



UNESP- Universidade Estadual Paulista

Faculdade de Medicina de Botucatu

Departamento de Clínica Médica – Lab. Biologia Molecular

**INTER-RELAÇÃO DA LEPTINA E DOS HORMÔNIOS
TIREOIDIANOS NA PERDA DE PESO DE RATOS
OBESOS**

Renata de Azevedo Melo Luvizotto

BOTUCATU

2007

Renata de Azevedo Melo Luvizotto

**INTER-RELAÇÃO DA LEPTINA E DOS HORMÔNIOS
TIREOIDIANOS NA PERDA DE PESO DE RATOS
OBESOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
“Fisiopatologia em Clínica Médica – Área de
Concentração – Metabolismo e Nutrição” da Faculdade de
Medicina da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Nogueira

BOTUCATU

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Luvizotto, Renata de Azevedo Melo.

Inter-relação da leptina e dos hormônios tireoidianos na perda de peso de ratos obesos / Renata de Azevedo Melo Luvizotto. – Botucatu : [s.n.], 2007

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2007.

Orientadora: Célia Regina Nogueira

Assunto CAPES: 40502007

1. Nutrição 2. Hormônios tireoidianos – Efeitos fisiológicos 3. Obesidade 3. Dietas 4. Leptina

CDD 612.3

Palavras-chave: Hormônios tireoidianos; Leptina ; Obesidade; Restrição alimentar

Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos apresentam projetos de sonhos, outras porque nos desafiam a construí-los e outras ainda porque nos ajudam na construção.

Aos meus pais, Dener e Maria de Lourdes
e aos meus irmãos, Gustavo e Roberta.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar, iluminar, proteger em todas as horas de minha vida, e por me ter dado uma família e amigos maravilhosos.

A meus pais, que sem o esforço deles nada disso teria acontecido. A meus avós, irmãos, tios e primos, pelo incentivo de continuar sempre. Amo vocês!

À minha orientadora, Profa. Dra. Célia, pela confiança, incentivo, apoio, compreensão e ensinamentos em todos os momentos dessa caminhada.

À Profa. Dra. Aparecida Yooko Outa Angeleli, pela amizade, atenção e auxílio em momentos de dúvida.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, pela análise estatística dos resultados obtidos

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Cicogna pelo apoio, sugestões e auxílio na revisão dos resultados.

À Profa. Dra. Gláucia Maria Fernanda da Silva Mazeto e ao Prof. Dr. Katashi Okoshi por terem participado da banca de qualificação, pela disponibilidade e sugestões.

Aos funcionários do Departamento e do Laboratório Experimental da Clínica Médica, Sueli Clara, José Carlos Georgete, Mário Bruno, Sandra Fábio, Elenize Jamas, Corina Corrêa, Camila Camacho, Vitor Souza, Rogério Monteiro, José Aparecido de Souza (Boca), Elizangela Silva, Bruno Fajiolli, Bruno Silva, Alexandre Loureiro, Renato Pereira, Ana Mengue. Obrigada pelo auxílio e simpatia de vocês!

Aos colegas do Laboratório, que se tornaram verdadeiros amigos, Maria Teresa De Sício, Sandro José Conde, Ana Paula de Almeida Lima, André Soares Leopoldo, André Ferreira do Nascimento, Paula Felipe Martinez, Sílvia Assis de Oliveira Júnior, Dijon Herinque Salomé de Campos, Loreta Casquel de Tomasi, Aline Ometto, Vanessa Oliveira e Isabel Veloso, Olga Mendes, Cristiana Freire, Rosângela Novo. Sem vocês este trabalho não estaria concluído. Obrigada pelo convívio, amizade, ajuda e pelos nossos momentos de descontração. Adoro vocês!

Aos amigos que estão sempre por perto e aos que seguiram outros rumos, mas estão sempre em meu pensamento. Tenham certeza que os tenho em mim, aprendi muito com vocês.

Ao pessoal da seção de Pós-Graduação, Regina Spadin, Lilian Nunes, Andréa Devidé, Janete Nunes Silva e Nathanael Salles, pela paciência, simpatia e disposição em ajudar sempre!

À bibliotecária Rosemary Cristina da Silva e Selma Maria de Jesus, pelo auxílio na revisão bibliográfica e confecção da ficha catalográfica desde trabalho.

Ao Departamento e ao Laboratório Experimental de Clínica Médica, Faculdade de Medicina – UNESP – Botucatu, pela oportunidade de realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Muito Obrigada!

O valor das coisas não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.

Por isso, existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis!

(Fernando Pessoa)

Introdução: A obesidade é uma doença crônica, multifatorial que leva ao aumento do risco de desenvolver outras doenças. É freqüentemente considerada como uma doença do estilo de vida, causada pela escolha errônea dos alimentos e pela diminuição da atividade física, sendo a restrição calórica a prática mais comum para tratar a obesidade. Em humanos, a perda de peso está associada com redução de fatores de risco para doenças cardiovasculares, diminuição da taxa de incidência de Diabetes Mellitus tipo 2 e aumento da qualidade de vida. O peso corporal é regulado por uma interação complexa entre hormônios e neuropeptídeos. A leptina e os hormônios tireoidianos (HT) estão envolvidos na regulação do balanço energético.

Objetivo: Analisar, em ratos, a inter-relação entre leptina e hormônios tireoidianos na obesidade e na perda de peso.

Metodologia: Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com 30 dias de idade, separados em dois grupos, Controle (C) e Obeso (OB). Os animais C receberam ração comercial Labina e os do grupo OB um ciclo de dietas hipercalóricas por 15 semanas. Após o período de indução de obesidade, os animais OB foram novamente separados em outros 3 grupos, OB; animais com restrição alimentar (RIA); e animais com restrição mais administração de Hormônio Tireoidiano (RHT) na dose de 5 µg/100g de peso do animal. Os animais OB receberam as dietas hipercalóricas até o final do experimento, enquanto os animais RIA e RHT receberam 75% do total consumido pelo grupo C de dieta comercial, por 28 dias. Após este período, os animais RIA continuaram, somente, com a restrição alimentar e os RHT receberam além da restrição a dose de HT, por 28 dias. A cada fase do trabalho, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados para a verificação da expressão gênica de leptina e TRβ, no tecido adiposo, utilizando técnicas de RT-PCR semi-quantitativo.

Resultados: Os animais OB apresentaram aumento de peso e adiposidade, alterações no perfil lipídico e glicêmico, aumento de leptina e insulina plasmáticas. Os animais RIA e RHT apresentaram o mesmo comportamento, ou seja, mostraram uma diminuição de peso e adiposidade, melhoraram o perfil lipídico e glicêmico e

normalizaram os níveis plasmáticos de leptina e insulina, sendo similares ao grupo C. No final do experimento, a expressão de leptina aumentou estatisticamente no grupo OB e foi significativamente diminuída no grupo RIA. O RHT apresentou diminuição não significativa quando comparado ao grupo C. A expressão gênica de TR β nos grupos OB e RHT foi similar a do C, enquanto o grupo RIA apresentou aumento significativo.

Conclusão: O grupo OB apresentou aumento na expressão de leptina. Os animais submetidos à restrição alimentar mostraram diminuição da expressão de leptina e aumento significativo de TR β , enquanto os animais RHT apresentaram diminuição de leptina e aumento de TR β em relação ao RIA, mostrando que o HT modula a expressão de leptina em animais submetidos à restrição alimentar.

Introduction: Obesity is a chronic multifactor disease which brings increased risk of developing other diseases. It is frequently considered as a lifestyle disease, caused by choosing the wrong foods and reducing physical activity, with calorie restriction being the commonest way of treating it. Weight loss in humans is associated with reduced risk factors for cardiovascular disease, reduced incidence of type II Diabetes Mellitus, and increased quality of life. Bodyweight is regulated by a complex interaction between hormones and neopeptides. Leptin and the thyroid hormones (TH) are involved in regulating the energy balance.

Objective: To analyze the interrelation in rats between leptin and thyroid hormones in obesity and weight loss.

Methodology: Male 30-day-old Wistar rats were separated into two groups, Control (C) and Obese (OB). Control animals received commercial Labina rat food and the OB group a cycle of hypercaloric diets for 15 weeks. After the induced obesity period, the OB animals were separated into three subgroups; OB hypercaloric diet; RIA food restriction; RHT food restriction plus 5µg/100g body weight thyroid hormone. OB animals received the hypercaloric diets until the end of the experiment, where the RIA and RHT animals received 75% the total commercial food consumed by the control group for 28 days. After this period, the RIA animals continued with food restriction only, and the RHT animals received food restriction plus a dose of TH for 28 days. At each phase of the experiment, five animals from each group were sacrificed to analyze gene expression of leptin and TRβ in adipose tissue using semi-quantitative RT-PCR.

Results: The OB animals showed increased weight and adipose tissue, lipid and glycemia profile changes, and increased plasmatic leptin and insulin. The RIA and RHT animals had the same behaviour, showed a reduction in weight and adipose tissue, improvement in lipid and glycemia profile, and normalization of leptin and insulin plasma levels comparable to controls. At the end of the experiment, leptin expression was significantly increased in the OB group and significantly reduced in the RIA group; the RHT group showed a non-significant drop compared to controls.

Gene TR β expression in groups OB and RHT was similar to controls, whereas group RIA showed a significant increase.

Conclusion: The OB group presented increased leptin expression. Animals submitted to food restriction showed reduced leptin and significantly increased TR β expression; RHT animals lower leptin and higher TR β than RIA, showing that TH modulates leptin expression in animals submitted to food restriction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de secreção a ação da leptina.....	08
Figura 2: Delineamento do estudo	21
Figura 3: Visualização do “multiplex” em gel de agarose 1%.....	28
Figura 4: Gel de agarose 1% e confirmação pelo tamanho da banda.....	29
Figura 5: Quantificação das amostras para PCR semi-quantitativo.....	29
Figura 6: Evolução do peso corporal.....	33
Figura 7: Gráfico do consumo alimentar.....	36
Figura 8: Gráfico do consumo hídrico.....	36
Figura 9: Gráfico do consumo calórico.....	37
Figura 10: Gráfico da composição corporal.....	41
Figura 11: Teste Oral de Tolerância à Glicose.....	42
Figura 12: Padronização do “multiplex” para TR.....	51
Figuras13: Gráfico da expressão gênica de leptina.....	53
Figura 14 Gráfico da expressão gênica de TR β	54
Figura 15: Relação entre leptina e TR β	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições morbidas associadas à obesidade.....	03
Tabela 2: Classificação de Sobrepeso e Obesidade segundo a OMS (1997.....	04
Tabela 3: Fatores Vinculados à Prevalência da Obesidade.....	05
Tabela 4: Ingredientes utilizados no preparo da dieta 1.....	22
Tabela 5: Ingredientes utilizados no preparo da dieta 2.....	22
Tabela 6: Ingredientes utilizados no preparo da dieta 3.....	22
Tabela 7: Ingredientes utilizados no preparo da dieta 4.....	23
Tabela 8: Ingredientes utilizados no preparo da dieta 5.....	23
Tabela 9: Composição Nutricional das dietas.....	24
Tabela 10: Sequência dos primers utilizados e tamanho dos fragmentos.....	28
Tabela 11: Número de ciclos e temperaturas de anelamento dos primers.....	29
Tabela 12: Ingestão alimentar, calórica e hídrica, e eficiência alimentar.....	35
Tabela 13: Variáveis morfológicas.....	39
Tabela 14: Análise de carcaça.....	40
Tabela 15: Análise do GTT segundo o momento de avaliação por grupo.....	44
Tabela 16: Variáveis bioquímicas segundo grupos.....	46
Tabela 17: Dosagem de leptina, insulina e T ₃ total segundo os grupos.....	48
Tabela 18: Razão insulina/glicose plasmáticas segundo os grupos.....	50
Tabela 19: Expressão gênica de leptina e TR β segundo grupos.....	52
Tabela 20: Associação da expressão de leptina e TR β	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA.....	Análise de Variância
C.....	Grupo Controle
Col. total.....	Colesterol Total
DM2.....	Diabetes Mellitus tipo 2
E.A.....	Eficiência Alimentar
GTT.....	Teste Oral de Tolerância à Glicose
HDL.....	Lipoproteína de Alta Densidade
HT.....	Hormônio Tireoidiano
IAS.....	Ingestão Alimentar Semanal
IC.....	Intervalo de Confiança
IL-1.....	Interleucina 1
IL-6.....	Interleucina 6
IMC.....	Índice de Massa Corpórea
KDa.....	Quilo-Dalton
Lep.....	Leptina
mRNA.....	RNA Mensageiro
OB	Grupo Obeso
OMS.....	Organização Mundial da Saúde
pb.....	Pares de Bases
PCF.....	Peso Corporal Final
PCI.....	Peso Corporal Inicial
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PP.....	Peso Pós Secagem
PPr.....	Peso Pré Secagem
Prot. totais.....	Proteínas Totais
PS.....	Ponto de Separação
PSSG.....	Peso Seco Pós Extração da Gordura
RHT.....	Grupo Restrito com Administração de Hormônio Tireoidiano
RIA.....	Grupo com Restrição da Ingestão Alimentar

RT.....	Transcrição Reversa
SHBG.....	Globulina Ligada a Hormônios Sexuais
T ₃	Triiodotironina
T ₄	Tiroxina
TG.....	Triglicérides
TMB.....	Taxa Metabólica Basal
TNF- α	Fator de Necrose tumoral- α
TR.....	Receptor de Triiodotironina
TR α	Receptor α de Hormônio Tireoidiano
TR β	Receptor β de Hormônio Tireoidiano
TRH.....	Hormônio Liberador de Tireotrofina
TSH.....	Hormônio Estimulador da Tireóide
UV.....	Ultra Violeta

1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Obesidade.....	2
1.2- Restrição Alimentar.....	5
1.3- Leptina	7
1.4- Hormônios Tireoidianos	10
1.5- Associação de Leptina e Hormônios Tireoidianos	12
2- HIPÓTESE	15
3- OBJETIVO	17
4- MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1- Animais	20
4.2- Composição das Dietas	21
4.3- Caracterização dos Grupos	24
4.4- Análise da Composição Corporal.....	25
4.5- Teste Oral de Tolerância à Glicose.....	25
4.6- Exames Bioquímicos.....	26
4.7- Dosagens Hormonais.....	26
4.8- Expressão de Leptina e Receptores de HT	27
4.8.1- <i>Extração de RNA total</i>	27
4.8.2- <i>Gel analítico de agarose para RNA</i>	27
4.8.3- <i>Transcrição reversa (RT) do RNA</i>	27
4.8.4- <i>Primers</i>	27
4.8.5- <i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Semi-Quantitativo</i>	27
4.9- Análise Estatística.....	30
5- RESULTADOS	31
5.1- Evolução de Peso	32
5.2- Ingestão Alimentar e Hídrica.....	32
5.3- Composição Corporal	38
5.4- Teste Oral de Tolerância à Glicose.....	42
5.5- Exames Bioquímicos.....	45

5.6- Dosagens Hormonais.....	47
5.7- Expressão Gênica.....	49
6- DISCUSSÃO	57
7- CONCLUSÃO	68
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
9- ANEXOS	84
10- ARTIGO	100

1- INTRODUÇÃO

1.1- Obesidade

Obesidade é uma alteração do estado nutricional e é definida como uma doença endócrino-metabólica, crônica, heterogênea e multifatorial, caracterizada pelo excesso de gordura no corpo (Waitzberg, 2000).

O metabolismo basal é modificado por atividade física, ingestão alimentar, temperatura ambiental e efeitos hormonais (Douglas, 2002). O principal fator determinante da taxa metabólica basal (TMB) é a massa livre de gordura, com alguns estudos encontrando uma contribuição adicional da massa de gordura, enquanto outros não encontram tais efeitos. Mesmo quando esses fatores são conhecidos, restam variações residuais importantes. Entender a natureza fisiológica desta variabilidade é importante, porque isto tem implicações na epidemiologia da obesidade de duas maneiras. Primeira, baixa TMB pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da obesidade, já que estudos transversais têm descrito que pacientes obesos apresentam TMB de 3 – 5% mais baixa que a esperada. Segundo, a TMB pode mostrar uma resposta adaptativa à restrição calórica, que pode predispor indivíduos a um ganho de peso subsequente. Muitos estudos têm questionado se essas mudanças refletem um ajuste metabólico ou simplesmente uma perda desproporcional de massa livre de gordura metabolicamente ativa (Johnstone *et al.*, 2005).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) a obesidade está se tornando um dos mais importantes males da saúde. É caracterizada por hipertrofia e hiperplasia de células de gordura levando ao aumento do risco de desenvolver diabetes mellitus tipo 2, doenças cardíacas, hipertensão, arteriosclerose e algumas formas de câncer (Bell-Anderson & Bryson, 2004).

Waitzberg (2000) relata que a obesidade representa um grave risco à saúde, risco que aumenta progressivamente de acordo com o ganho de peso. A Tabela 1 apresenta as condições mórbidas associadas à obesidade.

Tabela 1. Condições mórbidas associadas à obesidade.

Aparelho ou sistema	Morbidades
Cardiovascular	Hipertensão, aterosclerose, angina, trombose, hiperlipidemias, varizes
Respiratória	Hipoventilação alveolar e sonolência, apnéia noturna, embolia pulmonar, dispnéia
Endócrina	Diabetes mellitus, hiperinsulinemia
Reprodução	Infertilidade, pré-eclâmpsia, amenorréia, câncer de próstata, mama, útero e ovários.
Gastrintestinal	Colelitíase, colecistite, esteatose hepática, refluxo gastroesofágico, hérnia, obstipação, câncer de cólon, reto, vesícula biliar
Muscular, esquelética e epitelial	Osteoartrite, dermatite intertriginosa, estrias, fadiga muscular
Psiquiátrica	Discriminação social

Tabela adaptada de Waitzberg, 2000.

Esta doença também é um problema de saúde pública, sendo uma carga para o sistema de saúde e para a sociedade. Atualmente, mais de 30% dos adultos americanos e 70% - 80% dos pacientes com diabetes mellitus tipo 2 são obesos (Lonnqvist *et al.*, 1999). Além disso, os pacientes obesos têm redução na qualidade de vida e risco aumentado de desenvolver desordens psicológicas (Bell-Anderson & Bryson, 2004).

De acordo com tabelas da “Metropolitan Insure”, a obesidade maior do que 20% do peso corporal ideal associa-se com um aumento de morbimortalidade. Para Pasulka & Kohl (1999), por outro lado, obesidade grave equivale a peso maior que 50% do peso ideal. Thompson *et al.* (apud Waitzberg, 2000), definem obesidade mórbida como um aumento de 60% acima do peso ideal. Geralmente, esses pacientes apresentam alto risco para doenças degenerativas e para mortalidade.

A classificação atual para sobrepeso e obesidade, segundo o Índice de Massa Corpórea (IMC), conforme as últimas recomendações da OMS (1997), pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação de Sobrepeso e Obesidade segundo a OMS (1997)

<i>Classificação</i>	<i>IMC</i>	<i>Risco Comorbidade</i>
Normal	18,5 – 24,9 kg/m ²	Médio
Sobrepeso	25 – 29,9 kg/m ²	Aumentado
Obesidade grau I	30 – 34,9 kg/m ²	Moderado
Obesidade grau II	35 – 39,9 kg/m ²	Severo
Obesidade grau III	Acima de 40 kg/m ²	Muito severo

A obesidade freqüentemente é considerada como uma doença do estilo de vida, causada pela escolha errônea dos alimentos e pela diminuição da atividade física. Estes fatores têm grande influência no ganho de peso, entretanto, pesquisas recentes mostram que fatores hereditários podem ter importância equivalente para o desenvolvimento da obesidade e suas complicações. Contudo, a importância dos fatores genéticos para obesidade ainda estão em debate (Lonnqvist *et al.*, 1999).

Assim, a causa básica da obesidade é multifatorial e é provavelmente uma combinação entre genética, meio ambiente e fatores psicossociais que determinam o balanço entre a ingestão alimentar e o gasto energético (Bell-Anderson & Bryson, 2004). Estudos epidemiológicos (Lissner & Heitmann, 1995) demonstraram vários fatores vinculados à prevalência da obesidade, que podem ser observados na Tabela 3.

O peso corporal é regulado por uma interação complexa entre hormônios e neuropeptídeos, sob controle principal de núcleos hipotalâmicos (Kim *et al.*, 2000), que é responsável pelo apetite, taxa metabólica e atividade física (Bell-Anderson & Bryson, 2004). Leptina e os hormônios tireoidianos estão envolvidos na regulação do balanço energético (Vendrell *et al.*, 2004).

Tabela 3. Fatores Vinculados à Prevalência da Obesidade

<i>Fatores Demográficos</i>
Aumento da idade
Sexo feminino
Origem racial
<i>Fatores Socioculturais</i>
Baixo nível cultural
Estado civil casado
Baixa renda
<i>Fatores Biológicos</i>
Paridade
<i>Fatores Comportamentais</i>
Ingestão de gordura
Consumo de álcool
Inatividade

Tabela adaptada de Waitzberg, 2000.

1.2- Restrição Alimentar

O cerne do tratamento atual da obesidade baseia-se em terapias comportamentais dirigidas. O indivíduo obeso deve ser avaliado profundamente, em relação a erros em hábitos alimentares e de atividade física, presença de sintomas depressivos, presença de complicações e doenças associadas à obesidade (Mancini & Halpern, 2002).

Os princípios do controle do peso em indivíduos com sobrepeso e obesidade são atingir uma perda de peso clinicamente significativa (Finer, 2001). O “National Institutes of Health” sugere redução de 10% do peso como objetivo inicial. Uma perda de 5 a 10% do peso tem mostrado reduzir o risco de doença cardíaca (Strychar, 2006).

Para a perda de peso as estratégias mais utilizadas são a redução da ingestão calórica e o aumento da atividade física (Weiss *et al.*, 2006). Pesquisas concluíram que programas combinando ambos os comportamentos são geralmente mais efetivos em reduzir peso do que apenas um deles (Dunn *et al.*, 2006).

Apesar da restrição calórica ser freqüentemente prescrita para obeso não diabético e obeso com diabetes tipo 2, pouca informação está disponível sobre as mudanças que ocorrem na expressão de genes durante a restrição calórica em humanos (Viguerie *et al.*, 2005).

As dietas hipocalóricas são comumente usadas para tratar a obesidade. Elas têm papel central na redução de gordura em indivíduos obesos. As principais vias metabólicas ou de sinalização que regulam a depleção lipídica em resposta a restrição calórica ainda são desconhecidas (Dahlman *et al.*, 2005). Pouco é conhecido sobre as vias pelas quais os macronutrientes e a restrição calórica afetam a regulação da expressão gênica do tecido adiposo (Viguerie *et al.*, 2005).

A restrição alimentar, em modelos experimentais, induz redução na taxa de mortalidade e aumento da longevidade. Entre humanos obesos que estão tentando perder peso, a perda de peso está associada com redução de fatores de risco para doenças cardiovasculares, diminuição da taxa de incidência de diabetes mellitus tipo 2 e aumento da qualidade de vida (Vasselli *et al.*, 2005).

A restrição calórica tem mostrado melhora da imunidade e prolongamento da vida em modelos animais não obesos. Entretanto, os benefícios imunológicos da restrição calórica são reduzidos em animais obesos quando comparados com os magros (Santos *et al.*, 2003).

Existe muito interesse sobre a composição da dieta e a perda de peso, contudo, falta determinar a razão entre lipídeo e carboidrato nas dietas de baixo valor calórico que melhor facilitam a perda de peso e melhoram o perfil metabólico. A dieta pobre em lipídeo é geralmente considerada melhor do que a rica em lipídeo porque o paciente se beneficia com a diminuição dos fatores de risco cardiovascular e também resulta em perda de peso (Vigueire *et al.*, 2005).

As dietas de baixo valor calórico têm sido tradicionalmente definidas como balanceadas em proteínas, carboidratos e gorduras, em quantidades reduzidas. Devem ter muita fibra e baixo índice glicêmico, o que se associa com aumento da saciedade, resposta glicêmica pós-prandial mais baixa e menores níveis de insulina (Finer, 2001).

Essa dieta pode levar a perda de peso de 8%, em média, durante um período de 3 a 12 meses. Resulta em perda de peso também por diminuir a quantidade de gordura abdominal, mostrada pela redução da circunferência da cintura (Strychar, 2006).

A terapia nutricional deve garantir que as dietas sejam seguras, que evitem o aumento dos níveis de glicose pós-prandial e concentração de lipídeo sérico, que induzam uma composição ideal de lipídeos séricos para doença arterial coronariana, que não aumentem o risco de hipertensão ou câncer e que contenham quantidade adequada de nutrientes, mantendo a perda de peso (Strychar, 2006).

1.3- Leptina

O tecido adiposo participa ativamente na regulação de energia corporal, principalmente, através de uma rede de sinais endócrinos, parácrinos e autócrinos; isto permite que o adipócito tenha um papel metabólico em outros tecidos. A participação do tecido adiposo como tecido endócrino foi somente reconhecida recentemente quando foi descrita a participação deste tecido em relação aos esteróides sexuais. Posteriormente, foram identificados uma série de sinais químicos que se originam no adipócito. Este é o caso do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e seus respectivos receptores solúveis, a proteína ligante do retinol e, principalmente, a leptina, hormônio regulatório da energia corporal (Douglas, 2002).

Segundo Flier *et al.* (2000), a leptina é uma proteína sérica de 16 kDa com meia vida de 25 – 40 minutos. É sintetizada e secretada principalmente pelos adipócitos, mas também encontrada na placenta, coração, ovários, glândulas mamárias e endotélio gástrico.

A leptina circula no plasma parcialmente ligada à proteínas plasmáticas, sendo que a percentagem de ligação é maior em indivíduos magros (aproximadamente 45%) que em obesos (aproximadamente 20%) e quando existe mutação do receptor de leptina a fração do hormônio ligado às proteínas plasmáticas pode chegar a 80%. Existe outro *pool* de leptina que se fixa a sítios de ligação tissulares, participando aparentemente na manutenção do *steady-state* da taxa de leptina circulante (Douglas, 2002).

A leptina age como sinal de saciedade no hipotálamo e, deste modo, controla o peso corporal não somente pela diminuição da ingestão de alimentos, mas também pelo aumento do gasto energético (Giacobino, 2002).

Os efeitos da leptina são mediados pelos receptores de leptina predominantemente encontrados no hipotálamo, e são essenciais para que haja os efeitos centrais e periféricos (Bell-Anderson & Bryson, 2004). A leptina despolariza

os neurônios do hipotálamo ventricular, inibe a liberação do neuropeptídeo Y (Figura 1) e regula as aferências vagais no estômago, porém, os mecanismos que regulam estes efeitos não são conhecidos (Douglas, 2002).

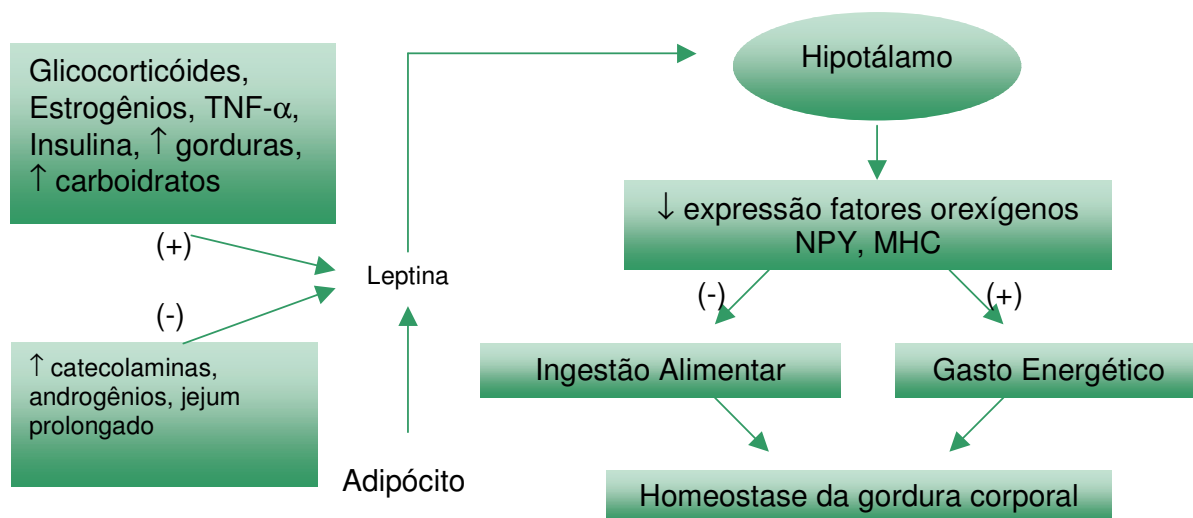


Figura 1. Mecanismos moleculares que estimulam a secreção de leptina e regulam no hipotálamo diferentes fatores que modulam o gasto energético e a homeostase da gordura corporal. NPY: neuropeptídeo Y; MHC: hormônio concentrador de melanina. (+): estimulação; (-): depressão; ↑: aumento; ↓: diminuição (Adaptado de Douglas, 2002).

A expressão de RNA mensageiro (mRNA) de leptina é aumentada pela insulina, glicocorticóides, e várias citocinas como TNF- α e interleucina-1 (IL-1). Os níveis séricos de leptina estão aumentados em algumas patologias incluindo insuficiência renal crônica, sepse aguda e diabetes. Em contraste, o jejum reduz os níveis séricos de leptina (Nakamura *et al.*, 2000).

Aparentemente, o papel mais importante da leptina seria a regulação da homeostase energética, ao agir como mediador da adaptação ao jejum quando estimula complexos neurais, metabólicos, hormonais e ajuste comportamental, com o objetivo de manter um suprimento de substratos energéticos adequados para serem utilizados pelo cérebro, com o intuito de proteger a massa magra e permitir a sobrevivência. O principal aspecto dessa adaptação seria a capacidade do organismo de desviar o metabolismo de carboidratos para o de lipídeos durante o jejum, que acontece principalmente pela queda da taxa de insulina e elevação de seus hormônios antagonistas (glucagon, cortisol, adrenalina). Outra adaptação ao

jejum inclui a diminuição dos hormônios tireoidianos e gonadais, elevação dos glicocorticóides, diminuição da temperatura corporal e aumento da sensação de fome (Douglas, 2002).

A concentração plasmática de leptina, em humanos, é fortemente correlacionada com a quantidade de gordura corporal e IMC. Os níveis séricos de leptina aumentam com a progressão da obesidade em ambos os sexos, mas são mais altos em mulheres do que em homens (Komorowski *et al.*, 2000).

A correlação entre gordura corporal e concentração de leptina circulante mostra grande variabilidade individual, que pode ser devido a diferenças na taxa metabólica basal. Estudos anteriores que mostraram a relação entre leptina circulante e TMB apresentaram resultados conflitantes: alguns com associação positiva, outros negativa e outros sem associação (Johnstone *et al.*, 2005).

Os níveis de leptina, geralmente, estão diminuídos durante a restrição calórica. Foi observado uma diminuição de 33% nos níveis de mRNA de leptina no tecido adiposo, que foi acompanhada por uma diminuição de 29% nos níveis de leptina circulante, durante a administração de uma dieta de baixo valor calórico (Viguerie *et al.*, 2005).

Acredita-se que a leptina, além de participar ativamente na regulação do peso corporal e ingestão alimentar, desempenha outros papéis no eixo neuroendócrino (Douglas, 2002).

1.4- Hormônios Tireoidianos

A glândula tireóide é um dos órgãos endócrinos mais estudados, e talvez um dos mais conhecidos; mas ainda restam muitos aspectos que exigem pesquisas a serem realizadas, para que se compreenda o papel exato desta glândula endócrina, como mecanismo controlador, regulador e modulador de funções, dado que seus efeitos podem ser evidenciados em muitos níveis da organicidade. Como efeito, a maior parte dos tecidos possui receptores para os hormônios tireoidianos e, por conseguinte, muitas e diferentes funções podem ser ativadas (Douglas, 2002).

Os hormônios tireoidianos agem através de seus receptores nucleares (TR), TR α e TR β (Brent, 1994). TR β parece desempenhar papel essencial sobre a regulação do TSH (Kaneshige *et al.*, 2000). O TR α apresenta papel importante na mediação de efeitos cronotrópicos e inotrópicos do hormônio tireoidiano no coração

(Troost *et al.*, 2000). A maioria das ações dos hormônios tireoidianos, entretanto, são provavelmente mediadas por ambos os receptores (Brent, 2000).

Os hormônios tireoidianos estão essencialmente envolvidos na regulação do gasto energético e na termogênese, e a disfunção tireoidiana é frequentemente associada com mudanças no apetite e peso corporal (Kautzky-Willer *et al.*, 1999).

Vários são os transtornos derivados da função tireoidiana, alguns evoluindo com hipofunção (hipotireoidismo), outros com hiperfunção (hipertireoidismo) e outros, ainda, em que se altera a estrutura da glândula tireóide, sem grande modificação de seu nível funcional normal (Douglas, 2002).

Os dados da literatura são conflitantes a respeito da relação entre função tireoidiana e o peso corporal. Alguns estudos mostram níveis altos, outros baixos e outros similares em indivíduos obesos comparados com indivíduos de peso normal (Näslund *et al.*, 2000).

O eixo hipófise – tireóide atua em conjunto com o sistema nervoso simpático, desempenhando papel central na regulação do metabolismo do tecido adiposo (Pinkney *et al.*, 1998).

Tem sido sugerido que baixa taxa metabólica seja um preditor de risco para o desenvolvimento da obesidade e que variações na concentração de T_3 contribuem para as variações observadas no gasto energético. Uma vez que os HT aumentam a TMB, função reduzida da tireóide contribui para a obesidade. Está bem estabelecido que a ingestão alimentar assim como o efeito térmico dos alimentos está diminuído no hipotireoidismo, enquanto o estado de hipertireoidismo está associado com aumento da ingestão alimentar e aumento do efeito térmico dos alimentos. Como consequência, o peso corporal é em média diminuído no hipertireoidismo em 15% e aumentado no hipotireoidismo em 15 – 30% (Krotkiewski, 2002).

O hormônio estimulador da tireóide (TSH) e os hormônios tireoidianos periféricos (T_3 e T_4) estão aumentados na obesidade. A causa desse aumento não está clara. O aumento na concentração dos hormônios tireoidianos pode indicar resistência ao hormônio, a semelhança da resistência à insulina que existe na obesidade. Em suporte a esta teoria está o fato de que na obesidade receptores de T_3 estão diminuídos e o *feedback* negativo entre TSH e T_3 também está diminuído (Reinehr & Andler, 2002).

Algumas alterações, como a menor atividade de conversão de T_4 a T_3 e metabolismo periférico de HT prejudicado, são provavelmente adaptativas na

maioria dos pacientes com sobrepeso e secundária à realimentação, e são eliminadas após a perda de peso (Krotkiewski, 2002).

Segundo Kim *et al.* (2000), a fome está associada a depressão do eixo hipotálamo – hipófise – tireóide. Sendo assim, T_3 , T_4 , TSH e TRH estão reduzidos em humanos durante o jejum.

A administração de HT resulta em aumento da perda de peso e TMB. A maioria dos estudos utilizam doses suprafisiológicas de T_3 que variam de 150 a 2000 $\mu\text{g}/\text{dia}$. Altas doses de T_3 causam vários efeitos colaterais, como problemas cardíacos, fraqueza muscular e depleção excessiva de massa magra (Krotkiewski, 2000). Recentemente, doses menores de T_3 variando de 5 a 20 μg , têm sido usadas como suplemento a dietas de baixo valor calórico. O propósito da suplementação é preferencialmente a prevenção da hipoglicemia durante a administração de dieta de muito baixo valor calórico ou melhoria da hiperlipidemia, o aumento da concentração de globulina ligada à hormônios sexuais (SHBG), a melhora do perfil hormonal sem influência principal da taxa de peso corpóreo ou TMB, durante ingestão de dieta de baixo valor calórico (Krotkiewski, 2002).

1.5- Associação de Leptina e Hormônios Tireoidianos

Desde que foi descoberto que a leptina aumenta a TMB, vários estudos têm procurado correlacionar leptina com os HT, encontrando resultados conflitantes (Näslund *et al.*, 2000).

A leptina pode ser um dos moduladores da função tireoidiana em pacientes obesos sem disfunção da tireóide e também em pacientes em condições críticas. O exato mecanismo da ação da leptina na função tireoidiana ainda necessita de mais estudos (Isozaki *et al.*, 2004).

Alguns estudos têm descrito a correlação entre a leptina e TSH; de fato a leptina já tem sido considerada a mediadora responsável pelo aumento na produção de TSH (Reinehr & Andler, 2002).

Em jejum a atividade da tireóide cai, levando a redução do gasto energético. A secreção de leptina também cai com a restrição de alimentos, sugerindo que a leptina e a tireóide podem responder paralelamente (Pinkney *et al.*, 1998).

A leptina pode restaurar a sensibilidade dos neurônios hipofisiotróficos para os efeitos de *feedback* dos hormônios tireoidianos (Krotkiewski, 2002). Regula a expressão do TRH no núcleo paraventricular do hipotálamo, assim influenciando o

eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. Tem sido descrito que a inanição causa a supressão da expressão do TRH no núcleo paraventricular do hipotálamo em ratos, apesar da queda nos níveis de T_4 que deveriam aumentar TRH, e que o tratamento com leptina, durante a inanição, previne esta supressão (Komorowski *et al.*, 2000).

A perda de peso é freqüentemente encontrada em pacientes com hipertireoidismo, e isto também está ligado à redução da massa de gordura. Existem vários relatos mostrando que não há alteração nos níveis séricos de leptina na disfunção tireoidiana, entretanto alguns relatos mostram diminuição da leptina sérica no hipotireoidismo (Nakamura *et al.*, 2000).

Como existe uma variabilidade nos níveis de leptina, até mesmo em condições iguais de IMC, é possível que a expressão gênica e a secreção de leptina sejam reguladas por vários fatores, incluindo os hormônios tireoidianos (Yoshida *et al.*, 1998).

Os hormônios tireoidianos regulam a expressão de mRNA de leptina e a secreção de leptina pelos adipócitos *in vitro*. A concentração de leptina é aumentada ou não se altera em resposta ao hipertireoidismo, enquanto no hipotireoidismo ela cai e se correlaciona positivamente com a diminuição do gasto energético. A significância funcional dos níveis séricos de leptina mais baixo, no hipotireoidismo, permanece desconhecida (Mantzoros, 1999).

Yoshida *et al.* (1998) mostraram que o T_3 , em doses fisiológicas, aumenta a expressão de mRNA de leptina e sua secreção. Esses achados sugerem que níveis fisiológicos de hormônios tireoidianos podem ser necessários para que haja uma apropriada secreção de leptina. Esses autores notaram também que os níveis séricos de leptina em pacientes com hipertireoidismo foram semelhantes com os níveis de indivíduos normais. O excesso de hormônios tireoidianos nesses pacientes não causou elevação da concentração sérica de leptina comparado aos níveis esperados para o IMC. Já os níveis séricos de leptina foram significativamente diminuídos nos pacientes com hipotireoidismo.

Diferente do que já foi descrito, um estudo realizado por Kautzky-Willer *et al.* (1999) mostrou que a concentração plasmática de leptina encontrou-se aumentada em pacientes obesos com hipotireoidismo comparado a obesos com hipertireoidismo e normais, apesar de grau parecido de obesidade e massa de gordura corpórea. Deste modo, para os autores, a elevação plasmática de leptina parece caracterizar pacientes obesos com hipotireoidismo e não somente reflete mudanças no peso

corporal secundário ao problema tireoidiano. Em concordância com os outros estudos, a leptina plasmática não foi alterada em pacientes magros e obesos com hipertireoidismo.

Essa elevação plasmática de leptina em pacientes obesos com hipotireoidismo suporta a hipótese que a queda prolongada na concentração de hormônios tireoidianos está associada com inadequada supressão da expressão da leptina. O aumento da leptina plasmática neste grupo pode também servir como explicação para a redução do apetite, apesar do aumento do peso corporal observado em pessoas com hipotireoidismo não tratado. Recentemente, o aumento na concentração plasmática de leptina também foi encontrado em pacientes moderadamente obesos com hipotireoidismo. Entretanto, no estudo, pacientes com hipotireoidismo foram levemente mais obesos do que os com hipertireoidismo ou normais (Kautzky-Willer *et al.*, 1999).

Komorowski *et al.* (2000) mostraram relação entre secreção de T_3 livre e concentração de leptina em pacientes obesos. A administração intravenosa de TRH estimula diretamente a liberação de TSH pela hipófise. Em pacientes eutireoideos magros e obesos, o nível de leptina no sangue depois da administração de TRH diminuiu, e a relação entre mobilização de TSH e níveis de leptina foi negativa.

Ainda não se sabe se a leptina pode influenciar o eixo tireoidiano em condições fisiológicas e se a insensibilidade à leptina e sua concentração sérica aumentada, associadas com a obesidade, podem ter qualquer influência sobre o eixo TRH-TSH-tireóide (Krotkiewski, 2002). Também não está claro se a perda de peso afeta a relação entre a leptina e os hormônios tireoidianos (Näslund *et al.*, 2000).

Depois da perda de 5 – 10% do peso corpóreo, tanto em animais quanto em humanos, é difícil a continuidade dessa perda. Não foram encontrados na literatura estudos que demonstram o que dificulta a perda de peso nessa etapa. Como a literatura define uma associação entre leptina e hormônios tireoidianos, torna-se importante o estudo dessa relação na obesidade e após a perda de peso corpóreo.

Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que aborda a influência da restrição calórica e da administração de HT sobre a expressão de leptina e $TR\beta$ na obesidade e na perda de peso.

2- HIPÓTESE

Após a perda de 5 – 10% de peso corpóreo a concentração de hormônios tireoidianos diminui, reduzindo, assim, a expressão gênica de leptina, levando a estabilidade da perda de peso.

3- OBJETIVO

Analisar a inter-relação entre leptina e hormônios tireoidianos em ratos obesos e após perda de 5 – 10% do peso corpóreo.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Animais

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (anexo 01), estando de acordo com o “Guia para Cuidados e Usos de Animais Experimentais”.

Para este trabalho foram utilizados 60 ratos da raça *Wistar*, machos, com 30 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UNESP de Botucatu. Os animais foram separados, por sorteio, primeiramente em dois grupos: Controle (C) com 15 animais; e Obeso (OB) com 30 animais. O grupo controle recebeu ração comercial *ad libitum*, enquanto o grupo obeso foi submetido a um processo de indução de obesidade e recebeu a mesma ração acrescida de dieta de cafeteria *ad libitum*, por 15 semanas (etapa 1). Após este período, os animais do grupo OB foram separados em três grupos: Obeso, Restrição Alimentar (RIA), e Restrição Alimentar com administração subcutânea de T₃ (RHT) na dose de 0,5µg/100g de peso do animal. Fizeram parte dos grupos OB e RIA 10 animais, enquanto cinco participaram do grupo RHT. Durante o período de restrição alimentar (oito semanas) os animais do grupo RIA e RHT passaram a ser alimentados com a dieta padrão, ração Labina, e receberam 75% da quantidade ingerida pelo grupo C. Assim, a restrição aplicada a esses grupos foi de 25% (Fernández-Galaz *et al.*, 2002). Após quatro semanas de restrição (etapa 2), o grupo RHT foi submetido ao tratamento com hormônio tireoidiano, até o final do experimento (etapa 3), como delineado na Figura 2.

Cinco animais de cada grupo, variando de acordo com o momento, foram eutanasiados entre 8:00 e 10:00h, sendo na 1ª etapa 5 ratos do grupo C e 5 do grupo OB; na 2ª, 5 ratos do grupo C, 5 do OB e 5 do RIA; e na 3ª eutanasiados 5 animais do grupo C, 5 do OB, 5 do grupo RIA e 5 do grupo RHT. A eutanásia dos animais foi necessária para a realização dos exames bioquímicos, das dosagens hormonais e verificação da expressão de leptina e receptores de HT.

O consumo da dieta foi controlado diariamente e o peso corporal dos ratos aferido semanalmente, utilizando-se uma balança digital Mettler® modelo Spider 2. Durante o trabalho, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno individuais forradas com maravalha de *Pinus* esterilizada, com tampa de arame cromado, em ambiente com temperatura (22 – 26°C) e luminosidade (ciclo claro-escuro – 12h) controladas.

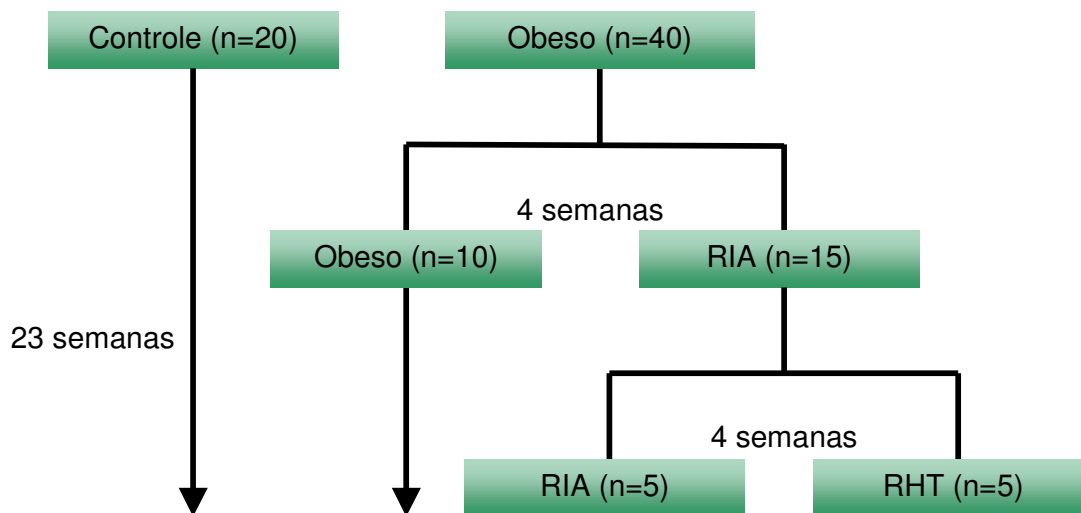


Figura 2. Delineamento do estudo.

4.2- Composição das Dietas

As dietas experimentais seguiram as especificações do guia “Nutrient requirements of the laboratory rat” para ratos de laboratório (Nascimento *et al*, 2006). A dieta base de todo o processo é a ração comercial Labina da Purina, fabricada em Paulínia, SP, Brasil. Essa ração é constituída de 3,76% de gordura, 20,96% de proteína, 52,28% de carboidrato, 9,60% de cinzas e 13,40% de umidade.

As dietas hipercalóricas consistem na ração comercial acrescida da dieta de cafeteria, composta por leite condensado, chocolate, batata frita, queijo, macarrão, bolacha (Sclafani & Springer, 1976). Durante o período de indução de obesidade os animais OB receberam essa dieta, alternando semanalmente entre uma dieta doce e uma salgada. As Tabelas 4, 5, 6, 7 e 8 apresentam os ingredientes utilizados no preparo das dietas hipercalóricas. A composição nutricional das dietas pode ser observada na Tabela 9.

Tabela 4. Ingredientes utilizados no preparo da dieta 1

Ingredientes	Peso (g)	Peso (%)
Pó Labina (Purina®/ SP)	355	35,5
Amendoim torrado	176	17,6
Caseína	123	12,3
Óleo de milho	82	8,2
Achocolatado	88	8,8
Bolacha Maisena	176	17,6
Total	1000	100

Para cada 1000g de dieta foram acrescentados: ferro: 19,4 mg; potássio: 138,4 mg; selênio: 73,1 µg; sulfato de molibidênio: 150,0 µg; vitamina B12: 34,6 µg; vitamina B6: 6 mg; biotina: 0,12 mg; vitamina E: 73,3 µg de equivalente de α -tocoferol; vitamina D: 61,53 µg de equivalente de calciferol; e vitamina A: 769,21µg de equivalente de retinol.

Tabela 5. Ingredientes utilizados no preparo da dieta 2

Ingredientes	Peso (g)	Peso (%)
Pó Labina (Purina®/ SP)	439	43,9
Amendoim torrado	218	21,8
Caseína	129	12,9
Óleo de milho	61	6,1
Batata frita	153	15,3
Total	1000	100

Para cada 1000g de dieta foram acrescentados: ferro: 26,7 mg; selênio: 62,7 µg; sulfato de molibidênio: 150,0 µg; vitamina B12: 32,5 µg; vitamina B6: 6 mg; biotina: 0,11 mg; vitamina E: 67,2 µg equivalente de α -tocoferol; vitamina D: 56,33 µg equivalente de calciferol; e vitamina A: 704,14 µg equivalente de retinol.

Tabela 6. Ingredientes utilizados no preparo da dieta 3

Ingredientes	Quantidade
Ração Labina (Purina®/ SP)	<i>Ad libitum</i>
Água e açúcar	300g sacarose/ litro água

Tabela 7. Ingredientes utilizados no preparo da dieta 4

Ingredientes	Peso (g)	Peso (%)
Pó Labina (Purina®/ SP)	371	37,1
Amendoim torrado	185	18,5
Caseína	99	9,9
Óleo de milho	68	6,8
Macarrão instantâneo	185	18,5
Queijo ralado	92	9,2
Total	1000	100

Para cada 1000g de dieta foram acrescentados: ferro: 24,1 mg; potássio: 35,6 mg; selênio: 70,8 µg; sulfato de molibidênio: 150,0 µg; vitamina B12: 34,2 µg; vitamina B6: 6 mg; biotina: 0,12 mg; vitamina E: 71,9 µg de equivalente de α -tocoferol; vitamina D: 60,4 µg de equivalente de calciferol; e vitamina A: 750,45 µg de equivalente de retinol.

Tabela 8. Ingredientes utilizados no preparo da dieta 5

Ingredientes	Peso (g)	Peso (%)
Pó Labina (Purina®/ SP)	359	35,9
Amendoim torrado	179	17,9
Caseína	105	10,5
Óleo de milho	80	8,0
Leite condensado	161	16,1
Bolacha Wafer	116	11,6
Total	1000	100

Para cada 1000g de dieta foram acrescentados: ferro: 25,2 mg; potássio: 104,8 mg; selênio: 73,1 µg; sulfato de molibidênio: 150,0 µg; vitamina B12: 34,5 µg; vitamina B6: 6 mg; biotina: 0,12 mg; vitamina E: 72,8 µg de equivalente de α -tocoferol; vitamina D: 61,17 µg de equivalente de calciferol; e vitamina A: 764,56 µg de equivalente de retinol.

Para verificar a eficiência das dietas, ou seja, a capacidade do animal converter a energia alimentar consumida em peso corporal, foi calculada a eficiência alimentar (EA), dividindo-se o ganho total de peso dos animais (g) pelo consumo alimentar (g) (Diniz *et al.*, 2004).

Tabela 9. Composição Nutricional das Dietas

Dieta	CHO (%)	Prot. (%)	Lip. (%)	Sais (%)	Fibra (%)	Umid.(%)	Kcal/g
Padrão	57,77	27,13	3,34	7,61	4,15	8,29	3,69
1	46,66	27,43	20,08	3,22	2,58	5,42	4,77
2	36,12	30,87	24,62	4,27	4,12	5,11	4,89
4	41,55	28,00	21,85	4,83	3,77	5,03	4,75
5	32,77	28,45	31,23	3,50	4,15	8,29	5,25

A dieta 3 foi composta de ração padrão e água com açúcar. Cada ml de água fornece 1,2 kcal. CHO: carboidrato; Prot.: proteína; Lip.: lipídeo; Umid.: Umidade.

4.3- Caracterização dos Grupos

Foram considerados obesos os animais que receberam as dietas hipercalóricas e que se adequaram aos critérios descritos abaixo.

Houve dois critérios para caracterizar os grupos C e OB, ao final das 15 semanas de experimento, o critério biológico (ingestão alimentar semanal) e o critério estatístico (peso corporal final).

Para a ingestão alimentar semanal (IAS) foi construído um intervalo de 95% de confiança (IC) para a média da IAS dos animais C e OB. Excluiu-se do grupo controle os animais com IAS acima do limite superior do grupo C (26 g) por um período igual ou superior a 12 semanas. O mesmo procedimento de exclusão ocorreu para os animais do grupo obeso; entretanto, nesse grupo foram excluídos os ratos com IAS abaixo do limite inferior do respectivo grupo (16 g).

Para o peso corporal final (PCF) foi estabelecido um IC de 95% para a média do peso de ambos os grupos, determinando assim os limites inferiores e superiores de cada um. A partir do limite superior do grupo C e do limite inferior do grupo OB foi determinado o ponto médio, o ponto de separação (PS), que foi de 499 g. Assim, foram excluídos do grupo C os animais que apresentavam peso corporal acima do PS e do grupo OB os animais com peso abaixo do PS.

4.4- Análise da Composição Corporal

A composição corporal foi determinada com a finalidade de quantificar a gordura corpórea. Foram obtidos os pesos corporal inicial (PCI) e final (PCF), e o comprimento dos animais (determinado do nariz a base da cauda). A partir desses

dados foi determinado o índice de Lee (PCF/comprimento), que tem sido considerado um marcador de obesidade (Li *et al.*, 1997).

Para a análise da carcaça, os animais foram anestesiados (pentobarbital sódico, 50mg/kg, intraperitoneal), decapitados e toracotomizados, foram então descartadas as vísceras restando apenas a carcaça. Esta foi armazenada a uma temperatura de $100 \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas em estufa ventilada Fanem[®], para a secagem da mesma. Após a secagem, a carcaça foi embrulhada em papel filtro e a gordura extraída em aparelho Extrator de Soxhlet (Corning Incorporated, USA). A porcentagem de gordura na carcaça foi determinada pela fórmula $(PP - PSSG) / PPr \times 100$, onde PP= peso pós-secagem, PSSG= peso seco após extração da gordura e PPr= peso pré-secagem.

4.5- Teste Oral de Tolerância à Glicose

Como o modelo de obesidade induz alterações no perfil glicêmico, foi realizado o teste oral de tolerância à glicose ao final de todos os momentos estudados (105, 135 e 165 dias de experimento). Os animais foram submetidos a jejum de 12 a 15 horas, a partir das 19:00h, e as coletas sanguíneas foram realizadas na artéria caudal, após este período. Foi coletada amostra de sangue na condição basal (0'), em seguida, foi administrada gavagem com solução de glicose a 20% (Glicose Monohidratada, Merck, São Paulo, Brasil) equivalente a 3g/kg (Borst, 2005). Amostras de sangue foram então, novamente, coletadas na cauda dos animais nos momentos 30', 60', 120', 180' e 240' minutos. O aparelho utilizado na mensuração dos níveis glicêmicos foi o glicosímetro ACCU-CHEK GO KIT (Roche Diagnostic Brazil Ltda, SP, Brasil).

4.6- Exames Bioquímicos

Os animais foram submetidos a jejum de 12 horas para a realização dos exames de colesterol total, HDL, triglicerídeos e glicose para caracterizar o padrão de obesidade.

Após anestesia com pentobarbital sódico, os animais foram decapitados e o sangue coletado em tubos. O material foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos para separação do soro, que foi utilizado para a realização dos exames.

Para colesterol total, triglicerídeos, HDL colesterol, proteínas totais e albumina foram utilizados o método enzimático colorimétrico. Esses exames foram realizados com o kit comercial CELM (Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos – Barueri, São Paulo, Brasil), no Laboratório Experimental da Clínica Médica da Faculdade de Medicina – UNESP – Botucatu. A glicose de jejum foi dosada com o glicosímetro ACCU-CHEK GO KIT (Roche Diagnostic Brazil Ltda, SP, Brasil).

4.7- Dosagens Hormonais

Foram dosadas no plasma, de todos os animais, a concentração de leptina e insulina e no soro a concentração dos hormônios tireoidianos (T_3 total).

A dosagem de T_3 total foi realizada pelo Laboratório Rhesus (São Paulo, Brasil) e os resultados foram obtidos por radioimunoensaio. Os valores de normalidade para T_3 total variam entre 64 – 86 ng/dL.

Para insulina foi utilizado o kit de imuno-ensaio (kit Linco Research Inc., USA, Cat nº EZRMI-13K), com uso de leitor de micro-placa (ELISA, Spectra Max 190 – Molecular Devices, USA). A dosagem de leptina também foi realizada através de ELISA (kit Linco Research Inc., USA, Cat nº EZRL-83K). Segue em anexo 02 e 03 as técnicas detalhadas do procedimento para dosagem plasmática de leptina e insulina, respectivamente.

Para verificar resistência à insulina foi utilizada a razão insulina plasmática/glicose plasmática (Barnes *et al.*, 2003).

4.8- Expressão de Leptina e Receptores de HT

A expressão dos receptores de hormônios tireoidianos e de leptina foi observada, no tecido adiposo, através de técnicas de RT-PCR semi-quantitativo.

4.8.1- Extração de RNA total

O RNA total foi extraído do tecido adiposo de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando-se TRIZOL Reagente (Gibco™, Cat. nº 15596-026). Para visualizar a técnica em todos os detalhes, vide anexo 04.

4.8.2- Gel analítico de agarose para RNA

A visualização do RNA foi feita em gel de agarose 1%. Segue em anexo 05 a técnica do preparo do gel de agarose 1% e visualização do RNA.

4.8.3- Transcrição reversa (RT) do RNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado o *Kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Brasil, Cat. nº 11904-018). Segue em anexo 06 a técnica detalhada da transcrição reversa do RNA.

4.8.4- Primers

Os *primers* que foram utilizados neste trabalho para verificar a expressão de leptina (LEP) e a expressão dos receptores α (TR α) e β (TR β) de HT, assim como o tamanho dos fragmentos amplificados, em pares de base (pb), estão apresentados na Tabela 10. Os *primers* foram desenhados no Laboratório de Biologia Molecular da Clínica Médica – UNESP – Botucatu.

4.8.5- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Semi-Quantitativo

- Foi determinada a temperatura de anelamento ideal para cada par de oligonucleotídeos iniciadores dos gene-específicos.
- Foi padronizado o “PCR multiplex” (amplificação no mesmo PCR do gene alvo e do gene constitutivo, a ser utilizado como referência para a quantificação do gene alvo – Figura 3).

O RT-PCR semi-quantitativo foi validado amplificando-se o gene alvo e o gene constitutivo num mesmo tubo, uma vez que a combinação dos respectivos pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) se mostrou compatível com a amplificação simultânea (“multiplex”). A Tabela 11 apresenta o número de ciclos e as temperaturas de anelamento de cada par de *primer*.

A reação foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycle gradient (modelo 5331, Bio Research do Brasil). Segue em anexo 07 a técnica detalhada da reação.

Tabela 10. Seqüência dos *primers* utilizados e tamanho dos fragmentos

<i>Primer</i>	Seqüência	Fragmento
LEP sense	5' TCCAAGAAGAAGAAGACCCC 3'	190 pb
LEP antissense	5' TGGCGGATACCGACTGCGTG 3'	
TR α sense	5' TGGGCAAGTCACTCTCTG 3'	214 pb
TR α antissense	5' TCAGTCACCTTCATCAGC 3'	
TR β sense	5' CCGTG TAGAGTAGATGTCTC 3'	226 pb
TR β antissense	5' TGAGTTCCCTTGCTTTTCAC 3'	
Ciclofilina sense	5' ACGCCGCTGTCTCTTTTC 3'	440 pb
Ciclofilina antissense	5' TGCCTTCTTTCACCTTGC 3'	

Lep: leptina; TR α : receptor α para HT; TR β : receptor para HT

A Ciclofilina foi utilizada como controle interno nas reações de RT-PCR semi-quantitativo.

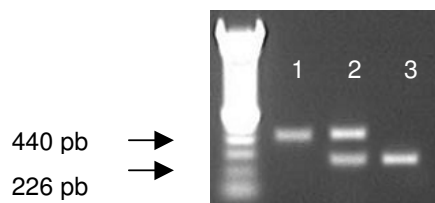


Figura 3. Visualização da padronização do “multiplex” em gel de agarose 1% para TR β . Ciclofilina: 440 pb; TR β : 226 pb. 1: simplex – ciclofilina; 2: duplex – ciclofilina e TR β ; 3: simplex - TR β .

A quantificação das amostras foi obtida dividindo-se o gene alvo pelo gene constitutivo (ciclofilina). Essa quantificação e o registro fotográfico das amostras foram realizados por meio do *software* da UVP Labwoks (versão 3.0.02.00 para Windows 98/NT). A Figura 5 apresenta o gráfico da quantificação de amostras para PCR semi-quantitativo.

Tabela 11. Número de ciclos e temperaturas de anelamento dos *primers*

<i>Primers</i>	<i>Nº Ciclos</i>	<i>Temp. Anelamento</i>
LEP	36	57,2°C
TR α	36	61,1°C
TR β	38	58,4°C

Lep: leptina; TR α : receptor α para HT; TR β : receptor para HT

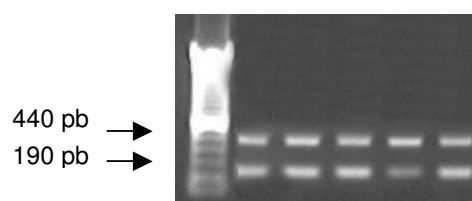


Figura 4. Visualização das amostras em gel de agarose 1% e confirmação pelo tamanho da banda. Todas as amostras são de animais C na etapa 1 (15 semanas de experimento). O peso molecular de 440 pb mostra a amplificação do gene da ciclofilina; o peso molecular de 190 pb mostra a amplificação do gene de leptina.

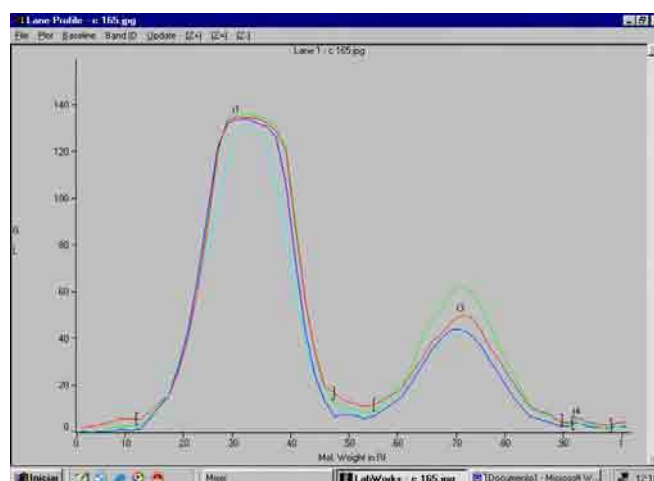


Figura 5. Gráfico da quantificação das amostras para PCR semi-quantitativo. Amostras de animais OB na etapa 1 (15 semanas de experimento). r1: curva para a expressão do gene da ciclofilina; r3: curva para a expressão do gene de receptor β para HT.

4.9- Análise Estatística

Para a análise estatística das variáveis morfológicas, bioquímicas, nutricionais, composição corporal, área glicêmica, dosagens hormonais e expressão gênica foram utilizadas a técnica de análise de variância (ANOVA), para o esquema de dois fatores (momentos e grupos) complementados com o teste de Bonferroni. Quando houve comparações apenas entre dois grupos, foi utilizado o teste “t” de student (Zar, 1999).

Para a evolução de peso foi feito o intervalo de confiança de 95% e, então, foram determinados os limites inferiores e superiores para cada grupo, durante todo o experimento.

Para o perfil glicêmico foi utilizada a técnica de análise de medidas repetidas nos momentos basal, 60', 180' e 240'.

A associação entre a expressão gênica de leptina e TR β foi realizada por meio do coeficiente de correlação linear de Pearson.

Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. O nível de significância adotado foi de 5%.

5- RESULTADOS

5.1- Evolução de Peso

Para caracterizar os grupos, 4 animais OB foram excluídos do estudo pelo critério biológico (ingestão alimentar), enquanto 2 animais C e 1 OB foram excluídos pelo critério estatístico (peso). A evolução do peso dos animais (anexo 8) está apresentada na Figura 6. Os animais que consumiram as dietas hipercalóricas tiveram ganho significativo de peso em relação ao grupo controle. Após a instauração da restrição alimentar, os grupos RIA e RHT tiveram redução significativa de peso, sendo similar ao grupo controle no final do experimento ($458,14 \pm 23,28$ e $448,32 \pm 20,42$ vs $493,12 \pm 44,43$; $p > 0,05$, respectivamente). Na primeira etapa da restrição alimentar, o grupo perdeu 9,46% do peso corporal. Quando RIA e RHT foram separados, o grupo RIA perdeu mais 5,63%, tendo uma perda total de 15,09% de peso em 8 semanas. O grupo RHT perdeu outros 8,87% de peso, chegando a uma perda de 18,33%.

5.2- Ingestão Alimentar e Hídrica

A Tabela 12 mostra a ingestão hídrica, alimentar e calórica dos grupos de acordo com a etapa e a eficiência alimentar das dietas. O grupo OB apresentou um aumento significativo da ingestão calórica apenas na etapa 3 ($95,90 \pm 8,10$ e $94,04 \pm 4,95$ vs $110,45 \pm 10,32$; $p < 0,05$) sendo que o consumo alimentar não apresentou diferença. O grupo RIA, na etapa 2, foi estatisticamente menor que o C em relação ao consumo alimentar ($17,27 \pm 0,11$ vs $23,19 \pm 2,82$; $p < 0,05$) e não apresentou diferença estatística em relação ao grupo OB ($17,27 \pm 0,11$ vs $16,80 \pm 0,95$; $p > 0,05$), porém sua ingestão calórica foi significativamente menor quando comparada aos mesmos grupos ($63,71 \pm 0,40$ vs $85,56 \pm 10,39$ e $94,04 \pm 4,95$; $p < 0,05$). Na etapa 3 o consumo alimentar e ingestão calórica dos grupos RIA e RHT foi o mesmo, já que ambos os grupos foram submetidos a mesma restrição ($17,09 \pm 0,01$). Os grupos RIA e RHT apresentaram consumo alimentar similar ao do grupo OB ($17,09 \pm 0,01$ vs $19,13 \pm 2,12$; $p > 0,05$) e estatisticamente diminuído em relação ao grupo C ($17,09 \pm 0,01$ vs $22,72 \pm 2,35$; $p < 0,05$). Já a ingestão calórica foi significativamente

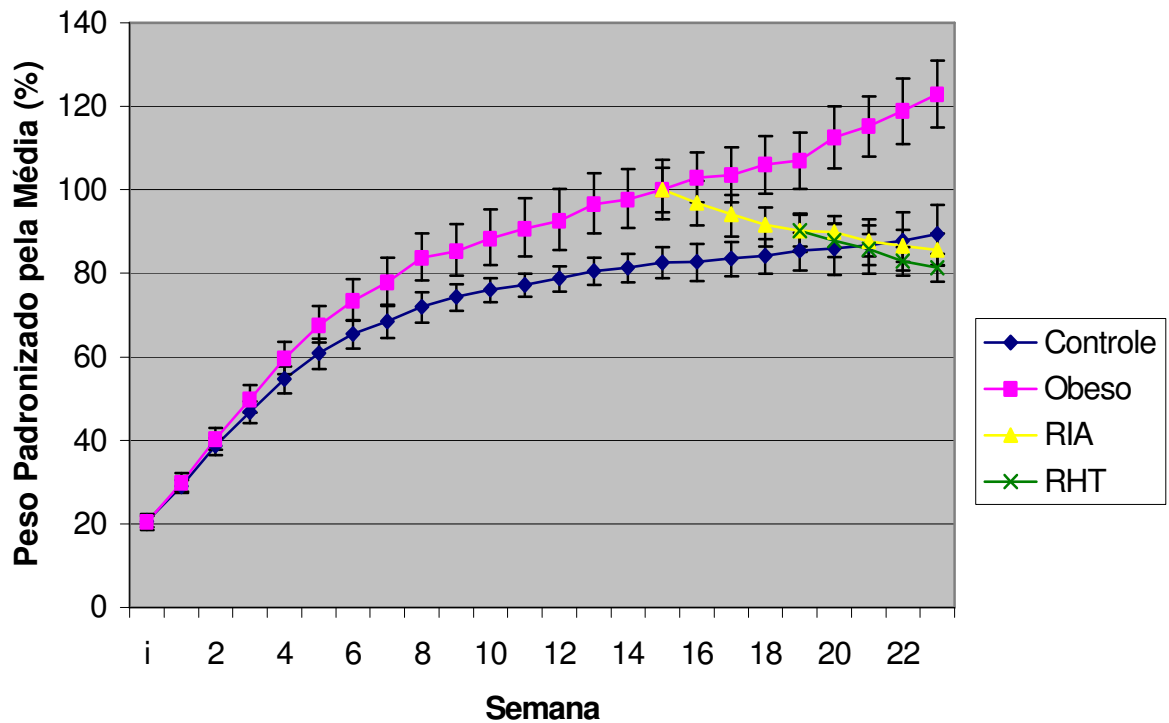


Figura 6. Evolução do peso corporal, em 23 semanas de experimento, de animais que receberam dietas hipercalóricas (Obeso), ração comercial (Controle), restrição de 25% de ração comercial (RIA) e animais que além da restrição alimentar de 25% receberam 5µg/100g de peso de HT (RHT). O grupo RIA recebeu dieta hipercalórica até a 15ª semana; após este período, o grupo foi submetido à restrição alimentar. O grupo RHT também recebeu dieta hipercalórica até a 15ª semana, foi então submetido à restrição alimentar e a partir da 19ª semana recebeu dose de 5µg/100g de peso de HT. i: peso inicial dos animais. Dados expressos em média, em percentagem e intervalos de confiança de 95%.

diminuída nos grupos RIA e RHT quando comparados com C ($63,06 \pm 0,03$ vs $83,82 \pm 8,65$; $p < 0,05$) e OB ($63,06 \pm 0,03$ vs $110,45 \pm 10,32$; $p < 0,05$). Apesar do grupo OB ter consumido quantidade significativamente menor de ração (Figura 7) em todas as etapas ($17,78 \pm 1,65$ vs $23,76 \pm 0,74$; $16,80 \pm 0,95$ vs $23,19 \pm 2,82$; $19,13 \pm 2,12$ vs $22,72 \pm 2,35$; $p < 0,05$), sua ingestão calórica foi maior que o grupo C, sendo esta diferença significativa apenas na última etapa do experimento ($110,45 \pm 10,32$ vs $83,82 \pm 8,65$; $p < 0,05$). O aumento da ingestão calórica se deve à alta ingestão hídrica do grupo OB no período de dieta 3, água com açúcar (Figura 8), porém apenas na etapa 3 o grupo OB apresentou aumento significativo do consumo hídrico em relação ao grupo C ($50,72 \pm 9,12$ vs $33,68 \pm 1,11$; $p < 0,05$). Na etapa 2 o grupo RIA apresentou consumo hídrico semelhante ao do grupo C ($33,95 \pm 5,50$ vs $36,22 \pm 4,49$; $p > 0,05$) e significativamente menor que o OB ($33,95 \pm 5,50$ vs $47,15 \pm 9,09$; $p < 0,05$). Os grupos RIA e RHT, na etapa 3, mantiveram o mesmo comportamento ($38,98 \pm 9,60$ vs $32,82 \pm 4,57$; $p > 0,05$), sendo estatisticamente menor que o grupo OB ($38,98 \pm 9,60$ e $32,82 \pm 4,57$ vs $50,72 \pm 9,12$; $p < 0,05$). A Figura 9 apresenta a ingestão calórica dos grupos para cada etapa do experimento. A eficiência alimentar foi estatisticamente maior no grupo OB em todas as etapas do experimento quando comparado ao C ($23,1 \pm 1,9$ vs $13,8 \pm 0,6$ etapa 1; $83,6 \pm 7,2$ vs $56,3 \pm 5,2$ etapa 2; $90,1 \pm 2,1$ vs $58,5 \pm 3,4$ etapa 3; $p < 0,05$). Na etapa 2 o grupo RIA foi menor que o C ($-10,6 \pm 1,8$ vs $56,3 \pm 5,2$; $p < 0,05$) e que o grupo OB ($-10,6 \pm 1,8$ vs $83,6 \pm 7,2$; $p < 0,05$). Os grupos RIA e RHT, na etapa 3, apresentaram diminuição da EA devido à restrição alimentar apresentando o mesmo comportamento ($-6,5 \pm 2,1$ vs $-10,2 \pm 2,8$; $p > 0,05$) e sendo significativamente menores que o grupo C ($-6,5 \pm 2,1$ vs $58,5 \pm 3,4$; $p < 0,05$ e $-10,2 \pm 2,8$ vs $58,5 \pm 3,4$; $p < 0,05$, respectivamente).

Tabela 12. Ingestão alimentar (g), calórica (kcal) e hídrica (mL), e eficiência alimentar (EA) dos animais controle (C), obeso (OB), com restrição alimentar (RIA) e com restrição alimentar e administração de dose fisiológica de HT (RHT), durante todo o período experimental.

Grupos	Variáveis			
	Consumo (gr)	Consumo (kcal)	Ingestão Hídrica	EA
C 1	23,76 ± 0,74 b	87,68 ± 2,72 A a	35,50 ± 1,79 A a	13,8 ± 0,6 A a
OB 1	17,78 ± 1,65 a	95,90 ± 8,10 A a	37,06 ± 2,91 A a	23,1 ± 1,9 A b
C 2	23,19 ± 2,82 b	85,56 ± 10,39 A b	36,22 ± 4,49 A ab	56,3 ± 5,2 B b
OB 2	16,80 ± 0,95 a	94,04 ± 4,95 A b	47,15 ± 9,09 AB b	83,6 ± 7,2 B c
RIA 2	17,27 ± 0,11 a	63,71 ± 0,40 A a	33,95 ± 5,50 A a	-10,6 ± 1,8 A a
C 3	22,72 ± 2,35 b	83,82 ± 8,65 A b	33,68 ± 1,11 A a	58,5 ± 3,4 B b
OB 3	19,13 ± 2,12 a	110,45 ± 10,32 B c	50,72 ± 9,12 B b	90,1 ± 2,1 C c
RIA 3	17,09 ± 0,01 a	63,06 ± 0,03 A a	38,98 ± 9,60 A a	-6,5 ± 2,1 A a
RHT 3	17,09 ± 0,01 a	63,06 ± 0,03 a	32,82 ± 4,57 a	-10,2 ± 2,8 a

Foi utilizada a técnica de análise de variância (ANOVA), para o esquema de dois fatores complementada com o teste de Bonferroni. Dados expressos em média ± desvio-padrão. C1: controle etapa 1; OB1: obeso etapa 1; C2: controle etapa 2; OB2: obeso etapa 2; RIA2: restrito etapa 2; C3: controle etapa 3; OB3: obeso etapa 3; RIA3: restrito etapa 3; RHT3: restrito com administração de HT etapa 3. Etapa 1: 105 dias de experimento; etapa 2: 133 dias de experimento; etapa 3: 161 dias de experimento. Letras maiúsculas – comparações realizadas dentro do mesmo grupo para etapas diferentes. Letras minúsculas – comparações realizadas dentro da mesma etapa. Letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$.

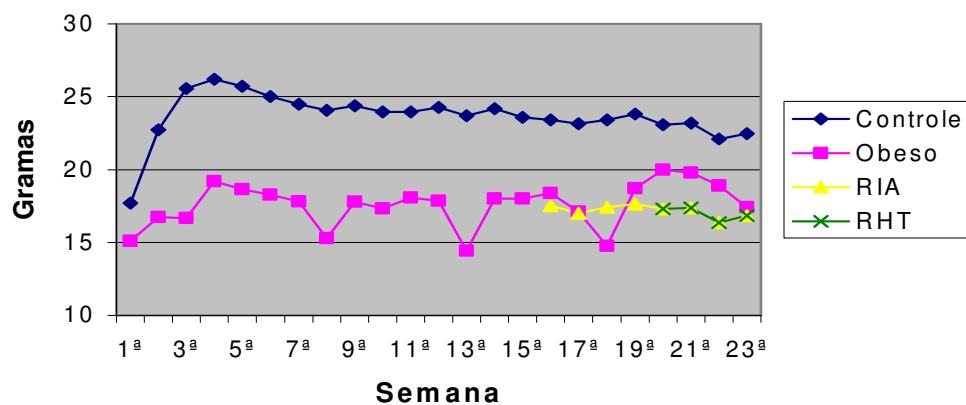


Figura 7. Gráfico do consumo alimentar, em gramas, dos animais C, OB, RIA e RHT ao longo do experimento. O grupo RIA recebeu dieta hipercalórica até a 15ª semana; após este período, o grupo foi submetido à restrição alimentar. O grupo RHT também recebeu dieta hipercalórica até a 15ª semana, foi então submetido à restrição alimentar e a partir da 19ª semana recebeu dose de 5µg/100g de peso de HT.

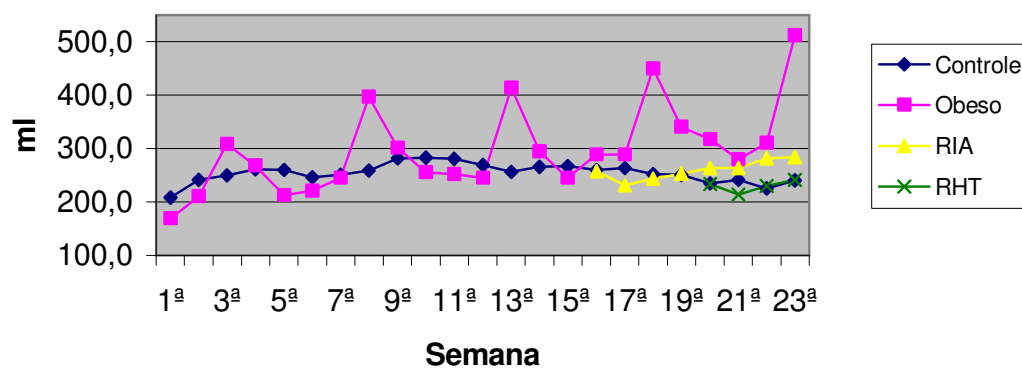


Figura 8. Gráfico do consumo hídrico, em mililitros, dos animais C, OB, RIA e RHT ao longo do experimento. O grupo RIA recebeu dieta hipercalórica até a 15ª semana; após este período, o grupo foi submetido à restrição alimentar. O grupo RHT também recebeu dieta hipercalórica até a 15ª semana, foi então submetido à restrição alimentar e a partir da 19ª semana recebeu dose de 5µg/100g de peso de HT.

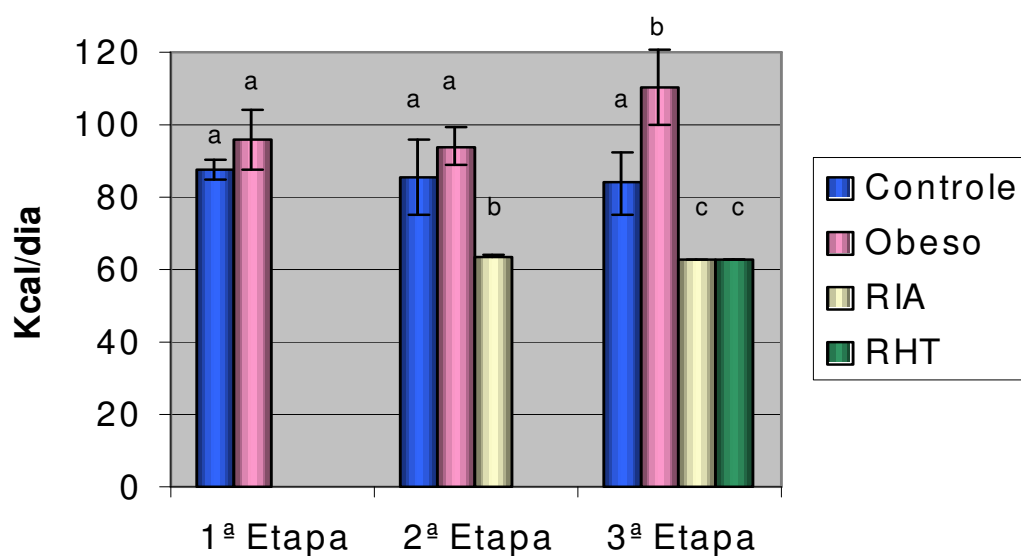


Figura 9. Gráfico da ingestão calórica dos grupos nas diferentes etapas do experimento. O grupo controle recebeu dieta padrão, enquanto o OB recebeu ciclos de dietas hipercalóricas. O grupo RIA recebeu dieta hipercalórica até a 15ª semana; após este período, o grupo foi submetido à restrição alimentar. O grupo RHT também recebeu dieta hipercalórica até a 15ª semana, foi então submetido à restrição alimentar e a partir da 19ª semana recebeu dose de 5µg/100g de peso de HT além da restrição alimentar. Letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$. As comparações mostradas são dentro da mesma etapa.

5.3- Composição Corporal

Os dados morfométricos dos animais podem ser visualizados na Tabela 13. Não houve diferença estatística entre todos os grupos para peso corporal inicial (PCI), já para peso corporal final (PCF) houve diferença significativa entre OB1 e OB3 ($572,75 \pm 69,19$ vs $679,50 \pm 49,25$; $p < 0,05$), OB2 e OB3 ($572,57 \pm 36,62$ vs $679,50 \pm 49,25$; $p < 0,05$) C1 e OB1 ($457,76 \pm 18,98$ vs $572,75 \pm 69,19$; $p < 0,05$), entre C2 e OB2 ($471,48 \pm 26,85$ vs $572,57 \pm 36,62$; $p < 0,01$), entre C3 e OB3 ($493,12 \pm 44,43$ vs $679,50 \pm 49,25$; $p < 0,01$), entre RIA2 e OB2 ($460,57 \pm 19,05$ vs $572,57 \pm 36,62$; $p < 0,01$), entre RIA 3 e OB3 ($458,14 \pm 23,28$ vs $679,50 \pm 49,25$; $p < 0,01$) e entre RHT3 e OB3 ($448,32 \pm 20,42$ vs $679,50 \pm 49,25$; $p < 0,01$). Os ratos OB apresentaram maior índice de Lee quando comparados com os outros animais da mesma idade. Na etapa 2, os animais C e RIA foram similares ($18,03 \pm 1,03$ vs $17,71 \pm 0,75$; $p > 0,05$) e na etapa 3 o grupo C, RIA e RHT apresentaram índice semelhante ($19,03 \pm 1,40$ vs $17,43 \pm 0,84$ vs $17,12 \pm 0,87$; $p > 0,05$, respectivamente).

As dietas hipercalóricas aumentaram de maneira significativa a quantidade de gordura da carcaça do grupo OB em relação aos demais grupos, em todas as etapas do experimento (Figura 10). Os animais RIA apresentaram diminuição da taxa de gordura corporal em relação ao grupo OB ($11,6 \pm 2,7$ vs $20,7 \pm 1,7$; $p < 0,05$) e foi similar ao grupo C ($11,6 \pm 2,7$ vs $13,3 \pm 4,5$; $p > 0,05$), na etapa 2. O grupo RHT, por sua vez, apresentou diminuição significativa da gordura da carcaça em relação ao grupo OB ($9,0 \pm 2,8$ vs $24,9 \pm 4,4$; $p < 0,05$), e foi similar ao grupo RIA ($9,0 \pm 2,8$ vs $8,4 \pm 4,5$; $p > 0,05$) e ao C ($9,0 \pm 2,8$ vs $14,1 \pm 7,2$; $p > 0,05$) (Tabela 14).

Tabela 13. Peso corporal inicial (PCI), peso corporal final (PCF), comprimento (Comp.) e o índice de Lee (PCF/Comp.) dos animais controle (C), obeso (OB), com restrição alimentar (RIA) e com restrição alimentar e administração de dose fisiológica de HT (RHT).

Grupos	Variáveis			
	PCI (g)	PCF (g)	Comp. (cm)	Índice Lee
C 1	114,3 ± 7,32 ^a	457,8 ± 18,98 ^a	25,9 ± 0,22 ^a	17,7 ± 0,68 ^a
OB 1	115,2 ± 10,95 ^a	572,7 ± 69,19 ^{Ab}	26,9 ± 0,50 ^{Ab}	21,3 ± 2,33 ^{Ab}
C 2	108,6 ± 5,31 ^a	471,5 ± 26,85 ^a	26,1 ± 0,24 ^a	18 ± 1,03 ^a
OB 2	105,8 ± 10,37 ^a	572,6 ± 36,62 ^{Ab}	26,7 ± 0,27 ^{Ab}	21,4 ± 1,30 ^{Ab}
RIA 2	108,9 ± 9,90 ^a	460,6 ± 19,05 ^a	26 ± 0,41 ^a	17,7 ± 0,75 ^a
C 3	120,8 ± 8,81 ^a	493,1 ± 44,43 ^a	25,9 ± 1,02 ^a	19 ± 1,40 ^a
OB 3	109,1 ± 7,76 ^a	679,5 ± 49,25 ^{Bb}	27,7 ± 0,52 ^{Bb}	24,5 ± 1,85 ^{Bb}
RIA 3	114,5 ± 14,03 ^a	458,1 ± 23,28 ^a	26,3 ± 0,70 ^a	17,4 ± 0,84 ^a
RHT 3	121,5 ± 11,99 ^a	448,3 ± 20,42 ^a	26,2 ± 0,91 ^a	17,1 ± 0,87 ^a

Foi utilizada a técnica de análise de variância (ANOVA), para o esquema de dois fatores complementada com o teste de Bonferroni. Dados expressos em média ± desvio-padrão. C1: controle etapa 1; OB1: obeso etapa 1; C2: controle etapa 2; OB2: obeso etapa 2; RIA2: restrito etapa 2; C3: controle etapa 3; OB3: obeso etapa 3; RIA3: restrito etapa 3; RHT3: restrito com administração de HT etapa 3. Etapa 1: 105 dias de experimento; etapa 2: 133 dias de experimento; etapa 3: 161 dias de experimento. Letras maiúsculas – comparações realizadas dentro do mesmo grupo para etapas diferentes. Letras minúsculas – comparações realizadas dentro da mesma etapa. Letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$.

Tabela 14. Análise de gordura da carcaça para animais controle (C), obeso (OB), com restrição alimentar (RIA) e com restrição alimentar e administração de dose fisiológica de HT (RHT), durante todo o período experimental.

Grupo	Carcaça			
	Água (mL)	Gordura (g)	Água (%)	Gordura (%)
C 1	224,4 ± 15,7 Aa	54,9 ± 2,3 Aa	58,3 ± 1,7 Aa	14,3 ± 0,7 Aa
OB 1	236,1 ± 22,5 Aa	102,4 ± 22,4 Ab	53,1 ± 6,0 Aa	22,7 ± 3,7 Ab
C 2	210,4 ± 14,4 Aa	49 ± 16,8 Aa	56,9 ± 2,6 Aa	13,3 ± 4,5 Aa
OB 2	250,6 ± 17,3 ABa	97,1 ± 12,1 Ab	53,5 ± 1,1 Aa	20,7 ± 1,7 Ab
RIA 2	208,3 ± 7,4 Aa	41 ± 11,1 Aa	59,2 ± 2,4 Aa	11,6 ± 2,7 Aa
C 3	221 ± 8,4 Aa	56,3 ± 31,4 Aa	56,9 ± 3,8 Aab	14,1 ± 7,2 Aa
OB 3	274,6 ± 23,7 Bb	132,3 ± 27,0 Ab	51,8 ± 2,6 Aa	24,9 ± 4,4 Ab
RIA 3	232,4 ± 8,3 Aa	32,2 ± 19,1 Aa	61,7 ± 2,7 Ab	8,4 ± 4,5 Aa
RHT 3	219,6 ± 11,0 a	32,7 ± 11,2 a	60,5 ± 2,7 b	9,0 ± 2,8 a

Foi utilizada a técnica de análise de variância (ANOVA), para o esquema de dois fatores complementada com o teste de Bonferroni. Dados expressos em média ± desvio-padrão. C1: controle etapa 1; OB1: obeso etapa 1; C2: controle etapa 2; OB2: obeso etapa 2; RIA2: restrito etapa 2; C3: controle etapa 3; OB3: obeso etapa 3; RIA3: restrito etapa 3; RHT3: restrito com administração de HT etapa 3. Etapa 1: 105 dias de experimento; etapa 2: 133 dias de experimento; etapa 3: 161 dias de experimento. Letras maiúsculas – comparações realizadas dentro do mesmo grupo para etapas diferentes. Letras minúsculas – comparações realizadas dentro da mesma etapa. Letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$.

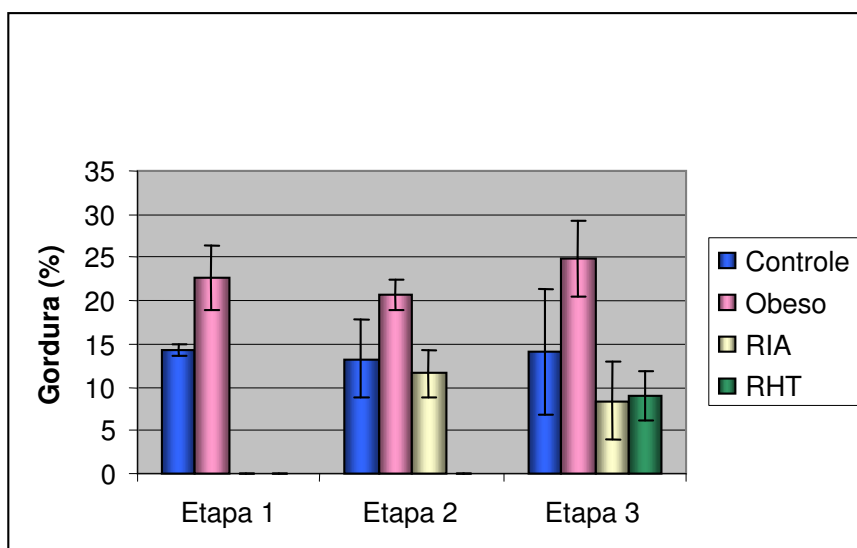
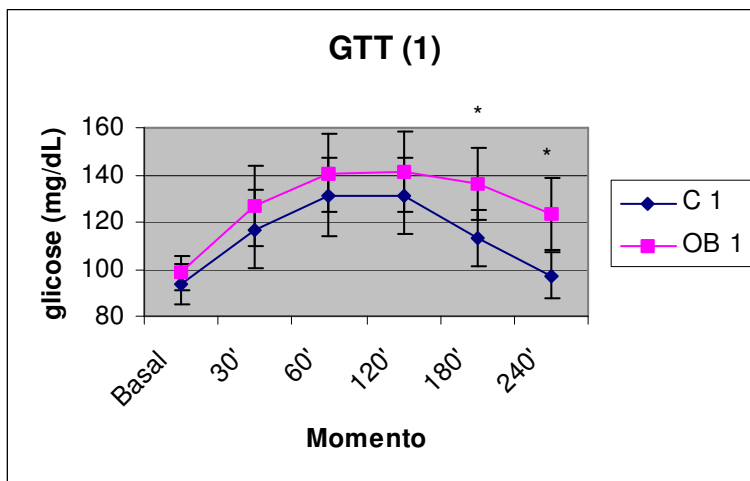


Figura 10: Gráfico da composição corporal dos grupos nas diferentes etapas do experimento. O grupo controle recebeu dieta padrão, enquanto o OB recebeu ciclos de dietas hipercalóricas. O grupo RIA recebeu dieta hipercalórica até a 15ª semana; após este período, o grupo foi submetido à restrição alimentar. O grupo RHT também recebeu dieta hipercalórica até a 15ª semana, foi então submetido à restrição alimentar e a partir da 19ª semana recebeu dose de 5µg/100g de peso de HT além da restrição alimentar. Letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$. As comparações mostradas são dentro da mesma etapa.

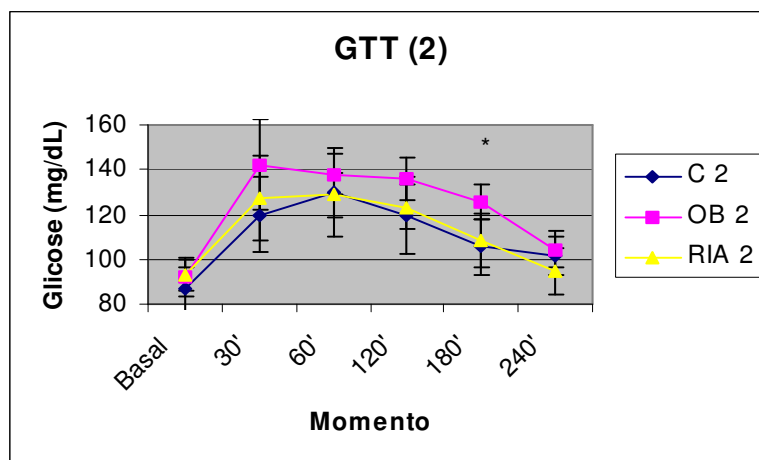
5.4- Teste Oral de Tolerância à Glicose

Ao final de cada etapa do experimento cinco animais de cada grupo foram submetidos ao teste oral de tolerância à glicose (GTT). As dietas hipercalóricas não causaram elevação da glicose de jejum, mas causaram aumento significativo da glicose nos momentos 180 e 240 minutos, sendo que no grupo OB2 não foi observado este aumento no último momento. Os grupos RIA e RHT apresentaram o mesmo comportamento do grupo C (Figura 11 a, b e c), apresentando uma melhora à tolerância à glicose devido a perda de peso desses animais. A Tabela 15 mostra a análise do GTT segundo o momento da coleta para cada grupo. Para estas análises foram utilizados somente 4 momentos (basal, 60', 180' e 240') devido ao pequeno número de animais em cada grupo.

a)



b)



c)

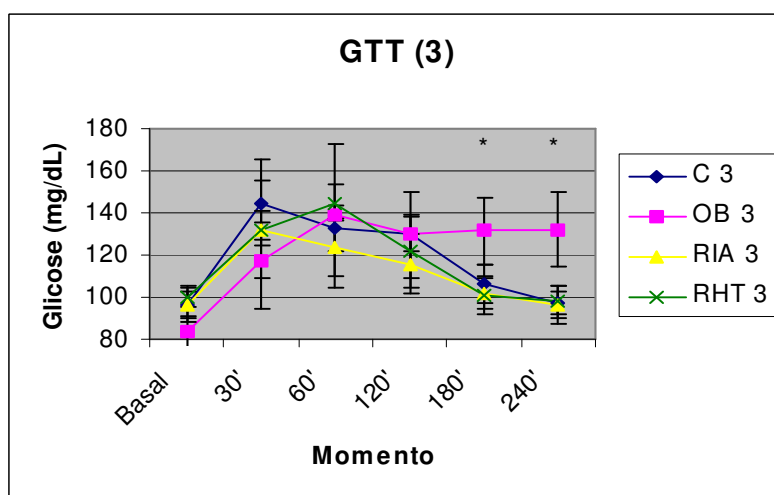


Figura 11. a) GTT com 15 semanas de experimento. C: controle, OB: obeso; b) GTT com 19 semanas de experimento. C: controle, OB: obeso, RIA: restrito; c) GTT com 23 semanas de experimento de animais que receberam dietas hipercalóricas (OB), ração comercial (C), restrição de 25% de ração comercial (RIA) e animais que além da restrição alimentar de 25% receberam 5 μ g/100g de peso de HT (RHT). Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio-padrão, * $p < 0,05$.

Tabela 15. Concentração de glicose em animais submetidos a jejum de 12 horas e gavagem com solução de glicose 20%, em animais do grupo controle (C), obeso (OB), com restrição alimentar (RIA) e com restrição alimentar e administração de dose fisiológica de HT (RHT), de acordo com o momento da avaliação.

Grupo	Momento de Avaliação				Resultado estatístico
	Basal	60'	180'	240'	
C 1	93,6 ± 8,14 <i>a</i>	130,8±16,80 <i>b</i>	113,2±12,28 <i>b</i>	97,4 ± 9,92 <i>a</i>	<i>P</i> <0,001
OB 1	98,5 ± 7,25 <i>a</i>	140,7±16,7 <i>c</i>	136,2±15,1 <i>c</i>	123,5±15,28 <i>b</i>	<i>P</i> <0,001
C 2	86,6 ± 9,71 <i>a</i>	129,7±19,87 <i>c</i>	105,4±12,16 <i>b</i>	101,6±8,58 <i>b</i>	<i>P</i> <0,001
OB 2	91,7 ± 8,16 <i>a</i>	138±9,01 <i>d</i>	125,5±7,97 <i>c</i>	104,3± 8,33 <i>b</i>	<i>P</i> <0,001
RIA 2	93,3 ± 6,99 <i>a</i>	128,7±10,16 <i>c</i>	108,3±11,83 <i>b</i>	94,9±10,19 <i>a</i>	<i>P</i> <0,001
C 3	96,4 ± 6,73 <i>a</i>	132,8±11,26 <i>c</i>	106,4±8,88 <i>b</i>	97,4 ± 5,77 <i>a</i>	<i>P</i> <0,002
OB 3	83,5 ± 7,57 <i>a</i>	138,8±34,17 <i>b</i>	131,7±15,95 <i>b</i>	132±17,78 <i>b</i>	<i>P</i> <0,001
RIA 3	96,4 ± 8,22 <i>a</i>	123,8±13,4 <i>b</i>	101,6±7,32 <i>a</i>	96,3 ± 9,16 <i>a</i>	<i>P</i> <0,001
RHT 3	100,4±5,03 <i>a</i>	144,8±8,64 <i>b</i>	100,8±9,20 <i>a</i>	97,8 ± 7,50 <i>a</i>	<i>P</i> <0,001

Análise do GTT segundo o momento de avaliação para cada grupo. Dados expressos em média ± desvio-padrão (mg/dL). C1: controle etapa 1; OB1: obeso etapa 1; C2: controle etapa 2; OB2: obeso etapa 2; RIA2: restrito etapa 2; C3: controle etapa 3; OB3: obeso etapa 3; RIA3: restrito etapa 3; RHT3: restrito com administração de HT etapa 3. Etapa 1: 105 dias de experimento; etapa 2: 133 dias de experimento; etapa 3: 161 dias de experimento. Foi utilizada a técnica de análise de medidas repetidas. Letras iguais = *p*>0,05; letras diferentes = *p*<0,05. Comparações realizadas para cada grupo.

5.5- Exames Bioquímicos

Os dados bioquímicos estão apresentados na tabela 16. Os animais que consumiram as dietas hipercalóricas mostraram um aumento significativo do colesterol total ao longo do experimento ($64,13 \pm 6,58$ vs $91,79 \pm 4,65$ vs $100,77 \pm 5,13$; $p < 0,01$ e $p < 0,05$ respectivamente). Em contrapartida os animais RIA tiveram uma diminuição significativa durante o experimento ($98,13 \pm 9,00$ vs $80,57 \pm 12,20$; $p < 0,05$). RIA3 apresentou-se significativamente diminuído em relação ao OB3 ($80,57 \pm 12,20$ vs $100,77 \pm 5,13$; $p < 0,01$) e estatisticamente aumentado quando comparado com C3 ($80,57 \pm 12,20$ vs $72,60 \pm 5,73$; $p < 0,05$). O grupo RHT3 também apresentou um aumento significativo em relação ao grupo C3 ($88,40 \pm 10,64$ vs $72,60 \pm 5,73$; $p < 0,05$). Contudo os animais OB apresentaram também aumento significativo da fração HDL-colesterol na etapa 3, quando comparado com o grupo C3 ($64,36 \pm 5,19$ vs $47,40 \pm 11,48$; $p < 0,05$). O grupo RIA apresentou diminuição significativa do HDL ao longo do experimento ($61,00 \pm 12,76$ vs $48,69 \pm 4,33$; $p < 0,05$), apresentando o mesmo comportamento do colesterol total. O grupo RHT3 apresentou aumento significativo em relação ao RIA3 e ao C3 ($58,40 \pm 4,72$ vs $48,69 \pm 4,33$ e $47,40 \pm 11,48$; $p < 0,05$, respectivamente). Em relação aos triglicérides o grupo OB apresentou aumento significativo de OB1 para OB2 ($89,00 \pm 21,29$ vs $121,82 \pm 14,21$; $p < 0,05$) e não houve aumento significativo de OB2 para OB3 ($121,82 \pm 14,21$ vs $123,17 \pm 11,62$; $p > 0,05$). O grupo RIA2 apresentou diminuição significativa em relação aos grupos C2 e OB2 ($76,71 \pm 2,78$ vs $121,23 \pm 27,70$ e $121,82 \pm 14,21$; $p < 0,01$, respectivamente). Os grupos RIA3 e RHT3 também apresentaram diminuição significativa em relação aos grupos C3 e OB3 ($74,98 \pm 37,41$ e $75,80 \pm 29,40$ vs $115,40 \pm 9,86$ e $123,17 \pm 11,62$; $p < 0,01$, respectivamente). Não houve diferença estatística nos grupos para proteínas totais.

Tabela 16: Colesterol total (Col. Total – mg/dL), triglicérides (TG – mg/dL), lipoproteína de alta densidade (HDL – mg/dL), proteínas totais (Prot. Totais – g/dL) e albumina (g/dL) de animais controle (C), obeso (OB), com restrição alimentar (RIA) e com restrição alimentar e administração de HT (RHT), nas etapas do experimento.

Grupo	Variáveis			
	Col. Total	TG	HDL	Prot. Totais
C 1	65 ± 6,21 A a	104 ± 5,79 A a	45,4 ± 4,72 A a	6,54 ± 0,45 A a
OB 1	64,1 ± 6,58 A a	89 ± 21,29 A a	50,7 ± 5,34 A a	6,49 ± 0,39 A a
C 2	81,6 ± 7,83 B a	121 ± 27,7 A b	49,3 ± 3,57 A a	6,66 ± 0,37 A a
OB 2	91,8 ± 4,65 B b	121 ± 14,2 B b	55,8 ± 4,90 AB ab	7,13 ± 0,22 A a
RIA 2	98,1 ± 9,00 A b	76,7 ± 2,78 A a	61,0 ± 12,76 B b	6,77 ± 0,49 A a
C 3	72,6 ± 5,73 A a	115 ± 9,86 A b	47,4 ± 11,48 A a	6,62 ± 0,35 A a
OB 3	100 ± 5,13 C c	123 ± 11,6 B b	64,4 ± 5,19 B b	6,92 ± 0,19 A a
RIA 3	80,6 ± 12,2 B b	74,9 ± 37,41 A a	48,7 ± 4,33 A a	6,64 ± 0,38 A a
RHT 3	88,4 ± 10,64 bc	75,8 ± 29,40 a	58,4 ± 4,72 b	6,58 ± 0,49 a

Foi utilizada a técnica de análise de variância (ANOVA), para o esquema de dois fatores (momentos e grupos) complementada com o teste de Bonferroni. Dados expressos em média ± desvio-padrão. C1: controle etapa 1; OB1: obeso etapa 1; C2: controle etapa 2; OB2: obeso etapa 2; RIA2: restrito etapa 2; C3: controle etapa 3; OB3: obeso etapa 3; RIA3: restrito etapa 3; RHT3: restrito com administração de HT etapa 3. Etapa 1: 105 dias de experimento; etapa 2: 133 dias de experimento; etapa 3: 161 dias de experimento. Letras maiúsculas – comparações realizadas dentro do mesmo grupo para etapas diferentes. Letras minúsculas – comparações realizadas dentro da mesma etapa. Letras ou letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$.

5.6- Dosagens Hormonais

Os níveis de leptina plasmática foram proporcionais ao peso final dos animais, para todos os grupos. Deste modo os animais OB apresentaram níveis maiores de leptina, enquanto os animais RIA e RHT apresentaram os menores. O grupo OB foi significativamente maior que o grupo C em todas as etapas ($13,20 \pm 6,96$ vs $3,84 \pm 1,90$, $p < 0,05$, etapa 1; $8,72 \pm 3,11$ vs $4,24 \pm 1,41$, $p < 0,01$, etapa 2; $15,73 \pm 6,05$ vs $4,82 \pm 2,37$, $p < 0,01$, etapa 3). Na etapa 2 o grupo RIA foi estatisticamente menor que o grupo OB ($4,44 \pm 1,03$ vs $8,72 \pm 3,11$; $p < 0,01$) e não foi diferente do C ($4,44 \pm 1,03$ vs $4,24 \pm 1,41$; $p > 0,05$). Apesar de não estatisticamente diferente o grupo RIA3 foi menor que o RIA2 ($2,81 \pm 0,65$ vs $4,44 \pm 1,03$; $p > 0,05$) e significativamente menor que o OB3 ($2,81 \pm 0,65$ vs $15,73 \pm 6,05$; $p < 0,01$), não se diferenciando do C e do RHT ($2,81 \pm 0,65$ vs $4,82 \pm 2,37$ e $2,80 \pm 0,89$; $p > 0,05$, respectivamente). A Tabela 17 apresenta a dosagem plasmática de leptina, insulina e a dosagem sérica de T_3 total.

O grupo OB apresentou níveis plasmáticos de insulina significativamente aumentados em relação ao grupo C, nas etapas 1 e 3 ($1,69 \pm 0,73$ vs $0,56 \pm 0,26$ e $3,07 \pm 0,55$ vs $1,13 \pm 0,35$; $p < 0,05$, respectivamente). Na etapa 2, os animais OB não foram estatisticamente diferentes dos grupos C e RIA ($1,65 \pm 0,80$ vs $0,89 \pm 0,59$ e $0,76 \pm 0,28$; $p > 0,05$, respectivamente). O grupo RHT, na etapa 3, foi similar aos grupos C e RIA ($0,83 \pm 0,30$ vs $1,13 \pm 0,35$ e $1,00 \pm 0,45$; $p > 0,05$, respectivamente) e significativamente diminuída em relação ao OB ($0,83 \pm 0,30$ vs $3,07 \pm 0,55$; $p < 0,05$).

Para os níveis séricos de T_3 total não houve diferença estatística entre os grupos, porém os animais OB apresentaram pequeno aumento, não significativo, de T_3 total quando comparado com o grupo C, nas etapas 1 e 3 ($61,29 \pm 8,54$ vs $60,66 \pm 14,28$ e $65,09 \pm 15,55$ vs $55,28 \pm 7,04$; $p > 0,05$, respectivamente), enquanto para o grupo OB 2, houve diminuição não significativa dos níveis de T_3 total em relação ao grupo C ($65,72 \pm 5,47$ vs $66,75 \pm 5,09$; $p > 0,05$). Nas etapas 2 e 3, o grupo RIA apresentou diminuição não significativa de T_3 quando comparado com o C ($55,99 \pm 12,69$ vs $66,75 \pm 5,09$ e $42,94 \pm 16,66$ vs $55,28 \pm 7,04$; $p > 0,05$, respectivamente). O grupo que recebeu dose fisiológica de T_3 apresentou diminuição não significativa em relação aos grupos C e OB ($44,79 \pm 13,92$ vs $55,28 \pm 7,04$ e $65,09 \pm 15,55$;

Tabela 17. Dosagem plasmática de leptina (ng/mL) e insulina (ng/mL) e dosagem sérica de T₃ total (ng/mL) dos animais controle (C), obeso (OB), com restrição alimentar (RIA) e com restrição alimentar e administração de dose fisiológica de HT (RHT), no final de cada etapa.

Grupos	Dosagens		
	Leptina	Insulina	T ₃ total
C1	3,84 ± 1,90 A a	0,56 ± 0,26 A a	60,66 ± 14,28 a
OB1	13,20 ± 6,96 B b	1,69 ± 0,73 A b	61,29 ± 8,54 a
C2	4,24 ± 1,41 A a	0,89 ± 0,59 A a	66,75 ± 5,09 a
OB2	8,72 ± 3,11 A b	1,65 ± 0,80 A a	65,72 ± 5,47 a
RIA2	4,44 ± 1,03 A a	0,76 ± 0,28 A a	55,99 ± 12,69 a
C3	4,82 ± 2,37 A a	1,13 ± 0,35 A a	55,28 ± 7,04 a
OB3	15,73 ± 6,05 B b	3,07 ± 0,55 B b	65,09 ± 15,55 a
RIA3	2,81 ± 0,65 A a	1,00 ± 0,45 A a	42,94 ± 16,66 a
RHT3	2,80 ± 0,89 a	0,83 ± 0,30 a	44,79 ± 13,92 a

Foi utilizada ANOVA para o modelo de dois fatores (momentos e grupos) complementada com o teste de Bonferroni. Dados expressos em média ± desvio-padrão. C1: controle etapa 1; OB1: obeso etapa 1; C2: controle etapa 2; OB2: obeso etapa 2; RIA2: restrito etapa 2; C3: controle etapa 3; OB3: obeso etapa 3; RIA3: restrito etapa 3; RHT3: restrito com administração de HT etapa 3. Etapa 1: 105 dias de experimento; etapa 2: 133 dias de experimento; etapa 3: 161 dias de experimento. Valor de referência para T₃ total: 64 – 86 ng/dL. Leptina e insulina foram comparadas em relação aos grupos C. Letras maiúsculas – comparações realizadas dentro do mesmo grupo para etapas diferentes. Letras minúsculas – comparações realizadas dentro da mesma etapa. Letras ou letras iguais = p>0,05; letras diferentes = p<0,05.

$p>0,05$, respectivamente) e aumento não significativo quando comparado com o grupo RIA ($44,79 \pm 13,92$ vs $42,94 \pm 16,66$; $p>0,05$).

Foi utilizada a razão insulina plasmática/glicose plasmática para caracterizar a resistência à insulina. Apesar do grupo OB apresentar razão insulina/glicose maior que o C em todas as etapas do experimento, apenas na etapa 3 este aumento foi significativo ($36,4 \times 10^{-3} \pm 8,4 \times 10^{-3}$ vs $13,7 \times 10^{-3} \pm 6,4 \times 10^{-3}$; $p<0,05$). O grupo RIA foi similar ao C nas etapas 2 e 3 ($8,2 \times 10^{-3} \pm 3,0 \times 10^{-3}$ vs $10,1 \times 10^{-3} \pm 7,0 \times 10^{-3}$ e $10,0 \times 10^{-3} \pm 3,7 \times 10^{-3}$ vs $13,7 \times 10^{-3} \pm 6,4 \times 10^{-3}$; $p>0,05$, respectivamente). Os animais RHT apresentaram a menor razão entre insulina e glicose plasmáticas, porém essa diferença não foi significativa em relação aos grupos C e RIA ($7,8 \times 10^{-3} \pm 3,8 \times 10^{-3}$ vs $13,7 \times 10^{-3} \pm 6,4 \times 10^{-3}$ e $10,0 \times 10^{-3} \pm 3,7 \times 10^{-3}$; $p>0,05$, respectivamente). A Tabela 18 apresenta a razão insulina plasmática/glicose plasmática para os animais C, OB, RIA e RHT nas três etapas do experimento.

5.7- Expressão Gênica

Neste trabalho foi estudada a expressão gênica de leptina e dos receptores α e β de hormônios tireoidianos em animais obesos, animais que receberam dieta hipercalórica e posteriormente foram submetidos a restrição alimentar e em animais que além da restrição receberam uma dose fisiológica de HT ($0,5 \mu\text{g}/100\text{g}$ de peso do animal).

Não foi possível mostrar expressão de receptor α de hormônio tireoidiano ($\text{TR}\alpha$) no tecido adiposo. Para confirmação deste dado foi realizada PCR com o gene $\text{TR}\alpha$ no tecido adiposo e no coração (ventrículo esquerdo). O coração foi o tecido escolhido por apresentar grande número de $\text{TR}\alpha$ (Kinugawa *et al.*, 2001). A Figura 12 apresenta o “multiplex” realizado para o gene $\text{TR}\alpha$ nos dois tecidos.

Tabela 18. Razão entre insulina e glicose plasmáticas dos animais controle (C), obeso (OB), com restrição alimentar (RIA) e com restrição alimentar e administração de dose fisiológica de HT (RHT), ao final de todas as etapas do experimento.

Grupos	Dosagens		
	Glicose	Insulina	Insulina/Glicose ($\times 10^{-3}$)
C1	93,6 $\pm$ 8,1 A a	0,56 $\pm$ 0,26 A a	7,7 $\pm$ 4,3 A a
OB1	97,7 $\pm$ 7,5 A a	1,69 $\pm$ 0,73 A b	22,5 $\pm$ 16,2 A a
C2	87,0 $\pm$ 10,6 A a	0,89 $\pm$ 0,59 A a	10,1 $\pm$ 7,0 A a
OB2	93,3 $\pm$ 7,5 A a	1,65 $\pm$ 0,80 A a	17,6 $\pm$ 8,5 A a
RIA2	92,0 $\pm$ 6,7 A a	0,76 $\pm$ 0,28 A a	8,2 $\pm$ 3,0 A a
C3	96,4 $\pm$ 6,7 A a	1,13 $\pm$ 0,35 A a	13,7 $\pm$ 6,4 A a
OB3	85,4 $\pm$ 6,6 A a	3,07 $\pm$ 0,55 B b	36,4 $\pm$ 8,4 B b
RIA3	98,0 $\pm$ 9,5 A a	1,00 $\pm$ 0,45 A a	10,0 $\pm$ 3,7 A a
RHT3	100,4 $\pm$ 5,0 a	0,83 $\pm$ 0,30 a	7,8 $\pm$ 3,8 a

Foi utilizada ANOVA para o modelo de dois fatores (momentos e grupos) complementada com o teste de Bonferroni. Dados expressos em média $\pm$ desvio-padrão. C1: controle etapa 1; OB1: obeso etapa 1; C2: controle etapa 2; OB2: obeso etapa 2; RIA2: restrito etapa 2; C3: controle etapa 3; OB3: obeso etapa 3; RIA3: restrito etapa 3; RHT3: restrito com administração de HT etapa 3. Etapa 1: 105 dias de experimento; etapa 2: 133 dias de experimento; etapa 3: 161 dias de experimento. Letras maiúsculas – comparações realizadas dentro do mesmo grupo para etapas diferentes. Letras minúsculas – comparações realizadas dentro da mesma etapa. Letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$.

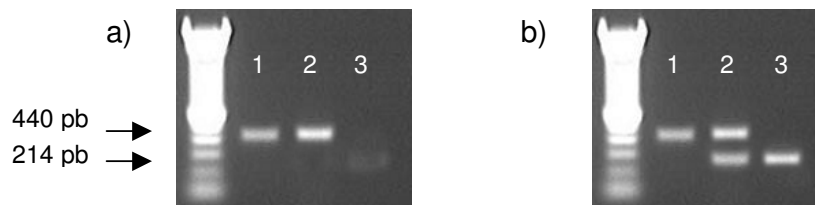


Figura 12. Visualização em gel de agarose 1%, padronização do “multiplex” para TRA (ciclofilina – 440 pb e TRA – 214 pb). a) expressão do TR α em tecido adiposo, 1: simplex – ciclofilina; 2: duplex – ciclofilina e TR α ; 3: simplex – TR α . b) expressão do TR α em ventrículo esquerdo, 1: simplex – ciclofilina; 2: duplex – ciclofilina e TR α ; 3: simplex – TR α .

A Tabela 19 mostra a expressão de leptina e receptor β de HT (TR β). A expressão de leptina para o grupo OB aumentou ao longo do experimento em 62% na etapa 1, em 63% na etapa 2 e em 69% na etapa 3, comparado com os controles da mesma idade. O grupo RIA teve uma diminuição de 46% na etapa 2 e de 57% na etapa 3, comparados ao C da mesma etapa, enquanto o RHT apresentou uma diminuição de aproximadamente 17%, quando comparado com o grupo C e aumento de 41% em relação ao RIA 3 (Figura 13). A expressão de TR β não apresentou diferença entre os grupos nas etapas 1 e 2. Apenas o grupo RIA 3 apresentou aumento significativo, tanto em relação ao RIA 2 ($1,780 \pm 0,491$ vs $0,717 \pm 0,066$; $p < 0,05$) quanto em relação aos grupos C 3, OB 3 e RHT 3 ($1,780 \pm 0,491$ vs $1,00 \pm 0,146$ e $1,187 \pm 0,445$ e $1,177 \pm 0,370$; $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 14).

A Tabela 20 apresenta a medida de associação da expressão gênica de leptina e receptor β de hormônio tireoidiano. A Figura 15 mostra a relação entre leptina e TR β para cada grupo. Não foi possível mostrar inter-relação significativa entre a leptina e o TR β .

Tabela 19. Expressão gênica para o gene da leptina e para o gene de receptor β de HT (TR β) para animais controle (C), obeso (OB), com restrição alimentar (RIA) e com restrição alimentar e administração de dose fisiológica de HT (RHT), em todas as etapas do experimento.

Grupo	Expressão Gênica	
	Leptina	TR β
C1	1,00 $\pm$ 0,183 <i>a</i>	1,00 $\pm$ 0,182 <i>A a</i>
OB1	1,62 $\pm$ 0,567 <i>b</i>	0,84 $\pm$ 0,242 <i>A a</i>
C2	1,00 $\pm$ 0,183 <i>a</i>	1,00 $\pm$ 0,122 <i>A a</i>
OB2	1,63 $\pm$ 0,196 <i>b</i>	0,79 $\pm$ 0,242 <i>A a</i>
RIA2	0,54 $\pm$ 0,157 <i>c</i>	0,72 $\pm$ 0,066 <i>A a</i>
C3	1,00 $\pm$ 0,119 <i>a</i>	1,00 $\pm$ 0,146 <i>A a</i>
OB3	1,69 $\pm$ 0,329 <i>b</i>	1,19 $\pm$ 0,445 <i>A a</i>
RIA3	0,43 $\pm$ 0,197 <i>c</i>	1,78 $\pm$ 0,491 <i>B b</i>
RHT3	0,83 $\pm$ 0,217 <i>d</i>	1,18 $\pm$ 0,370 <i>a</i>

Foi utilizada a técnica de análise de variância (ANOVA), para o esquema de dois fatores (momentos e grupos) complementada com o teste de Bonferroni. Dados expressos em média $\pm$ desvio-padrão. C1: controle etapa 1; OB1: obeso etapa 1; C2: controle etapa 2; OB2: obeso etapa 2; RIA2: restrito etapa 2; C3: controle etapa 3; OB3: obeso etapa 3; RIA3: restrito etapa 3; RHT3: restrito com administração de HT etapa 3. Etapa 1: 105 dias de experimento; etapa 2: 133 dias de experimento; etapa 3: 161 dias de experimento. Valores normalizados para o controle = 1,0. Letras maiúsculas – comparações realizadas dentro do mesmo grupo para etapas diferentes. Letras minúsculas – comparações realizadas dentro da mesma etapa. Letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$.

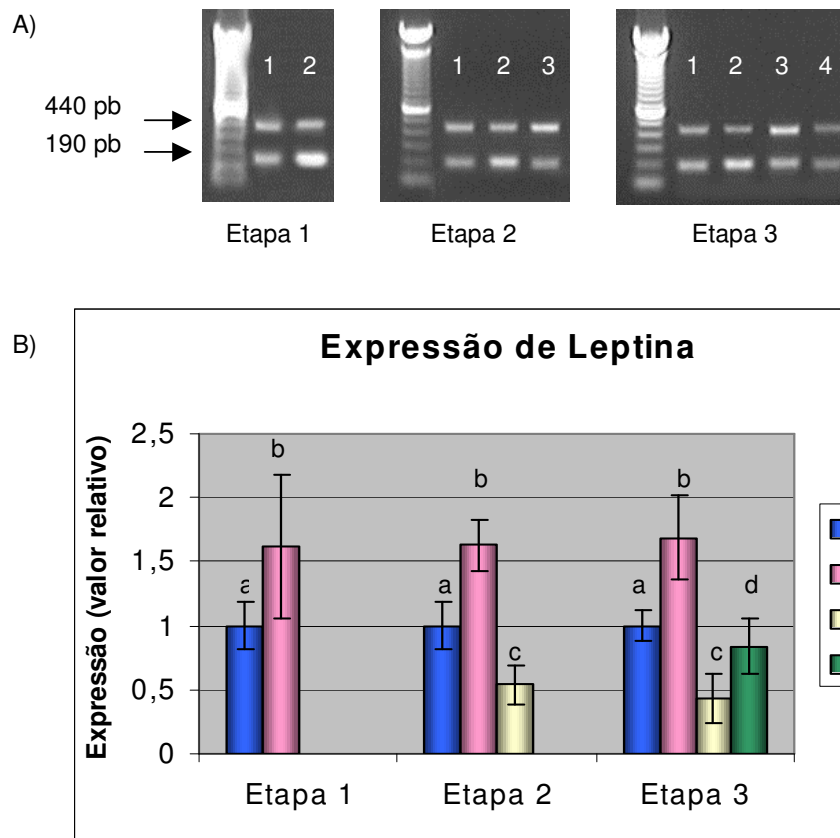
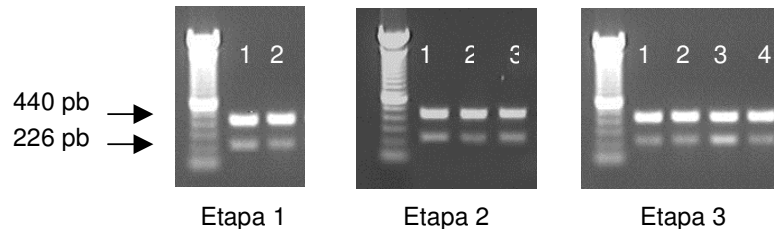


Figura 13. A) Visualização em gel de agarose 1% da expressão gênica de leptina (190 pb) por RT-PCR semiquantitativo em todas as etapas do experimento. 1- Controle; 2- Obeso; 3- RIA; 4- RHT. Como controle interno foi utilizado o gene da ciclofilina (440 pb). As amostras foram normalizadas pelo controle interno. B) Gráfico da expressão de leptina para os grupos em todas as etapas do experimento. O controle foi normalizado para 1,00. Etapa 1: 15 semanas de experimento; Etapa 2: 19 semanas de experimento; Etapa 3: 23 semanas de experimento. O grupo controle recebeu dieta padrão, enquanto o OB recebeu ciclos de dietas hipercalóricas. O grupo RIA recebeu dieta hipercalórica até a 15ª semana; após este período, o grupo foi submetido à restrição alimentar. O grupo RHT também recebeu dieta hipercalórica até a 15ª semana, foi então submetido à restrição alimentar e a partir da 19ª semana recebeu dose de 5µg/100g de peso de HT além da restrição alimentar. Letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$. As comparações mostradas são dentro de cada etapa.

A)



B)

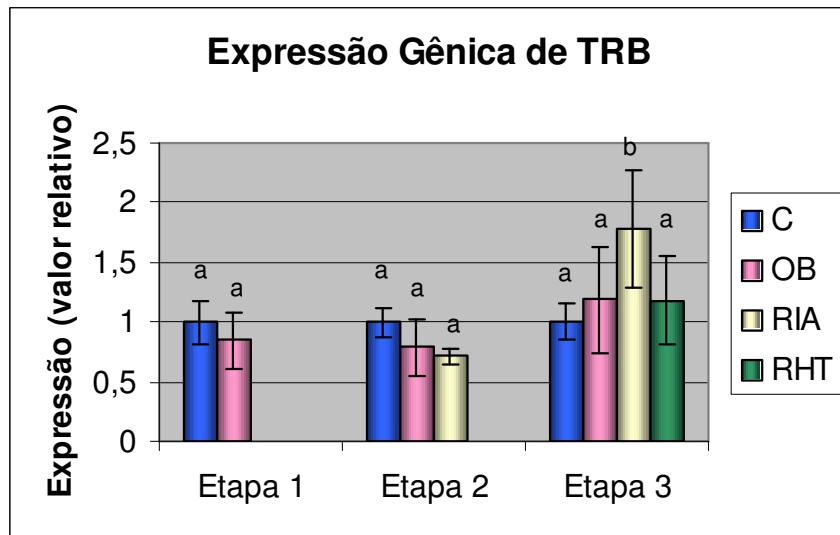


Figura 14. A) Visualização em gel de agarose 1% da expressão gênica de receptor β de HT (TR β) (226 pb) por RT-PCR semiquantitativo em todas as etapas do experimento. 1- Controle; 2- Obeso; 3- RIA; 4- RHT. Como controle interno foi utilizado o gene da ciclofilina (440 pb). As amostras foram normalizadas pelo controle interno. B) Gráfico da expressão gênica de TR β para os grupos em todas as etapas do experimento. O controle foi normalizado para 1,00. Etapa 1: 15 semanas de experimento; Etapa 2: 19 semanas de experimento; Etapa 3: 23 semanas de experimento. O grupo controle recebeu dieta padrão, enquanto o OB recebeu ciclos de dietas hipercalóricas. O grupo RIA recebeu dieta hipercalórica até a 15ª semana; após este período, o grupo foi submetido à restrição alimentar. O grupo RHT também recebeu dieta hipercalórica até a 15ª semana, foi então submetido à restrição alimentar e a partir da 19ª semana recebeu dose de 5 μ g/100g de peso de HT além da restrição alimentar. Letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$. As comparações mostradas são dentro de cada etapa.

Tabela 20. Medida de associação linear para expressão gênica de leptina e receptor β de HT (TR β) para animais controle (C), obeso (OB), com restrição alimentar (RIA) e com restrição alimentar e administração de dose fisiológica de HT (RHT)

Associação	Coeficiente Correlação	Resultado
Leptina x TR β	-0,184	p>0,05

Para análise da relação dos hormônios foi utilizado o coeficiente de correlação linear de Pearson. TR β : receptor β de hormônio tireoideano. Nível de significância, p<0,05.

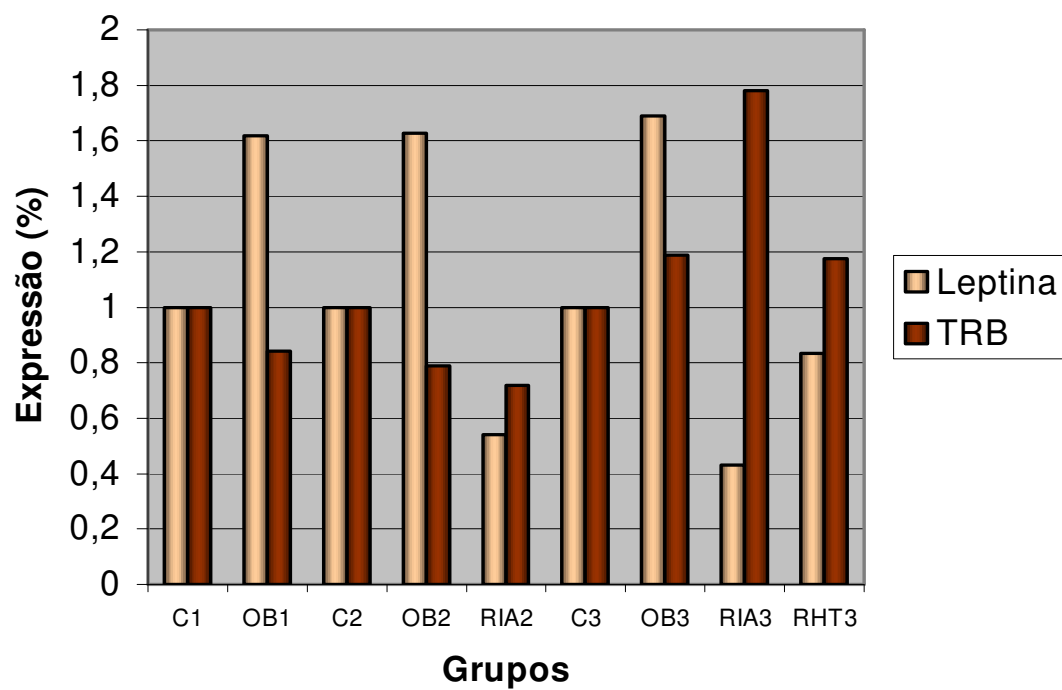


Figura 15. Relação entre leptina e receptor β de HT (TRB) para cada grupo em todas as etapas do experimento. C1: controle etapa 1; OB1: obeso etapa 1; C2: controle etapa 2; OB2: obeso etapa 2; RIA2: restrito etapa 2; C3: controle etapa 3; OB3: obeso etapa 3; RIA3: restrito etapa 3; RHT3: restrito com administração de HT etapa 3.

6- DISCUSSÃO

Obesidade é uma condição que tem alcançado níveis epidêmicos nos últimos anos. Mokdad *et al.*, 1999, reportaram que a proporção de adultos nos Estados Unidos com IMC ≥ 30 kg/m² aumentou em aproximadamente 50% de 1991 a 1998. Ogden *et al.*, 2006, estimaram que a proporção de adultos nos Estados Unidos com IMC entre 30 – 34,9 kg/m² cresceu por volta de 30% entre 1999 e 2004. O aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade entre adultos e crianças tem sido observado em muitos países do mundo. Entretanto, nenhum aumento significativo foi observado entre as mulheres no período de 1999 a 2004.

A obesidade é uma doença complexa, onde o estilo de vida interage com a susceptibilidade genética para produzir o fenótipo obeso. Desde que a genética, em humanos ou animais, não se alterou nos últimos 40 anos, o aumento substancial dos índices de obesidade parece ser devido ao estilo de vida da população, especificamente com o uso de dietas inapropriadas e falta de atividade física. O estilo de vida é marcadamente reconhecido por desempenhar papel central na etiologia de doenças crônicas (Booth, 2000). Além disso, a obesidade está associada com várias doenças crônicas, incluindo doença arterial coronariana, hipertensão, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e algumas formas de câncer (Must *et al.*, 1999).

A restrição calórica reduz a incidência de alguns cânceres relacionados com a idade, doenças cardiovasculares e deficiências em funções imunes em animais. Além do mais, a restrição alimentar é a única intervenção que mostrou retardar o envelhecimento e manter a vitalidade (Spindler, 2005). Os efeitos da restrição calórica têm sido propostos por atingir múltiplos mecanismos. Os mecanismos propostos incluem: a) diminuição do estresse oxidativo; b) diminuição da glicoxidação; c) diminuição da temperatura corporal e circulação de hormônios tireoidianos associada com estado hipometabólico; d) alteração da expressão de genes e proteínas de degradação; e) mudanças neuroendócrinas (Stelmanska *et al.*, 2004). Uma redução moderada da ingestão alimentar apresenta importante benefícios sobre a homeostase da glicose. A restrição alimentar é uma medida comum para o tratamento da resistência à insulina, obesidade e DM2. Foi demonstrado que uma restrição da ingestão alimentar de 30 – 50% em ratos apresentou importante benefício na expectativa de vida e prevenção de doenças associadas com idade. Isto parece estar relacionado com os efeitos da restrição alimentar sobre os níveis de glicose e insulina plasmática (Alonso *et al.*, 2005).

Neste estudo foi possível comparar as respostas dos animais que ingeriram as dietas hipercalóricas ao longo do experimento, assim como foi possível comparar os animais OB com os C, RIA e RHT que se encontravam na mesma etapa. Nas dietas hipercalóricas, ricas em gordura, a composição de macronutrientes e as propriedades sensoriais das dietas foram diferentes.

Nós demonstramos que as dietas hipercalóricas oferecidas aos animais OB induziu acentuado ganho de peso e adiposidade, quando comparados ao grupo C, RIA e RHT, mesmo os dois últimos grupos tendo recebido dieta hipercalórica no início do estudo. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por outros autores (Harris, 1994; Ainslie *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2002). Tem sido mostrado que manipulações dietéticas, hormônios e citocinas induzem respostas metabólicas distintas em diferentes depósitos de gordura (Pond, 1999). Dietas ricas em gordura reduzem a atividade de enzimas lipogênicas e a taxa de lipogênese nos depósitos de gordura retroperitoneal e inguinal (Gaíva *et al.*, 2001), mas aumentam a atividade da lipoproteína lipase na gordura visceral (Roberts *et al.*, 2002).

Apesar de alguns estudos mostrarem que dietas ricas em gordura provocam hiperfagia (Harris, 1994; Elliott *et al.*, 2004), os animais do grupo OB, que receberam dieta hipercalórica, consumiram menor quantidade de dieta, porém com ingestão calórica similar (etapas 1 e 2) ou maior (etapa 3) que os animais C. Esses dados são concordantes com outros encontrados na literatura (Gaíva *et al.*, 2001), que mostraram que dietas ricas em gordura aumenta a secreção de colecistoquinina, hormônio envolvido na processo de saciedade (French *et al.*, 1995; Horn *et al.*, 1996). Estes dados indicam que a eficiência alimentar no grupo OB foi maior quando comparado com os grupos que receberam dieta padrão.

Alguns trabalhos têm mostrado que dietas ricas em gordura, sem colesterol, não altera o perfil lipídico (Fielding *et al.*, 1995; Spady & Dietschy, 1988). No entanto, dietas com alto índice de lipídeos (20%), como as utilizadas neste estudo, levaram a hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, como previamente descrito em outros estudos (Dietschy, 1998).

Nossos resultados mostraram aumento de colesterol total e TG no grupo OB ao longo do experimento. No entanto, a fração HDL colesterol acompanhou o aumento do colesterol total. Isto pode ser devido à composição lipídica da dieta que é rica em ácidos graxos monoinsaturados favorecendo o aumento da HDL. Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos por Estadella *et al.* (2004) e Cintra

et al. (2006), que relataram que o grupo alimentado com dieta rica em lipídeo apresentou níveis de HDL maior que o grupo normal.

Os ácidos graxos monoinsaturados são oriundos de fontes vegetais (óleo de oliva, canola, açafrão e amendoim). Os principais efeitos dos monoinsaturados são: reduzir o colesterol total e LDL-colesterol; inibir a agregação plaquetária; possuir ação antitrombótica (Waitzberg, 2000).

Alteração em uma das inter-relações das lipoproteínas pode levar a hiperlipidemias e/ou hipercolesterolemias. Podem-se verificar essas situações quando ocorrem erros no metabolismo de lipoproteínas (na sua formação, transporte ou degradação), receptores ou enzimas. Podem também ocorrer alterações transitórias no metabolismo das lipoproteínas, por ingestão calórica aumentada e inadequada na proporção de ácidos graxos (AG) ou secundárias a outros fatores como diabetes, hipertensão arterial sistêmica, obesidade e estresse (Waitzberg, 2000).

O teste oral de tolerância à glicose não mostrou alteração da glicemia de jejum em todos os grupos, porém provocou aumento significativo nos níveis de glicemia nos momentos finais do teste (180' e 240') para o grupo OB, sendo que apenas na etapa 2 esse aumento não foi significativo no momento 240'. Nossos dados estão de acordo com outros laboratórios que reportaram que a dieta hipercalórica, rica em gordura, aumentou a gordura corporal levando à resistência à insulina seguida por mudanças nos níveis de glicose, sem elevação da glicemia de jejum (Chalkley *et al.*, 2002; Shang *et al.*, 2002). Resistência à insulina é a falta de habilidade dos tecidos periféricos responderem apropriadamente a concentrações normais e aumentadas de insulina circulante (Zhao *et al.*, 2005). Usando o índice insulina plasmática/glicose plasmática, foi sugerida uma resistência à insulina, para o grupo OB, na última etapa do experimento. Estes achados são consistentes com outros estudos da literatura, que demonstram uma associação entre dieta rica em gordura com resistência à insulina (Brown *et al.*, 2002; Van Dam *et al.*, 2002). Os níveis de insulina aumentam, não significativamente, com a progressão da idade no grupo C, como relatado em outros estudos (Gallardo *et al.*, 2005). Os animais OB apresentaram hiperinsulinemia, exceto na etapa 2, em relação aos demais grupos da mesma etapa. Esses dados estão de acordo com outros encontrados na literatura (Barnes *et al.*, 2003; Elliott *et al.*, 2004).

Os animais controle também apresentaram aumento, não significativo, nos níveis de leptina com a progressão da idade. Esses dados concordam com os encontrados por Gallardo *et al.* (2005) que mostraram aumento significativo nos níveis séricos de leptina em animais com alimentação *ad libitum*. Os animais OB apresentaram hiperleptinemia, quando comparados com os outros animais da mesma etapa. Estes resultados são concordantes com dados da literatura (Ainslie *et al.*, 2000; Barnes *et al.*, 2003; Bell-Anderson & Bryson, 2004; Vasselli *et al.*, 2005). A leptina pode influenciar na interação entre genética e fatores ambientais, desde que foi mostrado que dietas ricas em gordura causam aumento nos níveis de leptina, e este efeito pode explicar a variabilidade de composição corporal entre indivíduos que consomem dietas similares. Entretanto, o aumento nos níveis de leptina é mais bem explicado pelo aumento da gordura corporal (Schrauwen & Westerterp, 2000; Wolfe *et al.*, 2004; Johnstone *et al.*, 2005).

Como reportado, anteriormente, em animais com obesidade induzida pela dieta (López *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005), foi encontrado, neste experimento, aumento na expressão gênica de leptina quando comparado com os animais C, RIA e RHT da mesma idade. Houve aumento de 62%, 63% e 69% na expressão de leptina, no tecido adiposo, de animais OB nas etapas 1, 2 e 3, respectivamente. Esse aumento pode indicar uma correlação positiva entre tecido adiposo e expressão de leptina (Frederich *et al.*, 1995).

A dosagem sérica de T_3 total foi similar em todos os grupos nas três etapas do experimento. Alguns autores encontraram T_3 aumentado na obesidade (Krotkiewski, 2002; Reinehr & Andler, 2002), porém não encontramos na literatura o significado desse aumento.

Não foi possível mostrar expressão de $TR\alpha$, no tecido adiposo, pelos dados deste experimento. Por outro lado, Reyne *et al.* (1996) relataram que $TR\alpha$ e $TR\beta$ estão presentes no tecido adiposo marrom e no tecido adiposo branco, em ratos, e seus níveis de expressão não se alteram significativamente durante o desenvolvimento pós-natal, porém são menores na fase adulta.

Para expressão gênica de $TR\beta$, não houve diferença entre o grupo OB e o C, em todas as etapas do experimento. Esses dados não concordam com os encontrados por López *et al.* (2003), onde animais obesos apresentaram aumento da

expressão de TR β . Por outro lado, Redonnet *et al.* (2001) encontraram redução na expressão de TR β no tecido adiposo branco.

As modificações na expressão de receptores nucleares podem ser relacionadas ao desenvolvimento do tecido adiposo. Além disso, a diminuição na expressão de TR pode favorecer a proliferação de adipócitos na primeira fase da adipogênese. As ligações biomoleculares entre dieta e processos celulares são inúmeras e nem todas estão esclarecidas, mas os resultados obtidos em animais alimentados com dieta que induzem o ganho de peso mostraram modificações nos modelos de expressão de reguladores, como TR, nos processos de diferenciação/proliferação. Essas modificações em tais receptores desempenham papel importante no mecanismo adaptativo induzido por dietas ricas em gordura (Redonnet *et al.*, 2001).

Nossos resultados mostraram ganho de peso, aumento de adiposidade, alterações no perfil lipídico e glicêmico, hiperinsulinemia, hiperleptinemia e aumento da expressão gênica de leptina, caracterizando, assim, o padrão de obesidade.

A restrição calórica resultou em perda de peso significativa em relação ao grupo OB. Após 4 semanas de restrição os animais RIA apresentaram peso similar ao grupo C e após 8 semanas apresentaram peso menor, porém não estatisticamente significativa. Nossos dados estão de acordo com vários estudos (Thompson *et al.*, 2005; Daly *et al.*, 2005; Alonso *et al.*, 2005), onde tem sido descrita a perda de peso causada pela restrição alimentar.

O grupo RIA apresentou aumento significativo de colesterol total e HDL, em relação ao grupo C e não se diferenciou do grupo OB e houve uma diminuição significativa nos níveis de TG quando comparado com os grupos C e OB na etapa 2. Na etapa 3 houve aumento de colesterol total em relação ao C e diminuição quando comparado com o grupo OB, diminuição significativa de TG quando comparado com os grupos C e OB e diminuição de HDL em relação ao OB na etapa 3. Esses dados, em parte, são concordantes com os encontrados em outro estudo, onde não houve diferença estatística nos níveis de HDL entre o grupo controle e o submetido a restrição alimentar. Contudo, ao contrário do presente estudo, o autor não mostrou alteração significativa na concentração de TG em animais com restrição alimentar (Ugochukwu *et al.*, 2004).

Clinicamente, a combinação entre hiperlipidemia com obesidade e DM2 têm implicações potenciais para os humanos. É bem aceito que a alta incidência de

hiperlipidemia, obesidade e DM2 no ocidente são causadas pela predisposição genética em conjunto com dietas ricas em colesterol e gordura. Os pacientes são aconselhados a reduzir a ingestão de colesterol e gordura, para reduzir a hiperlipidemia. Em um grande número de pacientes, essas mudanças dietéticas apresentam efeito modesto em diminuir a taxa de lipídeos, em parte por causa do paciente e em parte por causa do aumento concomitante da síntese de colesterol que normalmente acompanha a diminuição do consumo dietético de colesterol (Heek *et al.*, 2001).

Para o teste oral de tolerância à glicose, o grupo RIA apresentou o mesmo comportamento dos animais C, sendo que na etapa 3 apresentou valores menores, mas não diferentes, que o grupo C. Esses resultados são concordantes com outros achados na literatura. Mostrando, assim, que a restrição alimentar reverteu a intolerância à glicose. A obesidade é na maioria das vezes associada com a resistência à insulina e qualquer redução do excesso de peso corporal contribui para a melhora da sensibilidade à insulina (Hauner, 1999; Zhou *et al.*, 1999). O índice insulina/glicose plasmáticas mostrou que a restrição alimentar melhora a sensibilidade à insulina, em relação ao grupo OB. Muitos trabalhos têm demonstrado que quando ocorre perda de peso, os níveis plasmáticos de insulina caem, diminui a resistência à insulina e todos os componentes da síndrome metabólica são melhorados (Colman *et al.*, 1995; Ikeda *et al.*, 1996; Ugochukwu *et al.*, 2004; Elliott *et al.*, 2004).

O grupo RIA apresentou diminuição significativa nos níveis plasmáticos de insulina, em relação ao OB e foi similar ao grupo C, na etapa 3. Esses resultados estão de acordo com alguns dados da literatura (Levin & Dunn-Meynell, 2004; Elliott *et al.*, 2004; Wolfe *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2005). Por outro lado, existem estudos que encontraram aumento nos níveis plasmáticos de insulina em animais submetidos a restrição alimentar (Stelmanska *et al.*, 2004).

Os resultados da restrição calórica por 4 e 8 semanas (etapas 2 e 3) mostraram que houve uma diminuição significativa nos níveis de leptina plasmática, em relação ao grupo OB. Esses dados estão de acordo com outros encontrados na literatura (Levin & Dunn-Meynell, 2004; Elliott *et al.*, 2004; Wolfe *et al.*, 2004; Viguerie *et al.*, 2005). Estudos experimentais sugerem que a sensibilidade a leptina pode estar sob controle hormonal e nutricional (Bennet *et al.*, 1998). Se esses resultados podem ser generalizados para humanos é apenas uma especulação,

mas, se puder, a saúde clínica e pública terá implicações profundas (Vasselli *et al.*, 2005).

Näslund *et al.* (2000) relataram aumento significativo de leptina plasmática em pacientes que ganharam peso comparado com os que perderam peso. Demonstraram que pacientes com alta concentração de leptina por unidade de IMC não pode sustentar a perda de peso durante os programas de restrição alimentar. Não está claro porque a concentração plasmática de leptina inicial pode predizer o sucesso de programas que visam a perda de peso. Torgerson *et al.* (1999) sugerem que uma redução nos níveis de leptina em resposta a restrição calórica não parece regular a resposta hormonal à inanição em obesos, mas de certo modo manter a perda de peso.

Foram investigadas mudanças no nível de expressão gênica de leptina em animais que foram submetidos a dietas hipercalóricas e posteriormente receberam restrição alimentar de 25%. Para estes animais houve diminuição significativa da expressão de leptina em relação aos demais grupos. Esses dados estão de acordo com outros da literatura (Frederich *et al.*, 1995; Gallardo *et al.*, 2005). A restrição calórica é a estratégia mais relevante para determinar a regulação da expressão de leptina. Está claro que animais submetidos a jejum de 24 horas apresentam diminuição substancial nos níveis circulantes de leptina, acompanhada por redução significativa da expressão de mRNA de leptina no tecido adiposo. (Frederich *et al.*, 1995).

A restrição calórica resultou em diminuição não significativa nos níveis de T_3 total. Esses dados estão de acordo com outros resultados da literatura (Torgerson *et al.*, 1999; Reinehr & Andler, 2002; Degoutte *et al.*, 2006). Em estudo realizado por Cao *et al.* (2001) a restrição alimentar diminuiu a expressão de deiodinase iodotironina tipo I (Diol). A *down-regulation* desta enzima pode ser responsável pelos baixos níveis de T_3 circulante encontrado em roedores submetidos à restrição calórica.

Para expressão gênica de $TR\beta$, o grupo RIA apresentou diminuição não significativa em relação ao grupo C na etapa 2 e aumento significativo em relação aos demais grupos na etapa 3. Não foram encontrados na literatura estudos sobre a expressão de $TR\beta$ em animais submetidos à restrição alimentar.

A restrição alimentar, em animais obesos, diminuiu o peso e a adiposidade, melhorou o perfil lipídico e glicêmico, promoveu restauração dos níveis de insulina e

leptina, diminuiu a expressão de leptina e aumentou a de TR β , na etapa 3. A restrição calórica de 25% conseguiu alcançar o objetivo de perder 5 – 10% do peso corporal e reverter os efeitos da obesidade.

O grupo RHT apresentou maior perda de peso que o grupo RIA no final do experimento, porém esta diferença não foi significativa, deste modo, ambos os grupos apresentaram o mesmo comportamento. De fato, alguns estudos têm reportado que a administração de T₃ aumenta a perda de peso durante a restrição calórica (Pasquali *et al.*, 1984; Rozen *et al.*, 1986; Krotkiewski, 2002).

O perfil lipídico para o grupo RHT foi similar ao do grupo RIA, diferenciando apenas pelo aumento significativo de HDL apresentado naquele grupo. Durante o GTT, apesar do grupo RHT apresentar o maior nível de glicose basal (diferença não estatística), apresentou o mesmo comportamento dos grupos C e RIA, mostrando que a restrição alimentar reverteu a intolerância à glicose. O aumento, não significativo, da glicemia basal pode ser devido à administração exógena de HT, uma vez que o excesso de hormônio tireoidiano aumenta a glicose plasmática (Dimitriadis & Raptis, 2001). Contudo a influência exata dos hormônios tireoidianos sobre a sensibilidade da insulina e o metabolismo da glicose ainda é controversa (Setia *et al.*, 2007).

Está bem estabelecido que os hormônios tireoidianos afetam a ação da insulina. Tem sido encontrado que o excesso de HT induz a resistência à insulina, enquanto a falta desse hormônio, em humanos, ainda apresenta resultados conflitantes (Dimitriadis & Raptis, 2001). A administração de dose fisiológica de T₃ em conjunto com a restrição alimentar apresentou o menor índice para a resistência à insulina. Os animais RHT apresentaram a menor concentração plasmática de insulina, porém foram similares aos do grupo C e RIA. Não foram encontrados na literatura estudos sobre os níveis plasmáticos de insulina em animais submetidos à restrição alimentar e administração de dose fisiológica de HT.

O grupo RHT apresentou diminuição significativa nos níveis de leptina em relação ao grupo OB, foi similar ao grupo C e ao RIA. A administração de HT influenciou os níveis de leptina nesses animais e isso pode ter implicações importantes, já que a leptina está envolvida na regulação da saciedade, assim, em restrição alimentar é importante uma concentração apropriada de HT. Não foi encontrado na literatura estudos sobre os níveis plasmáticos de leptina em animais submetidos a restrição alimentar e administração de dose fisiológica de HT.

Entretanto, alguns estudos relatam que a associação entre a concentração de leptina e HT não foi observada (Torgerson *et al.*, 1999; Näslund *et al.*, 2000; Reinehr & Andler, 2002), enquanto outros mostram uma correlação negativa (Escobar-Morreale *et al.*, 1997; Zabrocka *et al.*, 2006).

Escobar-Morreale *et al.* (1997) sugerem que, em ratos com hipotireoidismo revertido pela administração de doses suprafisiológicas de T_3 , os efeitos inibitórios dos HT sobre a leptina sérica pode ser um fenômeno fisiológico: 1) a relação inversa entre leptina e HT é mantida sobre uma larga escala de níveis de HT, do hipotireoidismo severo ao hipertireoidismo; 2) os efeitos inibitórios dos HT na leptina sérica ocorrem durante sua administração crônica (12 – 13 dias em ratos equivalem a aproximadamente 7 meses em humanos); 3) ambos T_3 e T_4 exercem efeitos inibitórios sobre a concentração plasmática de leptina. Parece plausível que a leptina pode diminuir para evitar o catabolismo excessivo quando há excesso de HT, já que a leptina e HT aumentam a taxa metabólica. Por outro lado, os resultados deste estudo mostraram que a dose fisiológica de hormônio tireoidiano, em animais submetido a restrição alimentar, aumentou a expressão de leptina, enquanto diminuiu a expressão gênica de $TR\beta$. Contudo, ainda existe muita controversa sobre a associação de níveis de leptina e hormônios tireoidianos.

O grupo RHT apresentou expressão de leptina menor que os grupos C e OB e maior que o grupo RIA. Não foram encontrados trabalhos que associem restrição alimentar com administração de dose fisiológica de HT. Pinkney *et al.* (1998) observaram aumento da expressão de leptina em animais com hipotireoidismo e diminuição da expressão em resposta ao tratamento com T_3 . Em concordância, Zabrocka *et al.* (2006) relataram diminuição da expressão de leptina quando há aumento da concentração sérica de T_3 .

Os níveis séricos de T_3 total foram menores no grupo RHT que no C. Estes dados são diferentes dos encontrados por Zabrocka *et al.* (2006), porém este autor utilizou doses suprafisiológicas de HT que aumentou de maneira dose dependente a concentração sérica de T_3 . A administração exógena de T_3 suprimiu a secreção endógena de TSH e a produção de T_4 pela tireóide (Abel *et al.*, 2003).

O grupo que recebeu dose fisiológica de HT, RHT, diminuiu a expressão de $TR\beta$ na etapa 3 em relação ao grupo RIA, sendo similar ao grupo C. Segundo Hernández & Obregón (1996) os níveis de mRNA de $TR\beta$ são reduzidos durante a

fase de diferenciação, mas o tratamento com T_3 (2nM, 18 h) aumenta a expressão de $TR\beta$. Animais com hipotireoidismo foram suplementados com 10 nM de T_3 por três dias, e foi encontrado redução de 50% na expressão de $TR\alpha$ e aumento na expressão de $TR\beta$.

Neste trabalho não foi possível mostrar associação significativa entre expressão de leptina e de $TR\beta$. Contudo, parece haver uma relação negativa entre a expressão de leptina e a expressão de $TR\beta$. Não foram encontrados na literatura estudos que associam a expressão desses hormônios, porém foram encontrados trabalhos de associação de níveis de leptina e função tireoidiana. Alguns desses estudos mostram aumento nos níveis de leptina em estado de hipertireoidismo (Nakamura *et al.*, 2000), outros apresentam diminuição (Pinkney *et al.*, 1998) e outros não mostram associação (Yoshida *et al.*, 1998). Em estado de hipotireoidismo, alguns estudos encontraram aumento nos níveis de leptina (Pinkney *et al.*, 1998; Kautzky-Willer *et al.*, 1999), outros encontraram uma diminuição desses níveis (Yoshida *et al.*, 1998), e ainda alguns não apresentam associação entre níveis de leptina e função tireoidiana normal (Torgerson *et al.*, 1999; Näslund *et al.*, 2000; Reinehr & Andler, 2002). Ainda há divergências, na literatura, sobre a associação de níveis de leptina e função tireoidiana.

O grupo RHT diminuiu o peso e a adiposidade, melhorou o perfil lipídico e glicêmico, promoveu restauração dos níveis de insulina e leptina, e aumentou a expressão de leptina e diminuiu a de $TR\beta$, em relação ao grupo RIA, mostrando que o hormônio tireoidiano modula a expressão de leptina.

7- CONCLUSÃO

O modelo experimental de obesidade induzida por dieta causou aumento na expressão gênica de leptina e não alterou a expressão de TR β .

A restrição calórica mostrou modular a expressão de leptina e TR β no tecido adiposo, diminuindo e aumentando, respectivamente, suas expressões. A restrição alimentar causa diminuição de leptina plasmática pela *down-regulation* da expressão gênica de leptina.

A dose fisiológica de T₃, no grupo submetido à restrição alimentar, aumentou a expressão de leptina quando comparado ao RIA, não retornando aos valores do grupo C. Foi significativamente menor que o grupo RIA para expressão gênica de TR β e similar aos animais C e OB. A dose fisiológica de T₃ modula a expressão de leptina em animais submetidos à restrição calórica.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel ED, Moura EG, Ahima, RS, Campos-Barros A, Pazos-Moura CC, Boers M, *et al.* Dominant inhibition of thyroid hormone action selectively in the pituitary of thyroid hormone receptor- β null mice abolishes the regulation of thyrotropin by thyroid hormone. *Mol Endocrinol.* 2003; 17:1767 – 76.

Ainslie DA, Proietto J, Fam BC, Thorburn AW. Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71:438 – 42.

Alonso A, Fernández Y, Fernández R, Ordóñez P, Moreno M, Díaz F, *et al.* Effect of food restriction on the insulin signalling pathway in rat skeletal muscle and adipose tissue. *J Nutr Biochem.* 2005; 16:602 – 9.

Barnes MJ, Lapanowski K, Conley A, Rafols JÁ, Jen KLC, Dunbar JC. High fat feeding is associated with increased blood pressure, sympathetic nerve activity and hypothalamic mu opioid receptors. *Brain Res Bull.* 2003; 61:511 – 9.

Bell-Anderson KS, Bryson JM. Leptin as a potencial treatment for obesity. *Treat Endocrinol.* 2004; 3:11 – 8.

Bennett PA, Lindell K, Karlsson C, Robinson ICAF, Carlsson LMS, Carlsson B. Differential expression and regulation of leptin receptor isoforms in the rat brain: effects of fasting and oestrogen. *Neuroendocrinology.* 1998; 67:29 – 36.

Booth FW, Gordon, SE. Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. *J Appl Physiol.* 2000; 88:774 – 87.

Borst SE, Conover CF. High-fat induces increased tissue expression of TNF- α . *Life Sci.* 2005; 77:2156 – 65.

Brent GA. The molecular basis of thyroid hormone action. *N Engl J Med.* 1994; 331:847 – 53.

Brent GA. Tissue-specific actions of thyroid hormone: insights from animals models. *Rev Endocr Metab Disord*. 2000; 1:27 – 34.

Brown JL, Spicer MT, Spicer LJ. Effect of high-fat diet on body composition and hormone responses to glucose tolerance test. *Endocrine*. 2002; 19:327 – 32.

Cao SX, Dhahbi JM, Mote PL, Spindler SR. Genomic profiling of short- and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:10630 – 5.

Chalkley SM, Hettiarachchi M, Chisholm DJ, Kraegen EW. Long-term high-fat feeding leads to severe insulin resistance but not diabetes in Wistar rats. *Am J Physiol*. 2002; 282:1231 – 8.

Cintra DEC, Costa AGV, Peluzio MCG, Matta SLP, Silva MTC, Costa NMB. Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout, or chicken skin. *Nutrition*. 2006; 22:197 – 205.

Colman E, Katzel LI, Rogus E, Coon P, Muller D, Goldberg AP. Weight loss reduces abdominal fat and improves insulin action in middle-aged and older men with impaired glucose tolerance. *Metabolism*. 1995; 44:1502 – 8.

Dahlman I, Linder K, Nordström EA, Andresson I, Lidén J, Verdich C, *et al*. Changes in adipose tissue gene expression with energy-restricted diets in obese women. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81:1275 - 85.

Daly ME, Paisey R, Millward BA, Eccles C, Williams K, Hammersley S, *et al*. Short-term effects of severe dietary carbohydrate-restriction advice in type 2 diabetes – a randomized controlled trial. *Diabetic Med*. 2005; 23:15 – 20.

Degoutte F, Jouanel P, Bègue RJ, Colombier M, Lac G, Pequignot JM, *et al*. Food restriction, performance, biochemical, psychological, and endocrine changes in judo athletes. *Int J Sports Med*. 2006; 27:9 – 18.

Dietschy JM. Dietary fatty acids and the regulation of plasma low density lipoprotein cholesterol concentrations. *J Nutr.* 1998; 128:444S – 8S.

Dimitriadis GD, Raptis SA. Thyroid hormone excess and glucose intolerance. *Exp Clin Endocrinol Diab.* 2001; 109:S225 – 39.

Diniz YS, Faine LA, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GX, Burneiko RC, *et al.* Monosodium glutamate in standard and high fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. *Nutrition.* 2005; 21:749 – 55.

Douglas CRR. *Tratado de Fisiologia aplicada à Nutrição.* São Paulo: Robe Editorial; 2002.

Dunn CL, Hannan PJ, Jeffery RW, Sherwood NE, Pronk NP, Boyle, R. The comparative and cumulative effects of a dietary restriction and exercise on weight loss. *Int J Obes.* 2006; 30:112 – 21.

Elliott JC, Harrold JA, Brodin P, Enquist K, Bäckman A, Byström M. *et al.* Increases in melanin-concentrating hormone and MCH receptor levels in the hypothalamus of dietary-obese rats. *Mol Brain Res.* 2004; 128:150 – 9.

Escobar-Morreale HF, Rey FE, Escobar GM. Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat. *Endocrinology.* 1997; 138:4485 – 8.

Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Nascimento CMO. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition.* 2004; 20:218 – 24.

Fernández-Galaz C, Fernández-Agulló T, Pérez C, Peralta S, Arribas C, Andrés A, *et al.* Long-term food restriction prevents ageing-associated central leptin resistance in wistar rats. *Diabetologia.* 2002; 45:997 – 1003.

Fielding CJ, Havel RJ, Todd KM, Yeo KE, Schioetter MC, Weinberg V, *et al.* Effects of dietary cholesterol and fat saturation on plasma lipoproteins in an ethnically diverse population of health young men. *J Clin Invest.* 1995; 95:611 – 8.

Finer N. Low-calorie diets and sustained weight loss. *Obes Res.* 2001; 9:290 - 4.

Flier JS, Harris M, Hollenberg AN. Leptin, nutrition, and the thyroid: the why, the wherefore, and the wiring (commentary). *J Clin Invest.* 2000; 105:859 – 61.

Frederich RC, Löllmann B, Hamann A, Napolitano-Rosen A, Kahn BB, Lowell BB, *et al.* Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents – impact of nutrition and obesity. *J Clin Invest.* 1995; 96:1658 – 63.

French SJ, Murray B, Rumsey RDE, Fadzlin R, Read NW. Adaptation to high-fat diets: effects on eating behaviour and plasma colecystokinin. *Br J Nutr.* 1995; 73:179 – 89.

Friedwald W, Levy R, Fredrickson D. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18:499 – 502.

Gaíva MHG, Couto RC, Oyama LM, Couto GEC, Silveira VLF, Ribeiro EB, *et al.* Polyunsaturated fatty acid-rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. *Br J Nutr.* 2001; 86:371 – 7.

Gallardo N, Arribas C, Villar M, Ros M, Carrascosa JM, Martinez C, *et al.* ObRa and ObRe are differentially expressed in adipose tissue in aged food-restricted rats: effects on circulating soluble leptin receptor levels. *Endocrinology.* 2005; 146:4934 – 42.

Giacobino JP. Uncoupling proteins, leptin and obesity: an update review. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 967:398 – 402.

Harris ARC, Fang SL, Vagenakis AG, Braverman LE. Effect of starvation, nutrient replacement, and hypothyroidism on “in vitro” hepatic T₄ to T₃ conversion in the rat. *Metabolism*. 1978; 27:1680 – 90.

Harris RBS. Factors influencing energy intake of rats fed either a high-fat or a fat mimetic diet. *Int J Obes*. 1994; 18:632 – 40.

Hauner H. The impact of pharmacotherapy on weight management in type 2 diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999; 23:S12 – 7.

Heek MV, Austin TM, Farley C, Cook JA, Tetzloff GG, Davis HR. Ezetimibe, a potent cholesterol absorption inhibitor, normalizes combined dyslipidemia in obese hyperinsulinemic hamsters. *Diabetes*. 2001; 50:1330 – 5.

Hernández A, Obregón MJ. Presence and mRNA expression of T₃ receptors in differentiating rat brown adipocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 1996; 121:37 – 46.

Horn C, Tordoff MG, Friedman MI. Does ingested fat produce satiety? *Am J Physiol*. 1996; 39:R761 – 5.

Ikeda T, Gomi T, Hirawa N, Sakurai J, Yoshikawa N. Improvement of insulin sensitivity contributes to blood pressure reduction after weight loss in hypertensive subjects with obesity. *Hypertension*. 1996; 27:1180 – 6.

Isozaki O, Tsushima T, Nozoe Y, Miyakawa M, Takano K. Leptin regulation of the thyroids: negative regulation on thyroid hormone levels in euthyroid subjects and inhibitory effects on iodide uptake and Na⁺/I⁻ Symporter mRNA expression in rat FRTL-5 cells. *Endocrine J*. 2004; 51:415 – 23.

Johnstone AM, Murison SD, Duncan JS, Rance KA, Speskman JR. Factors influencing in basal metabolic rate include fat-free mass, fat mass, age, and circulating thyroxine but not sex, circulating leptin, or triiodothyronine. *Am J Clin Nutr*. 2005; 82:941 – 8.

Kaneshige M, Kaneshige K, Zhu X, Dace A, Garrett L, Carter TA, *et al.* Mice with a targeted mutation in the thyroid hormone beta receptor gene exhibit impaired growth and resistance to thyroid hormone. *Proc Natl Acad Scie USA.* 2000; 97:13209 – 14.

Kautzky-Willer A, Ludwig C, Nowotony P, Roden A, Huemer C, Widhalm K, *et al.* Elevation of plasma leptin concentrations in obese hyperinsulinaemic hypothyroidism before and after treatment. *Eur J Clin Invest.* 1999; 29:395 – 403.

Kim MS, Small CJ, Stanley AS, Morgan DGA, Seal LJ, Kong W. *et al.* The central melanocortin system affects the hypothalamopituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *J Clin Invest.* 2000; 105:1005 – 11.

Kim SO, Yun S, Jung B, Lee EH, Halm D, Shim I, *et al.* Hipolipidemic effects of crude extract of adlay seed (*Coix lachrymajobi var. mayuen*) in obesity rat feed high fat diet: Relations of TNF- α and leptin mRNA expressions and serum lipid levels. *Life Sci.* 2004; 75:1391 – 1404.

Kinugawa K, Yonekura K, Ribeiro RCJ, Eto Y, Aoyagi T, Baxter JD, *et al.* Regulation of thyroid hormone receptor isoforms in physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 2001; 89:591 – 8.

Komorowski J, Jankiewicz-Wika J, Stepién H. Effects of Gn-RH, TRH, and CRF administration on plasma leptin levels in lean and obese women. *Neuropeptides.* 2000; 34:89 – 97.

Krotkiewski M. Thyroid hormones and treatment of obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000; 24:116 – 9.

Krotkiewski M. Thyroid hormones in the pathogenesis and treatment of obesity. *Eur J Pharmacol.* 2002; 440:85 – 98.

Levin BE, Dunn-Meynell AA. Chronic exercise lowers the defended body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats. *Am J Physiol.* 2004; 286:R771 – 8.

Li H, Matheny M, Nicolson M, Tumer N, Scarpace PJ. Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats. *Diabetes*. 1997; 46:2035 – 9.

Lissner L, Heitmann B. Dietary fat and obesity: evidence from epidemiology. *Eur J Clin Nutr*. 1995; 49:79 – 90.

Lonnqvist F, Nordfors L, Schalling M. Leptin and its potential role in human obesity. *J Int Med*. 1999; 245:643 – 52.

López IP, Marti A, Milagro FI, Zulet MA, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA, *et al*. DNA microarray analysis of genes differentially expressed in diet-induced (cafeteria) obese rats. *Obes Res*. 2003; 11:188 – 94.

Mancini MC, Halpern A. Tratamento farmacológico da obesidade. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002, 46:497 - 513.

Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med*. 1999; 130:671 – 80.

Meier U, Gressner AM. Endocrine Regulation of Energy Metabolism: Review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem*. 2004; 50:1511 – 25.

Mokdad AH, Serdula MK, Dietz WH, Bowman BA, Marks JS, Koplan JP. The spread of the obesity epidemic in the United States, 1991-1998. *JAMA*. 1999; 282:1519 – 22.

Must AV, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH. The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA*. 1999; 282:1523 – 9.

Nakamura T, Nagasaka S, Ishikawa S, Hayashi H, Saito T, Kusaka I, *et al*. Association of hyperthyroidism with serum leptin levels. *Metabolism*. 2000; 49:1285 – 8.

Nascimento AF, Sugizak MM, Leopoldo AS, Lima APA, Aragon FF, Bruno A, *et al.* Misclassification associated with error probability in diet-induced obesity. J Nutr (submetido à publicação).

Näslund E, Andersson I, Degerblad M, Kogner P, Kral JG, Rössner S, *et al.* Associations of leptin, insulin resistance and thyroid function with long-term weight loss in dieting obese men. J Intern Med. 2000; 248:299 – 308.

Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. JAMA. 2006; 295:1549 – 55.

Pasquali R, Baraldi G, Biso P, Piazzzi S, Patrono D, Capelli M, *et al.* Effect of physiological doses of triiodothyronine replacement on the hormonal and metabolic adaptation to short term semi-starvation and to low caloric diet in obese patients. Clin Endocrinol. 1984; 21:357 – 67.

Pasulka PS, Kohl D. Nutrition support of the stressed obese patient. Nutr Clin Pract. 1999; 4:130 – 2.

Pinkney JH, Goodrick SJ, Katz J, Johnson AB, Lightman SL, Cop Ack SW, *et al.* Leptin and the pituitary – thyroid axis: a comparative study in lean, obese, hypothyroid and hyperthyroid subjects. Clin Endocrinol. 1998; 49:583 – 8.

Pond CM. Physiological specialization of adipose tissue. Prog Lip Res. 1999; 38:225 – 48.

Redonnet A, Groubet R, Noël-Suberville C, Bonilla S, Martinez A, Higuieret P. Exposure to an obesity-inducing diet early affects the pattern of expression of peroxisome proliferator, retinoic acid, and triiodothyronine nuclear receptors in the rat. Metabolism. 2001; 50:1161 – 7.

Reinehr T, Andler W. Thyroid hormones before and after weight loss in obesity. Arch Dis Child. 2002; 87:320 – 6.

Reyney Y, Nougues J, Cambon B, Viguerie-Bascands N, Casteilla L. Expression of c-erbA α , c-erbA β and Rev.-erbA α m RNA during the conversion of brown adipose tissue into white adipose tissue. Mol Cell Endocrinol. 1996; 116:59 – 65.

Roberts CK, Barnard RJ, Liang KH, Varizi ND. Effect of diet on adipose tissue and skeletal muscle VLDL receptor and LPL: implications for obesity and hyperlipidemia. Atherosclerosis. 2002; 161:133 – 41.

Rozen R, Abraham G, Falcou R, Apfelbaum M. Effects of a physiological doses of triiodothyronine on obese subjects during protein-sparing diet. Int J Obes. 1986; 10:303 – 12.

Santos MS, Lichtenstein AH, Leka LS, Goldin B, Schaefer EJ, Meydani SN. Immunological effects of low-fat diets with and without weight loss. J Am Coll Nutr. 2003; 22:174 - 82.

Savage DB, Sewter CP, Klent ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV. Resistin/fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor- γ action in humans. Diabetes. 2001; 50:199 – 202.

Schrauwen P, Westerterp KR. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. Br J Nutr. 2000; 84:417 – 27.

Sclafani A, Springer D. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. Physiol Behav. 1976; 17:461 – 71.

Setia S, Sridhar MG, Koner BC, Bobby Z, Bhat V, Chaturvedula L. Increased insulin sensitivity in intrauterine growth retarded newborns – Do thyroid hormones play a role? Clin Chim Acta. 2007;376(1-2):37-40. Epub 2006 jul 14.

Shang W, Yasuda K, Takahashi A, Hamasaki A, Takehiro M, Nabe K, *et al.* Effect of high dietary fat on insulin secretion in genetically diabetic Goto-Kakizaki rats. *Pancreas*. 2002; 25:393 – 9.

Spady DK, Dietschy JM. Interaction of dietary cholesterol and triglycerides in the regulation of hepatic low density lipoprotein transport in the hamster. *J Clin Invest*. 1988; 81:300 – 9.

Spindler SR. Rapid and reversible induction of the longevity, anticancer and genomic effects of caloric restriction. *Mech Ageing Dev*. 2005; 126:960 – 6.

Stelmanska E, Korczynska J, Swierczynski J. Tissue-specific effect of refeeding after short and long-term caloric restriction on malic enzyme gene expression in rats tissues. *Acta Biochim Pol*. 2004; 51:805 – 14.

Strychar I. Diet in the management of weight loss. *Can Med Assoc J*. 2006; 174:56 – 63.

The National Academy of Sciences [monograph on the internet]. Nutrient requirements of the laboratory rat. In: Nutrient requirements of laboratory animals. 4 ed. Washington: The National Academy of Sciences; 1995[cited 2004 aug 31]. Available from: [http:// www.nap.edu](http://www.nap.edu).

Thompson WG, Holdman NR, Janzow DJ, Slezak JM, Morris KL, Zemel MB. Effect of energy-reduced diets high in dairy products and fiber on weight loss in obese adults. *Obes Res*. 2005; 13:1344 – 53.

Torgerson JS, Carlsson B, Stenlöf K, Carlsson LMS, Bringman E, Sjöström L. A low serum leptin level at baseline and a large early decline in leptin predict a large 1-year weight reduction in energy-restricted obese humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84:4197 – 203.

Trost SU, Swanson E, Gloss B, Wang-Iverson DB, Zhang H, Volodarsky T, *et al.* The thyroid hormone receptor- β -selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. *Endocrinology*. 2000; 141:3057 – 64.

Ugochukwu NH, Bagayoko ND, Antwi ME. The effects of dietary caloric restriction on antioxidant status and lipid peroxidation in mild and severe streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinica Chim Acta*. 2004; 348:121 – 9.

Van Dam RM, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ, Hu FB. Dietary fat and meat intake in relation to risk of type 2 diabetes in men. *Diabetes Care*. 2002; 25:417 – 24.

Vasselli JR, Weindruch R, Heymsfield SB, Pi-Sunyer FX, Boozer CN, Yi N, *et al.* Intentional weight loss reduces mortality rate in a rodent model of dietary obesity. *Obes Res*. 2005; 13:693 - 702.

Vendrell J, Montserrat B, Vilarrasa N, Molina A, Gomez JM, Gutierrez C, *et al.* Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes Res*. 2004; 12:962 – 71.

Viguerie N, Vidal H, Arner P, Holst C, Verdich C, Avizou S, *et al.* Adipose tissue gene expression in obese subjects during low-fat and high-fat hypocaloric diets. *Diabetologia*. 2005; 48:123 - 31.

Waitzberg DL. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. 3 ed. São Paulo: Atheneu; 2000. v.2

Wang M, Orci L, Ravazzola M, Unger R. Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: Implications for treatment of human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:18011 – 6.

Weiss EC, Galuska DA, Khan LK, Serdula MK. Weight-Control Practices Among U.S. Adults, 2001 – 2002. *Am J Prevent Med*. 2006; 31:18 – 24.

Wolfe BE, Jimerson DC, Orlova C, Mantozoros CS. Effect of dieting on plasma leptin, soluble leptin receptor, adiponectin and resistin levels in healthy volunteers. Clin Endocrinol. 2004; 61:332 - 8.

Yoshida T, Momotani N, Hayashi M, Monkawa T, Ito K, Saruta T. Serum leptin concentrations in patients with thyroid disorders. Clin Endocrinol. 1998; 48:299 – 302.

Zabrocka L, Klimek J, Swierczynski J. Evidence that triiodothyronine decreases rat serum leptin concentration by down-regulation of leptin gene expression in white adipose tissue. Life Sci. 2006; 79:1114 – 20.

Zar JH. Biostatistical analysis. 4 ed. New Jersey: Prentice-Hall; 1999. 663p.

Zhao R, Li Q, Xiao B. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on the improvement of insulin resistance in NIDDM rats. Yakugaku Zasshi. 2005; 125:981 – 8.

Zhou J, Yan X, Ryan DH, Harris RBS. Sustained effects of repeated restraint stress on muscle and adipocyte metabolism in high-fat-fed rats. Am J Physiol. 1999; 277:757 – 66.

ANEXO 02

Dosagem de Leptina Plasmática – kit ELISA

Acondicionar os reagentes em temperatura ambiente antes do início do procedimento.

1. Diluir o Wash Buffer 10 vezes, diluindo todo o conteúdo do recipiente em 900 ml de água deionizada ou destilada.
2. Lavar cada well 3 vezes com 300 ml de Wash Buffer já diluído, por lavagem. Remover o Wash Buffer por inversão da placa e bater a placa sobre papel toalha várias vezes. **Não permitir que os wells sequem antes do próximo passo.** Se for utilizado lavador automático, seguir as instruções do fabricante para todos os passos de lavagem descritos no protocolo.
3. Adicionar 30 µl de Assay Buffer nos wells do Branco, Padrões, Controle de Qualidade 1 (CQ1) e Controle de Qualidade 2 (CQ2). Adicionar 40 µl de Assay Buffer nos wells das amostras.
4. Se as amostras forem soro ou plasma, adicionar 10 µl de Matrix Solution nos wells de Branco, Padrões, CQ1 e CQ2. Se as amostras forem livres de componentes do soro, adicionar 10 µl de Assay Buffer ao invés de Matrix Solution.
5. Adicionar 10 µl de Assay Buffer no well do Branco e adicionar em duplicata 10 µl dos Padrões de Leptina para Ratos em ordem crescente de concentração nos wells apropriados.
6. Adicionar 10 µl de CQ1 e 10 µl de CQ2 nos wells apropriados.
7. Adicionar sequencialmente 10 µl das amostras em duplicata no restante dos wells.
8. Transferir Antiserum Solution para um suporte e adicionar 50 µl desta solução em cada well com uma pipeta multicanal. Cobrir a placa com o papel adesivo e incubá-la a temperatura ambiente por 2 horas em um shaker de placas em rotação moderada, de 400 a 500 rpm.

9. Remover o adesivo e descartar a solução. Bater a placa invertida para retirar o excesso de solução de cada well.

10. Lavar os wells 3 vezes com Wash Buffer diluído, 300 µl por well por lavagem. Descartar a solução e bater a placa sobre papel toalha para remover toda a solução, após cada lavagem.

11. Adicionar 100 µl de Detection Antibody em cada well. Cobrir a placa com o adesivo e incubá-la com rotação moderada a temperatura ambiente por 1 hora.

12. Remover o adesivo e descartar a solução da placa. Bater a placa invertida para retirar o excesso de solução de cada well.

13. Lavar cada well 3 vezes com Wash Buffer diluído, 300 µl por well por lavagem. Descartar a solução e bater a placa sobre papel toalha para remover toda a solução, após cada lavagem.

14. Adicionar 100 µl de Enzyme Solution em cada well. Cobrir a placa com o adesivo e incubá-la a com rotação moderada a temperatura ambiente por 30 minutos.

15. Remover o adesivo e descartar a solução da placa. Bater a placa invertida para retirar o excesso de solução de cada well.

16. Lavar cada well 6 vezes com Wash Buffer diluído, 300 µl por well por lavagem. Descartar a solução e bater a placa sobre papel toalha para remover toda a solução, após cada lavagem.

17. Adicionar 100 µl de Substrate solution em cada well, cobrir a placa com o adesivo e incubá-la com rotação moderada por aproximadamente 10 a 15 minutos. A coloração azul deverá ser formada nos wells dos padrões de Leptina com intensidade proporcional a concentração de Leptina.

NOTA: Esteja ciente que a coloração pode aparecer mais rapidamente ou demoradamente que o tempo de incubação recomendado dependendo da temperatura do ambiente. Monitorar visualmente a formação da cor para otimizar o tempo de incubação. A formação da cor pode ser monitorada usando um filtro 370 nm, se disponível no espectrofotometro. Quando a absorbância está entre 1.2 e 1.8 370 nm, a Stop Solution pode ser adicionada para terminar a formação da cor.

18. Remover o adesivo e adicionar 100 μ l de Stop Solution **[Cuidado: Solução Corrosiva]** e misturar com a mão. A cor azul deverá se tornar amarela após a acidificação. Ler na asorbência de 450nm e 590nm dentro de 5 minutes e verificar se não existe bolhas de ar em nenhum well. Registre a diferença das unidades de absorbência.

ANEXO 03

Dosagem de Insulina Plasmática – kit ELISA

Acondicionar os reagentes em temperatura ambiente antes do início do procedimento.

1. Diluir o Wash Buffer 10 vezes, diluindo todo o conteúdo do recipiente em 900 ml de água deionizada ou destilada.
2. Lavar cada well 3 vezes com 300 ml de Wash Buffer já diluído, por lavagem. Remover o Wash Buffer por inversão da placa e bater a placa sobre papel toalha várias vezes. **Não permitir que os wells sequem antes do próximo passo.** Se for utilizado lavador automático, seguir as instruções do fabricante para todos os passos de lavagem descritos no protocolo.
3. Adicionar 10 µl de Assay Buffer nos wells do Branco, Padrões, Controle de Qualidade 1 (CQ1) e Controle de Qualidade 2 (CQ2). Adicionar 40 µl de Assay Buffer nos wells das amostras.
4. Se as amostras forem soro ou plasma, adicionar 10 µl de Matrix Solution nos wells de Branco, Padrões, CQ1 e CQ2. Se as amostras forem livres de componentes do soro, adicionar 10 µl de Assay Buffer ao invés de Matrix Solution.
5. Add in duplicate 10 m l Rat Insulin Standards in the order of ascending concentration to the appropriate wells.
6. Adicionar 10 µl de CQ1 e 10 µl de CQ2 nos wells apropriados.
7. Adicionar sequencialmente 10 µl das amostras em duplicata no restante dos wells.
8. Adicionar 80 µl de Detection Antibody em todos os wells. **Para um melhor resultado todas as adições devem ocorrer dentro de 1 hora.** Cobrir a placa com o papel adesivo e incubá-la a temperatura ambiente por 2 horas em um shaker de placas em rotação moderada, de 400 a 500 rpm.
9. Remover o adesivo e descartar a solução. Bater a placa invertida para retirar o excesso de solução de cada well.

10. Lavar os wells 3 vezes com Wash Buffer diluído, 300 ml por well por lavagem. Descartar a solução e bater a placa sobre papel toalha para remover toda a solução, após cada lavagem.

11. Adicionar 100 µl de Enzyme Solution em cada well. Cobrir a placa com o adesivo e incubá-la com rotação moderada a temperatura ambiente por 30 minutos.

12. Remover o adesivo e descartar a solução da placa. Bater a placa invertida para retirar o excesso de solução de cada well.

13. Lavar cada well 6 vezes com Wash Buffer diluído, 300 µl por well por lavagem. Descartar a solução e bater a placa sobre papel toalha para remover toda a solução, após cada lavagem.

14. Adicionar 100 µl de Substrate Solution em cada well, cobrir a placa com o adesivo e incubá-la com rotação moderada por aproximadamente 10 a 15 minutos. A coloração azul deverá ser formada nos wells dos padrões de Insulina com intensidade proporcional a concentração de Insulina.

NOTA: Esteja ciente que a coloração pode aparecer mais rapidamente ou demoradamente que o tempo de incubação recomendado dependendo da temperatura do ambiente. Monitorar visualmente a formação da cor para otimizar o tempo de incubação. A formação da cor pode ser monitorada usando um filtro 370 nm, se disponível no espectofotometro. Quando a absorbância está entre 1.2 e 1.8 a 370 nm, a Stop Solution pode ser adicionada para terminar a formação da cor.

15. Remover o adesivo e adicionar 100 µl de Stop Solution **[Cuidado: Solução Corrosiva]** e misturar com a mão. A cor azul deverá se tornar amarela após a acidificação. Ler na absorbância de 450nm e 590nm dentro de 5 minutos e verificar se não existe bolhas de ar em nenhum well. Registre a diferença das unidades de absorbância.

ANEXO 04

Extração de RNA total

1- Homogeneização

As amostras de tecido adiposo congelados e mantidos em nitrogênio líquido serão pulverizadas sob banho de nitrogênio em um pulverizador Thermovac, da Telcolab Corporation e colocadas em tubos de centrifuga (Corex) contendo 1 mL de TRIZOL Reagente, passando-se o lisado através de uma pipeta.

2- Fase de Separação

As amostras de homogenato serão incubadas durante 5 min a 15 – 30°C para permitir a completa dissociação dos complexos das nucleoproteínas. Adicionar-se-á, então, 0,2 mL de Clorofórmio por 1 mL de Trizol. Os tubos serão fechados adequadamente e será feito uma agitação manual vigorosa por 15 segundos. Serão então incubados a 15 – 30°C durante 2 a 3 minutos. As amostras serão centrifugadas durante 15 minutos a 14000g a 4°C. Após a centrifugação, a mistura estará separada em 3 fases: a mais inferior rosa, a fase intermediária de fenol-clorofórmio e a superior, aquosa. O volume da fase aquoso é constituído por aproximadamente 60% do volume do Trizol usado para o homogenato.

3- Precipitação do RNA

Será transferida a fase aquosa para um novo tubo e adicionado 0,5 mL de álcool isopropílico para cada 1 mL de Trizol. As amostras serão incubadas a 15 – 30°C durante 10 minutos e centrifugadas a 14000g durante 10 minutos a 4°C. Formar-se-á um *pellet* no fundo do tubo, o qual é o precipitado de RNA.

4- Lavagem do RNA

Será removido o sobrenadante. O *pellet* de RNA será lavado com 1mL de etanol 75% por 1 mL de Trizol. As amostras serão agitadas no vortex e centrifugadas durante 5 minutos a 14000g a 4°C.

5- Redissolvendo o RNA

No final do procedimento, retirou-se o sobrenadante por inversão do tubo e secou-se as paredes dos tubos com cotonete autoclavado, sem perturbar o *pellet*. Dissolveu-se o RNA com 15µL de água ultrapura (Gibco™, Cat. nº 10977-015, ou em sua falta, foi utilizada água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato, também chamada água tratada com DEPC), passando-se a solução várias vezes pela ponteira de uma micropipeta. Incubou-se as amostras durante 10 minutos a 55 – 60°C. O RNA foi acondicionado em freezer -80°C.

Concentração do RNA

A concentração de RNA foi determinada por leitura espectrofotométrica a 260 nm. Esta leitura permitiu o cálculo da concentração de ácido nucléico da amostra. Uma unidade de densidade óptica (D.O.) corresponde a aproximadamente 40 µg/ml de RNA de fita simples e a relação entre as leituras a 260 nm (D.O. 260/D.O. 280) permite estimar a pureza do ácido nucléico. Esta relação, para uma preparação pura de RNA, deve ser de 1,8 a 2,0.

ANEXO 05

Gel Analítico de Agarose para RNA

Foi dissolvido por aquecimento 0,30 mg de agarose em 30 ml de tampão TAE 1M pH 7,0. Após esfriar, foi acrescentado 3 µl de brometo de etídio e despejado sobre uma cuba horizontal montada (5,0 cm x 7,7 cm – Life Technologies – Gibco BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus) com um pente de acrílico com dentes de 2 mm de espessura, para a formação dos poços de aplicação. A espessura do gel foi de aproximadamente 1 cm. A preparação permaneceu à temperatura ambiente por 30 minutos.

Durante este intervalo, as amostras foram postas em gelo para descongelar. Para cada amostra foi feito uma mistura de 1 µl de RNA, 1 µl de tampão orange e 8 µl de água mili-Q autoclavada. As amostras foram, então, aplicadas no gel.

A eletroforese foi realizada na corrente constante de 80 mA (Power Pac Basic – Bio-Rad) por aproximadamente 30 minutos.

Terminada a eletroforese o gel foi colocado sobre o Foto UV/WhiteDarkroom (UVP Laboratory Products) que, corado com laranja de acridina, permitiu que o RNA fosse visualizado e fotografado.

ANEXO 06

Transcrição Reversa do RNA

A transcrição reversa (RT) do RNA obtido do tecido adiposo foi realizada utilizando-se os componentes do *Kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Brasil, Cat. nº 11904-018). Uma mistura contendo 1000 ng de RNA total, 1 µL de *dNTP mix* 10 mM, 1µL de Oligo(dT) (0.5 µg/µL) e, com volume total ajustado para 10 µL de H₂O com DEPC (dietil pirocarbonato), foi incubada por 5 minutos a 65 °C e, em seguida, por pelo menos 1 minuto no gelo. Posteriormente, foi adicionado a essa mistura 9 µL de uma solução contendo 2µL de tampão RT 10x, 4 µL de MgCl₂ 25 mM, 2µL de DTT 0.1 M e 1 µL de Inibidor de RNase recombinante *RNaseOUTTM*. Após essa mistura de reagentes ser levemente agitada e incubada a 42°C por 2 minutos, foi adicionado à reação 1 µL da enzima *SuperScriptTM II RT* e a mistura foi novamente incubada por um período de 50 minutos a 42°C. Posteriormente a reação foi colocada no gelo e adicionado 1 µL de RNase H para finalmente incubá-la por 20 minutos a 37°C.

ANEXO 07

PCR Semi-Quantitativo

Para a realização da reação de PCR, alíquotas de 1 µl da reação de RT foram adicionadas a 24 µl de uma mistura contendo 17,8 µL de água autoclavada, 2,5 µL de tampão Taq polimerase 10X, 0,5 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL de Cloreto de Magnésio (25nM); 0,5 µL de primer sense (10 µM), 0,5 µL de primer antisense (10 µM) e 0,2 µL de Taq polimerase por amostra. Essa mistura foi então incubada a 94 °C, por 2 minutos e submetida a ciclos (tabela 10) com temperatura de desnaturação de 94 °C por 1 minuto, temperatura de anelamento (tabela 10) por 45 segundos e temperatura de extensão de 72 °C por 45 segundos. Ao final dos ciclos a reação ficou incubada por 10 minutos à 72°C e permaneceu à 4°C. A reação foi estocada à -20°C.