

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**EFEITOS DA DIETA HIPERPROTEICA NA ANSIEDADE, NA HEMODINÂMICA E EM
ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DO CORAÇÃO DE RATOS WISTAR**

FLANDER DIEGO DE SOUZA

UBERLÂNDIA

2020

FLANDER DIEGO DE SOUZA

EFEITOS DA DIETA HIPERPROTEICA NA ANSIEDADE, NA HEMODINÂMICA E EM
ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DO CORAÇÃO DE RATOS WISTAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr.: Elmiro Santos Resende

Co-orientador: Prof. Dr. Thiago Montes Fidale

UBERLÂNDIA

2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S729 Souza, Flander Diego de, 1990-
2020 Efeitos da dieta hiperproteica na ansiedade, na hemodinâmica e em aspectos morfofuncionais do coração de ratos Wistar [recurso eletrônico] / Flander Diego de Souza. - 2020.

Orientador: Elmiro Santos Resende.

Coorientador: Thiago Montes Fidale.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.492>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Ciências médicas. I. Resende, Elmiro Santos ,1953-, (Orient.).
II. Fidale, Thiago Montes,1979-, (Coorient.). III. Universidade
Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências da Saúde. IV.
Título.

CDU: 61

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Av. Pará, 1720, Bloco 2H, Sala 09 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: 34 3225-8628 - www.ppcsa.famed.ufu.br - copme@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico Nº 019/PPCSA				
Data:	28.07.2020	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	16:45h
Matrícula do Discente:	11812CSD018				
Nome do Discente:	Flander Diego de Souza				
Título do Trabalho:	EFEITOS DA DIETA HIPERPROTEICA NA ANSIEDADE, NA HEMODINÂMICA E EM ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DO CORAÇÃO DE RATOS WISTAR				
Área de concentração:	Ciências da Saúde				
Linha de pesquisa:	3: Fisiopatologia das doenças e agravos à saúde				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Remodelação cardiovascular				

Reuniu-se em web conferência pela plataforma Mconf-RNP, em conformidade com a PORTARIA Nº 36, DE 19 DE MARÇO DE 2020 da COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - CAPES, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Ana Cristina Tomaz Araujo (UNESP/USP), Marcos Luiz Ferreira Neto (UFU) e Elmiro Santos Resende (UFU) orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Elmiro Santos Resende, apresentou a Comissão Examinadora e candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por **Elmiro Santos Resende, Presidente**, em 28/07/2020, às



16:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Luiz Ferreira Neto, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/07/2020, às 16:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Cristina Tomaz Araujo, Usuário Externo**, em 28/07/2020, às 17:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2140296** e o código CRC **0D188FE9**.

DEDICATÓRIA

Primeiramente a **Deus**, nosso criador, que está sempre me proporcionando a saúde física, psicológica e espiritual para buscar meus objetivos e crescer como ser humano. Sempre buscando vencer minhas más tendências, para que um dia a virtude e amor se faça presente no meu coração.

Agradeço à minha mãe **Izabel Cristina Alves de Souza**, por ser minha base, minha força e meu farol nos dias nublados. Gratidão pelo amor incondicional doado durante toda minha vida.

Um obrigado em especial para meu pai **Jose Carlos de Souza** e aos meus irmãos **Fiori** e **Frederich**, por me proporcionarem os meios motivacionais para buscar minhas metas.

Aos meus **Amigos** queridos, que sempre me confortam em momentos difíceis fortalecendo minha alma.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Elmiro Santos Resende**, agradecimentos de coração, por todo os ensinamentos, pela paciência e humildade. Sua sabedoria e bom senso foi como uma bússola ao longo do mestrado, me orientando sempre ao melhor caminho a seguir. Estou honrado e orgulhoso pela oportunidade ímpar de crescimento científico que o senhor me proporcionou.

Ao meu co-orientador e amigo **Thiago Montes Fidale**, que sempre foi uma influência positiva desde a graduação, onde tornou possível o primeiro contato com a pesquisa na área da saúde. Um grande professor que me inspira através da sua trajetória profissional. Gratidão por direcionar minha vida para esse passo tão importante.

Ao professor **Marcos Ferreira Neto**, pela experiência científica e contribuição intelectual, ajudando também com fornecimento de materiais para realização de boa parte dos procedimentos laboratoriais.

Aos meus amigos Talita Cristina, Jefferson Fernandes, Fanny Lima, Eduardo Cabral e Luciano Alex pela contribuição ao longo do experimento e alegria vivida durante esse período. As doutoras Fernanda de Souza, Poliana Rodrigues Alves e Erica Carolina Campos, pelo conhecimento compartilhado.

Aos colegas de laboratório **Felipe César Gonçalves**, **Simone Ramos Deconte** e **Matheus Matioli Montovani** pelo apoio técnico, ensinamentos e amizade.

Para os colaboradores da Pós-Graduação em Ciências da Saúde, à **Gisele de Melo Rodrigues**, **Viviane Garcia Pires Gonçalves**, todos os professores e colegas da Pós-Graduação, pela sabedoria compartilhada e por abrilhantar cada momento dessa caminhada.

RESUMO

Introdução: A ansiedade é um mecanismo preparatório de resposta a situações de ameaça e perigo, envolvendo fatores comportamentais, cognitivos, fisiológicos e afetivos. Indivíduos ansiosos acreditam que a probabilidade de eventos negativos ocorrerem é muito alta, sentindo-se ameaçados e reagindo de maneira equivocada. Em 2017 a OMS publicou pesquisa mostrando que o Brasil lidera, entre todos os países, em termos de prevalência de transtornos de ansiedade. A complexa patogênese da ansiedade é mediada por diversos neurotransmissores. O glutamato, por ser um aminoácido excitatório do SNC, tem, como função, resguardar o animal e protegê-lo diante de algum perigo iminente. É um aminoácido abundante na dieta, sendo encontrado em grande parte nos alimentos de origem animal. O uso de dietas hiperproteicas vem ganhando popularidade nos últimos anos, sendo utilizada como estratégia alimentar para promover redução de peso corporal em indivíduos com sobrepeso e obesidade, e estudos demonstraram efeitos benéficos na massa muscular e para a saúde cardiovascular. **Objetivo:** Investigar a relação da dieta com alto teor de proteínas na ansiedade e em aspectos morfofuncionais e cardiovasculares de ratos Wistar. **Material e Métodos:** O experimento foi realizado na Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU) e teve duração de oito semanas. Foram utilizados 29 ratos machos da raça Wistar, com peso médio entre 250-300g, divididos em dois grupos, um com dieta padrão normoproteica (C= 14 animais) e outro com dieta hiperproteica (H=15 animais). A ansiedade foi avaliada pelo teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e os aspectos cardiovasculares por medidas hemodinâmicas invasivas e ecocardiografia transtorácica. Para as comparações entre os grupos utilizou-se o Teste t de Student ou a análise de variância (ANOVA), seguida, quando necessário, pelo teste de Tukey. A significância estatística foi estabelecida para valores de $p \leq 0,05$. **Resultados:** Não houve diferença estatisticamente significativa no teste de ansiedade, porém, o grupo hiperproteico se mostrou mais agitado apresentando um maior deslocamento durante o teste. Foram encontradas alterações morfofuncionais significativamente menores no grupo que recebeu a dieta hiperproteica: volume sistólico final e diastólico final, diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole e frequência cardíaca. A espessura do septo interventricular na diástole foi maior no grupo hiperproteico. Não foram observadas alterações hemodinâmicas. **Conclusão:** A dieta hiperproteica não teve influência na ansiedade mas induziu adaptações morfofuncionais no coração, sugerindo um menor trabalho cardíaco.

Palavras-chave: ansiedade, dieta alta em proteína, coração, pressão arterial.

ABSTRACT

Introduction: Anxiety is a preparatory response mechanism to situations of threat and danger, involving behavioral, cognitive, physiological and affective factors. Anxious individuals believe that the likelihood of negative events occurring is very high, feeling threatened and reacting in the wrong way. In 2017, WHO published research showing that Brazil leads, among all countries, in terms of the prevalence of anxiety disorders. The complex pathogenesis of anxiety is mediated by several neurotransmitters. Glutamate, as an excitatory amino acid of the CNS, has the function of protecting the animal and protecting it from any imminent danger. It is an abundant amino acid in the diet, being found largely in foods of animal origin. The use of high protein diet has been gaining popularity in recent years, being used as a dietary strategy to promote body weight reduction in overweight and obese individuals, and studies have shown beneficial effects on muscle mass and cardiovascular health. **Objective:** To investigate the relationship of diet with high protein content in anxiety and in morphofunctional and cardiovascular aspects of Wistar rats. **Material and Methods:** The experiment was carried out at the Rodent Animal Bioterium Network of the Federal University of Uberlândia (REBIR-UFU) and lasted eight weeks. Twenty-nine male Wistar rats were used, with an average weight between 250-300g, divided into two groups, one with a standard normoproteic diet (C = 14 animals) and another with a high protein diet (H = 15 animals). Anxiety was assessed by the elevated plus-maze test (CSF) and cardiovascular aspects by invasive hemodynamic measurements and transthoracic echocardiography. For comparisons between groups, Student's t-test or analysis of variance (ANOVA) was used, followed, when necessary, by the Tukey test. Statistical significance was established for p values ≤ 0.05 . **Results:** There was no statistically significant difference in the anxiety test, however, the hyperproteic group was more agitated with a greater displacement during the test. Significantly less morphofunctional changes were found in the group that received the high-protein diet: final stroke volume and final diastolic volume, left ventricular diameter in systole and heart rate. The thickness of the interventricular septum in diastole was greater in the hyperprotein group. No hemodynamic changes were observed. **Conclusion:** The high protein diet had no influence on anxiety but induced morphofunctional adaptations in the heart, suggesting less cardiac work.

Keywords: anxiety, high protein diet, heart, blood pressure.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Homogeneização e preparação da ração.....	24
Figura 2. Pellets na estufa de ar circulante a 60°C durante 48 horas.....	24
Figura 3. Medidas do Labirinto em Cruz Elevado.....	26
Figura 4. Animal durante o teste no LCE.....	27
Figura 5. Corte e exposição da artéria femoral.....	28
Figura 6. Processo de canulação da artéria femoral.....	28
Figura 7. Registro da pressão arterial em repouso.....	29
Figura 8. Equipamento utilizado no ecocardiograma (GE Healthcare Ultrasound – LOGIQ F6).....	30
Figura 9. Imagem do software GE Healthcare Ultrasound – LOGIQ F6), utilizado no ecocardiograma.....	30

LISTA DE ILUSTRAÇÕES ARTIGO

Figura 1. Desenho do estudo.....	33
Figura 2. Aparelho de labirinto em cruz elevado (LCE).....	34
Figura 3. Análise do tempo nos braços abertos no teste LCE.....	36
Figura 4. Análise do número de entradas totais no teste LCE.....	37
Figura 5. Gráfico frequência cardíaca durante análise hemodinâmica.....	37
Figura 6. Análise do ecocardiograma com diferenças significativas entre os grupos.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da ração comercial Nuvilab CR1 – Nuvital do grupo normoproteico.....	23
Tabela 2. Composição da ração hiperproteica com adição de Whey Protein Isolado à ração padrão Nuvilab CR1 – Nuvital.....	24
Tabela 3. Informações nutricionais do suplemento Whey Protein Isolado Provon 292 Glanbia Nutritionals.....	25

LISTA DE TABELAS ARTIGO

Tabela 1. Composição da ração comercial Nuvilab CR1 – Nuvital do grupo normoproteico.....	34
Tabela 2. Composição química da ração hiperproteica com adição de Whey Protein Isolado à ração padrão Nuvilab CR1 – Nuvital.....	34
Tabela 3. Consumo semanal de ração e peso dos animais.....	36
Tabela 4. Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	36
Tabela 5. Análise hemodinâmica.....	37
Tabela 6. Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo.....	38
Tabela 7. Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência.....	38
Tabela 8. Variabilidade da pressão arterial no domínio do tempo, frequência e sensibilidade barorreflexa.....	38
Tabela 9. Análise ecocardiográfica do coração.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIN	American Institute of Nutrition
AHA	American Heart Association
AMDR	Faixa aceitável de distribuição de macronutrientes
ANOVA	Análise de variância
BEI ALL	Sensibilidade barorreflexa
C	Carbono
CON	Controle
DCV	Doenças cardiovasculares
DDF	Diâmetro diastólico final
DIVED	Diâmetro do ventrículo esquerdo na diástole
DIVES	Diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole
EPM	Erro padrão da média
FC	Frequência cardíaca
FE	Fração de ejeção
FS	Fração sistólica
G	Gramas
HA	Hipertensão arterial
HF	Alta frequência normalizada da área
HM	Hipotálamo medial
IC	intervalo cardíaco
IDR	Ingestão Diária Recomendada
RR	Intervalo despolarização ventricular representada no eletrocardiograma pela onda R
LF	Baixa frequência normalizada da área
LF/HF	Relação baixa frequência/alta frequência
MCP	Matéria Cinzenta Periaquedutal
MHZ	Um milhão de Hertz
NMDA-R	N-metil-D-aspartato
LVEDD	Medidas do diâmetro diastólico final

LVEDS	Diâmetro da sistólico final do ventrículo esquerdo
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PNN50	Porcentagem de pares de intervalos RR com diferença de pelo menos 50 ms
PP	Pressão de pulso
RMSSD	Raiz quadrada da soma quadrática média das diferenças dos intervalos RR adjacentes
SDNN	Desvio padrão da média de todos os intervalos RR normais
SIVD:	Septo interventricular na diástole
SIVS	Septo interventricular na sístole
SNC	Sistema nervoso central
VDF	Volume diastólico final
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca
VSF	Volume Sistólico final

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 Ansiedade.....	16
2.2 Dieta hiperproteica.....	18
2.2.1 Dieta à base de proteína na saúde cardiovascular	19
3. OBJETIVO GERAL	21
3.1 Objetivos Específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Considerações gerais.....	22
4.2 Delineamento experimental	22
4.3 Composição e Elaboração da Dieta	23
4.4 Testes em labirinto de cruz elevado (LCE)	26
4.5 Análises hemodinâmica e da frequência cardíaca	27
4.5.1 Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca	28
4.6 Ecocardiografia Transtorácica	29
4.7 Análise estatística	30
5. ARTIGO.....	32
6. REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

A ansiedade é reconhecida como uma importante resposta fisiológica e comportamental, produzida com intuito o de evitar danos ao indivíduo e aumentar as suas chances de sobrevivência (SARTORI, *et al.*, 2011). O sentimento de ansiedade é desconfortante e penoso, nele a preocupação é caracterizada por antecipação de um provável perigo devido ao medo de uma situação não conhecida ou estranha (ALLEN, *et al.*, 1995; SWEDO, *et al.*, 1994). Para Carobrez (2003), a maneira de se auto proteger é um comportamento que faz parte do universo da ansiedade do animal e serve como uma estratégia de ação rápida frente a um perigo potencial. A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2000), mostra que pelo menos um terço da população de alguns países passa por episódios patológicos de ansiedade.

Quando há esse perigo potencial da ansiedade, conexões neurais são sinalizadas através do glutamato para reter informações e tornar mais fácil o aprendizado em relação àquele perigo (CAROBREZ, 2003). O glutamato por ser um aminoácido excitatório, tem, como ação, resguardar o animal e protegê-lo de algum perigo iminente. (POZZER, *et al.*, 2007). Por excitar constantemente o sistema nervoso central (SNC), o glutamato é o neurotransmissor mais abundante neste sistema e desempenha papel importante, respondendo por, aproximadamente, 75% da atividade excitatória do cérebro (TORTORA; GRABOWSKI, 2002).

O glutamato é o aminoácido mais abundante na dieta, sendo encontrado em grande parte dos alimentos à base de proteína (CAROBREZ, 2003; TAPIERO, *et al.*, 2002). Nos últimos anos, a adesão a dietas hiperproteicas vem ganhando espaço na sociedade (APARICIO, *et al.*, 2013). Essas dietas são utilizadas normalmente como estratégias de controle na redução do peso corporal, principalmente por indivíduos obesos (BANTLE, WYLIE-ROSETT, 2008; LEPE, 2011).

Alguns estudos nacionais e internacionais, realizados tanto em crianças como em adultos, observaram que boa parte dos países industrializados, e muitos em desenvolvimento, apresentam um consumo de proteína que excede às recomendações dietéticas diárias (BASTARDO, *et al.*, 2008; NOLAN, *et al.*, 2002). Devido à escassez de estudos relacionando as dietas hiperproteicas com glutamato e ansiedade, se torna importante compreender essa possível associação. Além disso, a ingestão elevada de proteínas pode causar efeitos adversos na saúde cardiovascular.

Grande parte da literatura científica defende as dietas hiperproteicas como forma preventiva para doenças cardíacas (BILSBOROUGH, *et al.*, 2006; NORTON, 2012). Na

metanálise de Zhao, *et al.* (2018), envolvendo dieta hiperproteica para pacientes com diabetes tipo 2, os resultados indicaram que essa estratégia alimentar é benéfica para diminuir o risco cardiovascular. Também, uma dieta rica em proteínas poderia manter a síntese proteica e evitar ou retardar a deterioração mitocondrial e a função ventricular esquerda (RIBEIRO; DABKOWSKI; O'CONNELL, 2014).

Diversos estudos mostram que a dieta hiperproteica é benéfica para o sistema cardiovascular (PAVLOU, *et al.*, 2018; SABAKA, *et al.*, 2017) utilizando, como justificativa para essa comprovação, a existência de respostas hemodinâmicas favoráveis. O mecanismo que relaciona o consumo de uma dieta hiperproteica à ansiedade e a aspectos morfofuncionais cardiovasculares ainda não são bem compreendidos e estão justificados os estudos nessa área devido ao crescimento da adesão às dietas hiperproteicas na sociedade.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Ansiedade

Quando se trata de saúde mental, o transtorno de ansiedade é o mais prevalente (KESSLER, *et al.*, 2010). Dados do ano de 2012 mostram que um em cada nove indivíduos no mundo inteiro desenvolveu ansiedade (BAXTER, *et al.*, 2013). Para a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017) entre 1990 e 2013 o número de pessoas acometidas de ansiedade ou depressão elevou-se em quase 50%, correspondendo a aproximadamente 30% de todas doenças não fatais no mundo. Em 2017 a OMS publicou uma pesquisa mostrando que o Brasil lidera entre todos outros países em prevalência de transtornos de ansiedade e é o quinto com mais casos de depressão.

A ansiedade é um mecanismo preparatório colocado em ação em situações de ameaça e perigo, envolvendo fatores comportamentais, cognitivos, fisiológicos e afetivos (CARDOZO, *et al.*, 2016). Pessoas ansiosas acreditam que a probabilidade de eventos negativos ocorrerem é muito alta, sentem-se ameaçadas pelo perigo e podem reagir de maneira equivocada, seguindo este pensamento obsessivo (MOURA, *et al.*, 2018). Apesar da ansiedade ser conhecida como um transtorno mental, ela pode ser acompanhada por sintomas físicos, prejudicando a qualidade de vida das pessoas.

Os sinais e sintomas podem ser divididos em: autonômicos, musculares, cenestésicos e psíquicos (ANDRADE, *et al.*, 1994). Pela complexidade e diversidades de sintomas e sinais, a etiologia da ansiedade compreende vários neurotransmissores em diferentes áreas do cérebro. Muitos neurotransmissores estão associados na regulação e modulação do comportamento defensivo que originam a ansiedade. Dentre eles estão as aminas biogênicas (noradrenalina, serotonina e dopamina), aminoácidos (GABA e glicina), alguns peptídeos, além de esteroides, como a corticosterona (CLEMENT; CHAPOUTHIER, 1998; GRAEFF, 2007).

O sistema límbico é uma estrutura importante para a ansiedade, pois está envolvido na interação entre mecanismos fisiológicos e comportamentais voltados às reações de defesa (CLEMENT; CHAPOUTHIER, 1998). Este sistema é considerado a base das emoções, do comportamento e da memória, sendo dividido em sistema de inibição comportamental (SIC) e sistema cerebral de defesa (SCD) (GRAEFF; HETEM, 2004).

O SCD é formado por estruturas nervosas: amígdala, hipotálamo medial (HM) e matéria cinzenta periaquedutal (MCP). A amígdala é importante na formação e na recuperação de emoções relacionadas ao medo, servindo como base cerebral para o comportamento defensivo. Suas conexões nervosas atuam interagindo de maneira sensório emocional e conseguindo

classificar a magnitude do estímulo (GRAEFF; HETEM, 2004). A amígdala é responsável pela expressão do medo e pela consecutiva resposta à agressão, ou seja, é a base cerebral essencial para o comportamento defensivo, desempenhando um papel importante na formação e recuperação de memórias emocionais e respectivas aos medos relacionados (GRAEFF; HETEM, 2004; KIM; GORMAN, 2005).

A retroalimentação negativa no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é realizada pelo hipotálamo medial que também possui controle tônico inibitório de resposta ao estresse hipotalâmico (MARTIN, *et al.*, 2010). A formação do septo-hipocampal desempenha um papel de destaque no sistema de inibição comportamental. A ativação desse sistema, por sinais de frustração, punição, situações ameaçadoras ou estímulos novos, provoca letargia no animal aumentando o estado de vigília (GRAEFF; HETEM, 2004).

Além do sistema límbico, o córtex pré-frontal, que é responsável por vários processos cognitivos, tem sido implicado na patogênese da ansiedade (LANDEIRA-FERNANDEZ, 2011). Essa região cortical medeia o controle da função executora e o controle emocional (EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012).

Pesquisas, utilizando animais de laboratório, mostraram que situações novas ou reaparição de uma ameaça real, promove ação do complexo da amígdala e septo-hipocampal, com a função de discernir as circunstâncias e comparar memórias armazenadas e experiência real (GELFUSO, *et al.*, 2014).

A comunicação com toda essa rede complexa da patogênese da ansiedade é mediada por diversos neurotransmissores. A ansiedade pode ser desencadeada por uma série de hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, esteroides (cortisol), monoaminas, colecistoquinina e aminoácidos, como o ácido gama-aminobutírico (GABA), glicina e L-glutamato (MARGIS, *et al.*, 2003; GRAEFF; BRANDÃO, 1997).

Em meados de 1985, começaram a ser estudados os efeitos dos aminoácidos excitatórios no comportamento defensivo aos perigos presentes (CAROBREZ, 2003). Glutamina e glutamato, juntamente com prolina, histidina, arginina e ornitina, totalizam cerca de 25% dos aminoácidos contidos na dieta e fazem parte de uma família de aminoácidos que são eliminados e convertidos em glutamato. O ácido glutâmico é um aminoácido presente em muitos alimentos, como, vegetais, frutas e em grande quantidade na proteína animal (TAPIERO, *et al.*, 2002).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central de mamíferos (OZAWA; KAMIYA; TSUZUKI, 1998). É sintetizado a partir da glutamina pela ação da glutaminase e metabolizado em glutamina pela glutamina sintetase (HASHIMOTO, 2014). O surgimento de diversos transtornos neuropsicológico vem sendo atribuído à disfunção

dos transportadores de glutamato (TROTTI, 2002). Ratos que receberam doses de 3 e 5mg/kg de glutamato apresentaram efeito ansiogênico verificado durante o teste de labirinto em cruz elevado (LCE) (POZZER, *et al.*, 2007).

Em relação aos receptores, diferentes evidências sugerem que padrões anormais na neurotransmissão glutamatérgica, através do N-metil-D-aspartato (NMDA-R), sejam responsáveis pela fisiopatologia de alguns transtornos depressivos (HASHIMOTO, 2014; SANACORA; SCHATZBERG, 2015).

2.2 Dieta hiperproteica

As proteínas são formadas a partir de ligações peptídicas formando polímeros de aminoácidos. Cada aminoácido apresenta um grupo carboxila (COOH), um grupo amina (NH₂) e uma cadeia lateral distinta (Grupo R) ligados a um átomo de carbono (C) (NELSON; COX, 2002). Dietas hiperproteicas elevam as concentrações de aminoácidos plasmáticos (VELDHORST, *et al.*, 2009). Classicamente, a ingestão diária recomendada de proteína é de 0,8g/kg, quantidade esta suficiente para adultos saudáveis não praticantes de exercício físico (DRI, 2005). Alguns esportistas chegam a consumir de 2 a 4g de proteína por quilo de peso corporal (TARNOPOLSKY, *et al.*, 1992).

O macronutriente responsável pela construção e manutenção de massa muscular é a proteína que também possui a capacidade de elevar o efeito térmico dos alimentos e promover saciedade após sua ingestão. Estes efeitos podem justificar o crescimento da adesão às dietas hiperproteicas como uma estratégia para a redução de peso e para o fornecimento de matéria prima para que ocorra a hipertrofia muscular (BILSBOROUGH; MANN, *et al.*, 2006). O uso de dietas hiperproteicas ganhou, assim, popularidade nos últimos anos. Estratégia alimentar rica em proteína para promover redução de peso corporal em indivíduos com sobrepeso e obesidade vem crescendo a cada dia (LEPE; BACARDÍ; JIMÉNEZ, 2011). A dieta mais conhecida pela sociedade com grande número de adeptos é do doutor Atkins (1993). Nos dias atuais, parte da população que busca estética corporal magra em curto período de tempo, também vem buscando este caminho através da dieta hiperproteica para potencializar o processo de emagrecimento (JALLINOJA, *et al.*, 2014).

É preciso salientar que o organismo consegue suportar a alta ingestão de proteína, mas esta não é, necessariamente, a maneira ideal para oferecer matéria prima para construção muscular (BILSBOROUGH; MANN, *et al.*, 2006) ou para emagrecer.

Há anos, tem sido debatida, na comunidade científica, a segurança das pessoas que aderem ao consumo de dietas com alto teor de proteínas. No ano de 2011 o posicionamento do

Comitê de Nutrição da *American Heart Association* (AHA), concluiu que as dietas hiperproteicas representavam um risco adicional para o desenvolvimento de doenças. Porém, várias pesquisas foram realizadas nesta área e uma grande parcela delas não corrobora essa afirmação (NORTON, 2012).

2.2.1 Dieta à base de proteína na saúde cardiovascular

O exagerado consumo de proteína, principalmente a proveniente da carne, conferiu a esse tipo de dieta uma má imagem na sociedade. É fato, porém, que boa parte da literatura científica defende as dietas hiperproteicas como forma preventiva para doenças cardíacas (BILSBOROUGH, *et al.*, 2006; NORTON, 2012). Um exemplo disso, é que tem sido sugerida dieta hiperproteica como parte do tratamento para estágios avançados de insuficiência cardíaca (RIBEIRO, *et al.*, 2014).

Foi identificado que o aumento de proteína e de energia total na dieta é capaz de prevenir ou mesmo de reverter a caquexia em pacientes com insuficiência cardíaca (ROZENTRYT P; VON HAEHLING S; LAINSCAK M, 2010). Pesquisas de intervenção sugerem que alta ingestão de proteína em indivíduos com massa corporal estável, tem efeitos menores, ou até mesmo nenhum, no risco de desenvolver doenças cardiovasculares (HE, *et al.*, 2011).

Ribeiro, *et al.* (2014), analisando ratos com insuficiência cardíaca induzida por sobrecarga pressórica imposta ao ventrículo esquerdo, verificou que a dieta hiperproteica não alterou a massa cardíaca, o volume ventricular esquerdo, a fração de ejeção e a capacidade oxidativa mitocondrial do miocárdio. Uma metanálise foi feita em relação ao uso de dieta hiperproteica em pacientes com diabetes mellitus tipo 2; os resultados indicaram redução de fatores de risco cardiovascular (ZHAO, *et al.*, 2018).

Foi evidenciado, em dois ensaios clínicos randomizados, que o aumento da ingestão proteica levou a maior redução da pressão arterial, em relação ao alto consumo de carboidratos (APPEL, *et al.*, 2005) e à suplementação com carboidratos (HE, *et al.*, 2011). Um grande estudo transversal com indivíduos que fizeram exame médico anual entre 2004 e 2010, sugere que a alta ingestão de calorias de origem proteica pode estar associada ao alto risco de hipertensão arterial (KUWABARA, *et al.*, 2019). Este achado reforça o conhecimento que já se tinha de o fato da ingestão de proteína ter a capacidade de elevar a pressão arterial média em animais de experimentação e em humanos (ENGEL; SWENSON, 1969).

Vários aspectos da alimentação e dieta saudável estão diretamente associados a maior variabilidade da frequência cardíaca (VFC) (HAYLEY A; YOUNG; BENTON D, 2018).

Exemplo disso é a característica da dieta mediterrânea que demonstra uma associação positiva na VFC, sugerindo que o tônus autonômico age induzindo à uma menor taxa de eventos cardiovasculares (DAI J, *et al.*, 2010). A hipertensão induzida pela dieta com baixo teor de proteína durante a amamentação demonstrou uma associação com aumento do tônus simpático nas proles adultas (BARROS, *et al.*, 2014). Jaatinen *et al.*, (2014) estudando o impacto de um iogurte enriquecido com lactoalbumina, peptídeos e vitaminas do complexo B em indivíduos ansiosos, perceberam que no grupo ativo a VFC (RMSSD) foi maior. A variabilidade da frequência cardíaca também pode ser usada para identificar aspectos positivos e negativos da dieta (HAYLEY A; YOUNG; BENTON D, 2018).

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi investigar a relação da dieta hiperproteica na ansiedade e em aspectos morfofuncionais cardiovasculares em ratos Wistar.

3.1 Objetivos Específicos

- Verificar o impacto da ingestão excessiva de proteínas na ansiedade estimada através do teste comportamental do labirinto em cruz elevado (LCE);
- Analisar as alterações morfofuncionais do coração pela ecocardiografia transtorácica;
- Quantificar as respostas hemodinâmicas a uma dieta hiperproteica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações gerais

O estudo conduzido foi do tipo experimental. Os procedimentos foram realizados após aprovação do Protocolo de Pesquisa 179/18, pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA). Todos os procedimentos seguiram os padrões definidos pelo comitê de ética responsável.

Foram utilizados 29 ratos machos, adultos, com peso médio entre 250-300 gramas da raça Wistar, fornecidos pela Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU), local onde foi realizado o estudo.

4.2 Delineamento experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos:

- Grupo 1: controle com 14 animais e dieta normoproteica (C);
- Grupo 2: hiperproteico com 15 animais e dieta rica em proteínas (H).

Após alocação randômica, os ratos permaneceram alojados em gaiolas coletivas, com lotação máxima de cinco animais em cada uma. O ambiente foi controlado, com ventilação, temperatura de aproximadamente 21°C e umidade do ar variando de 40 a 60%. Ao longo da pesquisa foi instituído um ciclo claro/escuro de 12 horas (claridade das 7h às 17h).

Foi realizada a pesagem prévia dos animais e todos tiveram acesso livre à alimentação e à água. As caixas de monitoramento e garrafas de água foram trocadas por material esterilizado duas vezes por semana, conforme protocolo do REBIR. O manuseio, limpeza das gaiolas e troca de alimentação e de água foram realizados em um gabinete de biossegurança, com fluxo de ar BS60 BioSafety Cabinet (Tecniplast®).

Foi realizado controle do peso corporal e do consumo de ração, semanalmente, utilizando-se uma balança de precisão. A alimentação foi substituída na mesma frequência e as sobras foram descartadas. A duração do experimento foi de oito semanas e durante todo o período houve perda de apenas um animal do grupo controle. Após todos os procedimentos experimentais, na oitava semana de estudo, os animais foram anestesiados, sendo amostra de sangue obtida por meio da punção cardíaca, e em sequência, procedeu-se a retirada do coração.

4.3 Composição e Elaboração da Dieta

Para o grupo controle (C) foi oferecida uma dieta padrão da marca Nuvilab CR-1 e sua composição nutricional está apresentada na Tabela 1. A dieta oferecida atende os requisitos nutricionais para um rato adulto, segundo as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN – 93M).

Tabela 1. Composição da ração comercial (Nuvilab CR1 – Nuvital) do grupo normoproteico.

Nutrientes	Dieta (100g)
Carboidrato	57
Proteína	22
Lipídio	4
Cinzas	9
Umidade	8
Energia Bruta (kcal/g)	3,5

Para o grupo hiperproteico (H), a dieta foi adaptada para atender aos requisitos nutricionais de um rato adulto. Conforme as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN – 93M), as dietas hiperproteicas devem conter 25 a 40% de proteína bruta em roedores de experimentação. Para atingir esta concentração, foram acrescentadas mais 18% de proteína à dieta do grupo controle. Para esta finalidade, utilizou-se o produto “Whey Protein” Isolado, Provon 292, da marca Glanbia Nutritionals, tornando a ração hiperproteica, com 40% de proteína bruta (Tabela 2).

Figura 1. Homogeneização e preparação da ração.



Fonte: O autor (2020).

Figura 2. Pellets da ração na estufa de ar circulante a 60°C durante 48 horas.



Fonte: O autor (2020).

Tabela 2. Composição da ração hiperproteica com adição de Whey Protein Isolado à ração padrão Nuvilab CR1 – Nuvital

Nutrientes	Dieta (100g)
Carboidrato	57,7
Proteína	40

Lipídio	4,16
Energia Bruta (kcal/g)	4,2

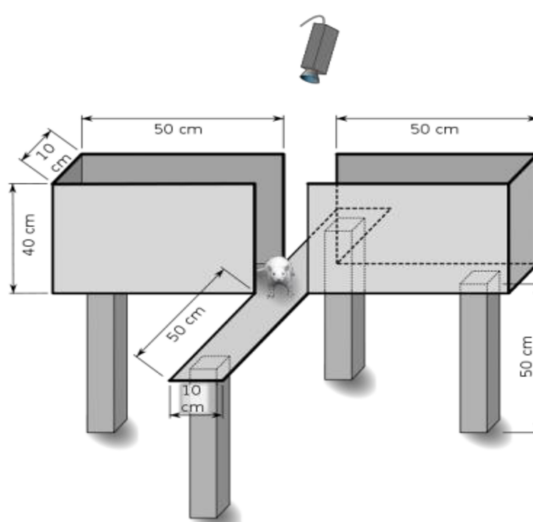
Tabela 3. Informações nutricionais do suplemento Whey Protein Isolado Provon 292 Glanbia Nutritionals.

Informação Nutricional (100g)	
Calorias	380
Calorias da gordura	7.0
Gordura total	0.8 g
Gordura saturada	0.2 g
Gordura poli-insaturada	0.3 g
Gordura monoinsaturada	0.2 g
Ácido graxo trans.	0.1 g
Colesterol	12 mg
Total de Carboidrato	3.4 g
Fibra alimentar	-
Açúcares	0.7 g
Proteína	88.9 g
Vitamina A	-
Vitamina C	-
Tiamina	-
Niacina	-
Riboflavina	-
Cálcio	415 mg
Sódio	249 mg
Potássio	551 mg
Magnésio	80 mg
Ferro	0,4mg
Fósforo	208 mg

4.4 Testes em labirinto de cruz elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um instrumento utilizado para medição do comportamento de ansiedade em ratos (Carobrez, A.P et al., 2005). O equipamento é formado por dois braços abertos e dois braços fechados, cada um medindo 50 x 10 cm, sendo cruzados por braços do mesmo tamanho e formando uma cruz. Os braços fechados são cercados com paredes laterais de 40 cm de altura, exceto no meio, delimitando uma plataforma central de 10 x 10 cm. As Figuras 3 e 4 retratam pormenores do equipamento utilizado.

Figura 3. Medidas do Labirinto em Cruz Elevado

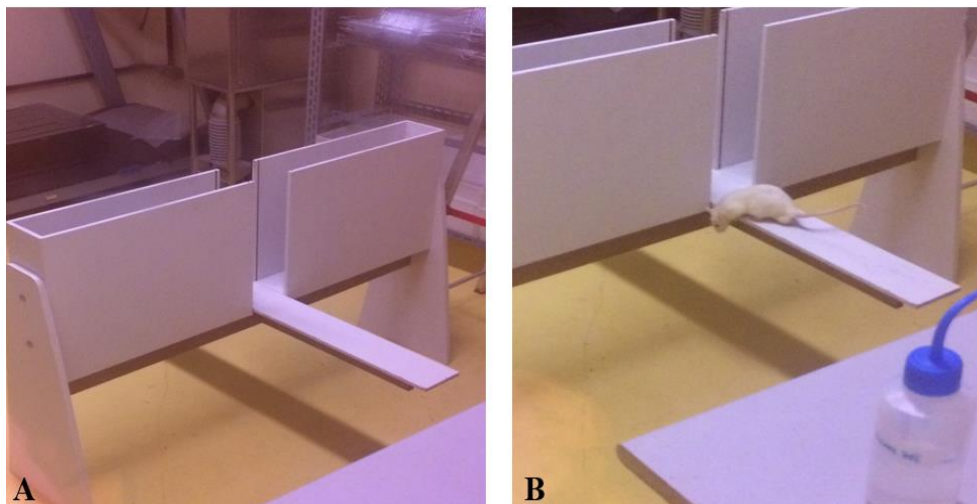


Fonte: JOHN, (2010). commons.wikimedia.org.

Cada animal foi posicionado no centro do labirinto, com a face voltada para um dos braços abertos, com o ambiente moderadamente iluminado. Foi permitido aos ratos explorar livremente o LCE por cinco minutos. Para evitar pistas odoríferas, o labirinto foi limpo com papel umedecido em solução de álcool a 70%. A eventual queda de um animal do labirinto implicou necessariamente na repetição do teste no dia seguinte. A entrada no ambiente foi definida quando o animal colocava as quatro patas nos braços e as sessões foram filmadas com auxílio de uma câmera e cronômetro. Todos os experimentos foram realizados no período matutino e vespertino (08:00h – 17:00h), com o experimentador fora da sala de teste.

Os parâmetros medidos no labirinto foram expressos pelo tempo que o animal permanecia nos braços abertos e o número total de entradas. A frequência com que o lado aberto é explorado representa baixa ansiedade e o número total de entradas representa a atividade motora do animal.

Figura 4. Labirinto em Cruz Elevado (A) e animal durante o teste (B).



Fonte: O autor (2020).

4.5 Análises hemodinâmica e da frequência cardíaca

Foram separados, aleatoriamente, seis ratos de cada grupo para análise hemodinâmica invasiva. O procedimento cirúrgico para acesso arterial foi feito na última semana do estudo, sendo os animais anestesiados, preliminarmente, com tiopental sódico (40mg/kg, i.v.) e, logo após, foi feita a administração inalatória de halotano (2%), em mistura com oxigênio (O₂) a 100%. A seguir foi realizada a canulação da artéria femoral para registro da pressão arterial.

Para a canulação arterial foram utilizados tubos de polietileno PE-50 (diâmetro interno de 0,05mm) soldados aos tubos de polietileno PE-10 (diâmetro interno de 0,01mm). Antes do implante, o interior das cânulas foi lavado e preenchido com heparina sódica 50UI/ml e solução fisiológica. As cânulas foram posicionadas através de uma pequena incisão inguinal (esquerda ou direita) em direção ao feixe vâsculo-nervoso e as extremidades de menor calibre das cânulas (PE-10) foram introduzidas na luz da artéria.

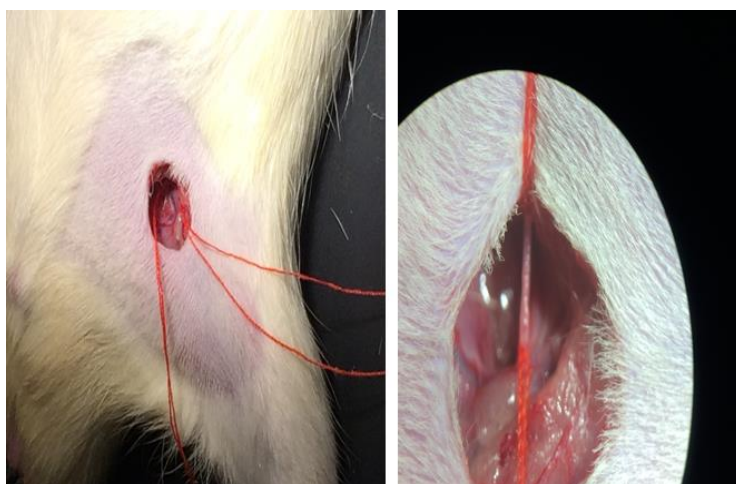
O procedimento está ilustrado nas Figuras 5 e 6.

Figura 5. Corte e exposição da artéria femoral.



Fonte: O autor (2020).

Figura 6. Processo de canulação da artéria femoral.



Fonte: O autor (2020).

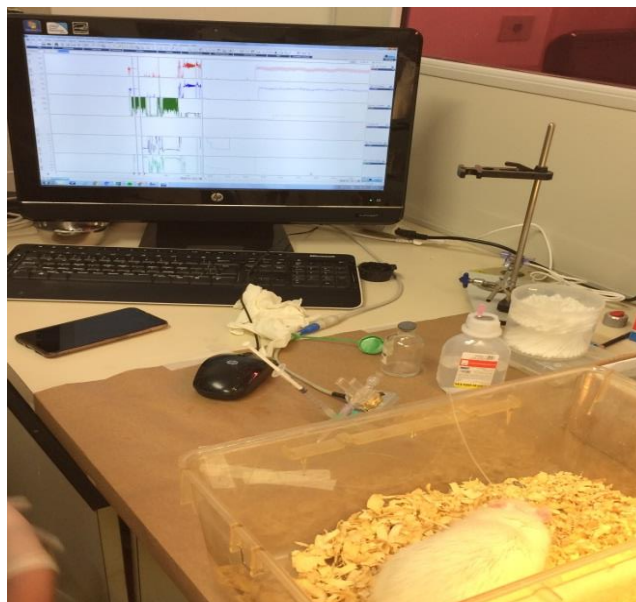
4.5.1 Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca

Antes de iniciar o registro da pressão arterial e da frequência cardíaca, foi injetada solução salina heparinizada (50UI/ml) na cânula implantada na artéria femoral com intuito de impedir a formação de coágulos e permitir a condução da onda de pulso durante o experimento. Em seguida, a cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão (mecano-elétrico), o qual foi acoplado ao amplificador BP100 (Ad Instruments) e ao sistema de digitalização computadorizado de registro Power Lab / 8 canais (Ad Instruments). A aquisição dos dados foi obtida por meio de software correspondente ao sistema de registro (Lab Chart v 8.0). Para

análise da variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial no domínio do tempo e da frequência foi usado o programa CardioSeries (PENTEADO, 2012).

O procedimento descrito está ilustrado na Figura 7.

Figura 7. Registro da pressão arterial em repouso.



Fonte: O autor (2020).

4.6 Ecocardiografia Transtorácica

Para análise estrutural e funcional do coração, selecionamos, aleatoriamente, oito animais de cada grupo. Todos os animais foram anestesiados com 0,1 ml / 100g de cetamina (10%) associada à mesma dose de xilazina (2%) e realizada tricotomia da região anterior do tórax sendo os animais colocados em decúbito lateral de 45 °. Para a aquisição das imagens, foi utilizado o aparelho de ultrassonografia GE, modelo Logiq-F6, e um transdutor de 8,0 MHz com profundidade de 3,0 cm e ângulo setorial de 75 °. Todos os procedimentos foram realizados no Hospital Veterinário. Utilizou-se o modo M e o corte paraesternal transversal direito, no plano das cordas tendíneas, para medidas do diâmetro diastólico final (DDFVE) e do diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSFVE). Estas medidas foram utilizadas para o cálculo da fração de encurtamento (FS) e da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) pelo método de Teichholz, *et al.*, 1976.

As Figuras 8 e 9 ilustram o procedimento.

Figura 8. Equipamento utilizado no ecocardiograma (GE Healthcare Ultrasound – LOGIQ F6).



Fonte: O autor (2020).

Figura 9. Imagem do software (GE Healthcare Ultrasound – LOGIQ F6), utilizado no ecocardiograma



Fonte: O autor (2020).

4.7 Análise estatística

Os resultados quantitativos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A normalidade foi testada por meio do teste Shapiro-Wilk. Para os dados normais, as comparações entre os grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, quando necessário. Para comparações de duas variáveis foi utilizado o Teste t de Student. A análise estatística foi realizada utilizando-se o pacote estatístico GraphPad Prism (versão 5.03). A significância estatística foi estabelecida para valores de $p \leq 0,05$.

Os resultados obtidos conforme as condições referidas previamente estão contidas no artigo apresentado a seguir.

5. ARTIGO

Efeitos da dieta hiperproteica na ansiedade, na hemodinâmica e em aspectos morfofuncionais do coração de ratos Wistar

Flander Diego de Souza¹, Thiago Montes Fidale^{1, 2}, Marcos Luiz Ferreira Neto¹, Matheus Matioli Mantovani³, Simone Ramos Deconte¹, Daniel Moreira Silva⁴, Elmiro Santos Resende¹.

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil.

² Universidade Federal de Goiás (Regional Catalão) , Goiás, Brasil.

³ Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

⁴ Universidade do Sul da Flórida, Tampa, Estados Unidos.

* Correspondência: esr_udi@hotmail.com; Tel.: +55-34-3218-2050.

Resumo: A ansiedade é um mecanismo preparatório para a resposta em situações de ameaça e perigo, envolvendo fatores comportamentais, afetivos e fisiológicos. Alimentos à base de proteína têm alta concentração de aminoácidos os quais desempenham múltiplas funções, entre elas, a biossíntese de transmissores excitatórios para o SNC. Nos últimos anos a adesão a dietas hiperproteicas vem ganhando espaço na sociedade, sob a argumentação de que ela traz benefícios para o sistema musculoesquelético e para a saúde cardiovascular. O objetivo do presente estudo foi investigar a relação da dieta hiperproteica na ansiedade e em aspectos morfofuncionais cardiovasculares em ratos Wistar. O experimento teve duração de oito semanas e dois grupos de ratos machos foram submetidos à dieta normoproteica ou hiperproteica. A ansiedade foi avaliada por meio do teste do labirinto em cruz e os aspectos morfofuncionais cardiovasculares por meio de ecocardiografia transtorácica e de medidas invasivas da pressão arterial femoral. Não houve diferença estatisticamente significativa no teste de ansiedade, porém, o grupo hiperproteico se mostrou mais agitado apresentando maior deslocamento durante o teste. Foram encontradas alterações no volume sistólico e diastólico final, diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole e frequência cardíaca, significativamente menores no grupo hiperproteico. E aumento da espessura do septo interventricular na diástole dos mesmos. Os resultados demonstraram não haver influência da dieta com alto teor de proteína sobre ansiedade dos animais, peso corporal e hemodinâmica.

Palavras chaves: dieta hiperproteica; ansiedade; coração.

1. Introdução

A ansiedade consta da escala de transtornos psicológicos acometendo, aproximadamente, 7,3% da população mundial [1]. É a emoção relacionada ao comportamento que avalia os riscos que frequentemente são lembrados em situações nas quais o perigo é incerto ou não está bem definido [2].

Alimentos à base de proteína contêm alta concentração de glutamato [3], principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) e responsável por 75% da atividade elétrica do cérebro [4]. Nos últimos anos, a adesão às dietas hiperproteicas vem ganhando maior espaço na sociedade [5]. Esse padrão alimentar com alto teor de proteínas, vem sendo uma estratégia eficaz no controle e na redução do peso corporal, principalmente em indivíduos obesos [6] [7], estimulando a saciedade e, conseqüentemente, reduzindo a ingestão alimentar [8].

Estudos mostram que a dieta hiperproteica é benéfica para o sistema cardiovascular, justificando ainda mais o interesse na compreensão dessa influência nas respostas hemodinâmicas [9] [10]. Embora os benefícios da dieta hiperproteica na saúde e composição corporal já estejam bem estabelecidos, o efeito dessa estratégia alimentar na ansiedade, em aspectos hemodinâmicos e morfofuncionais do coração ainda precisam ser elucidados. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da dieta hiperproteica versus dieta normoproteica nestas variáveis, em um modelo experimental utilizando ratos Wistar.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais e Dieta

O experimento foi realizado nas dependências da Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU) e todos os procedimentos seguiram o protocolo de ética do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) local, com parecer favorável número 179/18.

No estudo foram utilizados 29 ratos machos, adultos, da raça Wistar, com peso entre 250-300 gramas, fornecidos pela (REBIR-UFU).

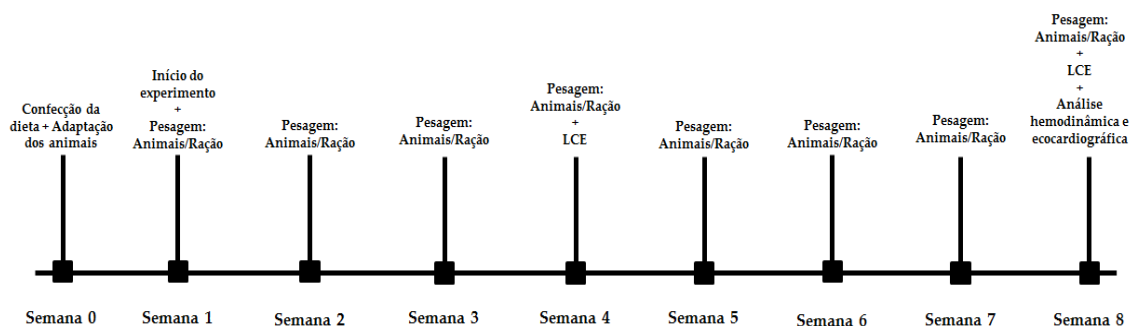


Figura 1. Desenho do estudo.

Os animais foram divididos em dois grupos sendo um o controle (C) com 14 animais alimentados com dieta padrão normoproteica; o segundo grupo (H), com 15 animais alimentados com dieta composta de 40% de proteína. Para o grupo controle foi oferecida uma dieta padrão da marca Nuvilab CR-1, com a composição nutricional apresentada na Tabela (1). A composição desta dieta atende aos requisitos nutricionais para ratos adultos, segundo as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN – 93M).

Os ratos foram alojados em caixas coletivas com lotação máxima de cinco animais por caixa, e tiveram acesso livre à alimentação e à água. As caixas de monitoramento e garrafas de água foram trocadas por material esterilizado duas vezes por semana, conforme protocolo do REBIR. A alimentação foi substituída na mesma frequência e as sobras foram descartadas. Foi realizado controle do peso corporal e do consumo de ração, semanalmente, utilizando-se uma balança de precisão. A duração do experimento foi de oito semanas e durante todo o período houve perda de apenas um animal do grupo controle.

O manuseio, limpeza das gaiolas e troca de alimentação e de água foram realizados em um gabinete de biossegurança com fluxo de ar BS60 BioSafety Cabinet (Tecniplast®). O ambiente foi controlado em relação à ventilação, temperatura (21°C) e com umidade variando de 40 a 60%. Ao longo da pesquisa foi instituído um ciclo claro/escuro de 12 horas (claridade das 7h às 17h). Após todos os procedimentos experimentais, na oitava semana de estudo, os animais foram anestesiados, sendo a coleta de sangue realizada por meio de punção cardíaca; na sequência foi feita a retirada do coração. O desenho experimental é mostrado na Figura 1.

Tabela 1. Composição química da ração comercial Nuvilab CR1 – Nuvital do grupo normoproteico.

Nutrientes	Dieta (100g)
Carboidrato	57
Proteína	22
Lipídio	4
Cinzas	9
Umidade	8
Energia Bruta (kcal/g)	3,5

A ração comercial foi adaptada para o grupo hiperproteico para atender aos requisitos nutricionais de um rato adulto. Conforme as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN – 93M), dietas hiperproteicas devem conter 25 a 40% de proteína bruta. Para atingir a concentração necessária, foram acrescentadas mais 18% de proteína à dieta do grupo controle. Para esta finalidade utilizou-se o produto “Whey Protein” Isolado, Provon 292, da marca Glanbia Nutritionals, tornando a ração hiperproteica, com 40% de proteína bruta (Tabela 2).

Tabela 2. Composição química da ração hiperproteica com adição de Whey Protein Isolado à ração padrão Nuvilab CR1 – Nuvital

Nutrientes	Dieta (100g)
Carboidrato	57,7
Proteína	40
Lipídio	4,16
Energia Bruta (kcal/g)	4,2

2.2. Avaliação da Ansiedade

Para avaliação da ansiedade foi aplicado o teste no labirinto em cruz elevado (LCE) que é um instrumento utilizado para medição da ansiedade em ratos [11]. O equipamento é formado por dois braços abertos e dois braços fechados, cada um medindo 50 x 10 cm, sendo cruzados por braços do mesmo tamanho formando uma cruz. Detalhes do equipamento são mostrados na Figura 2.

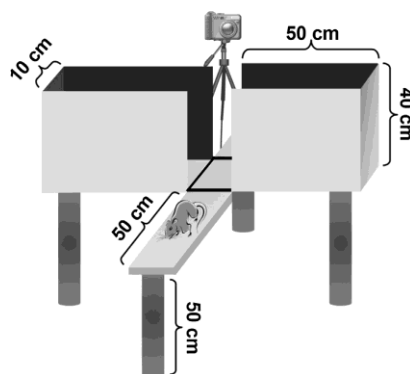


Figura 2. Aparelho de labirinto em cruz elevado (LCE). Fonte: Sweis B.M. et al., 2016, p. 150 [12].

Os braços fechados são cercados com paredes laterais de 40 cm de altura, exceto no meio, delimitando uma plataforma central de 10 x 10 cm. O ambiente foi moderadamente iluminado e cada animal colocado em direção a um dos braços abertos. Nesta posição o animal foi deixado durante cinco minutos para fazer livre exploração dos ambientes. A entrada no ambiente foi definida quando o animal colocava as quatro patas nos braços e cada sessão foi filmada com auxílio de uma câmera digital. Após cada teste, a plataforma foi higienizada com etanol a 70% [13] [14].

Os parâmetros medidos no labirinto foram expressos pelo tempo que o animal permanecia nos braços abertos e pelo número total de entradas. A frequência elevada com que o lado aberto é explorado representa baixa ansiedade e o número total de entradas representa a atividade motora do animal.

2.3. *Ecocardiografia Transtorácica*

A análise estrutural e funcional do coração foi feita pela ecocardiografia transtorácica em oito animais de cada grupo selecionados aleatoriamente. Todos os animais foram anestesiados com 0,1 ml / 100g de cetamina (10%) associada à mesma dose de xilazina (2%). Foi realizada a tricotomia anterior do tórax sendo os animais colocados em decúbito lateral de 45 °. Foi utilizado o aparelho de ultrassonografia GE, modelo Logiq-F6, e um transdutor de 8,0 MHz com profundidade de 3,0 cm e ângulo setorial de 75 °. Todos os procedimentos foram realizados no hospital veterinário da universidade. As medidas do diâmetro diastólico final (DDFVE) e do diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSFVE) foram feitas utilizando-se o modo M e o corte paraesternal transversal direito, no plano das cordas tendíneas. Estas medidas foram utilizadas para o cálculo da fração de encurtamento (FS) e da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) pelo método de Teichholz et al. (1976) [15].

2.4. *Registro invasivo da pressão arterial e da frequência cardíaca*

Foram separados, aleatoriamente, seis ratos de cada grupo para análise hemodinâmica invasiva. O procedimento cirúrgico foi feito na última semana do estudo, sendo os animais anestesiados, preliminarmente, com tiopental sódico (40mg/kg, i.v.); a seguir foi feita a administração inalatória de halotano (2%), em mistura com oxigênio (O₂) a 100%. Foi realizada a canulação da artéria femoral para registro da pressão arterial. A canulação da artéria femoral foi feita utilizando-se um cateter de polietileno cheio de líquido e conectado a um transdutor de pressão (mecano-elétrico) acoplado a um amplificador BP100 (Ad Instruments) e ao sistema de digitalização de registro Power Lab / 8 canais (Ad Instruments). A aquisição dos dados foi obtida por meio de software do sistema de registro (Lab Chart v 8.0). Para análise da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e da frequência foi usado o programa CardioSeries [16].

2.5. *Análise estatística*

Os resultados foram expressos em média ± erro padrão (EPM). A normalidade da distribuição amostral foi testada por meio do teste Shapiro-Wilk. Para os dados normais, as comparações foram realizadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, quando necessário, ou pelo Teste t de Student. A análise estatística foi realizada utilizando-se o pacote estatístico GraphPad Prism (versão 5.03). A significância estatística foi estabelecida para valores de $p \leq 0,05$.

3. Resultados

3.1. Consumo de ração e peso dos animais

O consumo semanal médio de ração foi semelhante nos dois grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa no peso corporal dos animais entre o grupo controle e o suplementado com ração hiperproteica. O registro das médias e erro padrão é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Consumo semanal de ração e peso dos animais

Variáveis	Controle (n=14)	Hiperproteico (n=15)	$\Delta\%$	p Valor
Consumo de ração	738,9 $\pm$ 43,8	690,4 $\pm$ 26,5	6,56%	0,359
Peso corporal	371,3 $\pm$ 12,3	384,2 $\pm$ 11,1	3,47%	0,448

Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão. $\Delta\%$: variação percentual. Com nível de significância para valor de $*p \leq 0,05$.

3.2. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

A Tabela 4 apresenta os valores das médias e o EPM referentes à variável tempo de permanência em segundos (s) nos braços abertos e o número total de entradas.

Tabela 4. Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Grupo	Tempo nos braços abertos (s)		Número total de entradas	
	4 semanas	8 semanas	4 semanas	8 semanas
Controle (n=14)	19,0 $\pm$ 5,1	20,3 $\pm$ 9,6	2,3 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,4
Hiperproteico (n=15)	19,6 $\pm$ 8,6	10,5 $\pm$ 4,1	2,5 $\pm$ 0,6	4,1 $\pm$ 0,7

Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão.

Foi realizada análise estatística nos dois pontos na linha do tempo em que o teste foi realizado. Não houve diferenças intragrupo no controle ($p=0,889$) e no hiperproteico ($p=0,523$). Na análise intergrupo também não foi encontrada diferença na quarta ($p=0,948$) e na oitava semana ($p=0,433$) (Figura 3).

Análise completa na quarta e oitava semana

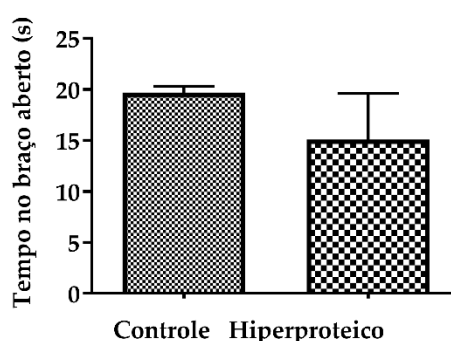


Figura 3. Análise do tempo nos braços abertos no teste LCE em duas situações: quarta e oitava semana. Número de animais: Controle (14) e Hiperproteico (15). Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão, com valor de significância de $p \leq 0,05$.

Para análise estatística do número de entradas totais no LCE, os resultados foram analisados na quarta e na oitava semana. Houve diferença significativa na comparação intragrupo apenas no grupo que recebeu dieta hiperproteica ($p \leq 0,020$) que apresentou maior número de entradas. Na análise intergrupo, este mesmo fato ocorreu apenas na oitava semana ($p \leq 0,012$) (Figura 4).

Análise completa na quarta e oitava semana

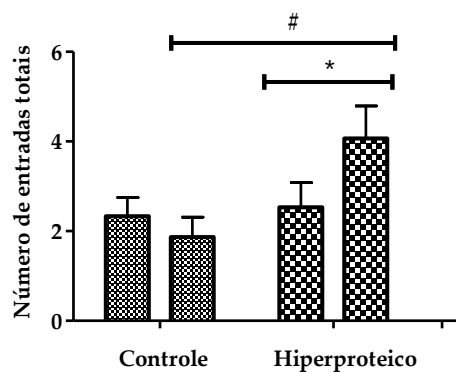


Figura 4. Análise do número de entradas totais no teste LCE em diferentes situações: quarta e oitava semana. Número de animais: Controle (14) e Hiperproteico (15). Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão, com valor de significância de $p \leq 0,05$. (#) Diferença intergrupo e (*) diferença intragrupo.

3.3. Análise hemodinâmica invasiva e variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial

O estudo hemodinâmico invasivo mostrou que os animais do grupo de dieta hiperproteica apresentaram frequência cardíaca mais baixa; não houve diferença estatística na pressão arterial entre os grupos (Tabela 5 e Figura 5).

Tabela 5. Análise hemodinâmica

Variáveis	Controle (n = 6)	Hiperproteico (n = 6)	p Valor
PAM (mmHg)	125,2 $\pm$ 3,1	121,6 $\pm$ 1,9	0,347
PAS (mmHg)	146,2 $\pm$ 3,5	147,8 $\pm$ 2,4	0,702
PAD (mmHg)	107,9 $\pm$ 3,4	102,0 $\pm$ 1,9	0,157
FC (bpm)	410,7 $\pm$ 6,6	381,4 $\pm$ 9,0	0,025

PAM: pressão arterial média; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; FC*: frequência cardíaca.

Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão com valor de $*p \leq 0,05$.

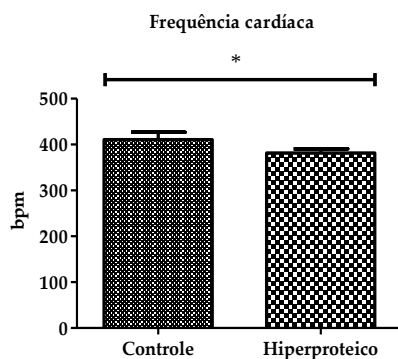


Figura 5. Análise da variabilidade da frequência cardíaca realizada na última semana de experimento. FC*: frequência cardíaca. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão com valor de $*p \leq 0,05$.

A análise da variabilidade da frequência cardíaca não mostrou diferenças estatisticamente significantes no domínio do tempo na média do intervalo cardíaco (IC), no desvio padrão dos intervalos RR (SD); na raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos R-R normais (RMSSD / Tabela 6).

Tabela 6. Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo

Variáveis	Controle (n = 5)	Hiperproteico (n = 5)	p Valor
IC	149,2 ± 1,4	158,4 ± 4,4	0,081
SD	5,8 ± 0,5	7,4 ± 0,9	0,142
VARIANCIA	34,6 ± 5,3	58,2 ± 13,2	0,135
RMSSD	4,0 ± 0,1	4,2 ± 0,3	0,455

IC: Média do intervalo cardíaco; SD: Desvio padrão dos intervalos RR; RMSSD: Raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos R normais. Resultados expressos em média ± erro padrão com valor de *p ≤ 0,05.

A análise do intervalo cardíaco no domínio da frequência, não mostrou diferenças significativas entre os grupos na média do intervalo cardíaco (IC), no componente de baixa e de alta frequência (LF e HF) absoluto e nulo, na razão LF/HF e na sensibilidade barorreflexa (BEI All) (Tabela 7).

Tabela 7. Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência

Variáveis	Controle (n = 5)	Hiperproteico (n = 5)	p Valor
IC	149,6 ± 1,5	158,8 ± 4,3	0,081
LF ABS	1,7 ± 0,4	3,3 ± 1,1	0,212
HF ABS	4,1 ± 0,2	5,4 ± 0,9	0,236
LF nu	27,4 ± 5,0	32,6 ± 6,1	0,528
HF nu	72,6 ± 5,0	67,4 ± 6,1	0,528
LF/HF	0,420 ± 0,104	0,584 ± 0,156	0,406

IC: Média do intervalo cardíaco domínio frequência; Componente de baixa e alta frequência LF e HF absoluto (ABS) e nulo (nu); Razão LF/HF. Resultados expressos em média ± erro padrão com valor de significância p ≤ 0,05.

A análise da variabilidade da pressão arterial no domínio do tempo, não mostrou diferenças na média (mmHg), SD e na variância. No domínio da frequência não houve diferenças em relação à média (ms) e no LF ABS, e sem alterações significantes na sensibilidade barorreflexa (BEI All) (Tabela 8).

Tabela 8. Variabilidade da pressão arterial no domínio do tempo, frequência e sensibilidade barorreflexa

Variáveis	Controle (n = 5)	Hiperproteico (n = 5)	p Valor
Dom. Tempo			
Média (mmHg)	143,8 ± 3,6	149,0 ± 3,4	0,325
SD	4,8 ± 0,4	5,5 ± 0,3	0,215
Variância	24,0 ± 4,1	30,3 ± 2,9	0,238
Dom. Frequência			
Média (ms)	143,8 ± 3,6	149,0 ± 3,4	0,325
LF ABS	9,6 ± 1,1	9,0 ± 1,3	0,755
Sens. Barorreflexa			
BEI ALL	0,086 ± 0,008	0,120 ± 0,018	0,128

SD: Desvio padrão dos intervalos RR; LF (ABS): Componente de baixa frequência absoluto; BEI ALL: Sensibilidade barorreflexa. Resultados expressos em média ± erro padrão com valor de significância p ≤ 0,05.

3.4. Ecocardiografia transtorácica

Na análise ecocardiográfica, observou-se que o volume sistólico final do VE foi menor no grupo de dieta hiperproteica e que a espessura do septo interventricular na sístole foi maior nesse mesmo grupo. Também houve tendência ao aumento do volume diastólico final do VE ($p=0,052$), redução do diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole ($p=0,054$) e na diástole ($p=0,065$). Os resultados constam da Tabela 9 e da Figura 6.

Tabela 9. Análise ecocardiográfica do coração

Variáveis	Controle (n = 8)	Hiperproteico (n = 8)	p Valor
FE (%)	65,87 ± 3,03	72,00 ± 2,06	0,117
FS (%)	32,12 ± 2,10	36,5 ± 1,80	0,137
VDF (ml)	0,82 ± 0,08	0,62 ± 0,05	0,052
VSF (ml)	0,29 ± 0,04	0,17 ± 0,02	0,033
SIVd (mm)	0,12 ± 0,005	0,14 ± 0,006	0,034
SIVs (mm)	0,20 ± 0,015	0,22 ± 0,009	0,394
DIVEs	0,71 ± 0,028	0,64 ± 0,0188	0,054
DIVEd	0,48 ± 0,030	0,40 ± 0,018	0,065

FE: fração de ejeção; FS: fração sistólica; FC: frequência cardíaca; VDF: Volume diastólico final; VSF: Volume sistólico final; SIVd: Septo interventricular na diástole; SIVs: Septo interventricular na sístole; DIVEd: Diâmetro do ventrículo esquerdo na diástole; DIVEs: Diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole. Resultados expressos em média ± erro padrão com valor de $p \leq 0,05$.

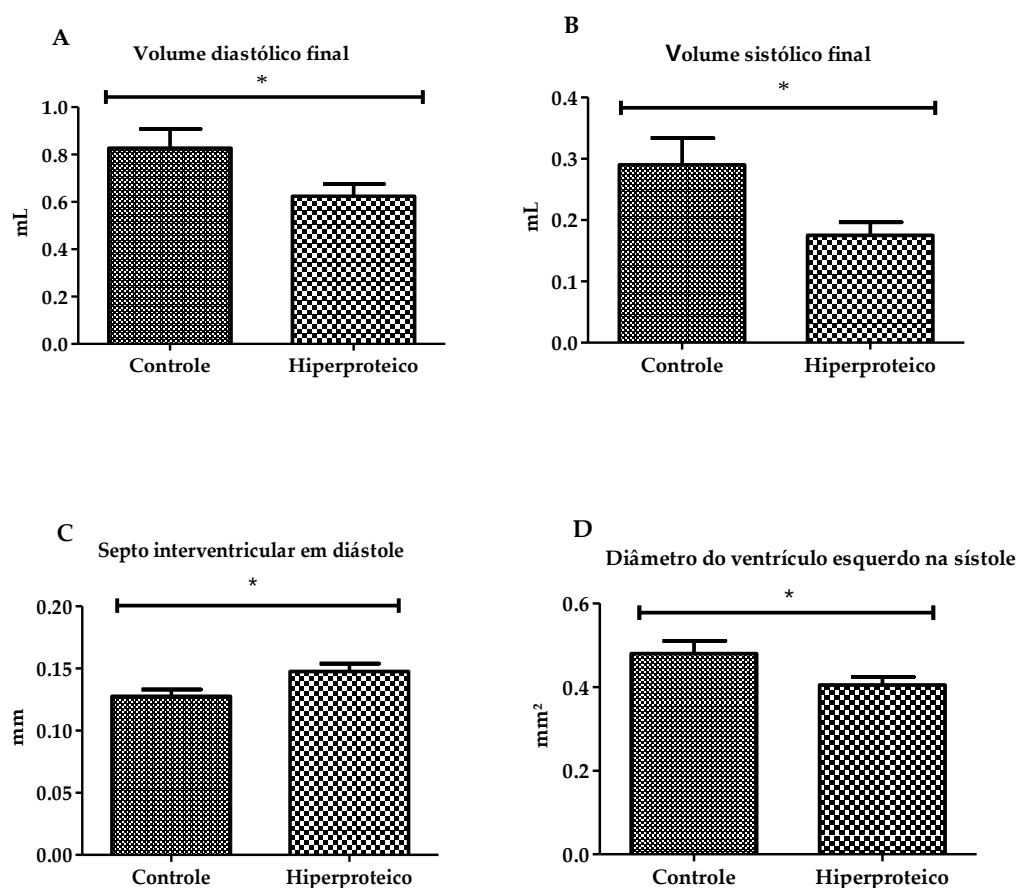


Figura 6. Análise do ecocardiograma com diferenças significativas entre os grupos. Resultados expressos em média ± erro padrão com valor significante de $*p \leq 0,05$.

4. Discussão

A relação entre o consumo de uma dieta hiperproteica com a ansiedade e com aspectos morfofuncionais do coração ainda não são bem compreendidos e foram analisados, nos limites do nosso conhecimento, de forma pioneira no presente estudo.

Já foi descrito que dietas ricas em proteínas, com 25% do total de energia ofertada, induz maior perda de peso quando comparado com uma dieta rica em carboidratos [17]. No presente estudo, um grupo de ratos Wistar recebeu dieta com aproximadamente 40% de proteína e compararam-se os resultados com os obtidos no grupo controle com dieta normoproteica. Ao final de oito semanas não foi encontrada diferença estatisticamente significativa no peso corporal total dos animais. Farnsworth, *et al*, (2003) [18], mostraram que a ingestão total de calorias reduzida é mais importante quando se pretende a redução de peso do que o teor elevado de proteínas. Porém, em um estudo analisando-se a dieta de voluntários americanos saudáveis, verificou-se que indivíduos que consumiam proteínas em quantidades que excediam as recomendações dietéticas diárias apresentaram menor índice de massa corporal [19].

Embora a comparação com outras pesquisas que não utilizaram o mesmo modelo experimental com ratos seja imprópria, uma das possibilidades para a não ocorrência da redução do peso corporal nos animais que receberam dieta hiperproteica no presente estudo pode ser atribuída à característica da distribuição de macronutrientes na dieta utilizada. Outra explicação pode estar relacionada ao tempo relativamente curto de exposição à dieta hiperproteica. As duas questões devem ser averiguadas em futuros experimentos, com outras formulações de dieta.

Uma pesquisa utilizando dieta hiperproteica ofertada *ad libitum*, por um período de 12 semanas, resultou em um quadro de saciedade maior do que a dieta com alto teor de proteína ofertada de forma isocalórica [20]. Finalmente, vale lembrar que a proteína é o macronutriente com maior efeito térmico no processo digestivo e absorptivo [21] e que o alto teor de proteína na dieta contribui para redução do peso devido ao aumento da taxa metabólica basal [22]. A ausência de redução do peso ao final do presente estudo poderia estar ligada à densidade calórica mais elevada no grupo que consumiu a dieta rica em proteína.

A proteína ingerida fornece ao organismo aminoácidos essenciais e não essenciais que são utilizados na biossíntese de novas proteínas, inclusive de neurotransmissores. A ingestão elevada de proteína pode afetar o funcionamento do cérebro e a saúde mental por produzir diferentes quantidades de neurotransmissores [23]. A hipótese testada no presente estudo é que a ração hiperproteica exerceria um efeito ansiogênico devido ao perfil aminoacídico da dieta. Diferentemente da hipótese inicial do nosso estudo, Haghighatdoost, *et al*, (2016) [24], ao avaliarem a influência da taxa glicêmica na ansiedade e depressão, sugerem que a redução de carboidratos refinados e a inclusão de mais proteína podem ser benéficas para a saúde mental. Em um relato de caso de paciente portadora de transtorno de ansiedade generalizada, constatou-se que alterações na composição de macronutrientes, diminuindo os carboidratos, principalmente os refinados, e acrescentando-se mais proteína e lipídios na dieta, poderia ter um efeito benéfico na diminuição dos sintomas clínicos [25].

No teste de labirinto em cruz permite verificar o estado de ansiedade do animal com base na exploração do braço aberto realizada pelo animal ao longo do tempo de investigação. Neste aspecto do teste não foi encontrada diferença de comportamento entre os grupos testados. Uma outra variável avaliada nesse mesmo teste foi o número de entradas totais do animal. Este resultado está associado com a atividade motora e foi maior na oitava semana no grupo de dieta hiperproteica, tanto na comparação intragrupo como na intergrupos.

Estudos têm evidenciado que a ansiedade relacionada ao estresse psicossocial está associada ao risco mais elevado de mortalidade cardiovascular [26][27] e um dos focos da presente pesquisa foi buscar compreender a relação da dieta hiperproteica na saúde cardiovascular a partir da análise do comportamento hemodinâmico dos animais. Estudos prévios demonstraram que a dieta hiperproteica associada à baixa ingestão de carboidratos produz redução na pressão arterial [28] [29]. Avaliando o

efeito protetor da dieta hiperproteica (40%) em três grupos de estudo: controle, whey protein e caseína, Singh et al (2016) [30] encontraram redução na pressão arterial sistólica, principalmente no grupo que recebeu o soro do leite.

A quantidade de proteína ofertada no grupo hiperproteico do presente estudo atingiu 40% de proteína bruta. Em um modelo animal, Martin et al (2015) [31] evidenciaram atenuação do aumento da pressão arterial sistólica associada com a idade em animais que consumiram dieta com alta quantidade de proteína do soro do leite e um dos motivos dessa resposta hemodinâmica poderia estar relacionado à quantidade de dipeptídeos capazes de inibir a enzima de conversão da angiotensina (ECA). Outros estudos demonstraram que as alterações no consumo de proteínas na dieta afetam o comportamento da pressão arterial sistólica em animais e também em humanos [32]. No presente estudo, utilizando-se medidas hemodinâmicas invasivas, não houve diferenças na pressão arterial sistólica, diastólica e média, mostrando que, no modelo proposto, a dieta hiperproteica não produziu as alterações já descritas na literatura. É preciso salientar que o efeito hipotensor não tem sido um achado consistente na literatura e uma metanálise que investigou o emprego da dieta hiperproteica comparada com outros tipos de dietas em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2 não demonstrou diferenças significativas na pressão arterial [33].

Ao analisar a modulação parassimpática, simpática e a sensibilidade barorreflexa, não encontramos nenhuma diferença significativa. Apesar do grupo hiperproteico apresentar uma taxa mais alta do componente de baixa frequência (low frequency – LF), que é derivado da ação conjunta dos componentes vagal e simpático sobre o coração, os resultados não atingiram significância estatística. Oliveira, *et al*, (2004) [34] mostraram que uma dieta com baixa quantidade de proteína promove aumento do nível basal da pressão arterial média, da frequência cardíaca e da variabilidade R-R. Nosso estudo mostrou que o grupo hiperproteico teve redução significativa da FC, em relação ao grupo controle.

A avaliação ecocardiográfica mostrou que o volume sistólico final e diastólico final, e o diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole, foram significativamente menores no grupo que recebeu a dieta hiperproteica. A espessura do septo interventricular na diástole também foi maior nos animais que receberam dieta hiperproteica, sugerindo que uma hipertrofia cardíaca ou um menor relaxamento diastólico possa ter ocorrido. Estas diferenças não foram acompanhadas de alterações na fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Estes resultados da ecocardiografia indicam que o consumo de dieta hiperproteica foi acompanhado por adaptações do coração que sugerem um modelo no qual um menor trabalho cardíaco possa ter ocorrido.

Este estudo é o primeiro, nos limites do nosso conhecimento, desenhado para examinar o efeito da dieta hiperproteica na ansiedade e na variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial sistólica. Entre as limitações do estudo, uma delas foi devida ao planejamento da dieta que permitiu a ingestão calórica diferente nos grupos experimentais. Outra limitação deriva do número relativamente baixo de animais que foram submetidos à análise hemodinâmica invasiva. São situações que deverão ser ajustadas nos próximos modelos experimentais.

5. Conclusão

A dieta hiperproteica não interfere na ansiedade do animal que possa ser evidenciada pelo teste do labirinto em cruz elevado. A dieta rica em proteína induz adaptações no coração que se caracterizam pelo menor trabalho cardíaco resultante da redução da FC sem redução concomitante da fração de ejeção do ventrículo esquerdo e da pressão arterial sistêmica. A análise da variabilidade R-R não mostra alterações na modulação do sistema nervoso autônomo que possam estar envolvidas nos resultados encontrados.

6. Referências

1. Craske, Mg.; Stein, Mb. Anxiety. *Lancet*. **2016**, 388 , 3048– 3059. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30381-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30381-6)
2. Graeff, F.G. Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Article in *Revista Brasileira de Psiquiatria*. **2007**. <https://doi.org/10.1590/S1516-44462007000500002>
3. Carobrez, A. P. Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. **2003**, v. 25, n. 2, 52-58. <https://doi.org/10.1590/S1516-44462003000600012>
4. Tortora, G. J.; Grabowski, S. R. Princípios de anatomia e fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara, **2002**.
5. Aparicio, V. A.; Nebot, E.; García-Del Moral, R.; Machado-Vílchez, M.; Porres, J. M.; Sánchez, C. and Aranda, P. High-protein diets and renal status in rats. *Nutr Hosp*. **2013**, 28 (1), 232-237. [doi: 10.3305/nh.2013.28.1.6165](https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6165).
6. Bantle, J.P.; Wylie-Rosett, J.; Albright, A.L.; Apovian, C.M.; Clark, N.G.; Franz, M.J.; et al. Nutrition recommendations and interventions for diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. **2008**, 61-78. <https://doi.org/10.2337/dc08-S061>
7. Lepe, M.; Bacardi Gascon, M.; Jimenez Cruz, A. Long-term efficacy of high-protein diets: a systematic review. *Nutr Hosp*. **2011**, 26, 1256-9. <https://doi.org/10.1590/S0212-16112011000600010>
8. Pesta, D.H.; Samuel, V.T. A high-protein diet for reducing body fat: Mechanisms and possible caveats. *Nutr. Metab. (Lond.)* **2014**, 11, 53. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-11-53>
9. Pavlou, D. I.; Paschou, S.A.; Anagnostis, P.; Spartalis, M.; Spartalis, E.; Vryonidou, A.; et al. Hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus: targets and management. *Maturitas*. **2018**, 112, e7, 71. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2018.03.013>
10. Sabaka, P.; Dukat, A.; Gajdosik, J.; Bendzala, M.; Caprnda, M.; Simko, F. The effects of body weight loss and gain on arterial hypertension control: an observational prospective study. *Eur J Med Res*. **2017**, 22 (1), 43. <https://doi.org/10.1186/s40001-017-0286-5>
11. Carobrez, A.P.; Bertoglio, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev*. **2005**, 29,1193–1205. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.017>
12. Sweis, B.M.; et al. A modified beam-walking apparatus for assessment of anxiety in a rodent model of blast traumatic brain injury. *Behavioural Brain Research*. **2016**, 296,149-156. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.09.015>
13. Barzegar, M.; Sajjadi, F.S.; Talaei, S.A.; Hamidi, G.; Salami, M. Prenatal exposure to noise stress: anxiety, impaired spatial memory, and deteriorated hippocampal plasticity in postnatal life. *Hippocampus*. **2015**, 25,187-196. <https://doi.org/10.1002/hipo.22363>
14. Roohbakhsh, A.; Moghaddam, A.H.; Massoudi, R.; Zarrindast, M.R. Role of dorsal hippocampal cannabinoid receptors and nitric oxide in anxiety like behaviours in rats using the elevated plus-maze test. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. **2007**, 34, 3, 223–9. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04576.x>
15. Teichholz, L.E.; Kreulen, T.; Herman, M.V.; Gorlin R. Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlations in the presence of absence of asynergy. *Am J Cardiol*. **1976**, 37 (1), 7-11. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(76\)90491-4](https://doi.org/10.1016/0002-9149(76)90491-4)
16. Penteado, D. CardioSeries. **2012**. Disponível em: <http://sites.google.com/site/cardioseries>.
17. Skov AR, Toubro S, Rønn B, Holm L, Astrup A. Randomized trial on protein vs carbohydrate in ad libitum fat reduced diet for the treatment of obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. **1999**;23(5):528-536. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0800867>
18. Farnsworth, E.; Luscombe, N.D.; Noakes, M.; Wittert, G.; Argyiou, E.; Clifton, P.M. Effect of a high-protein, energy-restricted diet on body composition, glycemic control, and lipid concentrations in overweight and obese hyperinsulinemic men and women. *Am. J. Clin. Nutr*. **2003**, 78, 31–39. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.1.31>
19. Pasiakos, S.M.; Lieberman, H.R.; Fulgoni, V.L. Higher-protein diets are associated with higher HDL cholesterol and lower bmi and waist circumference in us adults. *J. Nutr*. **2015**, 145, 605–614. <https://doi.org/10.3945/jn.114.205203>

20. Weigle, D.S.; et al. A high-protein diet induces sustained reductions in appetite, ad libitum caloric intake, and body weight despite compensatory changes in diurnal plasma leptin and ghrelin concentrations. *Am J Clin Nutr.* **2005**, 82:41–8. <https://doi.org/10.1093/ajcn/82.1.41>
21. Leidy, H. J., Clifton, P. M., Astrup, A., Wycherley, T. P., Westerterp-Plantenga, M. S., Luscombe-Marsh, N. D., et al. The role of protein in weight loss and maintenance. *Am. J. Clin. Nutr.* **2015**, 101, 1320s–1329s. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.084038>
22. Halton, T.L.; Hu, F.B. The effects of high protein diets on thermogenesis, satiety and weight loss: a critical review. *J Am Coll Nutr.* **2004**, 23 (5), 373–385. <https://doi.org/10.1080/07315724.2004.10719381>
23. Sathyanayana, Rao T.S.; Asha, M.R.; Ramesh, B.N.; Jagannatha, Rao K.S. Understanding nutrition, depression and mental illnesses. *Indian Psychiatry.* **2008**, 50, 77-82. <https://doi.org/10.4103/0019-5545.42391>
24. Haghighatdoost, F.; Azadbakht, L.; Keshteli, A.H.; Feinle-Bisset, C.; Daghighzadeh, H.; Afshar, H.; et al. Glycemic index, glycemic load, and common psychological disorders. *Am J Clin Nutr.* **2016**, 103 (1), 201–9. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.105445>
25. Aucoin, M.; Bhardwaj, S. Generalized Anxiety Disorder and Hypoglycemia Symptoms Improved with Diet Modification. *Case Rep Psychiatry.* **2016**, 1-4. <https://doi.org/10.1155/2016/7165425>
26. Rosengren, A.; et al. Association of psychosocial risk factors with risk of acute myocardial infarction in 11 119 cases and 13 648 controls from 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.* **2004**, 364, 953–62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17019-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17019-0)
27. Emdin, C.A.; Oduyayo, A.; Wong, C.X.; Tran, J.; Hsiao, A.J.; et al Meta-analysis of anxiety as a risk factor for cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* **2016**, 118, 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2016.05.041>
28. Dong, J.Y.; Zhang, Z.L.; Wang, P.Y.; Qin, LQ. Effects of high-protein diets on body weight, glycaemic control, blood lipids and blood pressure in type 2 diabetes: meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Nutr.* **2013**, 110, 781–9. Martins, F.; et al. Dieta Hiperlipídica Promove Remodelação. <https://doi.org/10.1017/S0007114513002055>
29. Te Morenga, L.A.; Levers, M.T.; Williams, S.M.; Brown, R.C.; Mann, J. Comparison of high protein and high fiber weight-loss diets in women with risk factors for the metabolic syndrome: a randomized trial. *Nutr J.* **2011**, 10:40. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-10-40>
30. Singh, A.; et al. Diets enriched in whey or casein improve energy balance and prevent morbidity and renal damage in salt-loaded and high-fat-fed spontaneously hypertensive stroke-prone rats. *Journal of Nutritional Biochemistry.* **2016**, 37, 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.07.011>
31. Martin, M.; Kopaliani, I.; Jannasch, A.; Mund, C.; Todorov, V.; Henle, T.; Deussen, A. Antihypertensive and cardioprotective effects of the dipeptide isoleucine–tryptophan and whey protein hydrolysate. *Acta Physiol.* **2015**, 215, 167–176. <https://doi.org/10.1111/apha.12578>
32. Engen, R.L.; Swenson, M.J. Influence of diet on indirect systolic blood pressure of rats. *J. Nutr.* **1969**, 97, 19–24. <https://doi.org/10.1093/jn/97.1.19>
33. Yu, Z.; et al. Effects of high-protein diet on glycemic control, insulin resistance and blood pressure in type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinical Nutrition.* **2019**, 08,008. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.08.008>
34. Oliveira, E. L.; et al. A Low Protein Diet Causes an Increase in the Basal Levels and Variability of Mean Arterial Pressure and Heart Rate in Fisher Rats. *Nutritional Neuroscience.* **2004**, 201–205. <https://doi.org/10.1080/10284150412331279827>

6. REFERÊNCIAS

ALLEN, A. J.; LEONARD, H.; SWEDO, S. E. Current knowledge of medications for the treatment of childhood anxiety disorders. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**. v.34(8), p.976-986, 1995.

<https://doi.org/10.1097/00004583-199508000-00007>

ANDRADE, L. H. S. G.; LOTUFO-NETO, F.; GENTIL, V.; MACIEL, L. M. A.; SHAVITT R. G. **Classificação e Diagnóstico dos Transtornos Ansiosos**. Em: GENTIL V & LOTUFO-NETO F., et al. *Pânico, Fobias e Obsessões: A Experiência do Projeto AMBAN*, Editora da Universidade de São Paulo, *São Paulo*. p.31-45, 1994.

APPEL, L. J.; SACKS, F. M.; CAREY, V. J., et al. Effects of protein, monounsaturated fat, and carbohydrate intake on blood pressure and serum lipids: results of the OmniHeart randomized trial. **JAMA**. v. 294(19), p.2455-2464, 2005.

<https://doi.org/10.1001/jama.294.19.2455>

ATKINS R. **Dr. Atkins' New diet revolution**. Vintage/Ebury Books, 1993.

BANTLE, J. P.; WYLIE-ROSETT, J., et al. Nutrition recommendations and interventions for diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care**. v.31(1), p.61-78, 2008.

<https://doi.org/10.2337/dc08-S061>

BARROS, M. A. V.; DE BRITO A. J. L.; NOGUEIRA, V. O.; WANDERLEY, A. G.; COSTA-SILVA, J. H. Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. **Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 25, p.123-130, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2014.07.011>

BASTARDO, G.; ANGARITA, C.; QUINTERO, Y.; ROJAS, L.; RODRÍGUEZ, L.C.; MÁRQUEZ, J.L. Consumo de hierro y otros nutrientes en la dieta de preescolares residentes en Apartaderos, Escagüey y Pueblo Llano (Mérida, Venezuela). **Rev Facultad de Medicina ULA**.v. 17, p.41-46, 2008.

Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2935121>. Acesso em: 19/04/2020.

BAXTER, A. J.; SCOTT, K. M.; VOS, T.; WHITEFORD, H. A. Global prevalence of anxiety disorders: a systematic review and meta-regression. **Psychol Med**. v.43(5), p.897-910, 2013.

<https://doi.org/10.1017/S003329171200147X>

BILSBOROUGH, S.; MANN, N. A review of issues of dietary protein intake in humans. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**. v.16(2), p.129-152, 2006.

<https://doi.org/10.1123/ijsnem.16.2.129>

CARDOZO, M. Q., et al. Fatores associados à ocorrência de ansiedade dos acadêmicos de Biomedicina. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 9(2), 2016.

<https://doi.org/10.17765/1983-1870.2016v9n2p251-262>

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci Biobehav Rev**. v.29(8), p.1193-1205, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.017>

CAROBREZ, A. P. Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade. **Rev. Bras. Psiquiatr**. v.25(2), p.52-58, 2003.

<https://doi.org/10.1590/S1516-44462003000600012>

CLEMENT, Y.; CHAPOUTHIER, G. Biological bases of anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**. v. 22(5), p.623-633, 1998.

[https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(97\)00058-4](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(97)00058-4)

DAI, J.; LAMPERT, R.; WILSON, P. W.; GOLDBERG, J.; ZIEGLER, T. R.; VACCARINO, V. Mediterranean dietary pattern is associated with improved cardiac autonomic function among middle-aged men: a twin study. **Circ Cardiovasc Qual Outcomes**. v.3(4), p.366-373, 2010.

<https://doi.org/10.1161/CIRCOUTCOMES.109.905810>

ENGEL, R. L.; SWENSON, M. J. Influence of diet on indirect systolic blood pressure of rats. **J Nutr**. v.97(1), p.19-24, 1969.

<https://doi.org/10.1093/jn/97.1.19>

EUSTON, D. R.; GRUBER, A. J.; MCNAUGHTON, B. L. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. **Neuron**. v.76(6), p.1057-1070, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.002>

GELFUSO, E. A.; ROSA, D. S.; FACHIN, A. L.; MORTARI, M. R.; CUNHA, A.O.; BELEBONI, R. O. Anxiety: a systematic review of neurobiology, traditional pharmaceuticals and novel alternatives from medicinal plants. **CNS Neurol Disord Drug Targets**. v.13(1), p.150-165, 2014.

<https://doi.org/10.2174/18715273113129990102>

GRAEFF, F. G. Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. v.29(9), p.3-6, 2007.

<https://doi.org/10.1590/S1516-44462007000500002>

GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L. **Ansiedade**. Neurobiologia das Doenças Mentais. 4 ed. São Paulo:Lemos. p: 109-144, 1997.

GRAEFF, F. G.; HETEM, L. A. B. **Transtornos da Ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004.434p.

HASHIMOTO, K. Targeting of NMDA receptors in new treatments for schizophrenia. **Expert Opin Ther Targets**. v.18(9), p.1049-1063, 2014.

<https://doi.org/10.1517/14728222.2014.934225>

HAYLEY, A.; YOUNG; B. D. Heart-rate variability: a biomarker to study the influence of nutrition on physiological and psychological health? **Behavioural Pharmacology**. v.29, p.140–151, 2018.

<https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000383>

HE, J.; WOFFORD, M. R.; REYNOLDS, K., et al. Effect of dietary protein supplementation on blood pressure: a randomized, controlled trial. **Circulation**. v.124(5), p.589-595, 2011.

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.009159>

JAATINEN, N.; KORPELA, R.; POUSSA, T., et al. Effects of daily intake of yoghurt enriched with bioactive components on chronic stress responses: a double-blinded randomized controlled trial. **Int J Food Sci Nutr**. v. 65(4), p.507-514, 2014.

<https://doi.org/10.3109/09637486.2014.880669>

JALLINOJA, P.; NIVA, M.; HELAKORPI, S.; KAHMA, N. Food choices, perceptions of healthiness, and eating motives of self-identified followers of a low-carbohydrate diet. **Food & Nutrition Research**. v.58(10), p.1-9, 2014.

<https://doi.org/10.3402/fnr.v58.23552>

JOHN, S. Schematic drawing of the Elevated Plus Maze (EPM) experiment for behavior tests with rats. commons.wikimedia.org.

Disponível em: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ab/ElevatedPlusMaze.svg>

. Acesso em: 20/05/2020.

KESSLER, R. C.; RUSCIO, A. M.; SHEAR, K.; WITTCHEN, H. U. Epidemiology of anxiety disorders. **Curr Top Behav Neurosci**. v.2, p.21-35, 2010.

https://doi.org/10.1007/7854_2009_9

KIM, J.; GORMAN, J. The psychobiology of anxiety. **Clinical Neuroscience Research**, v.4 (5), p.335-347, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.cnr.2005.03.008>

KUWABARA, M.; NIWA, K.; OHNO, M. et al. High rate of calories from protein is associated with higher prevalence of hypertension. **J Hum Hypertens**. v.33, p.340–344, 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41371-019-0162-6>

LANDEIRA-FERNANDEZ, J. **Neurobiologia dos transtornos de ansiedade**. Rangé B. & colaboradores, Eds.; Artmed: Porto Alegre (RS). p. 68-81, 2011.

LEPE, M.; BACARDÍ G. M.; JIMÉNEZ C. A. Long-term efficacy of high-protein diets: a systematic review. **Nutr Hosp**. v. 26(6), p.1256-1259, 2011.

<https://doi.org/10.1590/S0212-16112011000600010>

MARGIS, R; PICON, P.; COSNER.A.F.; SILVEIRA, R. O. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Rev. psiquiatr**. Rio Gd. Sul. v.25(1), 2003.

<https://doi.org/10.1590/S0101-81082003000400008>

MARTIN, E. I.; RESSLER, K. J.; BINDER, E.; NEMEROFF, C. B. The neurobiology of anxiety disorders: brain imaging, genetics, and psychoneuroendocrinology. **Clin. Lab. Med**. v.30, p.865-91, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.07.006>

MOURA, I. M.; ROCHA, V. H. C.; BERGAMINI, G. B.; SAMUELSSON, E.; JONER, C.; SCHNEIDER, L. F.; MENZ, P. R. A terapia cognitivo-comportamental no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada. **Revista Científica Da Faculdade De Educação E Meio Ambiente**. v.9(1), p.423-441, 2018.

<https://doi.org/10.31072/rcf.v9i1.557>

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger:Princípios de bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NOLAN, K.; SCHELL, L. M.; STARK, A. D.; GÓMEZ, M. I. Longitudinal study of energy and nutrient intakes for infants from low-income, urban families. **Public Health Nutr**. v. 5, p.405-12, 2002.

<https://doi.org/10.1079/PHN2001274>

NORTON, B. L. **Myths Surrounding High Protein Diet.**

Disponível em: <https://www.biolayne.com/articles/nutrition/myths-surrounding-high-protein-diet-safety/>. Acesso em: 31/05/2020

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol.** v.54(5), p.581-618, 1998.

[https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(97\)00085-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(97)00085-3)

PAVLOU, D. I.; PASCHOU, S. A.; ANAGNOSTIS, P.; SPARTALIS, M.; SPARTALIS, E.; VRYONIDOU, A. et al. Hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus: targets and management. **Maturitas.** v.112(7), p.71, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2018.03.013>

PENTEADO, D. **CardioSeries.** 2012.

Disponível em: <http://sites.google.com/site/cardioseries>. Acesso em: 10/01/2020

POZZER, C. P.; OLIVEIRA, I. J. L. Envolvimento do glutamato na ansiedade de ratos no labirinto em cruz elevado. **Univ. Ci. Saúde, Brasília.** v. 5(1), p. 51-59, 2007.

<https://doi.org/10.5102/ucs.v5i1.418>

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr.** v.123(11), p.1939-1951, 1993.

<https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>

RIBEIRO, R. F. JR.; DABKOWSKI, E. R.; O'CONNELL, K. A., et al. Effect of a high-protein diet on development of heart failure in response to pressure overload. **Appl Physiol Nutr Metab.** v.39(2), p.238-247, 2014.

<https://doi.org/10.1139/apnm-2013-0274>

ROZENTRYT, P.; VON HAEHLING, S.; LAINSCAK, M., et al. The effects of a high-caloric protein-rich oral nutritional supplement in patients with chronic heart failure and cachexia on quality of life, body composition, and inflammation markers: a randomized, double-blind pilot study. **J Cachexia Sarcopenia Muscle.** v.1(1), p.35-42, 2010.

<https://doi.org/10.1007/s13539-010-0008-0>

SABAKA, P.; DUKAT, A.; GAJDOSIK, J.; BENDZALA, M.; CAPRND, M.; SIMKO, F. The effects of body weight loss and gain on arterial hypertension control: an observational prospective study. **Eur J Med Res.** v.22(1), p.43, 2017.

<https://doi.org/10.1186/s40001-017-0286-5>

SANACORA, G.; SCHATZBERG, A. F. Ketamine: promising path or false prophecy in the development of novel therapeutics for mood disorders? [published correction appears in **Neuropsychopharmacology**. v. 40(2), p.259-267, 2015.
<https://doi.org/10.1038/npp.2014.261>

SARTORI, S. B.; LANDGRAF, R.; SINGEWALD, N. The clinical implications of mouse models of enhanced anxiety. **Fut Neurol**. v.6(4), p.531-71, 2011.
<https://doi.org/10.2217/fnl.11.34>

TAPIERO, H.; MATHÉ, G.; COUVREUR, P.; TEW, K.D. Glutamine and glutamate. **BiomedPharmacother**. v. 56(9), p.446-457, 2002.
[https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00285-8](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00285-8)

TARNOPOLSKY, M. A.; ATKINSON, S. A.; MACDOUGALL, J. D.; CHESLEY, A.; PHILLIPS, S.; SCHWARZ, H. P. Evaluation of protein requirements for trained strength athletes. **Journal of Applied Physiology**. v.73, p.1986-1995, 1992.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1992.73.5.1986>

TEICHHOLZ, L. E.; KREULEN, T.; HERMAN, M. V.; GORLIN, R. Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlations in the presence of absence of asynergy. **Am J Cardiol**. v.37(1), p.7-11, 1976.
[https://doi.org/10.1016/0002-9149\(76\)90491-4](https://doi.org/10.1016/0002-9149(76)90491-4)

TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. **Princípios de anatomia e fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002.

TROTTI, D. A role for glutamate transporters in neurodegenerative diseases. **Adv Exp Med Biol**. v.513, p.225-248, 2002.
https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0123-7_8

VELDHORST, M. A.; NIEUWENHUIZEN, A. G.; HOCHSTENBACH-WAELEN, A., et al. Comparison of the effects of a high- and normal-casein breakfast on satiety, 'satiety' hormones, plasma amino acids and subsequent energy intake. **Br J Nutr**. v.101(2), p.295-303, 2009.
<https://doi.org/10.1017/S0007114508003061>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Consortium in Psychiatric Epidemiology. Cross-national comparisons of the prevalences and correlates of mental disorders. **Bull World Health Organ**. v. 78(4),p.413-26, 2000.
 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2560724/pdf/10885160.pdf>.
 Acesso em: 13/02/2020

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Depression and other common mental disorders: **Global Health Estimates**. 2016.

Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2_eng.pdf;jsessionid=CE0186858732C304C426903EBD95D4DA?sequence=1. Acesso em: 11/01/2020

ZHAO, W. T.; LUO, Y.; ZHANG, Y.; ZHOU, Y.; ZHAO, T. T. High protein diet is of benefit for patients with type 2 diabetes: An updated meta-analysis. **Medicine (Baltimore)**. v.97, p.13146-13149, 2018.

<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013149>