o do Art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm>. Acesso em: 19 nov. 2018.

BROWN E. T. et al. Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice. **Visual Neuroscience**. v.22, p.615-618, 2005.

Callegari-Jacques, Sidia M. **Bioestatística: princípios e aplicações.** Porto Alegre: Artmed, 2003. 255 p.

CHIAVENATO, I. **Gestão de Pessoas: O novo papel dos recursos humanos nas organizações.** 7. ed. Rio de Janeiro, 1999, p. 374-398.

CHUANG, Jen-chieh et al. Ghrelin mediates stress-induced food-reward behavior in mice. **Journal Of Clinical Investigation**, Baltimore, v. 121, n. 7, p.2684-2692, 1 jul. 2011. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci57660>. Disponível em: <<https://www.jci.org/articles/view/57660>>. Acesso em: 19 nov. 2019.

COSTANZO, Linda S. **Fisiologia.** 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

CUNHA, Ana Carla de Araújo da. **O consumo crônico de “comfort food” e comportamentos relacionados á ansiedade em ratos adultos submetidos ao estresse neonatal.** 2015. 52 f. TCC (Graduação) - Curso de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/131195/000979741.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 17 nov. 2019.

DALLMAN, Mary F.; PECORARO, Norman C.; LAFLEUR, Susanne E.. Chronic stress and comfort foods: self-medication and abdominal obesity☆. **Brain, Behavior, And Immunity**, v. 19, n. 4, p.275-280, jul. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2004.11.004>.

DALMAZI, Guido di et al. Glucocorticoids and Type 2 Diabetes: From Physiology to Pathology. **Journal Of Nutrition And Metabolism**, Londres, v. 2012, p.1-9, 2012. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jnme/2012/525093/>>. Acesso em: 20 nov. 2019.

DREWNOWSKI, Adam; SPECTER, Se. Poverty and obesity: the role of energy density and energy costs. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, Oxford, v. 79, n. 1, p.6-16, 1 jan. 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14684391>>. Acesso em: 20 out. 2019.

EUROPA. **Constituição (1986).** Directiva 86/609/cee do Conselho de 24 de Novembro de 1986 relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares, e administrativas dos estados-membros respeitantes à proteção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos nº 86/609, de 1986. União Europeia, 18 dez. 1986. v. 356.

Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program. NCEP. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult

Treatment Panel III). **Journal Of The American Medical Association**, v. 285, n. 19, p.2486-2497, 16 mai. 2001.

FALUDI, Aa et al. Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose - 2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 1, p.1-62, 2017. Disponível em: <http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2017/02_DIRETRIZ_DE_DISLIPIDEMIAS.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2019.

FIGUEIRA, JC; HIPPERT, MI. Estresse: possibilidades e limites. In: Jaques MG, Codo W. **Saúde mental & trabalho**. Rio de Janeiro: Vozes, 2002, p. 112-29,

FRANCO, Gilberto Paulo Pereira et al. Síndrome metabólica em Hipertensos de Cuiabá - MT: Prevalência e Fatores Associados. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo, v. 6, n. 92, p.472-478, jan. 2009. Disponível em:

FREIBERG, Jacob J.. Nonfasting Triglycerides and Risk of Ischemic Stroke in the General Population. **Jama**, Chicago, v. 300, n. 18, p.2142-2152, 12 nov. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19001625>>. Acesso em: 18 nov. 2019.

FREITAS, Eulilian Dias de et al. Síndrome Metabólica: uma Revisão dos Critérios de Diagnóstico. **Rev. Min. Enferm.**, Minas Gerais, v. 3, n. 12, p.403-411, jul. 2008. Disponível em: <<http://www.reme.org.br/artigo/detalhes/283>>. Acesso em: 02 set. 2018.

GARBARINO, Sergio; MAGNAVITA, Nicola. Work Stress and Metabolic Syndrome in Police Officers. A Prospective Study. **Plos One**, São Francisco, v. 10, n. 12, p.1-15, 7 dez. 2015.

GAUTHIER, Marie-soleil; FAVIER, Roland; LAVOIE, Jean-marc. Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats. **British Journal Of Nutrition**, Cambridge, v. 95, n. 2, p.273-281, fev. 2006. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/time-course-of-the-development-of-nonalcoholic-hepatic-steatosis-in-response-to-highfat-diet-induced-obesity-in-rats/704368C022A665147DA95C5E334F5601>>. Acesso em: 20 nov. 2019.

GIL, Antonio Carlos. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 4. ed. São Paulo: Atlas, 2008. 175 p.

GREENO, Catherine G.; WING, Rena R.. Stress-induced eating. **Psychological Bulletin**, Washington, v. 115, n. 3, p.444-464, 1994. Disponível em: <<https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-0028437652&origin=inward&txGid=9c58f47c004d0b6ace419dc8bb466447>>. Acesso em: 10 nov. 2019.

HALL, John Edward; GUYTON, Arthur C. **Guyton & Hall tratado de fisiologia médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

HALPERN, Zuleika S. C.; RODRIGUES, Mariana del Bosco; COSTA, Roberto Fernandes da. Determinantes fisiológicos do controle do peso e apetite. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo, v. 31, n. 4, p.150-153, set. 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rpc/v31n4/22397>>. Acesso em: 28 out. 2019.

HERDMAN, Heather et al. **Diagnósticos de Enfermagem da NANDA: Definições e Classificação**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. 468 p.

JACQUES, MG. Abordagens. In: Guimarães LBM. **Ergonomia: tópicos especiais: qualidade de vida no trabalho, psicologia e trabalho**. Porto Alegre: FEENG/UFRGS/EE/PPGEP, 2004. p. 2.1-4.

KAUR, Jaspinder. A comprehensive review on metabolic syndrome. **Cardiology research and practice**. Cairo, v. 1, p. 1-21, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/943162>>. Acesso em: 21 nov. 2018.

KERSHAW, Erin E; FLIER, Jeffrey S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. Oxford, n.6, v.89, p.2548–2556, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1210/jc.2004-0395>>. Acesso em: 21 nov. 2018.

KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. **Berne y Levy: fisiologia**. 3.ed. Barcelona: Elsevier Mosby, 2009. 834p.

KUO, Taiyi et al. Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, p.99-126, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26215992>>. Acesso em: 20 nov. 2019.

LACERDA, Maria Ribeiro; COSTENARO, Regina Gema Santini. **Metodologias da pesquisa para a Enfermagem e saúde**. Porto Alegre: Moriá, 2016, 496p.

LAKKA, Hanna-Maaria et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. **Journal Of The American Medical Association**, v. 288, n. 21, p.2709-2716, dez. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12460094>>. Acesso em: 02 set. 2018.

LEÃO, Leila Sicupira Carneiro de Souza; BARROS, Érica Guimarães; KOIFMAN, Rosalina Jorge. Prevalência de Síndrome Metabólica em Adultos. **Revista Brasileira de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, p.93-100, mar. 2010.

MACEDO, Isabel Cristina de. Estresse crônico associado à dieta hipercalórica em ratos wistar: parâmetros ponderais e bioquímicos. 2010. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

MARCOLIN, Marina de Lima. **Acesso crônico à dieta palatável durante o desenvolvimento aumenta a resposta ao estresse e altera preferência alimentar em ratos machos adultos**. 2014. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

MARMOT, Michael; BRUNNER, Eric. Cohort Profile: the Whitehall II study. **International Journal Of Epidemiology**, Oxford, v. 2, n. 34, p.251-256, abr. 2005.

- MONTEIRO, Carlos A.; CONDE, Wolney L.; POPKIN, Barry M.. Independent Effects of Income and Education on the Risk of Obesity in the Brazilian Adult Population. **The Journal Of Nutrition**, Hinsdale, v. 131, n. 3, p.881-886, mar. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238779>>. Acesso em: 26 out. 2019.
- NETO, José Cláudio Garcia Lira et al. Prevalência da Síndrome Metabólica em pessoas com Diabetes Mellitus tipo 2. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 70, n. 2, p.265-270, abr. 2017.
- NORDESTGAARD, Børge G; VARBO, Anette. Triglycerides and cardiovascular disease. **The Lancet**, Londres, v. 384, n. 9943, p.626-635, ago. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25131982>>. Acesso em: 18 nov. 2019.
- PANIZZON, Cristiane; LUZ, Anna Maria Hecker; FENSTERSEIFER, Lísia Maria. ESTRESSE DA EQUIPE DE ENFERMAGEM DE EMERGÊNCIA CLÍNICA. **Rev Gaúcha Enferm.**, Porto Alegre, v. 3, n. 29, p.391-399, set. 2008.
- PECORARO, N.; DALLMAN, M. F.; WARNE, J. P.; et al. From Malthus to motive: How the HPA axis engineers the phenotype, yoking needs to wants. **Progress in Neurobiology**, v. 79, n. 5-6, p. 247–340, 2006.
- PEDROSO, G. L., MENDES, R. H., PERSCH, K., JAHN, M. P., KUCHARSKI, L. C. Efeito do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre o metabolismo de ratos machos. **Revista HCPA**, 2010. 30(3), 241-246 p.
- PINHEIRO, M.; ESTARQUE, M. Estresse. Disponível em: <http://www.geocities.com/hotsrings/oasis/9478/estrse.html>. Acesso em: 21 nov. 2018.
- RADZIUK, J.; PYE, S. Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. **Diabetes/metabolism Research And Reviews**, Massachussets, v. 17, n. 4, p.250-272, 2001. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/dmrr.217>>. Acesso em: 25 nov. 2019.
- REAVEN, Gerald et al. How insulin resistant are patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Oxford, v. 61, p. 32-36, 1985.
- REAVEN, Gerald. Role of Insulin Resistance in Human Disease (Syndrome X): an Expanded Definition. **Annual Review Of Medicine**, Palo Alto, v. 44, p.121-131, jan. 1993. Disponível em: <www.annualreviews.org>. Acesso em: 02 set. 2018.
- RESENDE, P. *et al.* Influence of crude extract and bioactive fractions of *Ilex paraguensis* A. St. Hil (yerba mate) on the Wistar rat lipid metabolism. **Journal of Functional Foods**, v.15, p.440-451, 2015.
- RIBEIRO, Renata Perfeito et al. Prevalência da Síndrome Metabólica entre trabalhadores de Enfermagem e associação com estresse ocupacional, ansiedade e depressão. **Rev. Latino-am. Enfermagem**, São Paulo, v. 23, n. 3, p.435-440, maio 2015.
- ROBERTS, Susan B et al. Measured energy content of frequently purchased restaurant meals: multi-country cross sectional study. **British Medical Journal**, Reino Unido, p.1-10, 12 dez.

2018. *BMJ*. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.k4864>. Disponível em:

<<https://www.bmj.com/content/bmj/363/bmj.k4864.full.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2019.

ROSINI, Tiago Campos; SILVA, Adelino Sanchez Ramos da; MORAES, Camila de. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 58, n. 3, p.383-387, maio 2012. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0104423012705250>>. Acesso em: 18 nov. 2019.

RUSS, Tom C. et al. Association Between Psychological Distress and Liver Disease Mortality: A Meta-analysis of Individual Study Participants. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 148, n. 5, p.958-966, maio 2015. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25680670>>. Acesso em: 20 nov. 2019.

RUTTERS, Femke et al. Acute Stress-related Changes in Eating in the Absence of Hunger. **Obesity**, Silver Spring, v. 17, n. 1, p.72-77, jan. 2009. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/oby.2008.493>>. Acesso em: 28 out. 2019.

SAHA JK *et al.* 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.

SANTOS, Juliana da Costa; SANTOS, Maria Luiza da Costa. Descrevendo o Estresse. **Principia**, João Pessoa, v. 1, n. 12, p.51-57, abr. 2005.

SELYE, Hans. **The stress of life**. 1 ed. New York: McGraw-Hill, 1956.

SILVA, R. D. et al. The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male wistar rats. *Fitoterapia*, 2011.82(6), 818-26 p.

SILVERTHORN, Dee Unglaub. *Fisiologia humana: uma abordagem integrada*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SIRTORI, Cesare R *et al.* Nutraceutical Approaches to the Metabolic Syndrome. **Annals of Medicine**. Oxford, v.8, n.49, p.678-697, 2017.

SOARES FILHO, Porfirio José; KANAAN, Salim; GUZMAN-SILVA, Maria Angelica. Avaliação do glicogênio hepático correlacionado com glicose sérica em ratas castradas sob tratamento com tibolona. **J Bras Patol Med Lab**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 5, p.561-68, out. 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v47n5/v47n5a11.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2019.

SHALEV, Uri et al. Long-term physiological and behavioral effects of exposure to a highly palatable diet during the perinatal and post-weaning periods. **Physiology & Behavior**, [s.l.], v. 101, n. 4, p.494-502, nov. 2010. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20688090>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20688090>>. Acesso em: 19 nov. 2019.

VAN HANDEL, E. Estimation of glycogen in small amount soft tissue. **Analytical Biochemistry**. 11: 256-265, 1965.

VIEIRA, Edna Cunha; PEIXOTO, Maria do Rosário Gondim; SILVEIRA, Erika Aparecida da. Prevalência e fatores associados à Síndrome Metabólica em idosos usuários do Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 17, n. 4, p.805-817, dez. 2014.

VON DENTZ, Maiza Cristina. **Avaliação da atividade do extrato de Pycnoporus sanguineus sobre o metabolismo energético de ratos submetidos aos modelos de diabetes e dislipidemia**. 2018. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

TAYLOR, Benjamin A.; PHILLIPS, Sandra J.. Detection of Obesity QTLs on Mouse Chromosomes 1 and 7 by Selective DNA Pooling. **Genomics**, Massachusetts, v. 34, n. 3, p.389-398, jun. 1996. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/geno.1996.0302>.

The World Health Report 2010. Obesity - preventing and managing the Global Epidemic II Series, 2010. Geneve.

YAO, Manjiang et al. Field Methods for Body Composition Assessment Are Valid in Healthy Chinese Adults. **The Journal Of Nutrition**, Boston, v. 132, n. 2, p.310-317, 1 fev. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11823597>>. Acesso em: 25 out. 2019.

ANEXOS

ANEXO I. Aprovação para realização de pesquisa da Comissão de Pesquisa da Enfermagem-UFRGS.

Dados Gerais:		Retornar	
Projeto Nº:	36788	Título:	EFEITOS DO ESTRESSE EM RATOS SUBMETIDOS A MODELO DE SÍNDROME METABÓLICA
Área de conhecimento:	Fisiologia	Início:	20/03/2019
		Previsão de conclusão:	20/02/2020
Situação:	Projeto em Andamento		
Origem:	Escola de Enfermagem	Projeto Isolado	
Local de Realização:	não informado		
Não apresenta relação com Patrimônio Genético ou Conhecimento Tradicional Associado.			
Objetivo:	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> Objetivo geral Identificar os efeitos do estresse sobre parâmetros metabólicos em ratos Wistar submetidos ao modelo de síndrome metabólica. </div>		
Palavras Chave:	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> ESTRESSE; SÍNDROME METABÓLICA </div>		
Equipe UFRGS:	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> Nome: Juliana Petri Tavares Coordenador - Início: 20/03/2019 Previsão de término: 20/02/2020 Nome: LUIZ CARLOS RIOS KUCHARSKI Coordenador - Início: 20/03/2019 Previsão de término: 20/02/2020 Nome: JÉSSICA MASCHIO Técnico: Assistente de Pesquisa - Início: 20/03/2019 Previsão de término: 20/02/2020 </div>		
Avaliações:	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> Comissão de Pesquisa de Enfermagem - Aprovado em 24/04/2019 Clique aqui para visualizar o parecer </div>		
Anexos:	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> Projeto Completo Data de Envio: 20/03/2019 </div>		

ANEXO II. Carta de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 37345

Título: EFEITOS DO ESTRESSE DE ISOLAMENTO EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE SÍNDROME METABÓLICA

Vigência: 01/06/2019 à 30/09/2020

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

LUIZ CARLOS RIOS KUCHARSKI - coordenador desde 01/06/2019

Juliana Petri Tavares - pesquisador desde 01/06/2019

JÉSSICA MASCHIO - Aluno de Especialização desde 01/06/2019

RENATA VICTÓRIA DA CRUZ OHLWEILER - Aluno de Especialização desde 01/06/2019

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 19/08/2019 - Auditório Plenarinho - Andar térreo do Prédio da Reitoria- Bairro Farroupilha - Campus Farroupilha - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 36 ratos Wistar, machos, adultos com 30 dias de idade de provenientes do CREAL/UFRGS de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 30 de Agosto de 2019

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética