

NILCEMAR RODRIGUES DA CRUZ

EFEITOS DA CARNE DE RÃ-TOURO (*Rana catesbeiana*) EM ANIMAIS  
DIABÉTICOS E HIPERCOLESTEROLÊMICOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2004

NILCEMAR RODRIGUES DA CRUZ

EFEITOS DA CARNE DE RÃ-TOURO (*Rana catesbeiana*) EM ANIMAIS  
DIABÉTICOS E HIPERCOLESTEROLÊMICOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 29 de março de 2004.

---

Prof<sup>a</sup> Neuza Maria Brunoro Costa  
(Conselheira)

---

Prof<sup>a</sup> Maria do Carmo G. Peluzio  
(Conselheira)

---

Prof. Sérgio Luis P. Matta

---

Prof<sup>a</sup> Céphora Maria Sabarense

---

Prof<sup>a</sup> Josefina Bressan Resende Monteiro  
(Orientadora)

A Deus.

Aos meus amáveis pais Eustáquio e Olga.

Aos meus maravilhosos irmãos Nilton, Alexsandro e André.

Ao meu amor Maurício.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelos caminhos percorridos e, principalmente, pela presença durante todo o percurso.

Ao meu pai, pela confiança depositada.

À minha mãe, pelo estímulo constante e pelo desejo de realização dos meus sonhos e, principalmente, por acreditar neles.

Aos meus irmãos Nilton, Alexsandro e André pela harmonia e amizade.

Ao meu amor, um verdadeiro companheiro e amigo, Maurício.

À profa. Josefina Bressan pela dedicada e competente atuação na coordenação do programa, pelo admirável carisma, como também pela orientação e acompanhamento deste trabalho.

Às queridas conselheiras, professoras Neuza e Maria do Carmo, pela dedicação, aconselhamento, acompanhamento e risadas.

Ao professor Samuel pela participação neste trabalho.

À prof<sup>a</sup> Sylvia Franceschini, pelas portas sempre abertas, espelhando harmonia e solidariedade. Obrigada pela sua contribuição!

A todos os professores e funcionários do DNS pela amizade, sorrisos e indispensável trabalho desempenhado.

Ao Professor Sérgio da Matta, competência conciliada a simpatia, pela participação ativa neste trabalho.

Às minhas amigas Eliana, Karina, Liz e Martha, minhas irmãzinhas espirituais.

À querida prima Sid pelo carinho, amizade e força no início de tudo.

Às colegas Ingrid, Fabiana, Érica, Lucimar e Luciana pelas agradáveis companhias e pelos bons momentos vividos.

Às colegas de turma pelas gostosas oportunidades de descontração.

Aos funcionários Sr. Adão, Cléa e José Geraldo, pela importante ajuda durante a realização do experimento e pela amizade conquistada.

Ao João pela amizade e valiosa contribuição neste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo parcial suporte financeiro concedido.

À todas as pessoas mencionadas por fazerem parte da minha vida... da minha formação..., da minha história.

## **BIOGRAFIA**

NILCEMAR RODRIGUES DA CRUZ, filha de Eustáquio Rodrigues da Cruz e Olga Maria da Cruz, nasceu em 04 de dezembro de 1974, na cidade de Coronel Fabriciano, Minas Gerais.

Em agosto de 1995, iniciou o Curso de Nutrição na Universidade Federal de Ouro Preto, concluindo-o em fevereiro de 2000.

Em Abril de 2002, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
INTRODUÇÃO .....	1
Referências Bibliográficas.....	2
CAPÍTULO 1 .....	5
O PROCESSO ATEROSCLERÓTICO NO DIABETES MELLITUS E NA DISLIPIDEMIA: O PAPEL DA NUTRIÇÃO .....	5
Introdução .....	5
Fontes protéicas e metabolismo lipídico .....	6
A influência do tipo de gordura da dieta no metabolismo dos lipídios ....	8
Diabetes mellitus e aterosclerose .....	12
Dislipidemia e aterosclerose .....	14
Conclusões .....	17
Referências Bibliográficas.....	17
CAPÍTULO 2 .....	23
EFEITOS DA CARNE DE RÃ-TOURO ( <i>Rana catesbeiana</i> ) EM RATOS DIABÉTICOS .....	23
Introdução .....	23
Material e Métodos.....	24

	Página
Resultados .....	30
Discussão.....	38
Conclusões .....	42
Referências Bibliográficas.....	43
CAPÍTULO 3 .....	46
EFEITOS DA CARNE DE RÃ-TOURO ( <i>Rana catesbeiana</i> ) EM CAMUNDONGOS KNOCK-OUT PARA APOE .....	46
Introdução .....	46
Material e Métodos.....	48
Resultados .....	51
Discussão.....	56
Conclusões .....	61
Referências Bibliográficas.....	61
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	66
APÊNDICE .....	67
APÊNDICE A .....	68



## RESUMO

CRUZ, Nilcemar Rodrigues da, M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2004. **Efeitos da carne de rã-touro (*Rana catesbeiana*) em animais diabéticos e hipercolesterolêmicos.** Orientadora: Josefina Bressan Resende Monteiro. Conselheiros: Neuza Maria Brunoro Costa, Maria do Carmo Gouveia Peluzio e Samuel Lopes de Lima

As doenças cardiovasculares são as causas mais comuns de morte nas sociedades ocidentais devido em grande parte ao seu padrão alimentar, existindo uma correlação positiva entre o consumo de carnes, tanto as brancas como as vermelhas, com os níveis de LDL-colesterol, o qual é considerado fator de risco para tais doenças. No presente estudo investigou-se, por meio de dois ensaios biológicos, se a carne de rã, com proteína considerada de alto valor biológico e sendo pobre em lipídios, poderia exercer efeito positivo nas proteínas séricas, no metabolismo lipídico e no processo de formação de placa aterosclerótica em animais saudáveis, diabéticos e hipercolesterolêmicos. Utilizou-se dietas AIN-93M semi-purificadas, porém com 20% de proteína derivada de carne de rã ou caseína. No primeiro ensaio, 45 ratos Wistar adultos foram divididos em grupos C (animais saudáveis recebendo dieta com caseína), R (animais saudáveis recebendo dieta com carne de rã), D (animais diabéticos recebendo dieta com caseína) e DR (animais diabéticos recebendo dieta com carne de rã), tratados durante 4 semanas. A carne de rã reduziu o colesterol

total dos ratos não diabéticos, mas aumentou a glicemia nos diabéticos. As concentrações séricas de proteínas totais, albumina, triacilgliceróis, LDL e HDL-colesterol, como também de lipídios totais hepáticos, foram semelhantes entre os grupos. O segundo ensaio foi realizado com 40 camundongos *Knock-out* para apoE tratados durante 10 semanas com dieta normolipídica (4% de lipídio), de acordo com o padrão AIN-93M, ou hiperlipídica (acréscimo de 11% de gordura vegetal hidrogenada e 1% de colesterol), divididos nos grupos NC (animais recebendo dieta normolipídica com caseína), NR (animais recebendo dieta normolipídica com carne de rã), HC (animais recebendo dieta hiperlipídica com caseína) e HR (animais recebendo dieta hiperlipídica com carne de rã). Com a dieta normolipídica, a carne de rã aumentou excreção de lipídios nas fezes, colesterol total e proteínas totais séricas e desenvolveu lesão aterosclerótica mais avançada. Na dieta hiperlipídica com carne de rã também houve excreção aumentada de lipídios nas fezes, mas as concentrações séricas de colesterol total e proteínas totais, como também o desenvolvimento da lesão aterosclerótica, não diferiram entre os dois grupos. Não houve efeito da carne de rã nas concentrações de LDL-colesterol, triacilgliceróis, glicose, como também de lipídios totais hepáticos, tanto nas dietas normolipídicas quanto nas hiperlipídicas. Em conclusão, a carne de rã não demonstrou ser benéfica na prevenção de doenças cardiovasculares em animais diabéticos e em camundongos hipercolesterolêmicos quando comparado à caseína. É necessário realização de estudos posteriores comparando o efeito da carne de rã com outros tipos de carnes, como também em outros modelos animais e em humanos.

## ABSTRACT

CRUZ, Nilcemar Rodrigues da, M.S., Universidade Federal de Viçosa, March 2004. **Bull-frog meat effect (*Rana catesbeiana*) in diabetic and hypercholesterolemic animals.** Adviser: Josefina Bressan Resende Monteiro. Committee Members: Neuza Maria Brunoro Costa, Maria do Carmo Gouveia Peluzio and Samuel Lopes Lima

Cardiovascular diseases are the most common causes of death in western societies largely due to its food habits, with a positive correlation between the consumption of meat, both white and red, with LDL-cholesterol levels, which is considered risk factor for such diseases. In the present study it was investigated, by two biological assays, whether frog meat, considered high biological value protein and low in lipids, could have positive effect on serum proteins, lipid metabolism and on the process of atherosclerotic plaque formation in healthy, diabetic and hypercholesterolemic animals. Semi-purified AIN-93M diets were used, with 20% of protein derived from frog meat or casein though. In the first assay, 45 adult Wistar mice were separated in the following groups C (healthy animals on diet with casein), R (healthy animals on diet with frog meat), D (diabetic animals on diet with casein) and DR (diabetic animals on diet with frog meat), treated for 4 weeks. Frog meat reduced non-diabetic mouse total cholesterol, but it increased glycemia in the diabetic ones. The concentration of total serum protein, albumin, triacylglycerol, LDL and HDL-

cholesterol, as well as total hepatic lipid, were similar among the groups. The second assay was carried out with 40 apoE knockout mice treated for 10 weeks with normo (4%), according to AIN-93M standard, or hyperlipidic diet (with 11% hydrogenated vegetable fat and 1% cholesterol increase), separated in the following groups NC (animals on normolipidic diet with casein), NR (animals on normolipidic diet with frog meat), HC (animals on hyperlipidic diet with casein) and HR (animals on hyperlipidic diet with frog meat). Under normolipidic diet, the frog meat increased lipid excretion in the feces, total cholesterol and total serum proteins and it developed more advanced atherosclerotic lesion. Under hyperlipidic diet with frog meat there was also increase in lipid excretion in the feces, but the serum concentration of total cholesterol and total protein, as well as the development of atherosclerotic lesion did not differ between the two groups. There was no effect of frog meat on the concentrations of LDL-cholesterol, triacylglycerol, glucose, and total hepatic lipid, in both normo and hyperlipidic diets. In conclusion, frog meat was not shown to be beneficial in the prevention of cardiovascular diseases in diabetic animals and in hypercholesterolemic mice when compared to casein. It is necessary to accomplish further studies to compare the effect of frog meat with other types of meat, as well as using other animal models and humans.

## INTRODUÇÃO

A ranicultura teve início no Brasil em 1935 no Rio de Janeiro, chegando em São Paulo em 1939. Dados estimativos mostram que até 1992 estavam funcionando no país cerca de 600 ranários (Mello, 1995), sendo considerado o maior produtor do mundo de rãs em cativeiro (Silva, 1995). A *Rana catesbeiana*, conhecida popularmente como rã-touro ou touro-gigante, detém as melhores possibilidades de cultivo (Ferreira *et al.*, 1995). Estudos sobre a carne deste animal são escassos, mas sua composição centesimal apresentou um baixo teor lipídico e presença de proteínas de alto valor biológico (Noll & Lindau, 1987). Devido a esta característica, a carne de rã tem sido indicada terapêuticamente em casos de obesidade e doenças cardiovasculares (Peluzio *et al.*, 1995).

A prevalência de diabetes Mellitus no município de São Paulo no final dos anos 80 era de 9,6%, comparável às respectivas taxas de países desenvolvidos, tornando-se um problema de saúde pública (Moraes & Souza, 1996). Além disso, esta prevalência vem aumentando nos países em desenvolvimento nas últimas décadas. Este dado é preocupante, visto que essa doença acarreta complicações macrovasculares tais como doença cardiovascular, cerebrovascular e de vasos periféricos, aumentando de 2 a 4 vezes o risco de doença coronária, o que contribui para a queda da qualidade de vida, principalmente em idosos (Coeli *et al.*, 2002; ADA, 2003). Parte do

risco cardiovascular se deve ao desequilíbrio no metabolismo lipídico (ADA, 2003).

A evidência de que a redução do colesterol sérico reduz o risco de ataque cardíaco e infarto em pacientes com diabetes tipo II (Lindholm, 2003) estimula a procura por terapias que venham colaborar no controle da dislipidemia. A lipoproteína LDL-colesterol é vista como alvo primário para intervenção e HDL-colesterol como alvo importante para prevenção segundo ATP III (Third Adult Treatment Panel) (Ballantyne & Hoogeveen *et al.*, 2003).

Além das dislipidemias, outros fatores de risco imperam para as doenças cardiovasculares tais como o tabagismo, diabetes Mellitus, obesidade e sedentarismo (Cobb *et al.*, 2003).

O consumo de carne bovina está relacionado ao aumento da prevalência de doenças cardíacas (Fraser, 1999), como também com o aumento de custos destinados a saúde (Barnard *et al.*, 1995). No entanto, tal afirmativa tem encontrado resultados contraditórios (Nicklas *et al.*, 1995).

Esta ligação da carne com o risco cardiovascular pode estar relacionada, pelo menos em parte, com o perfil lipídico deste alimento. A maioria das carnes contém quantidades consideráveis de ácidos graxos saturados (Rowe *et al.*, 1997), o qual parece aumentar as concentrações séricas de LDL-colesterol e de triacilgliceróis plasmáticos (Rivellese *et al.*, 2003), apesar deste efeito ainda não estar bem definido (Lu & Lu, 2002).

Assim, objetivou-se no presente trabalho avaliar o efeito da carne de rã no metabolismo lipídico de ratos diabéticos e hipercolesterolêmicos.

## Referências Bibliográficas

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications. **Diabetes Care**. 26(1):S51-S61, 2003

BALLANTYNE, C.M.; HOOGEVEEN, R.C. Role of lipid and lipoprotein profiles in risk assessment and therapy. **American Heart Journal**. 146(2):227-232, 2003

BARNARD, N.D.; NICHOLSON, A.; HOWARD, J.L. The medical costs attributable to meat consumption. **Preventive Medicine**. 24:646-655, 1995

COBB, F.R.; KRAUS, W.E.; ROOT, M.; ALLEN J.D. Assessing risk for coronary heart disease: beyond Framingham. **American Heart Journal**. 146:572-580, 2003

COELI, M.C.; FERREIRA, L.G.F.D.; DRBAL, M.M.; VERAS, R.P.; JUNIOR, K.R.C.; CASCÃO, A.M. Mortalidade em idosos por diabetes Mellitus como causa básica e associada. **Revista Saúde Pública**. 36(2):135-140, 2002

FERREIRA, C.M.; FONTANELLO, D.; WIRZ, R.R. Ranicultura. In: 1<sup>st</sup>. INTERNATIONAL MEETING ON FROG RESEARCH AND TECHNOLOGY: VIII ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 1995, Viçosa. **Anais...** Viçosa/MG:ABETRA/UFV, 1995. p. 194

FRASER, G.E. Associations between diet and cancer, ischemic heart disease, and all-cause mortality in non-Hispanic white California Seventh-day Adventists. **American Journal of Clinical Nutrition**. 70(supl):532S-538S, 1999

LINDHOLM, H. Major benefits from cholesterol-lowering in patients with diabetes. **The Lancet**. 361:2000-2001, 2003

LU, Y.F.; LU, S. Influence of dietary fat saturation on lipid peroxidation of serum and low density lipoprotein in rats. **Nutrition Research**. 22:463-472, 2002

MELLO, S.C.R.P. Situação da ranicultura e do mercado de carne de rãs no Brasil. In: 1<sup>st</sup>. INTERNATIONAL MEETING ON FROG RESEARCH AND TECHNOLOGY: VIII ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 1995, Viçosa. **Anais...** Viçosa/MG:ABETRA/UFV, 1995. p. 15

MORAES, S.A.; SOUZA, J.M.P. Diabetes mellitus e doença isquêmica do coração: estudo tipo caso-controle. **Revista Saúde Pública**. 30(4):364-371, 1996

NICKLAS, T.A.; FARRIS, R.P.; MYERS, L.; BERENSON, G.S. Impact of meat consumption on nutritional quality and cardiovascular risk factors in young adults: The Bogalusa Heart Study. **The Journal of the American Dietetic Association**. 95(8):887-892, 1995

NOLL, I.B.; LINDAU, C.F., Aspectos da composição em nutrientes da carne de rã touro-gigante (*Rana catesbeiana*). **Caderno de Farmácia**. 3(1/2):29-36, 1987

PELUZIO, M.C.G.; FORATO, A.L.S.C.; COELHO, A.I.M.; SANT'ANA, H.M.P.; SABARENSE, C.M.; QUEIROZ, V.M.V.; AZEREDO, R.M.C.; CASTRO, F.A.F. Composição centesimal e avaliação nutricional da carne de rã. In: 1<sup>st</sup>. INTERNATIONAL MEETING ON FROG RESEARCH AND TECHNOLOGY: VIII ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 1995, Viçosa. **Anais...** Viçosa/MG:ABETRA/UFV, 1995. p. 127

RIVELLESE, A.A.; MAFFETTONE, A.; VESSBY, B.; UUSITUPA, M.; HERMANSEN, K.; BERGLUND, L.; LOUHERANTA, A.; MEYER, B.J.; RICCARDI, G. Effects of dietary saturated, monounsaturated and n-3 fatty acids on fasting lipoproteins, LDL size and post-prandial lipid metabolism in healthy subjects. **Atherosclerosis**. 167:149-158, 2003

ROWE, A.; BERTONI, S.A.; PEREIRA, P.L.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N.E. Colesterol em carnes bovinas, suínas, frangos e derivados de carnes comercializados em Maringá, Paraná, Brasil. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**. 47(3):282-284, 1997

SILVA, D.L. Mercado de rãs no Brasil. In: 1<sup>st</sup>. INTERNATIONAL MEETING ON FROG RESEARCH AND TECHNOLOGY: VIII ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 1995, Viçosa. **Anais...** Viçosa/MG:ABETRA/UFV, 1995. p. 23



## CAPÍTULO 1

### O PROCESSO ATEROSCLERÓTICO NO DIABETES MELLITUS E NA DISLIPIDEMIA: O PAPEL DA NUTRIÇÃO

#### Introdução

Pacientes com *diabetes Mellitus* apresentam duas a quatro vezes maior risco para infarto do que pacientes não diabéticos, como também maior propensão à doença vascular periférica (Crespin, 2001). Neste caso, tem sido sugerido que a hiperglicemia possa ser o fator contribuinte para acelerar o processo aterosclerótico, visto que altos níveis glicêmicos estão relacionados a várias anormalidade, tais como alterações na parede vascular (Death *et al.*, 2003), maior nível plasmático de LDL-colesterol (lipoproteína de baixa densidade) (Chang *et al.*, 2001), transporte transvascular de LDL-colesterol (Kornerup *et al.*, 2003), maiores níveis de triacilgliceróis e alterações estruturais nas partículas das lipoproteínas (Taskinen, 2003).

A doença cardíaca coronariana tem como uma das causas a aterosclerose, um processo caracterizado por disfunção endotelial, em associação com hipertensão, diabetes, tabagismo e deposição de colesterol em macrófagos e células musculares lisas na parede arterial, devido em parte, a desajustes no perfil lipídico sérico (Schaefer, 2002).

O papel das lipoproteínas no processo aterogênico, e assim como nas doenças cardiovasculares, tem sido amplamente estudado (Skalén *et al.*, 2002; Ballantyne & Hoogeveen, 2003; Zayas *et al.*, 2003).

Enquanto existe uma relação positiva entre LDL-colesterol e o colesterol total com as doenças cardiovasculares, o oposto é visto para o HDL-colesterol (lipoproteína de alta densidade) (Bermudez *et al.*, 2002).

A dieta exerce forte influência no perfil das lipoproteínas plasmáticas. Existem evidências que ácidos graxos saturados interferem negativamente, aumentando principalmente LDL-colesterol, enquanto ácidos graxos monoinsaturados reduzem os níveis de triacilgliceróis, colesterol total e a fração LDL-colesterol (Rivellese *et al.*, 2003), sendo ainda controversos os efeitos quanto ao HDL-colesterol (Sacks & Katan, 2002; Schaefer, 2002).

Tem sido demonstrado também que diferentes fontes protéicas exercem efeitos diferenciados no metabolismo lipídico, sendo este fato associado à sua composição aminoacídica. O mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não foi claramente elucidado (Sugiyama *et al.*, 1996; Jacobucci *et al.*, 2001; Gilani *et al.*, 2002; Beeleville, 2002).

Nesta revisão será discutido o efeito do lipídio e da proteína no metabolismo lipídico, como também os mecanismos pelos quais o diabetes e a dislipidemia levam à formação de placa aterosclerótica e assim, às doenças cardiovasculares.

## **Fontes protéicas e metabolismo lipídico**

Vários estudos têm investigado o efeito das proteínas no metabolismo lipídico (Gatchalian *et al.*, 1995; Madani *et al.*, 2000; Jacobucci *et al.*, 2001). A proteína de origem animal tem sido considerada hipercolesterolemiantes em relação a de origem vegetal (Gilani *et al.*, 2002; Kern *et al.*, 2002), mas a existência de controvérsias indica a necessidade de mais pesquisas nesse assunto (Gatchalian-Yee *et al.*, 1995; Jacobucci *et al.*, 2001). A proteína de soja parece reduzir VLDL colesterol (lipoproteína de muita baixa densidade) (Madani *et al.*, 2000) e colesterol total (Lu & Jian, 1997) quando comparada à caseína, mas os níveis de triacilgliceróis parecem não ser afetados. Porém, o

efeito hipercolesterolemiantes da caseína em relação à soja ainda é controverso (Gatchalian-Yee *et al.*, 1995). Quanto à proteína do soro, parece haver redução (Jacobucci *et al.*, 2001) ou não afetar o colesterol total em dieta aterogênica, mas naquelas dietas isentas de colesterol ela induziu aumento dos níveis séricos de colesterol total (Larson *et al.*, 1994). Quando foi utilizada gelatina como fonte protéica para alimentação de ratos adultos, esta reduziu os níveis tanto de triacilgliceróis quanto de colesterol total sérico quando comparado à caseína (Gilani *et al.*, 2002). Os níveis de LDL-colesterol também parecem ser influenciados pelo tipo de proteína consumida, sendo que a proteína do soro parece promover seu aumento (Larson *et al.*, 1994).

São poucos os estudos sobre o efeito da carne nas lipoproteínas em animais experimentais, mas a substituição de peixe por caseína ou por proteína de soja suplementada com metionina levou à redução dos níveis de colesterol total em trutas tratadas por 12 semanas (Kaushik *et al.*, 1995). Ensaio realizado em humanos apresentam resultados contraditórios com relação à carne. O consumo de carne de frango, carne vermelha, como também as processadas, verificado pela aplicação de questionário de frequência alimentar em 1045 indivíduos, foi relacionado positivamente com maiores níveis de LDL-colesterol (Fornés *et al.*, 2000). Contrariamente, a variação na quantidade consumida não relacionou com aumentos nos níveis séricos de triacilgliceróis, colesterol total e frações HDL e LDL (Nicklas *et al.*, 1995). Além disso, níveis de colesterol total e a fração LDL foram reduzidos após consumo de dieta hipocalórica, onde a fonte protéica primária era carne bovina magra ou frango sem pele, embora deva-se considerar que as participantes, classificadas como risco moderado devido ao nível de colesterol sérico, também realizavam atividade física (Melanson *et al.*, 2003).

O mecanismo pelo qual as proteínas interferem no metabolismo lipídico ainda necessita de muitas investigações, mas alguns estudos têm indicado o perfil aminoacídico como o responsável por tais efeitos (Sugiyama *et al.*, 1996; Gilani *et al.*, 2002; Belleville, 2002). Uma das hipóteses é quanto ao efeito hipercolesterolemiantes da metionina. Sugiyama *et al.*, (1996) encontraram correlação significativa entre os níveis séricos de colesterol e metionina, sendo esta refletida pela metionina da dieta. No entanto, a suplementação de isolado protéico de soja com metionina não aboliu seu efeito hipocolesterolemiantes em

ratos, quando foi oferecido dieta hiperlipídica com 1% de colesterol, sendo sugerido que a soja tenha outros componentes responsáveis pelo seu efeito hipocolesteremiante (Kern *et al.*, 2002). Existe evidência de que a proteína de soja aumenta a excreção fecal de esteróides, incluindo colesterol e ácidos biliares, o que causaria um aumento no metabolismo de colesterol por aumentar a síntese de ácidos biliares, mobilizando para isso o colesterol plasmático (Gilani *et al.*, 2002).

Além da metionina, outros aminoácidos presentes na dieta podem estar envolvidos no metabolismo lipídico. A taxa de lisina/arginina da dieta apresentou relação negativa com os níveis de colesterol plasmático em trutas recebendo dieta normolipídica (Kaushik *et al.*, 1995). Já a arginina sozinha parece ter relação com o metabolismo lipídico inibindo a formação de placa aterosclerótica via produção de óxido nítrico, mas tal efeito não foi confirmado pela sua maior ingestão (Venho *et al.*, 2002). Outro aspecto é o efeito hipercolesteremiante da alta taxa de metionina/glicina, o que ocorre com a caseína quando comparado à proteína de soja (Kern *et al.*, 2002). Existem também evidências de correlação positiva de tirosina, ácido glutâmico e prolina em ratos alimentados com dieta livre de colesterol e correlação negativa com cistina e alanina (Gilani *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos nos vários estudos citados demonstram que a proteína interfere no metabolismo lipídico, e assim pode manter relação com a prevenção ou aparecimento de doenças cardiovasculares. Como os estudos não são conclusivos, verifica-se a necessidade de mais investigações com o objetivo de se avaliar os mecanismos envolvidos no efeito de aminoácidos específicos no metabolismo lipídico.

### **A influência do tipo de gordura da dieta no metabolismo dos lipídios**

Diferentes tipos de óleos têm sido estudados quanto aos seus efeitos no perfil lipídico sérico, em virtude das diferenças de composição de ácidos graxos e a presença de fenóis (Gorinstein *et al.*, 2002). Foi verificado que nem sempre uma dieta hiperlipídica oferece maior risco de doenças cardiovasculares que a

hipolipídica, mas que este risco é dependente também do tipo de óleo consumido (Takahashi & Takahashi, 2000, Gaíva *et al.*, 2003).

Substâncias presentes em óleos vegetais parecem ter efeito inibidor na formação de placa aterosclerótica (Gorinstein *et al.*, 2002). Gorinstein *et al.* (2002) verificaram que compostos antioxidantes como os fenóis, e não o ácido graxo monoinsaturado (MUFA) oléico, são os principais fatores bioativos de óleos vegetais. Eles alimentaram ratos Wistar por quatro semanas com dieta enriquecida com colesterol e azeite de oliva ou somente colesterol ou azeite de oliva. O grupo que recebeu colesterol juntamente com azeite de oliva mostrou um efeito positivo do óleo vegetal no metabolismo de lipídios, sendo que os melhores resultados foram para aqueles animais que se alimentaram de óleo de oliva com maior teor de fenóis (óleo de oliva virgem). No entanto, nos animais que receberam dieta isenta de colesterol enriquecida com azeite de oliva não houve influência no metabolismo lipídico, demonstrando que tal efeito possa ocorrer somente em casos de hiperlipidemia. Apesar de não ter demonstrado efeito no metabolismo lipídico em animais que receberam dieta sem colesterol, foi verificado que todos os grupos apresentaram efeito antioxidante. Esse papel antioxidante do óleo de oliva foi confirmado pelo estudo de Ramírez-Tortosa *et al.* (1999).

Benkhalti *et al.* (2002) observaram que o efeito dos polifenóis do azeite de oliva na redução do colesterol estava associado à redução da enzima 3 hidroxil-3 metilglutaril CoA (HMG-CoA) e não na colesterol 7  $\alpha$ -hidroxilase. Por outro lado, a suplementação da dieta com 40% de ácido graxo saturado aumentou os níveis de RNAm da HMG-CoA sintase (Hegardt, 1998).

A influência benéfica do azeite de oliva demonstra ser potencializada quando ingerida com o óleo de peixe rico em ácido linolênico ( $\omega$ -3). Um estudo realizado com homens portadores de doença vascular periférica mostrou que o grupo que recebeu suplementação na dieta com azeite de oliva e óleo de peixe apresentou maior redução de triacilgliceróis plasmáticos quando comparado com o grupo que recebeu suplementação apenas de azeite de oliva, apesar de não haver diferença nos níveis de colesterol total e suas frações. Neste estudo também foi verificado que uma adequada ingestão de óleo de peixe com azeite de oliva promove uma diminuição na taxa de oxidação de LDL-colesterol se

comparado com ingestão de dieta enriquecida somente com óleo de peixe, rico em ácido graxo polinsaturado  $\omega$ -3 (Ramírez-Tortosa et al., 1999).

A potencialização que ocorre entre os tipos de lipídios foi constatada no estudo realizado por Gaíva *et al.* (2003), onde o consumo de óleo de soja e óleo de peixe na razão de 5:1, por ratos Wistar durante oito semanas, levou a uma menor razão colesterol total/HDL, quando comparado ao grupo que recebeu somente óleo de soja ou de peixe.

Tem sido sugerido que os ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), presentes no óleo de peixe estável (estabilidade adquirida através de uma mistura de tocoferóis), promovem redução dos triacilgliceróis plasmáticos e aumento dos níveis de HDL-colesterol, porém o LDL-colesterol parece não ser afetado (Liu *et al.*, 2001).

O efeito protetor dos ácidos graxos polinsaturados na aterosclerose ainda não está claro, pois esses são mais propícios à oxidação quando comparados com ácidos graxos saturados e monoinsaturados, sendo sugerido por Lu & Lu (2002) que a razão entre ácidos graxos polinsaturado/saturado seja de 0,64, não excedendo 1,21. No entanto, um estudo desenvolvido com pacientes hiperlipidêmicos mostrou que a redução de ácidos graxos saturados na dieta melhora o perfil lipídico plasmático, sendo que os menores resultados para colesterol total e LDL-colesterol foram obtidos quando os pacientes receberam um acréscimo de 4% de lipídios na forma monoinsaturada e polinsaturada, apesar de que este último elevou elevou as concentrações de triacilgliceróis plasmáticos (Mendis *et al.*, 2001). Ratos Sprague-Dawley tratados com dieta hiperlipídica (40% de lipídios) ou normolipídica (6% de lipídios), por oito semanas, apresentaram maiores níveis de triacilgliceróis quando a fonte lipídica era a gordura de coco, rica em ácidos graxos saturados, comparado com o grupo que recebeu óleo de canola e de milho ricos em ácidos graxos polinsaturados. Além disso, os valores de colesterol total também foram superiores no grupo que recebeu gordura de coco, tanto na dieta hipolipídica quanto hiperlipídica (Ellis *et al.*, 2002).

O mecanismo pelo qual o tipo de ácido graxo influencia no metabolismo lipídico está ligado ao estímulo ou inibição na síntese de enzimas. Ratos Wistar alimentados por 10 dias com dieta hiperlipídica enriquecidas com óleo de soja ou óleo de peixe, diminuíram a atividade da enzima  $\Delta$  9 desaturase, bem como

a quantidade de RNAm para esta enzima no fígado em ambos os tratamentos, sendo que a redução foi maior no grupo tratado com óleo de peixe (Løchsen *et al.*, 1997). PUFAs mostraram suprimir marcadamente a expressão do gene da esteroil-CoA dessaturase I (SCDI) *in vivo* (Ntambi, 1992), enquanto MUFAs e ácidos graxos saturados pareceram ineficazes quanto a este efeito (Landschultz *et al.*, 1994).

Estudos recentes têm identificado um papel da proteína ligante elemento de regulação de esterol (SREBP) como um modulador da transcrição de enzimas lipogênicas (Deng *et al.*, 2002; Duplus & Forest, 2002). SREPBs são sintetizados como precursores ligados a membranas do retículo endoplasmático, podendo ser ativadas pela depleção de colesterol na célula (Robinet *et al.*, 2003) e pela insulina (Deng *et al.*, 2002), apresentando como inibidores desta ativação ácidos graxos polinsaturados (Duplus & Forest, 2002). Além disso, o estudo realizado por Deng *et al.* (2002) mostrou que o efeito estimulatório da insulina na ativação de SREBP foi reduzido 62% quando hepatócitos isolados foram incubados com ácido eicosapentaenóico. Ao ser ativado, SREPB estimula síntese de enzimas que estão envolvidas na síntese e captação de colesterol, síntese e dessaturação de ácido graxo, síntese de triacilgliceróis e metabolismo de glicose. Entre as enzimas envolvidas estão a HMG-CoA redutase, acetil-CoA carboxilase, ácido graxo sintase e esteroil CoA desaturase 1 e 2 (Edwards *et al.*, 2000).

Verifica-se que mesmo óleos ricos em ácidos graxos polinsaturados apresentam respostas de diferentes graus. Óleos ricos em  $\omega$ -3 reduzem mais os níveis séricos de triacilglicerol e colesterol que os óleos ricos em  $\omega$ -6 (Takahashi & Takahashi, 2000; Gaíva *et al.*, 2003), porém em dieta hiperlipídica esse fato tem sido associado com o aumento na concentração de lipídios hepáticos e maior ganho de peso (Gaíva *et al.*, 2003).

Esses trabalhos mostram que o consumo balanceado de ácidos graxos saturados, polinsaturados e monoinsaturados pode ser um dos pontos-chave para prevenção de doenças cardiovasculares e que necessitam ainda mais estudos para se determinar a razão ideal no consumo deles.

## Diabetes mellitus e aterosclerose

Vários estudos têm citado o risco maior de indivíduos diabéticos desenvolverem aterosclerose quando comparados aos não diabéticos (Lin *et al.*, 2003; Death *et al.*, 2003; Kornerup *et al.*, 2003). As anormalidades nos níveis de triacilgliceróis, LDL-colesterol e HDL-colesterol contribuem para aumentar o risco aterosclerótico em pacientes com diabetes (Taskinen, 2003), sendo recomendado que o perfil lipídico seja determinada anualmente e, caso esteja com os valores séricos considerados fora de risco, esse período pode ser prolongado para dois anos (ADA, 2004).

A dislipidemia diabética é caracterizada por elevados níveis de triacilgliceróis e baixos níveis de HDL-colesterol (Taskinen, 2002). As concentrações de LDL-colesterol podem estar em níveis normais, mas geralmente estas lipoproteínas estão alteradas em tamanho, encontrando-se pequenas e densas (ADA, 2003). Além disso, pequenas elevações na glicemia podem causar disfunção endotelial, podendo predispor ao início do processo aterogênico (França, 2002).

A hipertrigliceridemia, quando derivada principalmente do aumento de VLDL-colesterol, leva ao aumento da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP), mediando troca de lipídios entre LDL e partículas de triacilgliceróis, formando assim partículas de LDL ricas em triacilgliceróis, as quais são hidrolizadas pela lipase hepática (LH), formando partículas de LDL menores e mais densas. Estas, por sua vez, têm maior capacidade de penetrar na parede da íntima do vaso como também são mais expostas à oxidação, sendo facilmente captadas pelos macrófagos formando as células espumosas (Taskinen, 2003). A internalização da LDL-colesterol na parede vascular foi verificada em maior grau em indivíduos diabéticos quando comparado aos não diabéticos, apesar deste maior escape transvascular não correlacionar com o menor tamanho e maior densidade das partículas de LDL-colesterol (Kornerup *et al.*, 2003).

Segundo Death *et al.* (2003), a maior internalização pode também estar ligada a alterações na síntese e atividade das metaloproteinases (enzimas que degradam a matriz celular) produzidas pelas células endoteliais e macrófagos. Foi visto que células humanas submetidas a cultura hiperglicêmica



apresentaram aumento nos níveis de RNAm, na concentração e na atividade das metaloproteinases, sem alterar as enzimas inibidoras dessa enzima e isto é acreditado alterar a resistência da parede endotelial à passagem de monócitos. Poderia, desta forma, levantar a hipótese sobre a maior passagem de partículas de LDL-colesterol em indivíduos diabéticos.

Outra alteração que predispõe a LDL-colesterol, principalmente no diabético, a ter maior poder aterogênico é sua glicosilação, que ocorre através de reações não enzimáticas entre a glicose e a lisina da apoB, em uma taxa linearmente relacionada a concentração de glicose plasmática (Zimmermann *et al.*, 2001; Taskinen, 2002). A LDL-colesterol glicosilada é diferente da LDL nativa não só pela alteração da estrutura da apoB como também na composição de lipídios (Keren *et al.*, 2001). Os macrófagos parecem ter relação com o poder aterogênico da LDL-glicosilada por expressarem maiores níveis de lipase lipoprotéica (LPL), visto que esta enzima tem mostrado aumentar a ligação e captação de LDL glicosilada pelos macrófagos. Além disso, uma vez glicosilada a LDL se torna alvo para modificações oxidativas tornando-se menos reconhecidas pelos LDL-R (receptor de LDL ou receptor B/E) que a LDL normal, justificando o maior risco dos diabéticos desenvolverem a placa aterosclerótica (Zimmermann *et al.*, 2001; Mead & Ramji, 2002).

O papel da LPL como pró-aterogênica ainda necessita de mais estudos, mas acredita-se que quando secretada pelas células musculares e adipócitos exercem efeito protetor na formação da placa aterosclerótica, e quando produzidas por macrófagos exercem efeito contrário (Mead & Ramji, 2002).

Em relação ao colesterol HDL, seu nível reduzido em pacientes com diabetes Mellitus é acompanhado pela redução no tamanho da partícula e isto parece estar relacionado à transferência aumentada de triacilgliceróis para essa lipoproteína, favorecida pela hipertrigliceridemia e pela alta atividade da CETP, o que leva ao maior catabolismo da HDL e sua redução na circulação (Taskinen, 2003). A hiperglicemia em indivíduos diabéticos, mesmo que em curto período, tem papel importante no aumento da atividade da CETP, como também da lecitina: acil transferase (LCAT). Por sua vez, a alteração da CETP tem sido correlacionada positivamente com a quantidade de éster de colesterol

da LDL-colesterol, indicando ser esta partícula a principal receptora da troca realizada com o HDL-colesterol (Chang *et al.*, 2001).

Apesar da afirmação que pacientes diabéticos possuem risco aumentado de morbidade e mortalidade cardiovascular (Lindholm, 2003), ainda é controverso se o diabetes Mellitus possui um papel independente na produção da doença isquêmica do coração (Moraes & Souza, 1996).

## **Dislipidemia e aterosclerose**

Existe um vínculo bem estabelecido entre dislipidemia e aterosclerose, sendo recomendado pelo *National Cholesterol Education Program Painel III* (NCEP III, 2001) que todos os adultos acima de 20 anos tenham seu perfil lipídico determinado. Além disso, esse programa estabeleceu uma classificação com valores recomendados e com limite de normalidade para as lipoproteínas e triacilgliceróis (Tabela 1).

O aumento de triacilgliceróis, a redução do HDL-colesterol e a presença de LDL modificada tem sido associada com disfunção endotelial e cada uma apresenta relação com a formação do ateroma. O risco de doença arterial coronariana aumenta significativa e progressivamente quando o colesterol total e sua fração de LDL estão acima dos valores desejáveis e quando HDL-colesterol está abaixo do ideal (Taskinen, 2003). Existe clara evidência de que a redução de colesterol pela terapia com estatinas diminui o risco de ataque cardíaco, infarto e revascularizações (Lindholm, 2003), o que comprova o papel dessa lipoproteína em doenças cardiovasculares.

O LDL-colesterol elevado parece ser a maior causa de doença cardíaca coronária, sendo colocado como alvo primário na terapia do NCEP III (2001), mas a implicação desta lipoproteína não está somente em seus níveis mas em modificações que a mesma possa sofrer tornando-a mais aterogênica. Pacientes acometidos com doença coronariana parecem apresentar partículas de LDL-colesterol em menor tamanho (Schaefer, 2002). Além disso, tem sido sugerido que a elevada taxa de aterosclerose associada com diabetes tem relação com alterações no LDL-colesterol, como redução no tamanho, aumento da densidade, glicosilação e neste caso, maior propensão à oxidação levando

ao desenvolvimento de placa aterosclerótica (Taskinen, 2002). Tanto a oxidação quanto a glicosilação interferem na atividade regulatória dos macrófagos em fagocitar somente quantidade de lipídios adequada à capacidade de metabolização, possibilitando a formação de células espumosas e modificando suas características até levá-los à morte. Por sua vez, as células espumosas liberam citocinas, tornando-se quimiotática para monócitos, células musculares lisas e neutrófilos (França, 2002).

Tabela 1 – Classificação do triacilgliceróis, colesterol total e frações HDL e LDL plasmáticos (mg/dL), segundo NCEP III (NCEP III, 2001)

<b>LDL-colesterol</b>	
<100	Ótimo
100-129	Abaixo do ótimo
130-159	Limítrofe
160-189	Alto
≥190	Muito alto
<b>Colesterol total</b>	
<200	Desejável
200-239	Limítrofe
≥240	Alto
<b>HDL-colesterol</b>	
<40	Baixo
≥60	Desejável
<b>Triacilgliceróis</b>	
<150	Normal
150-199	Limítrofe
200-499	Alto
≥500	Muito alto

O papel protetor conferido ao HDL-colesterol se deve à sua função desempenhada no transporte reverso de colesterol, o qual consiste em quatro etapas: efluxo de colesterol das membranas celulares para as partículas de HDL-colesterol, esterificação deste colesterol pela enzima LCAT, transferência dos ésteres de colesterol formados para partículas de VLDL e LDL-colesterol com a contribuição da CETP e, finalmente, a entrega dos ésteres de colesterol ao fígado (Montoya *et al.*, 2002), que ocorre via HDL, LDL ou VLDL-colesterol

(Schaefer, 2002). Além disso, o HDL-colesterol exerce um importante papel através da inibição direta do processo pró-aterogênico na parede arterial, incluindo inibição da oxidação da LDL-colesterol, prevenção da quimiotaxia e adesão de monócitos, redução na formação de macrófagos e inibição da disfunção endotelial e apoptose (Rashid *et al.*, 2003).

Em relação às lipoproteínas ricas em triacilgliceróis, tem-se sugerido seu uso na avaliação de risco cardiovascular em conjunto com outras modificações lipídicas tais como redução do HDL-colesterol e análise da razão LDL/HDL. Indica-se também a soma de VLDL + LDL-colesterol, identificado como colesterol não-HDL, como alvo secundário de terapia em indivíduos com alto triacilgliceróis (NCEP III, 2001). Os níveis de colesterol não-HDL foram positivamente associados com estria gordurosa e aumento da lesão na aorta e artéria coronária (McGill *et al.*, 2000). Por outro lado, os níveis de apoB têm sido indicados como os melhores marcadores de risco porque seu nível reflete, além do LDL-colesterol, os níveis de outras lipoproteínas aterogênicas tais como VLDL-colesterol e colesterol IDL (lipoproteína de densidade intermediária) (Ballantyne & Hoogeveen, 2003).

Outro fator de risco que vem sendo considerado como independente refere-se à concentração de lipoproteína A, Lp(a), que quando elevado (>25mg/dL) predispõe à aterogênese. Esta lipoproteína, que apresenta apo (a) ligada à apoB-100, tem estrutura semelhante à LDL-colesterol e também à molécula do plasminogênio, competindo com este por seus receptores (Ramires *et al.*, 1997). O mecanismo envolvido com seu efeito parece estar relacionado à forte interação com a fibronectina, a qual está presente nas lesões ateroscleróticas iniciais. Uma vez na camada subendotelial, a Lp(a) interage com os componentes da matriz conjuntiva, é modificada, servindo como ligante para receptores *scavenger* de macrófagos, o que contribui para formação de estria gordurosa (Zayas *et al.*, 2003).

Portanto, após as colocações, o perfil lipídico pode ser considerado um alvo para prevenção e terapia de doenças cardiovasculares.

## Conclusões

Pode-se concluir que o metabolismo lipídico está sob influência da dieta e que o balanço entre os ácidos graxos saturados, monoinsaturados e polinsaturados é importante fator a ser considerado na prevenção e terapêutica de doenças cardiovasculares.

Quanto à proteína, foi visto que as de origem animal nem sempre apresentam efeito negativos quando comparado àquelas de origem vegetal e que entre as de origem animal também ocorrem efeitos diferentes. A influência deste nutriente pode estar relacionada ao perfil aminoacídico, mas os mecanismos envolvidos ainda necessitam de maiores esclarecimentos.

A relação do diabetes e da dislipidemia com a aterosclerose, e assim com o aparecimento de doenças cardiovasculares, está bem definida como um fator de risco, sendo que no diabetes Mellitus a interrelação envolve tanto o desequilíbrio nas concentrações de partículas de lipoproteínas como alterações estruturais a que as mesmas estão predispostas.

## Referências Bibliográficas

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Dyslipidemia management in adults with diabetes. **Diabetes Care**. 27(1):S68-S71, 2004

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Management of dyslipidemia in adults with diabetes. **Diabetes Care**. 26(1):S83-S86, 2003

BALLANTYNE, C.M.; HOOGEVEEN, R.C. Role of lipid and lipoprotein profiles in risk assessment and therapy. **American Heart Journal**. 146(2):227-232, 2003

BELLEVILLE, J. Hypocholesterolemic effect of soy protein. **Nutrition**. 18:684-685, 2002

BENKHALTI, F.; PROST, J.; PAZ, E.; PEREZ-JIMENEZ, F.; EL MOFADAR, C.; EL BOUSTANI, E. Effects of feeding virgin olive oil or their polyphenols on lipid of rat liver. **Nutrition Research**. 22:1067-1075, 2002

BERMUDEZ, O.I.; VELEZ-CARRASCO, W.; SCHAEFER, E.J.; TUCKER, K.L. Dietary and plasma lipid, lipoprotein, and apolipoprotein profiles among elderly Hispanics and non-Hispanics and their association with diabetes. **American Journal of Clinical Nutrition**. 76:1214-1221, 2002

CHANG, C.K.; TSO, T.K.; SNOOK, J.T.; HUANG, Y.S.; LOZANO, R.A.; ZIPF, W.B. Cholesteryl ester transfer and cholesterol esterification in type 1 diabetes: relationships with plasma glucose. **Acta Diabetologica**. 38:37-42, 2001

CRESPIN, S.R. What does the future hold for diabetic dyslipidaemia? **Acta Diabetologica**. 38:S21-S26, 2001

DEATH, A.K.; FISHER, E.J.; McGRATH, K.C.Y.; YUE, D.K. High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: potential impact on atherosclerosis in diabetes. **Atherosclerosis**. 168:263-269, 2003

DENG, X.; CAGEN, L.M.; WILCOX, H.G.; PARK, E.A. Regulation of rat SREBP-1c promoter in primary rat hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 290:256-262, 2002

DUPLUS, E.; FOREST, C. Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription? **Biochemical Pharmacology**. 64:893-901, 2002

EDWARDS, P.A.; TABOR, D.; KAST, H.R. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1529:103-113, 2000

ELLIS, J.; LAKE, A.; HOOVER-PLOW, J. Monounsaturated canola oil reduces fat deposition in growing female rats fed a high or low fat diet. **Nutrition Research**. 22:609-621, 2002

FORNÉS, N.S.; MARTINS, I.S.; HERNAN, M.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G.; ASCHERIO, A. Frequência de consumo alimentar e níveis séricos de lipoproteínas na população de Cotia, SP, Brasil. **Revista Saúde Pública**. 34(4):380-387, 2000

FRANÇA, H.H. O paradoxo da doença coronariana. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. 79(4):419-421, 2002

GAÍVA, M.H.; COUTO, R.C.; OYAMA, L.M.; COUTO, G.E.C.; SILVEIRA, V.L.F.; RIBEIRO, E.B.; NASCIMENTO, C.M.O. Diets rich on polyunsaturated fatty acids: effect on hepatic metabolism in rats. **Nutrition**. 19:144-149, 2003

GATCHALIAN-YEE, M.; IMAMURA, M.; NONAKA, M.; YAN GU, J.; SUGANO, M. Effects of different dietary fats and proteins on cholesterol metabolism and eicosanoid production in hamsters. **Nutrition Research**. 15(8):1149-1158, 1995

GILANI, G.S.; RATNAYAKE, N.; BROOKS, S.P.J.; BOTTING, H.G.; PLOUFFE, L.J.; LAMPI, B.J. Effects of dietary protein and fat on cholesterol and fat metabolism in rats. **Nutrition Research**. 22:297-311, 2002

GORINSTEIN, S.; LEONTOWICZ, H.; LOJEK, A.; LEONTOWICZ, M.; CIZ, M.; KRZEMINSKI, R.; GRALAK, M.; CZERWINSKI, J.; JASTRZEBSKI, Z.; TRAKHTENBERG, S.; GRIGELMO-MIGUEL, N.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTIN-BELLOSO, O. Olive oils improve lipid metabolism and increase antioxidant potential in rats fed diets containing cholesterol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50:6102-6108, 2002

HEGARDT, F.G. Transcriptional regulation of mitochondrial HMG-CoA sintase in control of ketogenesis. **Biochemistry**. 80:803-806, 1998

JACOBUCCI, H.B.; SGARBIERI, V.C.; DIAS, N.F.G.P.; BORGES, P.; TANIKAWA, C. Impact of different dietary protein on rat growth, blood serum lipids and protein and liver cholesterol. **Nutrition Research**. 21: 905-915, 2001

KAUSHIK, S.J.; CRAVEDI, J.P.; LALLES, J.P.; SUMPTER, J.; FAUCONNEAU, B.; LAROCHE, M. Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**. 133:257-274, 1995

KEREN, P.; GEORGE, J.; KEREN, G.; HARATS, D. Non-obese diabetic (NOD) mice exhibit an increased cellular immune response to glycated-LDL but are resistant to high fat diet induced atherosclerosis. **Atherosclerosis**. 157:285-292, 2001

KERN, M.; ELLISON, D.; MARROQUIN, Y.; AMBROSE, M.; MOSIER, K. Effects of soy protein supplemented with methionine on blood lipids and adiposity of rats. **Nutrition**. 18:654-656, 2002

KORNERUP, K.; NORDESTGAARD, B.G.; FELDT-RASMUSSEN, B.; BORCH-JOHNSEN, K.; JENSEN, K.S.; JENSEN, J.S. Increased transvascular low density lipoprotein transport in insulin dependent diabetes: a mechanistic model for development of atherosclerosis. **Atherosclerosis**. 170:163-168, 2003

LANDSCHULTZ, K.T. Transcriptional control of the estearoyl-CoA desaturase-1 gene by polyunsaturated fatty acids. **Biochemical and Biophysical research Communications**, 200: 763-768, 1994

LARSON, M.R.; WILSON, C.; POTTER, S.M. The role of dietary protein source in the development of cholesterol metabolism in rabbits. **Journal Nutritional Biochemistry**. 5:232-237, 1994

LIN, R.Y.; CHOUDHURY, R.P.; CAI, W.; LU, M.; FALLON, J.T.; FISHER, E.A.; VLASSARA, H. Dietary glycotoxins promote diabetic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Atherosclerosis**. 168:213-220, 2003

LINDHOLM, H. Major benefits from cholesterol-lowering in patients with diabetes. **The Lancet**. 361:2000-2001, 2003

LIU, M.; WALLIN, R.; SALDEEN, T. Effect of bread containing stable fish oil on plasma phospholipid fatty acids, triglycerides, HDL-cholesterol, and malondialdehyde in subjects with hyperlipidemia. **Nutrition Research**. 21:1403-1410, 2001

LØCHSEN, T.; ORMSTAD, H.; BRAUD, H. BRODAL, B.; CHRISTIANSEN, E.N.; OSMUNDSEN, H. Effects of fish oil and n-3 fatty acids on the regulation of  $\Delta^9$ -fatty acid desaturase mRNA and -activity in rat liver. **Journal Nutritional Biochemistry**. 8:408-413, 1997)

LU, Y.F.; JIAN, M.R. Effects of soy protein and casein on lipid metabolism in mature and suckling rats. **Nutrition Research**. 17(8):1341-1350, 1997

LU, Y.F.; LU, S. Influence of dietary fat saturation on lipid peroxidation of serum and low density lipoprotein in rats. **Nutrition Research**. 22:463-472, 2002

MADANI, S.; PROST, J.; BELLEVILLE, J. Dietary protein level and origin (casein and highly purified soybean protein) affect hepatic storage, plasma lipid transport, and antioxidative defense status in the rat. **Nutrition**. 16:368-375, 2000

McGILL, H.C.; McMAHAN, C.A.; HERDERICK, E.E.; MALCOM, G.T.; TRACY, R.E.; STRONG, J.P. Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence. **American Journal of Clinical Nutrition**. 72(supl):1307S-1315S, 2000

MEAD, J.R.; RAMJI, D.P. The pivotal role of lipoprotein lipase in atherosclerosis. **Cardiovascular Research**. 55:261-269, 2002

MELANSON, K.; GOOTMAN, J.; MYRDAL, A.; KLINE, G.; RIPPE, J.M. Weight loss and total lipid profile changes in overweight women consuming beef or chicken as the primary protein source. **Nutrition**. 19:409-414, 2003

MENDIS, S.; SAMARAJEWA, U.; THATTIL, R. O. Coconut fat and serum lipoproteins: effects of partial replacement with unsaturated fats. **British Journal of Nutrition**. 85:583-589, 2001

MONTOYA, M.T.; PORRES, A.; SERRANO, S.; FRUCHART, J.C.; MATA, P.; GERIQUE, J.A.G.; CASTRO, G.R. Fatty acid saturation of the diet and plasma lipid concentrations, lipoprotein particle concentrations, and cholesterol efflux capacity. **American Journal of Clinical Nutrition**. 75:484-491, 2002

MORAES, S.A.; SOUZA, J.M.P. Diabetes mellitus e doença isquêmica do coração: estudo tipo caso-controle. **Revista Saúde Pública**. 30(4):364-371, 1996

NCEP III - NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM. Third Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol Adults (ATP-III). NIH Publication nº. 01-3670. Bethesda, MD: National Institute of Health, 2001



NICKLAS, T.A.; FARRIS, R.P.; MYERS, L.; BERENSON, G.S. Impact of meat consumption on nutritional quality and cardiovascular risk factors in young adults: The Bogalusa Heart Study. **Journal of The American Dietetic Association**. 95(8):887-892, 1995

NTAMBI, J.M. Dietary regulation of stearoyl-CoA desaturase I gene expression in mouse liver. **Journal of Biological Chemistry**. 267: 10925-10930, 1992.

RAMIREZ, J.A.F.; SPÓSITO, A.C.; MANSUR, A.P.; SOLIMENE, M.C.; CHAMONE, D.; LUZ, P.L.; PILEGGI, F. O genfibrozil reduz níveis elevados de lipoproteína (a) em pacientes hipercolesterolêmicos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 68(4), 1997

RAMÍREZ-TORTOSA, C.; LÓPEZ-PEDROSA, J.M.; SUAREZ, A.; ROS, E.; MATAIX, J.; GIL, A. Olive oil – and fish oil – enriched diets modify plasma lipids and susceptibility of LDL to oxidative modification in free-living male patients with peripheral vascular disease: the Spanish Nutrition Study. **British Journal of Nutrition**. 82:31-39, 1999

RASHID, S.; WATANABE, T.; SAKAUE, T.; LEWIS, G.F. Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemic states: the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity. **Clinical Biochemistry**. 36:421-429, 2003

RIVELLESE, A.A.; MAFFETTONE, A.; VESSBY, B.; UUSITUPA, M.; HERMANSEN, K.; BERGLUND, L.; LOUHERANTA, A.; MEYER, B.J.; RICCARDI, G. Effects of dietary saturated, monounsaturated and n-3 fatty acids on fasting lipoproteins, LDL size and post-prandial lipid metabolism in healthy subjects. **Atherosclerosis**. 167:149-158, 2003

ROBINET, P.; VÉDIE, B.; CHIRONI, G.; GARIÉPY, J.; SIMON, A.; MOATTI, N.; PAUL, J.L. Characterization of polymorphic structure of SREBP-2 gene:role in atherosclerosis. **Atherosclerosis**. 168:381-387, 2003

SACKS, F.M.; KATAN, M. Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease. **The American Journal of Medicine**. 113(9B):13S-24S, 2002

SCHAEFER; E.J. Lipoproteins, nutrition, and heart disease. **American Journal of Clinical Nutrition**. 75:191-212, 2002

SKALEN, K.; GUSTAFSSON, M.; RYDBERG, E.K.; HULTÉN, L.M.; WIKLUND, O.; INNERARITY, T.L.; BORÉN, J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. **Nature**. 417:750-754, 2002

SUGIYAMA, K.; KANAMORI, H.; AKACHI, T.; YAMAKAWA, A. Amino acid composition of dietary proteins affects plasma cholesterol concentration through alteration of hepatic phospholipid metabolism in rats fed a cholesterol-free diet. **Journal Nutritional Biochemistry**. 7:40-48, 1996

TAKAHASHI, Y.; TAKASHI, I. Dietary *n*-3 fatty acids affect mRNA level of brown adipose tissue uncoupling protein 1, and white adipose tissue leptin and glucose transporter 4 in the rat. **British Journal of Nutrition**. 84:175-184, 2000

TASKINEN, M.R. Controlling lipid levels in diabetes. **Acta Diabetologica**. 39:S29-S34, 2002

TASKINEN, M.R. LDL-cholesterol, HDL-cholesterol or triglycerides – which is the culprit? **Diabetes Research and Clinical Practice**. 61:S19-S26, 2003

VENHO, B.; VOUTILAINEN S.; VALKONEN, V.P.; VIRTANEN, J.; LAKKA, T.A.; RISSANEN, T.H.; OVASKAINEN, M.L.; LAITINEN, M.; SALONEN, J.T. Arginine intake, blood pressure, and the incidence of acute coronary events in men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. **American Journal of Clinical Nutrition**. 76:359-364, 2002

ZAYAS, L.E.A.; ROCA, G.P.; BETANCOURT, A.A. Lipoproteína (A): Estructura, metabolismo, genética y mecanismos patogénicos. **Revista Cubana Investigaciones Biomédicas**. 22(1):32-40, 2003

ZIMMERMANN, R.; PANZENBÖCK, U.; WINTERSPERGER, A.; LEVAK-FRANK, S.; GRAIER, W.; GLATTER, O.; FRITZ, G.; KOSTNER, G. M.; ZECHNER, R. Lipoprotein lipase mediates the uptake of glycated LDL in fibroblasts, endothelial cells, and macrophages. **Diabetes**. 50:1643-1653, 2001

## **CAPÍTULO 2**

### **EFEITOS DA CARNE DE RÃ-TOURO (*Rana catesbeiana*) EM RATOS DIABÉTICOS**

#### **Introdução**

O consumo aumentado de carnes guarda forte relação com o aumento na ingestão de ácidos graxos saturados (Nicklas *et al.*, 1995; Melanson *et al.*, 2003). Por sua vez, uma grande ingestão de ácidos graxos saturados em indivíduos diabéticos e não diabéticos promove aumento do LDL-colesterol (lipoproteína de baixa densidade) e a redução na ingestão de gordura saturada e colesterol reduz os níveis de LDL-colesterol e de colesterol total. Por outro lado, ácidos graxos polinsaturados e monoinsaturados parecem oferecer efeitos contrários (Howard, 2002). Tais influências, quanto aos tipos de ácidos graxos e sua quantidade exercendo efeito sobre o metabolismo das lipoproteínas, levaram a definição das recomendações nutricionais para os indivíduos saudáveis e diabéticos. Assim, a Associação Americana de Diabetes recomenda que menos de 10% da ingestão energética seja derivada dos ácidos graxos saturados, e em casos de LDL-colesterol acima de 100mg/dL a redução para 7% pode ser benéfica. Quanto à ingestão de colesterol, esta deve ser menor que 300 mg/dL ou 200 mg/dL em casos de LDL-colesterol acima de 100 mg/dL (ADA, 2003). Estas recomendações são baseadas no fato de que pacientes diabéticos apresentam incidência aumentada de doenças

cardiovasculares (Lindholm, 2003). Tem sido sugerido que uma exposição prolongada à hiperglicemia levaria ao aumento do estresse oxidativo, que promoveria a glicosilação de lipoproteínas, principalmente LDL-colesterol. Uma vez glicosilada, esta lipoproteína aumenta sua suscetibilidade à oxidação e, conseqüentemente, à captação por macrófagos, contribuindo para maior risco de desenvolvimento de placa aterosclerótica (Kuyvenhoven & Meinders, 1999; Zimmermann *et al.* 2001). Outro fator que pode contribuir para este processo aterosclerótico é a defesa anti-oxidante do indivíduo, visto que pacientes diabéticos têm demonstrado menor teor de glutathione peroxidase (anti-oxidante intracelular) e teor aumentado de malondialdeído (produto final de peroxidação de ácidos graxos polinsaturados), em eritrócitos (Kuyvenhoven & Meinders, 1999).

Visando atender às recomendações nutricionais para prevenir ou tratar as dislipidemias, tem sido sugerido o consumo de carnes magras, o que tem levado a bons resultados, principalmente quando conjugado à prática de atividade física (Beauchesne-Rondeau *et al.*, 2003; Melanson *et al.* 2003).

Mesmo apresentando boa aceitabilidade e sendo indicada na terapia das doenças cardiovasculares e da obesidade (Azevedo & Oliveira, 1988; Pelúzio *et al.*, 1995), ainda não foram demonstrados efeitos metabólicos da carne de rã em modelos experimentais e no homem.

Assim, o presente estudo teve como objetivo verificar o efeito da carne de rã-touro (*Rana catesbeiana*) sobre parâmetros morfométricos, bioquímicos e histológicos de animais diabéticos e não diabéticos.

## **Material e Métodos**

### ***Animais e dietas***

Foram utilizados 45 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) adultos, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram divididos em quatro grupos de maneira que as médias dos pesos entre eles ficassem semelhantes.

Foram utilizadas dietas semi-purificadas (AIN-93M), sendo sua composição baseada na formulação recomendada pelo *American Institute of Nutrition* (Reeves, 1993) modificada para fornecer 20% de proteína derivada de caseína (AIN-93M) ou de carne de rã desidratada (AIN-93M sem caseína e com carne de rã).

Os quatro grupos formados foram divididos aleatoriamente em grupo C (animal não diabéticos recebendo dieta AIN-93M), D (animal diabético recebendo dieta AIN-93M), R (animal não diabético recebendo dieta AIN-93M com carne de rã) e DR (animal diabético recebendo dieta AIN-93M com carne de rã). A composição das dietas experimentais é apresentada na Tabela 1. As dietas foram preparadas semanalmente e estocadas a 4°C até o momento da distribuição nos comedouros. Os animais foram mantidos por 28 dias em gaiolas individuais em ambiente com fotoperíodo de 12 horas e temperatura entre 22 e 24°C no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde/UFV. O oferecimento de água (destilada) e das respectivas dietas foi *ad libitum*.

Cada grupo foi composto por 10 animais, mas sabendo que a estreptozotocina e/ou o desequilíbrio metabólico leva à morte dos animais, foram incluídos mais 2 animais no grupo D e 3 no grupo DR.

O consumo alimentar e o peso corporal dos animais foram registrados semanalmente.

As rãs foram adquiridas da Anfigranja Tambiu, em Ponte Nova, Minas Gerais, em janeiro de 2003, sendo o peso médio de 104 g por animal. A carne chegou congelada, eviscerada e sem pele.

A carne foi desossada e desidratada em estufa de circulação de ar, por 8 horas, com temperatura variando de 68 a 70°C. Posteriormente, foi triturada em multiprocessador e peneirada para obtenção da farinha, a qual foi armazenada em saco plástico em geladeira, à temperatura de 4°C, até o preparo da dieta.

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais

Ingredientes	Dietas (g/kg)			
	C	D	R	DR
Amido de milho*	368,86	368,86	372,88	372,88
Caseína**	236,84	236,84	-	-
Carne de rã	-	-	232,81	232,81
Amido de milho dextrinizado**	155,00	155,00	155,00	155,00
Sacarose*	100,00	100,00	100,00	100,00
Óleo de soja*	40,00	40,00	40,00	40,00
Fibras (celulose microfina)**	50,00	50,00	50,00	50,00
Mistura mineral**	35,00	35,00	35,00	35,00
Mistura vitamínica**	10,00	10,00	10,00	10,00
L-cistina**	1,80	1,80	1,80	1,80
Bitartarato de colina**	2,50	2,50	2,50	2,50

\* Adquiridos no comércio local.

\*\* Adquiridos pela Rhoster Indústria e Comércio LTDA.

C = não diabéticos com dieta AIN-93M; D= diabético com dieta AIN-93M; R= não diabéticos com dieta AIN-93M com carne de rã; DR= diabéticos com dieta AIN-93M com carne de rã.

### ***Determinação da composição centesimal da carne de rã e determinação do teor protéico da caseína***

O teor de proteínas, lipídios, cinzas e umidade da carne de rã sem osso, assim como o teor protéico da caseína foram determinados segundo o método da AOAC (1984).

### ***Indução do diabetes mellitus***

Foi utilizada estreptozotocina (Sigma Chemical, St Louis, MO), na dose de 50mg/kg de peso, para a indução de diabetes nos animais. A droga foi previamente diluída em solução salina (0,9%) de acordo com o peso do animal, sendo injetada na dose de 100µL, na veia peniana, após jejum de 14 horas. Nos animais dos grupos sadios foi aplicada solução salina utilizando o mesmo procedimento.

Após 48 horas da primeira aplicação da droga foi dosada a glicemia dos animais com glicosímetro (marca Advantage), após jejum de 12 horas, utilizando-se uma gota de sangue retirada por punção da cauda. Os animais que apresentaram glicemia abaixo de 200mg/dL receberam uma segunda dose da droga na mesma diluição, porém com aplicação intraperitoneal.

O desenvolvimento do diabetes foi monitorado por meio de sintomas como polidipsia, polifagia e poliúria, e após 7 dias da primeira aplicação da droga foi confirmado o diagnóstico pela análise da glicemia em glicosímetro.

A glicemia foi avaliada semanalmente, utilizando-se o mesmo procedimento já descrito acima.

### ***Preparo das amostras***

Ao final do período experimental, os animais foram mantidos em jejum de 12 horas e sacrificados com CO<sub>2</sub>. Após abertura torácica e abdominal, as amostras sanguíneas foram coletadas por punção cardíaca, centrifugadas a 2368,8g durante 15 minutos e mantidas sob refrigeração por no máximo 72 horas. O soro foi utilizado para determinar as concentrações de triacilgliceróis, albumina, proteínas totais e do colesterol total e suas frações (HDL e LDL-colesterol).

Após pesagem, o fígado foi lavado em solução salina (0,9%). O lobo caudado foi retirado e fixado para análises histológicas e o restante do fígado foi armazenado em recipiente plástico, sendo congelado para posterior análise da deposição lipídica tecidual.

Foi também retirado o fêmur direito de cada animal para pesagem e assim, verificação de possível alteração quantitativa do tecido ósseo.

### ***Análise dos constituintes sanguíneos***

As análises dos constituintes sanguíneos foram realizadas no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFV.

Foram analisados na amostra de soro os triacilgliceróis, a albumina, as proteínas totais, a glicose, o colesterol total e as frações HDL e LDL-colesterol através de kits da marca BioMérieux, utilizando-se o equipamento de dosagens multiparamétrico de Bioquímica (Alizé, Mod Lisabio B.652).

As concentrações de colesterol total foram determinadas enzimaticamente de acordo com Allain *et al.* (1974) e a de triacilgliceróis segundo Bucolo & David (1973). Para o HDL-colesterol, induziu-se a precipitação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) com ácido fosfotúngstico e  $MgCl_2$ , como descrito por Assman *et al.* (1983). A glicose foi determinada segundo a metodologia de Trinder (1969).

### ***Análises histopatológicas***

As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral/UFV.

As amostras de fígado, aorta abdominal na região de origem da artéria renal, pâncreas e rim foram lavadas em solução salina (0,9%), fixadas por imersão em solução *Stefanini* (*Stefanini et al.*,1967), conservadas nesta solução por 48 horas e mantidas em álcool (70%) até o momento da inclusão em parafina. Os cortes de 4 $\mu$ m em micrótomo rotativo (Reichert-jung 2045 Multicut, Germany) foram corados por Hematoxilina-Eosina (HE), exceto o pâncreas que foi corado pelo método da Hematoxilina Crômica de Gomori. As preparações histológicas foram analisadas sob microscopia de luz (Olympus BX 41). Nos cortes de fígado foi investigado acúmulo de lipídios e naqueles da aorta a presença de alterações na parede. Nas preparações dos tecidos renal e pancreático objetivou-se verificar alterações histológicas promovidas pela estreptozotocina.

A documentação fotográfica foi realizada em fotomicroscópio Olympus AX-70, no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal/UFV.



### ***Determinação dos lipídios hepáticos***

Cada amostra de fígado foi individualmente descongelada e macerada em graal até a obtenção de um produto homogêneo para a extração dos lipídios totais.

A extração dos lipídios totais do fígado foi realizada segundo o método de Folch *et al.* (1957) modificado por Peluzio (2001). Cem miligramas de cada amostra foram homogeneizados em 1,9 mL de solução de clorofórmio e metanol (2:1) em agitador de tubos (modelo Phoenix AP56). Após a adição de 400µL de metanol, os tubos foram centrifugados por dez minutos a 2368,8g. O sedimento foi desprezado, e o sobrenadante foi homogeneizado com 800µL de clorofórmio e 640µL de NaCl (0,73%). As amostras foram novamente centrifugadas por dez minutos a 2368,8g e o sobrenadante desprezado. A parede interna do tubo foi lavada três vezes com 300µL de solução de Folch [3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água e 2% de NaCl (0,29%)]. Após a secagem dos extratos lipídicos em estufa a 37°C por 24 horas, os tubos foram resfriados em dessecador por 12 horas e pesados para quantificação dos lipídios totais.

### ***Análise estatística***

Os valores estão representados como média  $\pm$  desvio padrão. Foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov para verificar o tipo de distribuição. Uma vez realizado o teste de normalidade, foi utilizado o teste-t para comparação de dois grupos independentes (D e DR), (C e D), (D e DR) e (R e DR), utilizando o programa Sigma (Fox *et al.*, 1994). As diferenças estatísticas foram consideradas significativas a  $p < 0,05$ .

A análise histopatológica foi qualitativa, considerando que o universo amostral consistiu de 100% dos animais estudados.

## Resultados

### ***Composição centesimal da carne de rã comparado com o teor protéico da caseína***

A carne de rã em base seca apresentou quantidade de proteína (85,90g/100g) muito próxima da encontrada na caseína (84,44g/100g). O teor lipídico em base úmida (0,49g/100g) caracteriza a carne de rã como sendo pobre neste nutriente (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise da composição centesimal da carne de rã e teor protéico da caseína

Análises	Carne de rã sem	Carne de rã sem	Caseína g/100g
	osso g/100g base úmida	osso g/100g base seca	
Proteína	14,96	85,9	84,44
Lipídios	0,49	17,42	ND
Umidade	82,58	-	ND
Cinzas	0,74	0,74	ND

ND= não determinado.

### ***Peso final e consumo alimentar***

Durante as quatro semanas os animais não diabéticos (C e R) ganharam peso e os diabéticos (D e DR) perderam peso. Assim, os animais diabéticos (D e DR) apresentaram peso final significativamente inferior aos animais dos grupos não diabéticos (C e R). A dieta com carne de rã não influenciou o peso dos animais quando comparado à dieta com caseína (Figura 1).

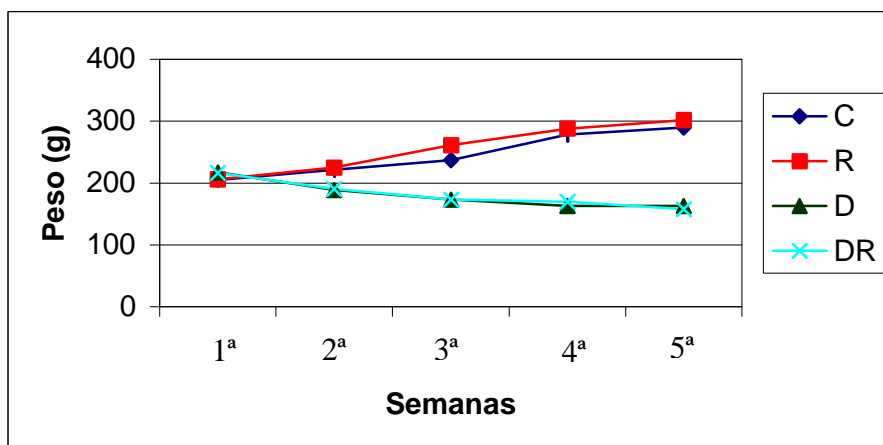


Figura 1 – Evolução do peso médio semanal dos animais dos grupos: C= não diabéticos, dieta AIN-93M; D= diabético, dieta AIN-93M; R= não diabéticos, dieta AIN-93M com carne de rã; DR= diabéticos, com dieta AIN-93M com carne de rã. Resultados expressos em média de 10 animais nos grupos (C e R), 7 no grupo (D) e 8 no grupo (DR).

Houve maior consumo alimentar ( $p < 0,05$ ) entre os animais dos grupos diabéticos (D e DR), quando comparados aos animais dos grupos não diabéticos (C e R). Entretanto, a carne de rã não afetou a ingestão alimentar nos animais diabéticos (D e DR) e naqueles não diabéticos (C e R) (Figura 2).

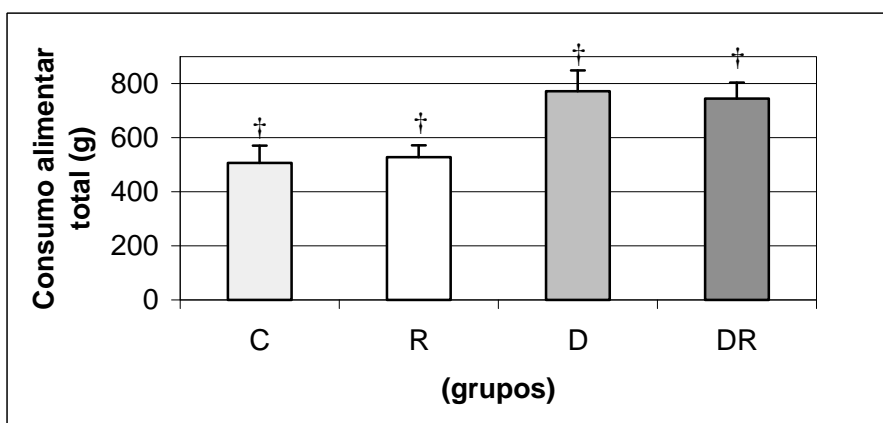


Figura 2 – Consumo alimentar total dos animais dos grupos: C= não diabéticos, dieta AIN-93M; D= diabético, dieta AIN-93M; R= não diabéticos, dieta AIN-93M com carne de rã; DR= diabéticos, com dieta AIN-93M com carne de rã. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 10 animais nos grupos C e R, 7 no grupo D e 8 no grupo DR. † diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos (C e D) e entre os grupos (R e DR) pelo teste-t.

### **Indução do diabetes e análise da glicemia dos animais**

Dos 12 animais do grupo (D) e 13 do grupo (DR), os quais receberam a aplicação da estreptozotocina, apenas 6 desenvolveram glicemia acima de 200mg/dL na primeira aplicação, sendo que os demais desenvolveram após a segunda aplicação. Durante todo o período experimental houve morte de 5 animais em cada grupo diabético. Os animais mostraram glicemia acima de 200mg/dL nas quatro últimas determinações, evidenciando ser a estreptozotocina um bom indutor da doença nessa espécie (Figura 3).

Não houve diferença significativa nas determinações de glicemia realizadas entre os grupos não diabéticos (C e R). Porém, nos grupos diabéticos (D e DR), houve diferença significativa nas determinações de glicemia realizadas na terceira e quarta semanas, mostrando-se superior para o grupo que consumiu dieta com carne de rã (DR). Como era esperado, a glicemia foi superior em todas as dosagens para os animais dos grupos diabéticos (D e DR), quando comparado aos grupos não diabéticos (C e R) (Figura 3).

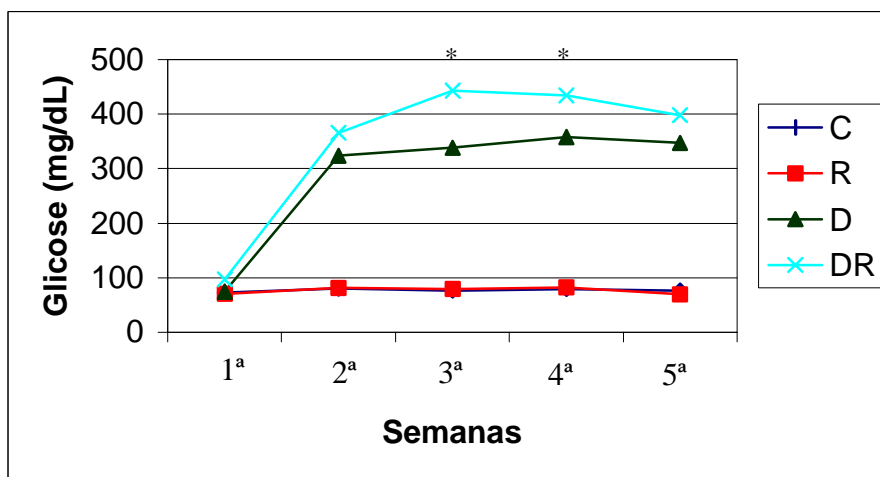


Figura 3 – Glicemia semanal dos animais dos grupos: C= não diabéticos, dieta AIN-93M; D= diabético, dieta AIN-93M; R= não diabéticos, dieta AIN-93M com carne de rã; DR= diabéticos, com dieta AIN-93M com carne de rã. Resultados expressos como média semanal dos grupos de 10 animais nos grupos (C e R), 7 no grupo (D) e 8 no grupo (DR). \* diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos (D e DR) pelo teste-t.

## Análise dos constituintes sangüíneos

A dieta com carne de rã não alterou os parâmetros analisados no grupo de animais não diabéticos (R) e diabéticos (DR), comparado aos grupos que consumiram dieta com caseína (C e D), exceto o colesterol total, que se mostrou inferior para o grupo (R) (Figura 4).

As comparações realizadas entre os animais não diabéticos (R e C) e diabéticos (D e DR) mostraram aumento significativo do colesterol total e fração LDL nos dois grupos diabéticos (D e DR) e de triacilgliceróis no grupo diabético que consumiu dieta com carne de rã (DR) (Figura 4).

A alteração no nível do HDL-colesterol promovida pelo tipo de dieta consumida e pelo estado diabético dos animais não foi significativo ( $p > 0,05$ ) (Figura 4).

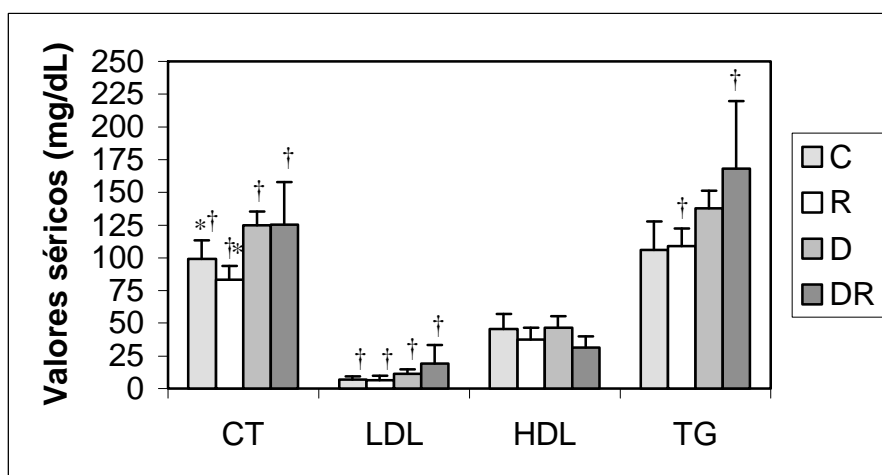


Figura 4 – Parâmetros sangüíneos dos lipídios séricos dos animais dos grupos: C= não diabéticos, dieta AIN-93M; D= diabético, dieta AIN-93M; R= não diabéticos, dieta AIN-93M com carne de rã; DR= diabéticos, com dieta AIN-93M com carne de rã. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 10 animais nos grupos (C e R), 7 nos grupos (D e DR). \* diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos (C e R) e † nos grupos (C e D) e (R e DR) pelo teste-t.

Quanto à razão colesterol total/HDL-colesterol, não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os animais consumindo dieta com fontes protéicas diferentes. O diabetes promoveu aumento desta razão somente nos animais que consumiram carne de rã (Figura 5).

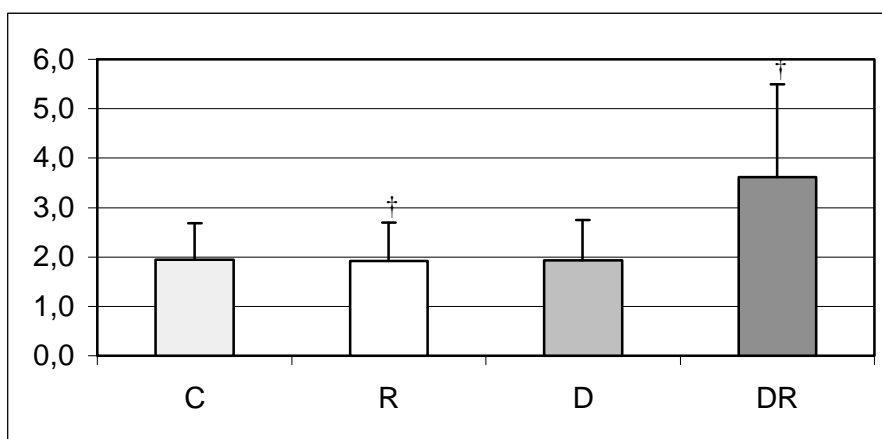


Figura 5 – Razão entre colesterol total e HDL nos animais dos grupos: C= não diabéticos, dieta AIN-93M; D= diabético, dieta AIN-93M; R= não diabéticos, dieta AIN-93M com carne de rã; DR= diabéticos, com dieta AIN-93M com carne de rã. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 10 animais nos grupos (C e R), 7 nos grupos (D e DR). † diferença ( $p<0,05$ ) nos grupos (R e DR), pelo teste-t.

Os animais não diabéticos e diabéticos que receberam dieta com carne de rã (grupos R e DR) não apresentaram alteração nos níveis de proteínas totais e albumina quando comparados com os respectivos grupos que receberam dieta padrão (C e D). Assim, a carne de rã se mostrou igual à caseína quando analisados esses dois parâmetros. Entretanto, quando foram comparados os grupos diabéticos com os grupos não diabéticos (D e DR) e (C e R) que receberam a mesma dieta, observou-se que os animais diabéticos apresentaram menores níveis séricos de proteínas totais e de albumina (Figura 6).

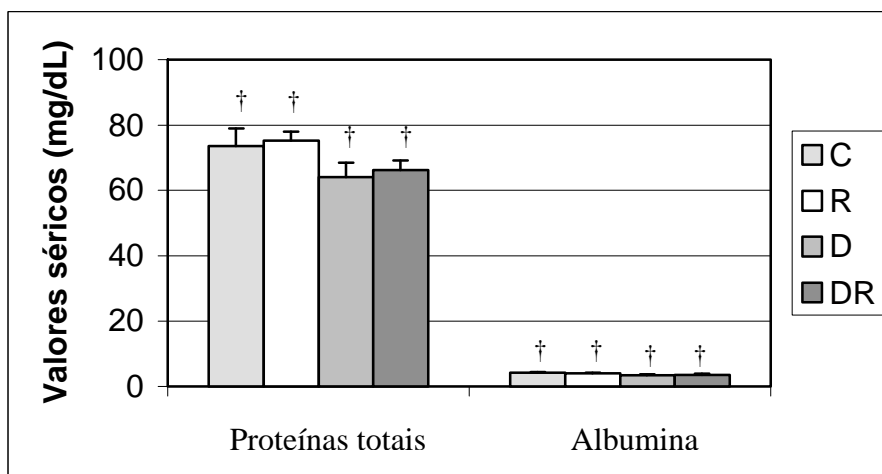


Figura 6 – Parâmetros sanguíneos de proteínas totais e de albumina de animais dos grupos: C= não diabéticos, dieta AIN-93M; D= diabético, dieta AIN-93M; R= não diabéticos, dieta AIN-93M com carne de rã; DR= diabéticos, com dieta AIN-93M com carne de rã. Resultados expressos como média de 10 animais nos grupos (C e R), 7 nos grupos (D e DR). † diferença ( $p < 0,05$ ) nos grupos (C e D) e (R e DR) pelo teste-t.

### **Análises histopatológicas**

Nos animais não diabéticos, a carne de rã (grupo R) promoveu um maior acúmulo de lipídios hepáticos do que a caseína (grupo C) (Figura 7) (Tabela 3). Entre os grupos de animais diabéticos (D e DR), não houve diferença qualitativa quanto à deposição de lipídios hepáticos.

Os animais diabéticos apresentaram fígado sem deposição de lipídios (Tabela 3) (Figura 7).

Tabela 3 – Perfil hepático de gordura em ratos Wistar alimentados durante 28 dias

<b>Tecido</b>	<b>C</b>	<b>R</b>	<b>D</b>	<b>DR</b>
Parênquima hepático	+	+++	-	-

(-) ausência microscópica de gotícula de gordura, (+) leve teor lipídico, (+++) alto teor lipídico. C= não diabéticos com dieta AIN-93M; D= diabético com dieta AIN-93M; R= não diabéticos com dieta AIN-93M com carne de rã; DR= diabéticos com dieta AIN-93M com carne de rã.

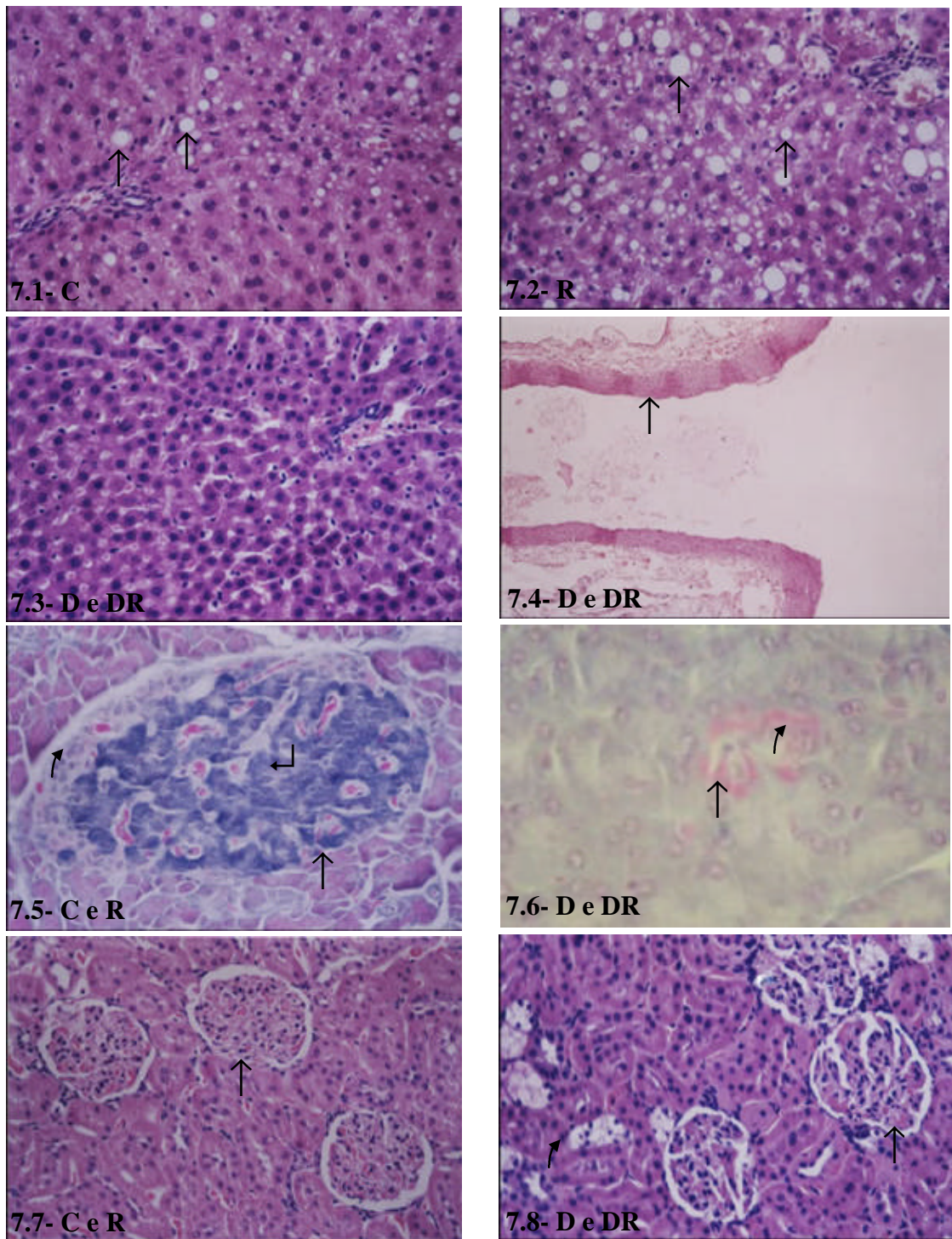


Figura 7 – Análise histológica do parênquima hepático, aorta abdominal, pâncreas e rim dos animais dos grupos: C= não diabéticos, dieta AIN-93M; D= diabético, dieta AIN-93M; R= não diabéticos, dieta AIN-93M com carne de rã; DR= diabéticos, com dieta AIN-93M com carne de rã. ↑ 7.1 e 7.2 gotículas de lipídios, em 7.4 parede vascular, em 7.5 e 7.6 ilhotas de Langerhans e em 7.7 e 7.8 glomérulo. Em 7.3 não foram identificadas gotículas de gordura. ↗ em 7.5 e 7.6 células  $\alpha$  e em 7.8 túbulos proximais degenerados. ↘ em 7.5 células  $\beta$ . Figuras 7.1, 7.2, 7.3, 7.7, e 7.8: tamanho 480X; Figura 7.4: tamanho 160X; Figura 7.5: tamanho 220X e Figura 7.6: tamanho 640X.



Não foram observadas alterações histológicas na aorta abdominal e na artéria renal dos animais, independente do grupo experimental (Figura 7).

A histologia do rim e do pâncreas foi analisada com o objetivo de se avaliar o grau de comprometimento desses órgãos em decorrência da aplicação de estreptozotocina. Como pode ser visto, os animais dos grupos diabéticos (D e DR) não apresentaram células  $\beta$  na ilhota de Langerhans, enquanto os animais não diabéticos (C e R) apresentaram essas células preservadas (Figura 7). Em se tratando dos rins, nos animais diabéticos (D e DR) houve degeneração dos túbulos proximais quando comparados com os grupos não diabéticos (C e R) (Figura 7).

### ***Determinação do peso do fígado, do rim e do fêmur e quantificação dos lipídios hepáticos***

Apesar da tendência no aumento de lipídios dos fígado de animais não diabéticos (C e R), principalmente no grupo que consumiu carne de rã (R), não houve diferença estatística entre os grupos quando foi determinado os lipídios totais hepáticos (Tabela 4).

Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) quanto ao peso do fígado entre os grupos que receberam dietas diferentes (C e R) e (D e DR). Entretanto, os grupos diabéticos (D e DR) apresentaram uma redução do peso do fígado ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos animais dos grupos não diabéticos (C e R), recebendo mesma dieta (Tabela 4).

Os animais diabéticos que consumiram dieta com carne de rã (DR) mostraram menor peso dos rins quando comparados com o grupo diabético que consumiu dieta padrão (D). As comparações feitas entre os grupos (C e R), (C e D) e (R e DR) não apresentaram diferenças estatísticas (Tabela 4).

Quanto ao fêmur dos animais dos grupos diabéticos (D e DR), apresentou menor peso quando comparados aos animais dos grupos não diabéticos (C e R) (Tabela 4). Não foi observado efeito da carne de rã no peso do fêmur (Tabela 4).

Tabela 4 – Lipídios totais hepático, peso do fígado, do rim e do fêmur

	Peso do fígado (g)	Lipídios totais hepáticos (mg/g)	Peso do rim (g)	Peso do fêmur (g)
C	9,29±1,28†	47,9±7,5	2,00±0,16	469,8±33,0†
R	9,72±1,35†	52,0±14,5	1,97±0,16	476,9±20,1†
D	7,75±0,89†	42,5±9,4	2,17±0,23*	351,9±18,8†
DR	6,73±1,50†	41,1±20,1	1,86±0,26*	357,6±49,0†

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de 10 animais nos grupos (C e R), 7 no grupo (D) e 8 no grupo (DR). \* diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos (D e DR) e † nos grupos (C e D) e (R e DR) pelo teste-t.

C= não diabéticos com dieta AIN-93M; D= diabético com dieta AIN-93M; R= não diabéticos com dieta AIN-93M com carne de rã; DR= diabéticos com dieta AIN-93M com carne de rã.

## Discussão

Pelúzio *et al.* (1995) concluíram que as carnes de rã-touro e rã-pimenta têm composição centesimal semelhante a outras carnes brancas e magras e que seu perfil aminoacídico supera o padrão (FAO/OMS, 1985) para crianças acima de 1 ano de idade e adultos. Entretanto, Noll e Lindau (1987) consideraram a carne de rã limitante no aminoácido valina. No presente trabalho a carne de rã foi capaz de promover o ganho de peso dos animais e manter as proteínas totais e albumina em concentrações próximas daqueles animais que receberam dieta com caseína.

O teor de proteínas, umidade e cinzas da carne de rã-touro (Tabela 2), mostrou-se semelhante a outros estudos que identificaram 16,52g/100g, 77,7g/100g e 0,75g/100g (Lindau & Noll, 1987) e 18,22g/100g, 83,68g/100g e 0,89g/100g (Azevedo & Oliveira, 1988), respectivamente.

Pelo seu baixo teor lipídico, a carne de rã tem sido indicada no tratamento de doenças cardiovasculares (Queiroz *et al.*, 1995; Pelúzio *et al.*, 1995). Além disso, Noll & Lindau (1987) encontraram um menor teor de sódio (80,07mg/100g) em comparação com a carne bovina (132,3mg/100g), de frango (131,0mg/100g) e de porco (101,2mg/g) e uma elevada percentagem de ácidos graxos polinsaturados, as quais características colaboram para tal

indicação (Noll & Lindau, 1987). No caso de diabetes Mellitus, a Associação Americana de Diabetes recomenda que a gordura saturada assim como a polinsaturada atenda menos de 10% das calorias totais e que 10 a 15% seja em gordura monoinsaturada (ADA, 2000). Assim, a carne de rã, sendo pobre em lipídios poderia beneficiar os indivíduos diabéticos. Neste estudo, a dieta com carne de rã não alterou de maneira significativa os níveis de LDL, HDL-colesterol e de triacilgliceróis, mas reduziu colesterol total nos animais não diabéticos. Não foi encontrado estudo relacionando o efeito de outras carnes em comparação com a caseína no metabolismo lipídico de animais experimentais, mas existem evidências em humanos de que o consumo de carne bovina está relacionado com o aumento de risco para isquemia cardíaca fatal (Fraser, 1999).

A relação da carne com a lipemia não está totalmente definida. O estudo relatado por Nicklas *et al* (1995), ao comparar indivíduos que consumiam diferentes quantidades de carne, não verificou diferença entre eles nos níveis de triacilgliceróis, colesterol total e frações (HDL, LDL e VLDL). Carnes magras parecem reduzir de maneira semelhante o colesterol total, LDL-colesterol e triacilgliceróis em homens hiperlipidêmicos (Beauchesne-Rondeau *et al.*, 2003), e em mulheres obesas recebendo dieta hipocalórica conciliada à prática de exercício físico (Melanson *et al.*, 2003). No presente estudo, apesar de se tratar de uma carne magra, pouco efeito benéfico no metabolismo lipídico foi visto nos animais diabéticos. No entanto, o grau de atividade física não foi avaliado e não houve restrição da ingestão calórica.

Comparando animais não diabéticos (grupos C e R) com os diabéticos (grupos D e DR), houve aumento dos níveis de colesterol total e LDL-colesterol nos dois últimos. Sabe-se que a hiperglicemia leva à glicosilação de LDL-colesterol, tornando-a menos reconhecida pelos receptores de LDL nativa e, portanto, reduzindo seu *clearance* (Mead & Ramji, 2002). Assim, parte do aumento nos níveis de colesterol total e fração LDL no presente estudo nos animais diabéticos pode estar relacionado a hiperglicemia desenvolvida.

Quanto à maior glicemia desenvolvida nos animais diabéticos que consumiram carne de rã, não se sabe até o momento os mecanismos envolvidos, visto que nos animais não diabéticos houve igual controle.

O HDL-colesterol possui um efeito protetor contra a formação de placa aterosclerótica na parede do vaso através da inibição da oxidação de LDL-colesterol, prevenindo a adesão de monócitos, e assim, reduzindo a formação de macrófagos, inibindo a disfunção endotelial e a apoptose. Porém, seu papel na proteção contra doenças cardiovasculares é atribuído principalmente ao transporte reverso de colesterol do tecido periférico para o fígado. Em estado de resistência insulínica é comum a redução nos níveis de HDL-colesterol e isso parece estar relacionado principalmente à hipertrigliceridemia que ocorre neste caso. O mecanismo para tal fato, em humanos, se deve à proteína transportadora de éster de colesterol (CETP), a qual media a transferência de triacilgliceróis da VLDL para HDL-colesterol em troca de éster de colesterol, gerando partículas de HDL-colesterol ricas em triacilgliceróis e pobre em éster de colesterol. Por sua vez, essa alteração seria responsável pelo seu maior *clearance*, devido, pelo menos em parte, à redução da estabilidade termodinâmica e integridade estrutural da partícula. Os ratos não apresentam a CETP, podendo ser tal fato a explicação para a não redução significativa do HDL colesterol nos animais diabéticos que consumiram carne de rã, mesmo apresentando níveis elevados de triacilgliceróis. Além disso, a ausência desta proteína explica a maior concentração de colesterol na partícula de HDL-colesterol comparado ao nível de LDL apresentada (Moghadasian, 2002).

Estudando o efeito das carnes bovina, de aves e de peixe, todas com teor menor que 1% de lipídios, sobre o efeito da lipemia em homens hiperlipidêmicos, Beauchesne-Rondeau *et al.* (2003) não verificaram diferença após tratamento nos níveis de HDL-colesterol, CT/HDL-colesterol entre as dietas. No presente estudo, o tipo de dieta não influenciou os níveis séricos de HDL-colesterol e a taxa de CT/HDL-colesterol, mas o diabetes levou ao aumento da razão de CT/HDL-colesterol nos animais que consumiram dieta com carne de rã.

Uma vez sendo a HDL a principal partícula carreadora de colesterol em ratos, existe uma grande resistência neste modelo animal em desenvolver placa aterosclerótica (Moghadasian, 2002), mas considerando a dislipidemia derivada do diabetes mellitus, este estudo investigou se este fato seria suficiente para promover alterações na estrutura da parede da aorta dos animais. Como foi visto, apesar do colesterol total e LDL-colesterol

apresentarem-se aumentados nos animais diabéticos, não foi verificada alteração na parede dos vasos. Isto pode estar relacionado à manutenção da concentração de HDL-colesterol, que foi apenas discretamente reduzida.

Em humanos, o acometimento de diabetes Mellitus promove o desenvolvimento de placa aterosclerótica que os predispõem a morbimortalidade em longo prazo, como também à mortalidade. Além da dislipidemia, essa maior predisposição pode estar ligada ao estado aumentado de estresse oxidativo que promove a formação de LDL-colesterol oxidada. Por outro lado, altos níveis de LDL-colesterol glicosilada presente nestes pacientes serve como alvo para anticorpos. Em alguns modelos animais transgênicos e não transgênicos é possível estudar a relação do desenvolvimento de lesão aterosclerótica em diabéticos. O camundongo BALB/C, com diabetes induzida por estreptozotocina e recebendo dieta rica em lipídios, desenvolve estria gordurosa aórtica. O mesmo ocorre com camundongo transgênico deficiente para LDL-R, recebendo dieta rica em gordura (Keren *et al.*, 2001).

A LDL-colesterol tem um papel importante no início do processo aterosclerótico, sendo recomendado que sua concentração sérica se mantenha em níveis normais. Esse papel aterogênico parece ter relação com a afinidade desta lipoproteína com proteoglicanos da parede endotelial, visto que camundongos que expressavam LDL-colesterol com defeito para ligação em proteoglicanos desenvolveram menos aterosclerose que seu tipo selvagem (Skalén *et al.*, 2002). Este fato justifica novamente a resistência dos animais em estudo em desenvolverem placa aterosclerótica, pois mesmo após indução do diabetes Mellitus e o aumento na concentração de LDL-colesterol, este se manteve baixa quando comparada à concentração de HDL-colesterol.

Ao ser analisado o aspecto histológico do fígado, foi identificado maior quantidade de gotículas de gordura nos animais não-diabéticos, sendo que o grupo que consumiu carne de rã parece ter apresentado maior intensidade. No entanto, pela análise de lipídios totais, não foi observada diferença significativa entre os grupos, apesar das menores concentrações nos animais diabéticos e naqueles não diabéticos que consumiram caseína.

A degeneração tubular do rim observada pela histologia não foi associada com seu peso. Porém, apesar de não ser esperado, a dieta com carne de rã reduziu o peso renal dos animais diabéticos quando comparado

aos animais que consumiram dieta com caseína. O mecanismo deste efeito ainda necessita ser esclarecido, visto que o estudo histológico não evidenciou diferença tecidual entre os animais que receberam dietas diferentes.

O teor de cálcio da carne de rã foi analisado por Noll e Lindau (1987), os quais verificaram maior teor deste mineral (49,19mg/100g) em comparação com carnes bovina (12mg/100g), de frango (16mg/100g) e de porco (6mg/100g). Esta característica da carne de rã não foi associada a preservação do tecido ósseo, visto que o maior peso do fêmur verificado nos animais que consumiram dieta com carne de rã não alcançou valor significativo. Sugere-se um estudo à longo prazo para verificar esse efeito.

## **Conclusões**

Quando comparada à caseína, a carne de rã foi semelhante na promoção do crescimento, medido através da evolução do ganho de peso e do consumo alimentar, e na determinação das concentrações de albumina e proteínas totais séricas. Além disso, promoveu redução dos níveis de colesterol total nos animais não diabéticos. Por outro lado, parece ter ocorrido maior descompensação glicêmica nos animais diabéticos que consumiram carne de rã, o que necessita de posteriores investigações do possível mecanismo envolvido.

O baixo teor lipídico da carne de rã, confirmado no presente trabalho é visto como uma vantagem na prevenção e controle da dislipidemia, a qual o indivíduo diabético está predisposto. No entanto, não foi observado influência no metabolismo lipídico daqueles animais diabéticos, o que leva a supor que mecanismos envolvidos na hiperglicemia não controlada com insulina poderia inibir a ocorrência de um possível efeito benéfico.

Sugere-se a realização de estudos posteriores utilizando outros tipos de carnes, em modelos animais sadios e diabéticos, como também em humanos, para se identificar, entre as carnes, qual é a mais vantajosa quando analisados os efeitos no metabolismo lipídico.

## Referências Bibliográficas

ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.; RICHMOND, W.; FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**. 20:470-475, 1974

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications. **Diabetes Care**. 26(1):S51-S61, 2003

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. III - Recomendações de nutrição para pacientes diabéticos. **Diabetes Clínica**. 04:128-132, 2000

A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemistry. Official Methods of Analysis of A.O.A.C. Washington; AOAC, 1984

ASSMAN, G.; SCHRIEWER, H.; SCHMITZ, G.; HAGELE, E.O. Quantification of high-density-lipoprotein cholesterol by precipitation with phosphotungstic acid/MgCl<sub>2</sub>. **Clinical Chemistry**. 29:2026-2030, 1983

AZEVEDO, S.; OLIVEIRA, C.C. Composição química e análise microbiológica da carne de rã. In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 6, 1988, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Associação dos Ranicultores do Estado do Rio de Janeiro, 1988. p. 262-270

BEAUCHESNE-RONDEAU, E.; GASCON, A.; BERGERON, J.; JACQUES, H. Plasma lipids and lipoproteins in hypercholesterolemic men fed a lipid-lowering diet containing lean beef, lean fish, or poultry. **American Journal of Clinical Nutrition**. 77:587-593, 2003

FAO/WHO/UNO: Energy and proteins requirements report of a joint FAO/WHO/UNO Expert Consultation WHO Technical Report n.º 724. Geneva: WHO, 1985

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**. 226:498-509, 1957

FOX, E.; KUO, J.; TILLING, L.; ULRICH, C. User's manual – sigma stat: statistical software for windows. Germany, Jandel, 1994

FRASER, G.E. Associations between diet and cancer, ischemic heart disease, and all-cause mortality in non-Hispanic white California Seventh-day Adventists. **American Journal of Clinical Nutrition**. 70(supl):532S-538S, 1999

HOWARD, B. V. Dietary fat and diabetes: a consensus view. **The American Journal of Medicine**. 113 (9B):38S-40S, 2002

KEREN, P.; GEORGE, J.; KEREN, G.; HARATS, D. Non-obese diabetic (NOD) mice exhibit an increased cellular immune response to glycated-LDL but are resistant to high fat diet induced atherosclerosis. **Atherosclerosis**. 157:285-292, 2001

- KUYVENHOVEN, J.P.; MEINDERS A. E. Oxidative stress and diabetes mellitus pathogenesis of long-term complications. **Internal Medicine**. 10:9-19, 1999
- LINDHOLM, H. Major benefits from cholesterol-lowering in patients with diabetes. **The Lancet**. 361:2000-2001, 2003
- MEAD, J.R.; RAMJI, D.P. The pivotal role of lipoprotein lipase in atherosclerosis. **Cardiovascular Research**. 55:261-269, 2002
- MELANSON, K.; GOOTMAN, J.; MYRDAL, A.; KLINE, G.; RIPPE, J.M. Weight loss and total lipid profile changes in overweight women consuming beef or chicken as the primary protein source. **Nutrition**. 19:409-414, 2003
- MOGHADASIAN, M.H. Experimental atherosclerosis a historical overview. **Life Sciences**. 70:855-865, 2002
- NICKLAS, T.A.; FARRIS, R.P.; MYERS, L.; BERENSON, G.S. Impact of meat consumption on nutritional quality and cardiovascular risk factors in young adults: The Bogalusa Heart Study. **Journal of The American Dietetic Association**. 95(8):887-892, 1995
- NOLL, I.B.; LINDAU, C.F. Aspectos da composição em nutrientes da carne de rã touro-gigante (*Rana catesbeiana*). **Caderno de Farmácia**. 3(1/2):29-36, 1987
- PELUZIO, M.C.G.; FORATO, A.L.S.C.; COELHO, A.I.M.; SANT'ANA, H.M.P.; SABARENSE, C.M.; QUEIROZ, V.M.V.; AZEREDO, R.M.C.; CASTRO, F.A.F. Composição centesimal e avaliação nutricional da carne de rã. In: 1<sup>st</sup>. INTERNATIONAL MEETING ON FROG RESEARCH AND TECHNOLOGY: VIII ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 8, 1995, Viçosa. **Anais... Viçosa/MG:ABETRA/UFV**, 1995. p. 125
- PELUZIO, M.C.G. Redução do desenvolvimento de lesões ateroscleróticas por a-tocoferol em camundongos com diferentes dietas e em estágios diferentes da lesão. Papel da expressão de MCP-1. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2001. Tese de Doutorado.
- QUEIROZ, V.M.V.; FORATO, A.S.C.; COELHO, A.I.M.; SABARENSE, C.M.; CASTRO, F.A.F.; ALMEIDA, F.M.; SANT'ANA, H.M.P.; PELUZIO, M.C.G.; AZEREDO, R.M.C. Carne de rã: informações sobre o alimento e seu preparo. In: TECNOFROG, 1995, Viçosa/MG: ABETRA/UFV, 1995. 29 p.
- REEVES, P.G. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet. **The Journal of Nutrition**. 127:838S-841S, 1993
- SKALEN, K.; GUSTAFSSON, M.; RYDBERG, E.K.; HULTÉN, L.M.; WIKLUND, O.; INNERARITY, T.L.; BORÉN, J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. **Nature**. 417:750-754, 2002



STEFANINI, M.; De MARTINO, C.; ZAMBONI, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. **Nature**. 216(14):173-174, 1967

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals Clinical Biochemistry**. 6: 24, 1969

ZIMMERMANN, R.; PANZENBÖCK, U.; WINTERSPERGER, A.; LEVAK-FRANK, S.; GRAIER, W.; GLATTER, O.; FRITZ, G.; KOSTNER, G. M.; ZECHNER, R. Lipoprotein lipase mediates the uptake of glycated LDL in fibroblasts, endothelial cells, and macrophages. **Diabetes**. 50:1643-1653, 2001

## CAPÍTULO 3

### EFEITOS DA CARNE DE RÃ-TOURO (*Rana catesbeiana*) EM CAMUNDONGOS KNOCK-OUT PARA APOE

#### Introdução

Nas últimas décadas tem-se observado uma elevação na prevalência das doenças cardiovasculares, sendo um dos maiores fatores de risco as dislipidemias (Taskinen, 2003; Lewington, 2003; Khoo *et al.*, 2003). Assim, as aferições de triacilgliceróis, colesterol total e as frações LDL (lipoproteína de baixa densidade) e HDL (lipoproteína de alta densidade) são recomendados em todos os indivíduos e a manutenção de níveis ótimos ou desejáveis das lipoproteínas séricas são importantes para redução de tal risco (NCEP III, 2001).

Além da dislipidemia, são considerados como fatores de risco importantes para esta doença: idade, tabagismo, pressão arterial elevada, diabetes mellitus, história familiar de doença coronária prematura, obesidade, sedentarismo, dentre outros (Cobb *et al.*, 2003), podendo atuar de forma isolada ou através de sinergismo entre estes fatores (Françoso & Coates, 2002).

Muitos esforços têm sido realizados com o objetivo de se entender os mecanismos envolvidos na relação entre dislipidemia e risco para doença cardiovascular. Parece haver uma relação positiva dos níveis de colesterol total

e LDL, e inversamente com HDL-colesterol, com a manifestação inicial do processo aterosclerótico, a estria gordurosa, nos vasos. A patogênese da aterosclerose é entendida como uma resposta à agressão do endotélio do vaso, sendo a aterogênese uma resposta inflamatória derivada desta agressão (Françoso & Coates, 2002).

Existem evidências que a nutrição pode afetar o processo da aterogênese. O tipo de ácido graxo tem uma importante participação, mas ainda existem controvérsias a respeito do seu verdadeiro papel (Hennig & Toborek, 2001). No estudo realizado por Tajima *et al.* (1995), as dietas com 12% e 22% de lipídios derivados de gordura bovina ou óleo de palma, fontes lipídicas ricas em ácidos graxos saturados, promoveram aumento dos níveis séricos de triacilgliceróis e colesterol total em ratos Sprague-Dawley quando comparadas ao óleo de soja, fonte que apresenta maior concentração de ácidos graxos monoinsaturados e polinsaturados. No entanto, a concentração de lipídios hepáticos foi maior nos animais que consumiram dieta com óleo de soja quando o teor lipídico da dieta era 12%.

A utilização de carnes na dieta promove ingestão de ácidos graxos saturados (Noll & Lindau, 1987; Bragagnolo & Rodriguez-Amaya, 2002) e seu consumo parece aumentar o risco para doenças cardiovasculares (Barnard *et al.*, 1995; Fraser, 1999), mas isto ainda não está claro, existindo estudo mostrando que o consumo de carnes magras pode ser uma recomendação para tratamento e controle de dislipidemias (Melanson *et al.*, 2003).

A carne de rã apresenta característica de carne magra (0,3g/100g de lipídio/grama de carne) com a vantagem de serem os lipídios, em sua grande parte, constituídos de ácidos graxos polinsaturados, principalmente ácido linoléico e araquidônico (Noll & Lindau, 1987). Assim, ela tem sido recomendada na terapia das doenças cardiovasculares (Queiroz *et al.*, 1995; Peluzio *et al.*, 1995), apesar de não terem sido encontrados estudos verificando seu efeito metabólico em tais situações.

Assim o presente estudo teve como objetivo verificar o efeito da carne de rã-touro (*Rana catesbeiana*) no metabolismo lipídico de camundongos deficientes para o gene da apoproteína E.

## **Material e Métodos**

### ***Animais e dietas***

Foram utilizados 40 camundongos C57BL/6 “knock-out” para o gene da Apo E (Jackson Laboratory, E.U.A), de 10 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa, divididos em quatro grupos de dez animais de maneira que a média dos pesos entre eles fossem semelhantes.

Os animais receberam dietas semi-purificadas, sendo sua composição baseada na formulação do *American Institute of Nutrition* – AIN-93M (Reeves, 1993) modificada para fornecer 20% de proteínas derivada de caseína ou de carne de rã desidratada, com quantidades normais de lipídios (4%) ou com acréscimo de 11% de lipídio derivado de gordura vegetal hidrogenada mais 1% de colesterol (dieta aterogênica). O maior teor de proteínas (20%) foi oferecido com o objetivo de fornecer maior quantidade de carne de rã.

Os animais foram divididos nos grupos NC (dieta controle AIN-93M), NR (dieta AIN-93M, com carne de rã), HC (dieta AIN-93M aterogênica) e HR (dieta AIN-93M aterogênica, com carne de rã). Cada grupo foi composto por 10 animais, sendo 5 fêmeas e 5 machos, exceto o grupo NR que possuía 4 fêmeas e 6 machos.

As dietas foram preparadas quinzenalmente e estocadas a -20°C até o momento da distribuição nos comedouros. Os animais receberam água destilada e as dietas, *ad libitum*, por 70 dias, em gaiolas individuais, em ambiente com fotoperíodo de 12 horas e temperatura entre 22 e 24°C no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde/UFV. A composição das dietas experimentais é apresentada na Tabela 1.

O consumo alimentar e o peso corporal dos animais foram registrados semanalmente.

As rãs foram adquiridas da Anfigranja Tambiu em Ponte Nova - MG, em janeiro de 2003. A carne chegou congelada, eviscerada e sem pele.

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais

Ingredientes (g/kg)	Grupos experimentais			
	NC	NR	HC	HR
Amido de milho*	368,86	372,88	248,86	252,88
Caseína**	236,84	-	236,84	-
Carne de rã	-	232,82	-	232,82
Amido de milho dextrinizado**	155,00	155,00	155,00	155,00
Sacarose*	100,00	100,00	100,00	100,00
Óleo de soja*	40,00	40,00	40,00	40,00
Fibras (celulose microfina)**	50,00	50,00	50,00	50,00
Mistura mineral**	35,00	35,00	35,00	35,00
Mistura vitamínica**	10,00	10,00	10,00	10,00
L-cistina**	1,80	1,80	1,80	1,80
Bitartarato de colina**	2,5	2,5	2,5	2,5
Gordura vegetal hidrogenada*	-	-	110,00	110,00
Colesterol***	-	-	10,00	10,00

\* Adquiridos no comércio local.

\*\* Adquiridos pela Rhostr Indústria e Comércio LTDA.

\*\*\* Adquiridos pela Sigma.

NC= dieta AIN-93M; NR= dieta AIN-93M com carne de rã; HC= dieta AIN-93M hiperlipídica; HR= dieta AIN-93M hiperlipídica com carne de rã.

As rãs foram desossadas manualmente e desidratadas em estufa com circulação de ar, durante 8 horas, com temperatura variando de 68 a 70°C. Para obtenção da farinha a carne foi posteriormente triturada em multiprocessador doméstico (marca Arno) e peneirada, sendo armazenada em geladeira à temperatura de 4°C até o preparo da dieta.

### **Preparo das amostras**

No final do experimento, após jejum noturno de 12 horas, os animais foram anestesiados com éter e após abertura torácica e abdominal, amostras sanguíneas foram coletas por secção da aorta abdominal e centrifugadas a 2368,8g, durante 15 minutos, e mantidas sob refrigeração por no máximo 72 horas. O soro foi utilizado para determinar as concentrações plasmáticas de

colesterol total e frações HDL e LDL-colesterol, triacilgliceróis e proteínas totais.

O fígado de cada animal foi removido, pesado e lavado em solução salina (0,9%). O lobo caudado foi retirado e fixado para análises histológicas e o restante do fígado foi acondicionado em recipiente plástico e congelado para determinação de lipídios totais hepáticos.

### ***Análise dos constituintes sangüíneos***

As análises dos constituintes sangüíneos foram realizadas no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFV.

Foram analisados na amostra de soro os triacilgliceróis, proteínas totais, glicose, colesterol total e fração LDL-colesterol através de kits da marca BioMérieux, utilizando-se o equipamento de dosagens multiparamétrico de Bioquímica (Alizé, Mod Lisabio B.652).

A concentração de colesterol total foi determinada enzimaticamente de acordo com Allain *et al.* (1974) e a de triacilgliceróis segundo Bucolo & David (1973). A glicose foi determinada segundo a metodologia de Trinder (1969).

### ***Análises histopatológicas***

As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral/UFV.

Amostras de fígado, o coração e a secção proximal da aorta foram removidos cirurgicamente, lavados em solução salina 0,9%, fixados por imersão em solução *Stefanini* segundo Stefanini *et al.* (1967), conservados nesta solução por 48 horas e mantidos em álcool 70% até o momento da desidratação e inclusão em parafina. O coração foi cortado transversalmente na região átrio-ventricular, para análise da porção inicial da aorta e da origem das coronárias. Foram feitos cortes de 4µm em micrótomo rotativo (Reichert-jung 2045 Multicut, Germany), corados por Hematoxilina-Eosina (HE). As preparações histológicas foram analisadas sob microscopia de luz (Olympus BX 41). A documentação fotográfica foi realizada em fotomicroscópio Olympus AX-70, no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal/UFV.

### ***Determinação dos lipídios hepáticos e das fezes***

Cada fígado foi individualmente descongelado e macerado até a obtenção de amostras homogêneas para a extração dos lipídios totais.

A extração dos lipídios do tecido hepático e das fezes foi realizada segundo o método de Folch *et al.* (1957) com algumas modificações realizadas por Peluzio (2001). Alíquota de 100 mg de cada amostra foram homogeneizadas em 1,9 mL de solução de clorofórmio e metanol (2:1) em agitador de tubos (modelo Phoenix AP56). Após a adição de 400µL de metanol, os tubos foram centrifugados por dez minutos a 2368,8g. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante homogeneizado com 800µL de clorofórmio e 640µL de NaCl (0,73%). As amostras foram novamente centrifugadas por dez minutos a 2368,8g e a fase superior foi desprezada. A parede interna do tubo foi lavada 3 vezes com 300µL de solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água e 2% de NaCl a 0,29%). Os extratos lipídicos foram secos em estufa a 37°C por 24 horas. Em seguida, os tubos foram resfriados em dessecador por 12 horas e pesados para quantificação de lipídios.

### ***Análise estatística***

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnof para verificar o tipo de distribuição. Uma vez passado pelo teste de normalidade foi utilizado o teste-t para comparação de dois grupos independentes (NC e NR) e (HC e HR), utilizando o programa SigmaStat (Fox *et al.*, 1994). Foram consideradas significativas as diferenças com  $p < 0,05$ .

A análise histopatológica foi qualitativa, considerando que o universo amostral consistiu de 100% dos animais estudados.

## **Resultados**

### ***Peso final, ganho de peso, peso relativo do fígado e consumo alimentar***

A carne de rã não influenciou o ganho de peso, peso final e o consumo alimentar dos animais. Já o peso relativo do fígado foi superior para o grupo HC quando comparado ao HR (Tabela 2).

Tabela 2 – Peso final, ganho de peso, peso relativo do fígado\* e consumo alimentar médio dos animais

	<b>Peso final (g)</b>	<b>Ganho de peso (g)</b>	<b>Peso relativo do fígado (%)</b>	<b>Consumo alimentar médio (g)</b>
NC	21,6±2,0 <sup>a</sup>	2,4±1,0 <sup>a</sup>	4,6±0,7 <sup>a</sup>	349,3±35,0 <sup>a</sup>
NR	22,3±2,0 <sup>a</sup>	3,8±3,0 <sup>a</sup>	4,2±0,8 <sup>a</sup>	362,1±18,3 <sup>a</sup>
HC	21,3±3,2 <sup>A</sup>	4,1±2,6 <sup>A</sup>	5,4±0,7 <sup>A</sup>	265,7±27,0 <sup>A</sup>
HR	22,6±1,9 <sup>A</sup>	4,4±1,2 <sup>A</sup>	4,6±0,4 <sup>B</sup>	279,6±15,1 <sup>A</sup>

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de 10 animais por grupo. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos (NC e NR) e maiúsculas entre (HC e HR) após teste-t.

\*Peso final/peso hepático x 100.

NC= dieta AIN-93M; NR= dieta AIN-93M com carne de rã; HC= dieta AIN-93M hiperlipídica; HR= dieta AIN-93M hiperlipídica com carne de rã.

### **Análise dos constituintes sanguíneos**

Os animais do grupo NR apresentaram valores de colesterol total maiores que os animais do grupo NC. Nenhum efeito da carne de rã foi encontrado nas análises de triacilgliceróis, colesterol total e fração LDL nos animais que consumiram dieta hiperlipídica (HR) quando comparados aos animais que consumiram hiperlipídica com caseína (HC). A carne de rã também não alterou as concentrações de LDL-colesterol e triacilgliceróis plasmáticos no grupo de animais que receberam dieta normolipídica (NR) (Figura 1).

Os animais dos grupo NR apresentaram maior valor de proteínas totais quando comparados com os do grupo NC. Na dieta hiperlipídica a carne de rã não alterou a concentração de proteínas totais. A glicemia não foi alterada pelo tipo de dieta (Figura 2).



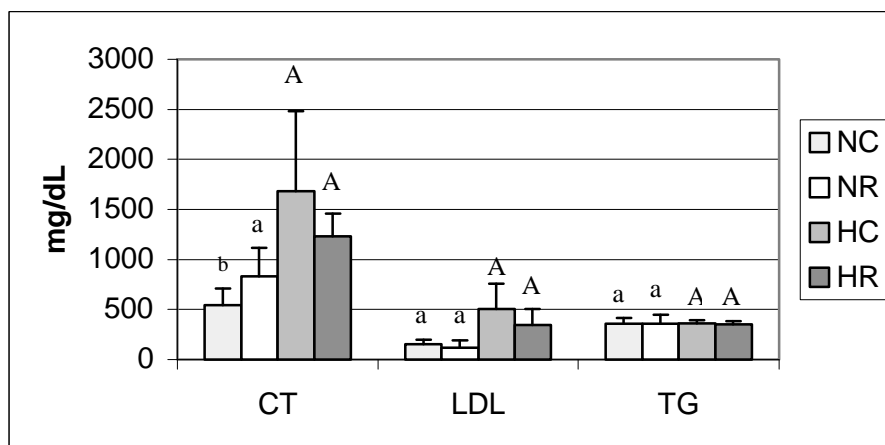


Figura 1 – Análise dos parâmetros sanguíneos de colesterol total (CT), LDL-colesterol e triacilgliceróis (TG) dos animais dos grupos: NC= dieta AIN-93M; NR= dieta AIN-93M com carne de rã; HC= dieta AIN-93M hiperlipídica; HR= dieta AIN-93M hiperlipídica com carne de rã. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 10 animais por grupo. Letras minúsculas representam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos (NC e NR) e maiúsculas entre (HC e HR) pelo teste-t.

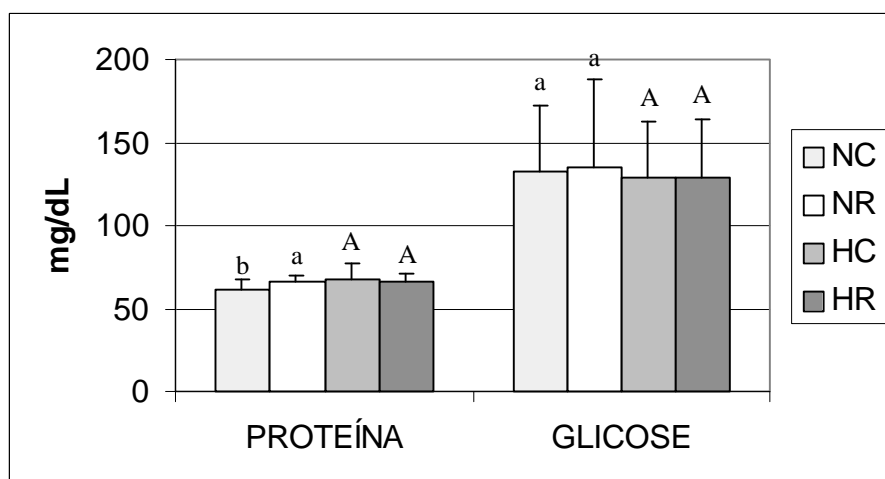


Figura 2 – Concentrações séricas das proteínas totais e da glicose dos animais dos grupos: NC= dieta AIN-93M; NR= dieta AIN-93M com carne de rã; HC= dieta AIN-93M hiperlipídica; HR= dieta AIN-93M hiperlipídica com carne de rã. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 10 animais. Letras minúsculas representam diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos (NC e NR) e maiúsculas entre (HC e HR) pelo teste-t.

### **Análises histopatológicas**

A deposição de lipídios hepáticos foi observada em todos os grupos, não sendo visto efeito diferenciado nos grupos que consumiram dieta contendo carne de rã (Tabela 3) (Figura 3).

Pela análise histológica dos vasos, foi evidenciada formação de placas ateroscleróticas em todos os grupos de animais. Dentre animais que consumiram dietas normolipídicas (grupos NC e NR), aqueles que consumiram dieta contendo carne de rã (NR) apresentaram lesões com maior profundidade e extensão. Nos animais do grupo NC, evidenciou-se início do desenvolvimento da lesão com visualização de xantomias. Já nos animais do grupo NR, foi observado o desenvolvimento da placa em estágio mais avançado, podendo ser visto além das células espumosas, cristais de colesterol e a invasão da placa na camada média (Tabela 3) (Figura 3).

Nos grupos com dietas hiperlipídicas (HC e HR), particularmente nas coronárias, houve formação de placa mais pronunciada com oclusão quase total do vaso, formação de centro necrótico bem definido, capa fibrosa, cristais de colesterol e proliferação de células musculares lisas. No entanto, não foi verificada diferença na característica da placa aterosclerótica entre esses dois grupos (Tabela 3) (Figura 3).

Tabela 3 – Análise subjetiva da deposição lipídica hepática e da placa aterosclerótica (extensão e profundidade) nos grupos experimentais

	<b>NC</b>	<b>NR</b>	<b>HC</b>	<b>HR</b>
Parênquima hepático	+++	+++	++++	++++
Placa aterosclerótica – extensão	+	++	+++	+++
Placa aterosclerótica: profundidade	+	++	+++	+++

(+) leve, (++) moderado, (+++) alto e (++++) muito alto.

NC= dieta AIN-93M; NR= dieta AIN-93M com carne de rã; HC= dieta AIN-93M hiperlipídica; HR= dieta AIN-93M hiperlipídica com carne de rã.

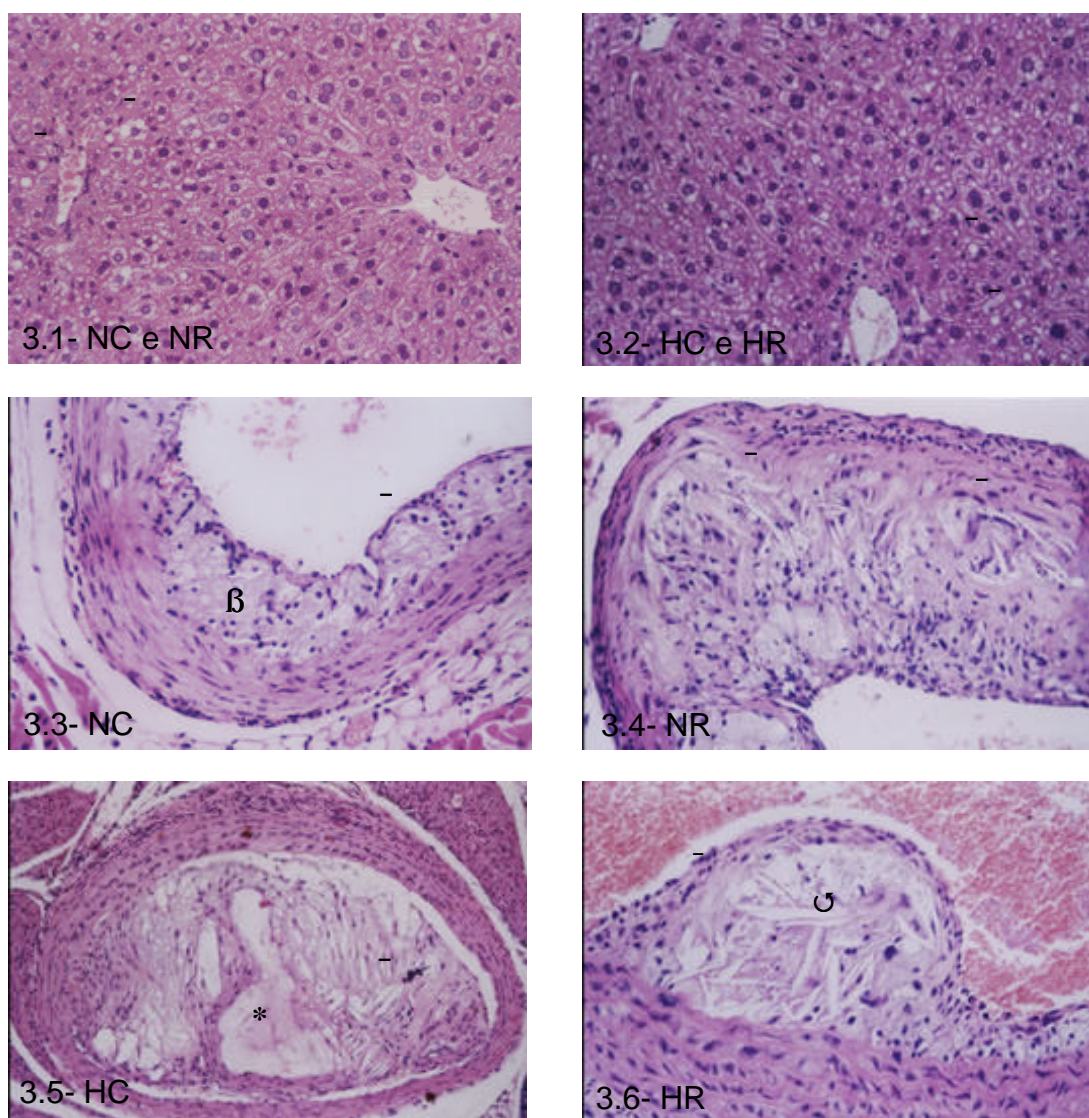


Figura 3 – 3.1 e 3.2 referem-se a morfologia do fígado dos animais dos grupos (NC e NR) e (HC e HR) respectivamente. 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6 referem-se à morfologia de vasos (aorta e coronárias) com placa aterosclerótica em graus de complexidade variados. Em 3.1 e 3.2 - indica gotículas de gordura e em 3.3 indica camada endotelial. Em 3.3  $\beta$  indica células espumosas. Em 3.4  $\downarrow$  indica presença de cristais de colesterol. Em 3.5  $\downarrow$  indica cristais de colesterol em artéria coronária e \* indica luz do vaso. Em 3.6 - indica proliferação de células musculares lisas formando a placa fibrosa e  $\cup$  indica área do centro necrótico. Figura 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.6: tamanho 480X; Figura 3.5: tamanho 220X.  
 NC= dieta AIN-93M; NR= dieta AIN-93M com carne de rã; HC= dieta AIN-93M hiperlipídica; HR= dieta AIN-93M hiperlipídica com carne de rã

### **Determinação do peso do fígado, dos lipídios hepáticos e das fezes**

Não houve diferença significativa quanto ao peso do fígado entre os grupos variando a fonte protéica (Tabela 4).

Os lipídios totais hepáticos foram semelhantes entre todos os grupos. Já os lipídios extraídos das fezes se mostraram mais elevados ( $p < 0,05$ ) para os grupos que consumiram dietas com carne de rã (NR e HR) quando comparados com aqueles que consumiram caseína (NC e HC) (Tabela 3).

Tabela 4 – Peso do fígado (PF), lipídios totais hepático (LTH) e lipídios totais das fezes (LTF)

	<b>NC</b>	<b>NR</b>	<b>HC</b>	<b>HR</b>
PF (g)	0,99±0,13 <sup>a</sup>	0,95±0,19 <sup>a</sup>	1,15±0,14 <sup>A</sup>	1,05±0,10 <sup>A</sup>
LTH (mg/g)	110,50±30,00 <sup>a</sup>	107,70±28,60 <sup>a</sup>	120,50±20,80 <sup>A</sup>	124,3±28,30 <sup>A</sup>
LTF(mg/g)	15,40±4,80 <sup>b</sup>	21,60±4,50 <sup>a</sup>	89,00±10,80 <sup>B</sup>	104,8±6,70 <sup>A</sup>

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 10 animais por grupo. Letras minúsculas representam diferença entre os grupos (NC e NR) e maiúsculas entre (HC e HR) após teste-t com  $p < 0,05$ .

NC= dieta AIN-93M; NR= dieta AIN-93M com carne de rã; HC= dieta AIN-93M hiperlipídica; HR= dieta AIN-93M hiperlipídica com carne de rã.

### **Discussão**

Estudos epidemiológicos e triagens clínicas estabeleceram relações entre a elevação de LDL-colesterol e o aumento do risco para doenças cardiovasculares, pois esta lipoproteína atua no desenvolvimento da placa aterosclerótica (Ballantyne & Hoogeveen *et al.*, 2003). Assim, vários estudos foram desenvolvidos com o objetivo de identificar um tratamento mais eficaz para redução do LDL-colesterol (Rebollo *et al.*, 1998; Murakami *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 2001). No presente estudo, foi verificado que as dietas com carne de rã, tanto normolipídica e hiperlipídica, não afetaram as taxas de LDL-colesterol, quando comparadas com a dieta com caseína, como também o colesterol total na dieta hiperlipídica. Já na dieta normolipídica, a carne de rã

aumentou as concentrações de colesterol total, não sendo associado, no entanto, com alterações na LDL-colesterol.

A influência de proteínas no metabolismo lipídico foi verificada em vários estudos (Gatchalian-Yee *et al.*, 1995; Lu & Jian, 1997; Madani *et al.*, 2000; Nagasawa *et al.*, 2003; Blum *et al.*, 2003). Sabe-se que o maior consumo de carne está relacionado ao aumento de fatores de risco cardiovasculares como maior relação cintura/quadril, níveis séricos de LDL-colesterol e total, maior índice de massa corporal, insulina e pressão arterial (Yeh *et al.*, 1996; Fornés *et al.*, 2000). Porém, esta influência da carne ainda é contraditória (Melanson *et al.*, 2003).

A ingestão de carne em geral proporciona maior consumo de ácidos graxos saturados. No entanto, ocorre uma grande variação do teor de lipídios, de colesterol e do tipo de ácido graxo. No fígado bovino encontra-se grande quantidade de colesterol ( $265,03 \pm 35,39$ mg/100g) (Rowe *et al.*, 1997). Quanto às carnes bovina e suína, estas apresentam grande porcentagem de ácidos graxos saturados (acima de 50% e em torno de 40% respectivamente), e baixa porcentagem em ácido graxo polinsaturados, especialmente em ácido linoléico (Chizzolini *et al.*, 1999). A carne de rã tem sido sugerida na terapia de doenças cardiovasculares, por conter baixo teor de lipídios (0,57g/100g) (Peluzio *et al.*, 1995; Queiroz *et al.*, 1995). As carnes de aves sem pele, bovina e de peixe, por serem magras, têm mostrado efeito positivo no tratamento de hipercolesterolemia, reduzindo de 5 a 9% do colesterol total e do LDL-colesterol, e 22% a 31% do triacilglicerol da VLDL reduziu 22-31% (Beauchesne-Rondeau, 2003). No presente estudo, os animais que consumiram as dietas com carne de rã mostraram concentrações de triacilgliceróis semelhantes as encontradas nos animais que consumiram as dietas com caseína, apesar da maior excreção de lipídios nas fezes.

Vários estudos foram realizados visando identificar o efeito de diferentes tipos de ácidos graxos no metabolismo lipídico de animais experimentais (Gorinstein *et al.*, 2002; Ellis *et al.*, 2002; Benkhalti *et al.*, 2002; Minami *et al.*, 2002; Gaíva *et al.*, 2003), porém não foi encontrado estudo utilizando a carne de rã ou outras carnes comumente utilizadas na dieta de humanos, para avaliar sua influência sobre o metabolismo lipídico de modelos animais.

O efeito negativo da carne de rã na dieta normolipídica sem adição de colesterol pode estar ligado à sua composição em aminoácidos. O estudo de Sugiyama *et al* (1996) evidenciou correlação positiva entre a concentração de colesterol total e a de metionina plasmáticas, correlacionando esta última com a metionina da dieta, mas ainda existe controvérsia (Belleville, 2002). O perfil aminoacídico da carne de rã não foi determinado neste estudo, mas Corrêa (1988) encontrou 2,74mg/100g de metionina em matéria seca, enquanto a caseína apresentou 2,28mg/100g (Pelúzio *et al.*, 1998). Apesar da pequena diferença no teor de metionina entre a carne de rã e a caseína, esta poderia explicar, pelo menos em parte, a maior taxa de colesterol total plasmático em ratos alimentados com dieta normolipídica contendo carne de rã. No entanto, este efeito da metionina parece não atuar em dieta com adição de colesterol (Kern *et al.*, 2002), o que pode ser verificado também no presente estudo.

Há também evidências do efeito hipercolesterolemiante da alta taxa lisina/arginina (Kern *et al.*, 2002), mas o estudo realizado por Kaushik, (1995) encontrou uma relação negativa quando alimentou trutas com caseína ou proteína de soja. A fonte protéica no estudo atual tem relação lisina:arginina de 6,99 e 1,19mg/g para caseína e carne de rã, respectivamente (Corrêa, 1988), mas sua influência positiva ou negativa no metabolismo lipídico ainda necessita ser esclarecida.

A caseína é reconhecida como uma proteína de alto valor biológico, promovendo ganho de peso dos animais e coeficiente de eficiência alimentar superior ao da proteína do soro do leite. Com relação à proteína de soja, a caseína promove igual taxa sérica de proteínas totais (Jacobucci *et al.*, 2001). No presente estudo, a carne de rã promoveu maior concentração de proteínas plasmáticas nos animais que receberam dieta normolipídica, e na dieta hiperlipídica manteve-se semelhante ao grupo que consumiu caseína, evidenciando qualidade comparável à caseína, e assim também à soja.

Existem alguns estudos comparando o efeito da soja com o da caseína no metabolismo lipídico hepático (Madani *et al.*, 2000; Jacobucci *et al.*, 2001). As concentrações de triacilgliceróis, colesterol hepático, bem como o peso do fígado, parecem ser maiores nos animais consumindo dieta com caseína quando comparado com aqueles consumindo soja (Madani *et al.*, 2000). A

dieta com carne de rã utilizada neste trabalho não reduziu a deposição de lipídios e o peso do fígado, mas se mostrou semelhante à caseína, o que pode caracterizar a proteína de soja como mais vantajosa neste aspecto. Quando foi avaliado o peso relativo do fígado, foram verificados valores semelhantes entre os dois grupos de animais que consumiram dieta normolipídica (NC e NR), porém, entre as dietas hiperlipídicas (HC e HR), a carne de rã apresentou valor superior. Este resultado parece não estar relacionado ao maior acúmulo de lipídios hepáticos, já que os valores de lipídios totais hepáticos e o aspecto morfológico do fígado foram semelhantes entre os dois grupos (HC e HR). Como o peso corporal também variou significativamente entre os grupos, pode-se supor que a proteína da carne de rã possui capacidade superior à caseína em desenvolver o tecido hepático.

A carne de rã promoveu maior deposição de lipídios na parede dos vasos dos animais com dieta normolipídica, mas não com a hiperlipídica. Não está claro ainda como diferentes fontes de proteínas poderiam promover efeitos diferenciados na formação da placa aterosclerótica. Larson *et al.* (1994), comparando a caseína e a proteína do soro na formação de placa aterosclerótica não identificou efeito diferenciado entre as duas proteínas estudadas quando 0,4% de colesterol foi adicionado à dieta. Possivelmente, o efeito da maior concentração de metionina nos níveis de colesterol total poderia, pelo menos em parte, explicar o efeito acima descrito. Assim, apesar da característica positiva quanto ao teor lipídico da carne de rã, esta não apresentou vantagens na prevenção da placa aterosclerótica quando foi comparada à caseína.

No processo aterosclerótico estão envolvidas muitas moléculas, as quais podem sofrer modulação derivada de alterações de lipoproteínas. Kavanagh *et al.* (2003) verificaram que o grau de oxidação da LDL-colesterol influencia os níveis de PPAR $\gamma$  (receptor ativador proliferador peroxissomal) e de CD36, um receptor *scavenger* chave em macrófagos. Nas LDL-colesterol minimamente e moderadamente oxidada há um aumento da expressão de RNAm de CD36 por monócitos humanos, enquanto em LDL-colesterol altamente oxidada não apresenta este efeito. Esta resposta, diferenciada de acordo com o grau de oxidação da LDL-colesterol, pode indicar que um novo ou um produto intermediário da oxidação da LDL-colesterol está envolvido na ativação da

atividade de transcrição do gene CD36, mas tais produtos sofrem decomposição em LDL-colesterol altamente oxidada. Já o RNAm do PPAR $\gamma$  apresentou aumento com a progressão do grau de oxidação do LDL, sendo sugerido pelos autores que isso se deve à tentativa de remover colesterol de macrófagos via transporte reverso de colesterol.

Camundongos deficientes em apoE foram criados em 1992. A apoproteína E é sintetizada primariamente no fígado e é um constituinte de superfície de partículas de lipoproteínas e um ligante para reconhecimento e *clearance* por receptores de lipoproteínas. Assim, camundongos deficientes em apo E têm *clearance* de lipoproteínas demorado e mesmo sob dieta hipolipídica e baixa em colesterol os níveis de colesterol total séricos alcançam 400 a 600mg/dL (Breslow, 1996). Como pode ser constatado no presente trabalho, a dieta normolipídica desenvolveu severa hipercolesterolemia neste modelo animal. Fazio & Linton (2001) relatam que este fato é refere-se ao acúmulo de lipoproteínas remanescentes de VLDL e quilomícrons, evidenciando que o papel da apo E em camundongos é idêntico ao de humanos. Além disso, esses animais desenvolvem lesão aterosclerótica semelhante às desenvolvidas em humanos (Nakashima *et al.*, 1994). Inicialmente observa-se a formação de estria gordurosa que é caracterizada pela presença de macrófagos cheios de lipídios, conhecidos como células espumosas, no espaço subendotelial. Em uma segunda fase da lesão aterosclerótica ocorre proliferação de células musculares lisas, muitas das quais contêm depósitos de lipídios e colágeno, evidenciando a formação de capa fibrosa com um centro acelular formado por lipídios derivado de células espumosas necrosadas. Em um estágio final, é possível verificar lesão complexa, com formação de trombos e deposição de fibrina e plaquetas, podendo ocorrer total oclusão do vaso (Nakashima *et al.*, 1994; Breslow, 1996; Françoso & Coates, 2002). As etapas descritas acima foram também observadas no presente estudo, o qual iniciou-se com os animais em 10 semanas, quando, supõe-se, que a lesão já estava pré-instalada.



## Conclusões

Foi constatado que a carne de rã, embora apresente baixo teor lipídico, não foi eficaz na prevenção do desenvolvimento de placa aterosclerótica. Esse efeito pode ser atribuído, pelo menos parcialmente, à sua composição aminoacídica.

Os resultados verificados neste estudo podem estar presentes nas carnes de maneira geral, e assim, torna-se necessário comparar o efeito da carne de rã a outras carnes, como também em outros modelos animais, em humanos e em diferentes estágios da vida, permitindo a avaliação nas diferentes fases de formação da lesão.

## Referências Bibliográficas

ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S., RICHMOND, W.; FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**. 20:470-475, 1974

BALLANTYNE, C.M.; HOOGEVEEN, R.C. Role of lipid and lipoprotein profiles in risk assessment and therapy. **American Heart Journal**. 146(2):227-232, 2003

BARNARD, N.D.; NICHOLSON, A.; HOWARD, J.L. The medical costs attributable to meat consumption. **Preventive Medicine**. 24:646-655, 1995

BEAUCHESNE-RONDEAU, E.; GASCON, A.; BERGERON, J.; JACQUES, H. Plasma lipids and lipoproteins in hypercholesterolemic men fed a lipid-lowering diet containing lean beef, lean fish, or poultry. **American Journal of Clinical Nutrition**. 77:587-593, 2003

BELLEVILLE, J. Hypocholesterolemic effect of soy protein. **Nutrition**. 18:684-685, 2002

BENKHALTI, F.; PROST, J.; PAZ, E.; PEREZ-JIMENEZ, F.; EL MOFADAR, C.; EL BOUSTANI, E. Effects of feeding virgin olive oil or their polyphenols on lipid of rat liver. **Nutrition Research**. 22:1067-1075, 2002

BLUM, A.; LANG, N.; PELEG, A.; VIGDER, F.; ISRAELI, P.; GUMANOVSKI, M.; LUPOVITZ, S.; ELGAZI, A.; BEN-AMI, M. Effects of oral soy protein on markers of inflammation in postmenopausal women with mild hypercholesterolemia. **American Heart Journal**. 145(2):N1-N4, 2003

BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Teores de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos em cortes de carne suína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 22(1):98-104, 2002

BRESLOW, J.L. Mouse models of atherosclerosis. **Science**. 272:685-688, 1996

CHIZZOLINI, R.; ZANARDI, E.; DORIGONI, V.; GHIDINI, S. Calorific value and cholesterol content of normal and low-fat meat and meat products. **Trends in Food Science & Technology**. 10: 119-128, 1999

COBB, F.R.; KRAUS, W.E.; ROOT, M.; ALLEN J.D. Assessing risk for coronary heart disease: beyond framingham. **American Heart Journal**. 146:572-580, 2003

CORRÊA, A.N.L.; ANTUNES, A.J. Avaliação composicional de diferentes espécies de rãs e efeitos do armazenamento a – 18° C sobre frações protéicas e lipídicas do músculo de rã-touro (*rana catesbeiana*). Tese mestrado. **Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP**, Campinas, 1988

ELLIS, J.; LAKE, A.; HOOVER-PLOW, J. Monounsaturated canola oil reduces fat deposition in growing female rats fed a high or low fat diet. **Nutrition Research**. 22:609-621, 2002

FAZIO, S.; LINTON, M.R.F. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. **Frontiers in Bioscience**. 6:d515-525, 2001

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**. 226:498-509, 1957

FORNÉS, N.S.; MARTINS, I.S.; HERNAN, M.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G.; ASCHERIO, A. Frequência de consumo alimentar e níveis séricos de lipoproteínas na população de Cotia, SP, Brasil. **Revista Saúde Pública**. 34(4):380-387, 2000

FOX, E.; KUO, J.; TILLING, L.; ULRICH, C. User's manual – sigma stat: statistical software for windows. Germany, Jandel, 1994

FRANÇOSO, L.A.; COATES, V. Evidências anatomopatológicas do início da aterosclerose na infância e adolescência. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. 78(1):131-136, 2002

FRASER, G.E. Associations between diet and cancer, ischemic heart disease, and all-cause mortality in non-Hispanic white California Seventh-day Adventists. **American Journal of Clinical Nutrition**. 70(supl):532S-538S, 1999

GAÍVA, M.H.; COUTO, R.C.; OYAMA, L.M.; COUTO, G.E.C.; SILVEIRA, V.L.F.; RIBEIRO, E.B.; NASCIMENTO, C.M.O. Diets rich on polyunsaturated fatty acids: effect on hepatic metabolism in rats. **Nutrition**. 19:144-149, 2003

GATCHALIAN-YEE, M.; IMAMURA, M.; NONAKA, M.; YAN GU, J.; SUGANO, M. Effects of different dietary fats and proteins on cholesterol metabolism and eicosanoid production in hamsters. **Nutrition Research**. 15(8):1149-1158, 1995

GORINSTEIN, S.; LEONTOWICZ, H.; LOJEK, A.; LEONTOWICZ, M.; CIZ, M.; KRZEMINSKI, R.; GRALAK, M.; CZERWINSKI, J.; JASTRZEBSKI, Z.; TRAKHTENBERG, S.; GRIGELMO-MIGUEL, N.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTIN-BELLOSO, O. Olive oils improve lipid metabolism and increase antioxidant potential in rats fed diets containing cholesterol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50:6102-6108, 2002

HENNIG, B.; TOBOREK, M. Nutrition and endothelial cell function: implications in atherosclerosis. **Nutrition Research**. 21:279-293, 2001

JACOBUCCI, H.B.; SGARBIERI, V.C.; DIAS, N.F.G.P.; BORGES, P.; TANIKAWA, C. Impact of different dietary protein on rat growth, blood serum lipids and protein and liver cholesterol. **Nutrition Research**. 21: 905-915, 2001

KAUSHIK, S.J.; CRAVEDI, J.P.; LALLES, J.P.; SUMPTER, J.; FAUCONNEAU, B.; LAROCHE, M. Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**. 133:257-274, 1995

KAVANAGH, I.C.; SYMES, C.E.; RENAUDIN, P.; NOVA, E.; MESA, M.D.; BOUKOUVALAS, G.; LEAKE, D.S.; YAQOOB, P. Degree of oxidation of low density lipoprotein affects expression of CD36 and PPAR $\gamma$ , but not cytokine production, by human monocyte-macrophages. **Atherosclerosis**. 168:271-282, 2003

KERN, M.; ELLISON, D.; MARROQUIN, Y.; AMBROSE, M.; MOSIER, K. Effects of soy protein supplemented with methionine on blood lipids and adiposity of rats. **Nutrition**. 18:654-656, 2002

KHOO, K.L.; TAN, H.; LIEW, Y.M.; DESLYPERE, J.P., JANUS, E. Lipids and coronary heart disease in Asia. **Atherosclerosis**. 169:1-10, 2003

LARSON, M.R.; WILSON, C.; POTTER, S.M. The role of dietary protein source in the development of cholesterol metabolism in rabbits. **Journal Nutritional Biochemistry**. 5:232-237, 1994

LEWINGTON, S. The importance of cholesterol, blood pressure and smoking for coronary heart disease. **European Heart Journal**. 24:1703-1704, 2003

LU, Y.F.; JIAN, M.R. Effects of soy protein and casein on lipid metabolism in mature and suckling rats. **Nutrition Research**. 17(8):1341-1350, 1997

MADANI, S.; PROST, J.; BELLEVILLE, J. Dietary protein level and origin (casein and highly purified soybean protein) affect hepatic storage, plasma lipid transport, and antioxidative defense status in the rat. **Nutrition**. 16:368-375, 2000

MELANSON, K.; GOOTMAN, J.; MYRDAL, A.; KLINE, G.; RIPPE, J.M. Weight loss and total lipid profile changes in overweight women consuming beef or chicken as the primary protein source. **Nutrition**. 19:409-414, 2003

MINAMI, A.; NORIKO, I.; SAKAMOTO, S.; TAKISHITA, E.; MAWATARI, K.; OKADA, K.; NAKAYA, Y. Effect of eicosapentaenoic acid ethyl éster v. oleic acid-rich safflower oil on insulin resistance in type 2 diabetic model rats with hypertriacylglycerolaemia. **British Journal of Nutrition**. 87:157-162, 2002

MURAKAMI, S.; KONDO-OHTA, Y.; TOMISAWA, K. Improvement in cholesterol metabolism in mice given chronic treatment of taurine and fed a high-fat diet. **Life Sciences**. 64(1):83-91, 1999

NAGASAWA, A.; FUKUI, K.; KOJIMA, M.; KISHIDA, K.; MAEDA, N.; NAGARETANI, H.; HIBUSE, T.; NISHIZAWA, H.; KIHARA, S.; WAKI, M.; TAKAMATSU, K.; FUNABASHI, T.; MATSUZAWA, Y. Divergent effects of soy protein diet on the expression of adipocytokines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 311:909-914, 2003

NAKASHIMA, Y.; PLUMP, A.S.; RAINES, E.W.; BRESLOW, J.L.; ROSS, R. ApoE-Deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. **Arteriosclerosis and Thrombosis**. 14(1):133-140, 1994

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP). Third Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol Adults (ATP-III). NIH Publication nº. 01-3670. Bethesda, MD: National Institute of Health, 2001

NOLL, I.B.; LINDAU, C.F. Aspectos da composição em nutrientes da carne de rã touro-gigante (*Rana catesbeiana*). **Caderno de Farmácia**. 3(1/2):29-36, 1987

PELUZIO, M.C.G. Redução do desenvolvimento de lesões ateroscleróticas por a-tocoferol em camundongos com diferentes dietas e em estágios diferentes da lesão. Papel da expressão de MCP-1. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2001. Tese de Doutorado.

PELUZIO, M.C.G.; FORATO, A.L.S.C.; COELHO, A.I.M.; SANT'ANA, H.M.P.; SABARENSE, C.M.; QUEIROZ, V.M.V.; AZEREDO, R.M.C.; CASTRO, F.A.F. Composição centesimal e avaliação nutricional da carne de rã. In: 1<sup>st</sup>. INTERNATIONAL MEETING ON FROG RESEARCH AND TECHNOLOGY: VIII ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 1995, Viçosa. **Anais...** Viçosa/MG:ABETRA/UFV, 1995. p. 125

PELUZIO, M.C.G.; MIRANDA, L.C.G.; MORAES, G.H.K.; PELUZIO, L.E. Avaliação da qualidade nutricional da proteína da folha de mandioca combinada com a caseína pela reação de plasteína. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**. 48(4): 311-315, 1998

QUEIROZ, V.M.V.; FORATO, A.S.C; COELHO, A.I.M.; SABARENSE, C.M.; CASTRO, F.A.F.; ALMEIDA, F.M.; SANT'ANA, H.M.P.; PELUZIO, M.C.G.; AZEREDO, R.M.C. Carne de rã: informações sobre o alimento e seu preparo. In: TECNOFROG, 1995, Viçosa/MG: ABETRA/UFV, 1995. 29 p.

REBOLLO, A.J.G.; BOTEJARA, E.M.; CANSADO, A.O.; BLANCO, P.J.M.; BELLIDO, M.M.; SÁNCHEZ, A.F.; ARIAS, P.M.; ALVAREZ, J.E.C. Effects of consumption of meat product rich in monounsaturated fatty acids (the ham from the iberian pig) on plasma lipids. **Nutrition Research**. 18:743-750, 1998

REEVES, P.G. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet. **The Journal of Nutrition**. 127:838S-841S, 1993

ROWE, A.; BERTONI, S.A.; PEREIRA, P.L.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N.E. Colesterol em carnes bovinas, suínas, frangos e derivados de carnes comercializados em Maringá, Paraná, Brasil. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**. 47(3):282-284, 1997

STEFANINI, M.; De MARTINO, C.; ZAMBONI, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. **Nature**. 216(14):173-174, 1967

STEWART, J.W.; KAPLAN, M.; BEITZ, D.C. Pork with a high content of polyunsaturated fatty acids lowers LDL cholesterol in women. **American Journal of Clinical Nutrition**. 74:179-187, 2001

SUGIYAMA, K.; KANAMORI, H.; AKACHI, T.; YAMAKAWA, A. Amino acid composition of dietary proteins affects plasma cholesterol concentration through alteration of hepatic phospholipid metabolism in rats fed a cholesterol-free diet. **Journal Nutritional Biochemistry**. 7:40-48, 1996

TAJIMA, A.; KAWAHARA, S.; SHIN, M.S.K.; IMAIZUMI, K.; NAKAMURA, T.; ITO, T. Is beef tallow really hazardous to health? **Nutrition Research**. 15(10):1429-1436, 1995

TASKINEN, M.R. LDL-cholesterol, HDL-cholesterol or triglycerides – which is the culprit? **Diabetes Research and Clinical Practice**. 61:S19-S26, 2003

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals Clinical Biochemistry**. 6: 24, 1969

YEH, L.L.L.; KULLER, L.H.; BUNKER, C.H.; UKOLI, F.A.; HUSTON, S.L.; TERRELL, A.D.F. The role of socioeconomic status and serum and serum fatty acids in the relationship between intake of animal foods and cardiovascular risk factors. Elsevier Science. 6: 290-298, 1996

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi confirmado o baixo teor lipídico da carne de rã. No entanto, esta característica não foi suficiente para garantir a ocorrência de efeitos positivos no metabolismo lipídico dos animais diabéticos e hipercolesterolêmicos. Enquanto nos ratos Wistar diabéticos e nos camundongos *knock-out* para apo E com dieta hiperlipídica não houve alteração no perfil lipídico, nos camundongos que receberam dieta normolipídica a carne de rã elevou as concentrações de colesterol total e promoveu o desenvolvimento de placa aterosclerótica mais avançada. No entanto, nos ratos Wistar saudáveis houve redução nas concentrações de colesterol total.

Assim, pode-se considerar que tais efeitos foram influenciados pelo modelo animal utilizado, pela patologia instalada, como também pelo teor lipídico da dieta.

É necessário uma investigação direta do efeito desta carne no perfil lipídico de humanos saudáveis e naqueles com dislipidemia já instalada, realizando uma comparação da carne de rã com as demais carnes, identificando aquela que oferece menor risco para o sistema cardiovascular e os possíveis mecanismos envolvidos.

## APÉNDICE

## APÊNDICE A

Tabela 1A – Efeito de carne de rã-touro (*Rana catesbeiana*) em ratos saudáveis. Resultados são apresentados como média e desvio-padrão

<b>Análises</b>	<b>C</b>	<b>R</b>
Peso final (g)	289,90±29,71	301,70±26,14
Consumo alimentar total (g)	506,71±64,66	528,07±43,35
Glicemia 2 <sup>a</sup> semana (mg/dL)	80,50±5,96	81,40±8,14
Glicemia 3 <sup>a</sup> semana (mg/dL)	76,30±7,33	78,80±8,57
Glicemia 4 <sup>a</sup> semana (mg/dL)	79,10±6,75	82,60±9,02
Glicemia 5 <sup>a</sup> semana (mg/dL)	76,40±10,75	69,00±10,41
Colesterol total (mg/dL)	98,92±14,54	83,31±10,60
HDL (mg/dL)	45,79±11,29	37,48±8,84
LDL (mg/dL)	6,99±2,51	6,48±3,18
Colesterol total/HDL	2,26±0,59	2,28±0,38
Triacilgliceróis (mg/dL)	106,05±21,59	109,08±13,34
Albumina (mg/dL)	4,22±0,25	4,10±0,12
Proteínas totais (mg/dL)	75,22±2,78	73,60±5,28

Referente ao capítulo 2.

Tabela 2A – Efeito de carne de rã-touro (*Rana catesbeiana*) em ratos diabéticos. Resultados são apresentados como média e desvio-padrão

<b>Análises</b>	<b>D</b>	<b>DR</b>
Peso final (g)	162,71±15,58	157,62±25,82
Consumo alimentar total (g)	771,97±76,82	744,88±58,65
Glicemia 2 <sup>a</sup> semana (mg/dL)	324,00±105,59	366,12±92,58
Glicemia 3 <sup>a</sup> semana (mg/dL)	339,00±66,45	443,12±73,68
Glicemia 4 <sup>a</sup> semana (mg/dL)	358,57±70,58	434,25±54,21
Glicemia 5 <sup>a</sup> semana (mg/dL)	347,28±28,69	397,75±97,56
Colesterol total (mg/dL)	124,91±27,80	125,31±32,39
HDL (mg/dL)	46,55±19,17	31,53±8,59
LDL (mg/dL)	11,45±1,86	19,28±14,03
Colesterol total/HDL	2,90±0,90	4,20±1,62
Triacilgliceróis (mg/dL)	137,88±40,65	168,02±51,64
Albumina (mg/dL)	3,49±0,23	3,56±0,32
Proteínas totais (mg/dL)	64,12±4,42	66,24±2,88

Referente ao capítulo 2.



Tabela 3A – Valor de p das análises referentes ao efeito de carne de rã-touro (Rana catesbeiana) em ratos saudáveis e diabéticos

<b>Análises</b>	<b>C x R</b>	<b>D x DR</b>	<b>C x D</b>	<b>R x DR</b>
Peso final	0,358	0,658	<0,001	<0,001
Consumo alimentar total	0,397	0,453	<0,001	<0,001
Glicemia 2ª semana	0,781	0,425	<0,001	<0,001
Glicemia 3ª semana	0,492	0,013	<0,001	<0,001
Glicemia 4ª semana	0,339	0,035	<0,001	<0,001
Glicemia 5ª semana	0,135	0,212	<0,001	<0,001
Colesterol total	0,013	0,981	0,023	0,002
HDL-colesterol	0,084	0,083	0,920	0,187
LDL-colesterol	0,696	0,169	0,001	0,013
Colesterol total/HDL	0,926	0,089	0,093	0,002
Triacilgliceróis	0,710	0,248	0,052	0,003
Albumina	0,192	0,676	<0,001	<0,001
Proteínas totais	0,402	0,310	0,001	<0,001
Peso do fêmur	0,568	0,778	<0,001	<0,001
Peso do rim	0,710	0,030	0,097	0,261
Peso do fígado	0,473	0,142	0,015	<0,001
Lipídios totais hepáticos	0,438	0,813	0,205	0,107

Referente ao capítulo 2.

Tabela 4A – Efeito de carne de rã-touro (Rana catesbeiana) em camundongos knock-out para apoE recebendo dieta normolipídica. Resultados são apresentados como média e desvio-padrão

<b>Análises</b>	<b>NC</b>	<b>NR</b>
Glicemia (mg/dL)	132,34±39,72	135,24±53,14
Proteínas totais (mg/dL)	61,26±5,84	66,06±3,52
Colesterol total (mg/dL)	546,66±164,07	832,04±286,19
LDL (mg/dL)	152,45±42,63	118,08±71,62
Triacilgliceróis (mg/dL)	355,34±59,75	355,04±91,87

Referente ao capítulo 3.

Tabela 5A – Efeito de carne de rã-touro (*Rana catesbeiana*) em camundongos knock-out para apoE recebendo dieta hiperlipídica. Resultados são apresentados como média e desvio-padrão

<b>Análises</b>	<b>HC</b>	<b>HR</b>
Glicemia (mg/dL)	128,62±34,07	129,14±34,68
Proteínas totais (mg/dL)	67,56±9,15	66,60±4,84
Colesterol total (mg/dL)	1681,74±800,55	1233,08±225,06
LDL (mg/dL)	509,64±248,34	347,82±160,84
Triacilgliceróis (mg/dL)	363,60±33,95	353,60±29,09

Referente ao capítulo 3.

Tabela 6A – Valor de p das análises referentes ao efeito de carne de rã-touro (*Rana catesbeiana*) em camundongos knock-out para apoE

<b>Análises</b>	<b>NC x NR</b>	<b>HC x HR</b>
Ganho de peso	0,188	0,747
Peso final	0,446	0,284
Peso do fígado	0,557	0,081
Peso relativo do fígado	0,355	0,012
Consumo alimentar total	0,317	0,175
Glicemia	0,892	0,973
Proteínas totais	0,039	0,773
Colesterol total	0,014	0,105
LDL-colesterol	0,209	0,101
Triacilgliceróis	0,993	0,488
Lipídios hepáticos	0,831	0,739
Lipídios das fezes	0,007	<0,001

Referente ao capítulo 3.