



UNESP – Universidade Estadual Paulista

Faculdade de Medicina – Botucatu

Departamento de Clínica Médica – Laboratório Biologia Molecular

Juliana Marino

**Efeito de diferentes doses de hormônio tireoidiano sobre a
expressão gênica e protéica de proteínas relacionadas ao
trânsito de cálcio em animais obesos e obesos submetidos à
restrição alimentar**

Orientadora: Prof. Dra. Célia Regina Nogueira

BOTUCATU

2011

Juliana Marino

**Efeito de diferentes doses de hormônio tireoidiano sobre a
expressão gênica e protéica de proteínas relacionadas ao
trânsito de cálcio em animais obesos e obesos submetidos à
restrição alimentar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Fisiopatologia em Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica. Área de Concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof. Dra. Célia Regina Nogueira

BOTUCATU

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Marino, Juliana.

Efeito de diferentes doses de hormônio tireoidiano sobre a expressão gênica e protéica de proteínas relacionadas ao trânsito de cálcio em animais obesos e obesos submetidos à restrição alimentar / Juliana Marino. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Célia Regina Nogueira

Capes: 40101002

1. Coração - Fisiopatologia. 2. Obesidade - Fisiopatologia. 4. Hormônios Tireoidianos.

Palavras-chave: Coração; Dieta hiperlipídica; Hormônio tireoidiano; Obesidade; restrição alimentar; Obesidade; Trânsito de cálcio.

Dedico esse trabalho a todos que me fazem querer ser alguém melhor a cada dia,

À Deus,

que me permitiu estar aqui, e está sempre presente em minha vida, iluminando meus caminhos e me dando forças para continuar na luta.

Aos meus pais,

aos quais sou grata pela vida, e por tudo que conquistei até hoje e que estiveram ao meu lado em todos os momentos deste trabalho, me dando força e incentivo. A minha vontade de crescer é impulsionada pelo amor e pelo laço de amizade que prezamos.

À minha família,

a todos os meus tios e tias que são como meus pais, aos meus primos e primas que são mais que amigos são verdadeiros irmãos, a minha avó Mauria, a todos meus queridos amigos que são a família que eu escolhi. Sem vocês tudo seria mais difícil e menos divertido.

Ao meu namorado Rômulo,

Que sempre me apóia e torce pelo meu sucesso, me faz voar alto e também me mantém com os pés no chão.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, por me escolher, capacitar e nunca me abandonar.

A minha orientadora, *Profª Drª Célia Regina Nogueira*, pela oportunidade e confiança, por todo apoio, e ter auxiliado no meu amadurecimento pessoal e científico, muito obrigada pela paciência e delicadeza em todos os momentos.

A Renata Luvizzoto que além de amiga, é para mim um exemplo de pesquisadora e me espelho em você pessoalmente e profissionalmente, obrigada por todas as dicas e tudo que você me ensinou, sempre muito prestativa e presente, mesmo quando distante, em todas as etapas desse trabalho, sem você seria impossível ter chegado até aqui.

A Ana Paula Lima Leopoldo e Paula Martinez pela paciência, amizade, por todo o conhecimento técnico e científico, o sucesso de vocês é indiscutível, torço muito por vocês.

A todos os colegas e companheiros de laboratório experimental Neide Bueno, Adriana Fernandes, Paulinha Paccielle, Carlos, Dani (São Manuel), Camila Bonomo, Camila Moreno, Dani, Loreta, Luciana, Marcela, Yedda, Renata Carolina, Dijon, Ricardo, Marcelo, Thiago, Heloisa, Bruna, Mario, André Leopoldo, André Nascimento; Tenho certeza que crescemos juntos e aprendemos muito com tudo que passamos obrigada por toda a ajuda, agradeço especialmente aqueles que participaram do sacrifício dos animais, que aprenderam e me ensinaram muito nesse momento importante do trabalho.

Ao *Profº Drº Carlos Antônio Cicogna* que sempre esteve presente e disponibilizou seu laboratório e seus alunos para que nosso trabalho fosse concluído com êxito.

Ao *Profº Drº Carlos Roberto Padovani*, ao Silvio Assis de Oliveira Júnior e ao André Nascimento pela colaboração com a estatística do nosso trabalho.

À *Drª Gláucia Mazeto* e aos Residentes da Endócrino, pelas sugestões e estarem sempre disponível para ajudar no que fosse necessário.

As colegas de laboratório Maria Teresa, Miriane, Regiane, que diariamente compartilharam as dificuldades e prazeres do trabalho, vibraram e choraram comigo em todas as fases, obrigada e muito sucesso.

Aos funcionários do Departamento e do Laboratório Experimental da Clínica Médica Sueli Clara, Corina Corrêa, Elenize Jamas, José Carlos Georgete (Zé), Mário Bruno, Ângelo, José Aparecido de Souza (Boca), Renato Pereira, Rogério Monteiro, Sandra Fábio, Sueli Garcia, as tias da limpeza sempre colocando o biotério em ordem depois de um dia de pesagem dos animais, Elizangela Silva, Bruno Fajiolli, Bruno Silva, Alexandre Loureiro, Ana Mengue, todos sempre dispostos a ajudar no que fosse necessário.

A minha banca de qualificação Sandro Conde e Prof^a Maely, as suplentes Dr^a Vânia e Dr^a Glaucia, obrigada por cada correção, cada dica e questionamento, tenho certeza que esse trabalho está muito mais rico após o olhar de vocês.

As minhas grandes amigas Natália Machado e Morena Flor, minhas primas-amigas Katrine, Natália, Fernanda, Jaqueline, Aline Miranda, obrigada pela amizade sempre, vocês são essenciais, sem vocês não dá **“Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos”.** (Fernando Pessoa)

Aos meu amigos Larissa e Cris Loli, Aniele e Neto, Flavinha e Gu Valim, Fer e Ricardo, Lígia e Renato, Luciane, Joyce, Marcio, Rô Palhinha, Ju Stein, Artur, Lucas Martin, Karina Moreira, Nice, César, Karine, presentes ou não, nunca menos importantes, amo todos vocês. **”não importa a distância, no coração estarão sempre perto.”**

A grande amiga Fernanda Fontes pelo auxílio, disposição, risadas, confissões que contribuíram muito para o meu trabalho e para a minha vida pessoal, muito obrigada por tudo! Agradeço por toda a ajuda, conselhos e amizade; quero estar ao seu lado, em cada etapa e em cada vitória da nossa vida !! Obrigada pela paciência, apoio e dedicação... **“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós e nenhuma substitui a outra! Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”.** (Charles Chaplin)

A minha família, Tias Neise, Nelise, Célia, Diná, Rose, Ida e Marcia, Tios Osmar, Dorival, Val, Vitor, Gilberto, Paulo, Gilberto Damiano, aos meus primos Fael, Aline, Vitor, Isabela, Bruno, Cris, Camila, Gabriel, Luan, Dari e Faedy, a minha avó Mauria, aos meus amigos e futura família Rosana, Cícero, Vó Rosa, Renatinho, Ramon, Betina, Rubens, Sofia, Raíssa e Thais; Obrigada por todo carinho e amizade, todas as palavras de estímulo que com certeza me fizeram muito bem, pela companhia, pelos finais de

semana, pessoas que mesmo de longe me dão segurança, são com certeza meu porto seguro, sei para onde correr quando quiser rir ou chorar, obrigada.

Aos meus pais Selma e Nilson pelos conselhos, por todo apoio e incentivo, por me oferecerem o ombro amigo e me animarem sempre que precisei, não canso de relatar o quanto amo vocês e sou grata.

Agradeço ao meu namorado Rômulo pela torcida, paciência, carinho, amor e todo o apoio, te amo e sabe que pode contar comigo sempre.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

(Saint-Exupéry)

Resumo

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. Estudos clínicos mostram que obesidade está associada à disfunção ventricular, geralmente, diastólica. A relação entre obesidade e o trânsito de Ca^{2+} intracelular tem sido estudada por técnicas de biologia molecular, as quais tornam possível o entendimento dos mecanismos responsáveis pelas alterações no desempenho do miocárdio. O trânsito de cálcio intracelular é regulado pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Canal do tipo L do retículo sarcoplasmático (SR), canal rianodina (RyR), bomba Ca^{2+} ATPase do RS (SERCA), fosfolambam (PLB). Os raros estudos que avaliaram as proteínas envolvidas na homeostase intracelular de Ca^{2+} do miocárdio em modelos experimentais de obesidade apresentaram resultados divergentes. Sabe-se que a administração de T3 pode alterar a expressão gênica e protéica de proteínas relacionadas ao trânsito de cálcio cardíaco. A restrição alimentar é a estratégia mais comum para tratar a obesidade e têm papel central na redução de gordura em indivíduos obesos. Poucos estudos têm analisado os mecanismos moleculares relacionados com o ciclo de Ca^{2+} do miocárdio no coração de animais submetidos à restrição. Assim, qualquer modificação na expressão dessas proteínas poderia levar a anormalidades da homeostase do Ca^{2+} e, conseqüentemente, disfunção contrátil no tecido cardíaco de ratos submetidos à restrição alimentar. O objetivo deste estudo foi analisar a influência da obesidade e na restrição alimentar em obesos com dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos insaturados e administração de diferentes doses de hormônio tireoidiano na expressão gênica e protéica de proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio cardíaco. Para isto, foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar inicialmente separados randomicamente em dois grupos: Controle (C) e Obeso (OB). O grupo C recebeu uma dieta padrão e os animais OB receberam dieta hiperlipídica por 20 semanas para desenvolver a obesidade com dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos insaturados. Após esse período os animais OB foram randomizados em grupos obeso (OB), obeso com $0,5\mu\text{g}/100\text{g}$ de T3 (OF), obeso com $25\mu\text{g}/100\text{g}$ de T3 (OS), obeso submetido à restrição alimentar (ORC), obeso submetido à restrição alimentar com dose de $0,5\mu\text{g}/100\text{g}$ de T3 (ORF), obeso submetido à restrição calórica com dose de $25\mu\text{g}/100\text{g}$ de T3 (ORS). Os animais restritos receberam 75% da dieta consumida pelos animais do grupo C por oito semanas. Após esse período os animais OF, OS, ORF e ORS foram submetidos ao tratamento com T3 por duas semanas. Ao final do tratamento os animais foram eutanasiados e amostras do tecido ventricular esquerdo

foram coletadas para análise da expressão gênica e protéica da PLB usando PCR em tempo real e Western Blot, respectivamente. Os resultados deste estudo mostram que a administração exógena de T3 aumentou os níveis séricos de T3 total e baixou os níveis de T4 livres mostrando a efetividade do tratamento, e diminuiu o peso corporal e índice de adiposidade nos grupos tratados. A administração de T3 diminuiu a expressão gênica da PLB, Canal L, TR β e TR α nos animais OF e OS. Enquanto a expressão de NCX e SERCA foi aumentada apenas nos animais OS em relação à OF e OB. Para os grupos restritos, a restrição de 25% fez com que os animais retornassem ao peso dos animais controle. Em relação às expressões gênicas das proteínas relacionadas ao trânsito de cálcio cardíaco, houve uma menor expressão na PLB, SERCA, Canal L e RyR nos animais submetidos a restrição em relação aos animais obesos, e um aumento na expressão do NCX nos submetidos a restrição em relação aos obesos. O TR β não se alterou nos animais quando submetidos à restrição alimentar de 25%. A expressão gênica de PLB e TR β apresentaram diminuição de acordo com a dose administrada e para os genes SERCA e Canal L houve aumento de maneira dose dependente. A expressão gênica de NCX foi diminuída apenas nos animais ORS em relação à ORF. No entanto, apesar de verificar diferenças importantes na expressão gênica tanto na influência da dieta, como na presença das doses de hormônio tireoidiano, não observamos as mesmas alterações na tradução dessas proteínas estudadas. Em relação à expressão protéica, apenas o gene PLB, nos animais alimentados com dieta hiperlipídica, apresentou diminuição nos grupos OF e OS, seguindo o mesmo comportamento da expressão gênica. As expressões protéicas das outras proteínas do trânsito de cálcio não se alteraram. Dessa forma concluímos que a obesidade e a administração de diferentes doses de hormônio tireoidiano alteram a expressão gênica da SERCA, RyR, Canal L e NCX, porém, não alteram a expressão proteica das mesmas. A obesidade não altera a expressão gênica e protéica da PLB, porém, as diferentes doses de hormônio tireoidiano diminuem tanto a expressão gênica quanto a protéica. A restrição alimentar moderada e as diferentes doses de hormônio tireoidiano alteram a expressão gênica, porém não alteram a expressão das proteínas responsáveis pelo trânsito de cálcio cardíaco.

Palavras-chave: Obesidade, restrição alimentar, hormônio tireoidiano, proteínas do trânsito de cálcio cardíaco.

Abstract

The underlying cause of obesity is multifactorial and is probably a combination of genetic, environmental and psychosocial factors that determine the balance between food intake and energy expenditure. Clinical studies show that obesity is associated with ventricular dysfunction, usually diastolic. The relationship between obesity and transit of intracellular Ca^{2+} has been studied by molecular biology techniques, which make possible the understanding of the mechanisms responsible for changes in myocardial performance. The transit of intracellular calcium is regulated by $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$, L channel, sarcoplasmic reticulum (SR), channel ryanodine (RyR2), SR Ca^{2+} pump ATPase (SERCA2), phospholamban (PLB). Few studies that evaluated the proteins involved in intracellular Ca^{2+} homeostasis of the myocardium in model experimental showed divergent results in obesity. It is known that obesity and administration of T3 may alter the gene and protein expression of the transit of calcium in the heart. Food restriction is the most common strategy for treating obesity and has a central role in fat reduction in obese subjects. Few studies have examined the molecular mechanisms related to myocardial Ca^{2+} cycle in the heart of restricted animals. So any change in the expression of Ca^{2+} related genes could lead to abnormal Ca^{2+} homeostasis and, consequently, contractile dysfunction in heart tissue of rats restricted. The objective of this study was to analyze the influence of obesity and food restriction on administration of different doses of thyroid hormone on gene and protein expression of proteins related to the transit of cardiac calcium. For this, male Wistar rats were randomized and initially divided into two groups: control (C) and obese (OB). Group C received a standard diet and OB animals received a high fat diet for 20 weeks to develop obesity. After this period the animals were randomized into OB obese (OB), obese with 0.5 $\mu\text{g} / 100\text{g}$ of T3 (OF), obese with 25 $\mu\text{g} / 100\text{g}$ of T3 (OS), obese subjected to caloric restriction (ORC), obese subjected to caloric restriction with a dose of 0.5 $\mu\text{g}/100\text{g}$ of T3 (ORF), obese subjected to caloric restriction with a dose of 25 $\mu\text{g}/100\text{g}$ of T3 (ORS). The restricted animals received 75% of that consumed by animals in group C for eight weeks. After this period the animals OF, OS, ORF and ORS were treated with T3 for two weeks. At the end of treatment the animals were euthanized and tissue samples were collected from left ventricle to measure the gene and protein expression of PLB using real time PCR and Western blot, respectively. The results of this study show that exogenous administration of T3 increased serum T3 and decreased levels of free T4 showing the effectiveness of treatment, and decreased body weight and adiposity index in the treated groups. The administration of T3 decreased the gene expression of PLB, Canal L, $\text{TR}\alpha$ and $\text{TR}\beta$ in

animals OF and OS. While the expression of NCX and SERCA was increased only in OS animals in relation to OF and OB. For the restricted groups, the restriction of 25% meant that the animals return to the weight of control animals. Regarding gene expression of proteins related to cardiac calcium transit, there was less expression in the PLB, SERCA, Channel L and RYR in animals subjected to restrictions regarding obese animals, and an increased expression of NCX in those submitted to restriction compared to obese group. The TR β not changed in animals when subjected to food restriction of 25%. The gene expression of PLB and TR β showed decreased according to dose and for genes SERCA and Channel L increased in a dose-dependent. The gene expression of NCX was reduced only in animals ORS in relation to ORF. However, despite important differences in gene expression in both the influence of diet, as in the presence of doses of thyroid hormone did not observe the same changes in the translation of these proteins studied. Regarding protein expression, only the PLB gene in animals fed a high fat diet, showed a decrease in OF and OS groups, following the same pattern of gene expression. The protein expression of other proteins in the transit of calcium did not change. Thus we conclude that obesity and administration of different doses of thyroid hormone alters the gene expression of SERCA, RYR, Channel L and NCX, but does not alter the protein expression of the same. Obesity does not alter the gene and protein expression of PLB, however, different doses of thyroid hormone reduces both gene expression and the protein. The moderate food restriction and the different doses of thyroid hormone alter gene expression, but not alter the expression of proteins responsible for cardiac calcium transit.

Keywords: Obesity, food restriction, thyroid hormone, Protein expression of cardiac calcium transit.

Lista de Abreviaturas e Siglas

C = Controle

Ca^{2+} = Cálcio

Canal L = canal de Ca^{2+} tipo L

cDNA = Ácido Desoxirribonucleico Complementar

CELM = Método Enzimático Calorimétrico Automatizado

CNA = Comprimento Naso-Anal

COL = Colesterol Total

DH = Dietas Hipercalóricas

DHL = Lipoproteína de Alta densidade

DN = Dieta normocalórica

DNA = Ácido desoxirribonucleico

EA = Eficiência Alimentar

g = Grama

GCT = Gordura Corporal Total

HMG-CoA = Enzima Hidroximetil glutaril Coenzima A

IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC = Intervalo de Confiança

IMC = Índice de Massa Corporal

Kcal = Calorias

LDL = Lipoproteína de Baixa Densidade

Na^+ = Sódio

NCX = Trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

OB = Obeso

OBF = Obeso com dose 0,5 μg /100g

OBS = Obeso com peso animal de 25 μg /100g

OF = Obeso com dose 0,5 μg /100g de T3

OMS = Organização Mundial de Saúde

ORC = Obeso submetido à restrição alimentar

ORF = Obeso submetido a restrição alimentar com dose 0,5 μg /100g de T3

ORS = Obeso submetido à restrição calórica com dose de 25µg/100g de T3

OS = Obeso com dose 25ug/100g de T3

PCF = Peso Corporal Final

PCR = Reação em cadeia de polimerase

PLB = Fosfolamban

PS = Ponto de Separação

RNA_m = Ácido ribonucleico mensageiro

RS = Retículo Sarcoplasmático

R_{YR} = Canal ou Receptor de Rianodina

Serca2 = Bomba de Ca²⁺ ATPase do Reticulo sarcoplasmático

SR = Retículo Sarcoplasmático

T3 = Triiodotironina

T4 = Tiroxina

TER = Elemento Responsivo ao Hormônio Tireoidiano

TG = Triglicérides

TR = Receptor de Hormônio Tireoidiano

TRH = Hormônio Liberador da Tireóide

TR_α = Receptor de Hormônio Tireoidiano Alfa

TR_β = Receptor de Hormônio Tireoidiano Beta

TSH = Hormônio estimulador da tireóide

Sumário

Abstract

Resumo

Lista de Abreviaturas e siglas

1. Introdução.....	17
2. Hipótese.....	22
3. Objetivo geral.....	23
4. Materiais e métodos.....	23
4.1 Protocolo Experimental.....	23
4.2 Composição das Dietas.....	25
4.3 Caracterização dos grupos.....	27
4.4 Sacrificio dos animais.....	28
4.5 Eficiência alimentar e ingestão calórica.....	28
4.6 Depósito de gordura corporal.....	28
4.7 Análises bioquímicas séricas	28
4.8 Dosagens hormonais.....	29
4.9 Expressões gênicas por RT-PCR.....	29
4.9.1 Extração do ácido ribonucleico (RNA).....	29
4.9.2 Transcrição reversa do RNA (RT-PCR).....	31
4.9.3 PCR em tempo real.....	31
4.10 Expressão das proteínas do trânsito de Ca^{2+}	32
4.10.1 Extração das proteínas.....	32
4.10.2 Western Blotting.....	33
4.10.3 Quantificação das proteínas.....	35
4.11 Análise estatística	35
5. Resultados.....	35
Capítulo I: Obesidade e Doses Fisiológicas e Suprafisiológicas de	
Hormônio Tireoidiano.....	36
Resumo	36

I. Hipótese.....	37
II. Objetivos específicos.....	37
III. Resultados	37
i. Constituição dos grupos	37
ii. Evolução do peso.....	39
iii. Dosagens hormonais.....	40
iv. Características gerais.....	41
v. Análise bioquímica.....	44
vi. Expressão gênica e protéica.....	44
IV. Discussão	56
V. Conclusão	60
Capítulo II: Ratos Obesos e Submetidos à Restrição Alimentar Moderada e	
Doses Fisiológica e Suprafisiológica de Hormônio Tireoidiano	61
Resumo.....	61
I. Hipótese.....	62
II. Objetivos específicos.....	62
III. Resultados	62
i. Constituição dos grupos	62
ii. Evolução do peso.....	63
iii. Dosagens hormonais.....	65
iv. Características gerais.....	66
v. Análise bioquímica.....	69
vi. Expressão gênica e protéica.....	70
IV. Discussão	82
V. Conclusão	85
6. Conclusões Gerais.....	85
7. Referências Bibliográficas.....	86
Apêndices.....	97

1. Introdução

Obesidade é uma doença crônica caracterizada por hipertrofia e hiperplasia de células de gordura levando ao aumento do risco de desenvolver outras doenças (Bell-Anderson & Bryson, 2004). É uma alteração do estado nutricional devido ao excesso da ingestão alimentar. Há várias maneiras de se definir obesidade, e a mais sintética e atual é a que define o obeso como portador de uma doença endócrino-metabólica, crônica, heterogênia, caracterizada pelo excesso de gordura no organismo (Waitzberg, 2000).

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).

Esta doença também é um problema de saúde pública, sendo uma carga para o sistema de saúde e para a sociedade. Além disso, os pacientes obesos têm uma redução na qualidade de vida e risco aumentado de desenvolver desordens psicológicas (Bell-Anderson & Bryson, 2004).

Tabelas da Metropolitan Insure mostram que a obesidade maior do que 20% do peso corporal ideal associa-se com um aumento de morbimortalidade. Conforme as últimas recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS), a classificação atual, segundo o Índice de Massa Corpórea (IMC), para sobrepeso é de 25 – 29,9 kg/m², já a obesidade se divide em 3 graus, sendo obesidade grau I de 30 – 34,9 kg/m², obesidade grau II de 35 – 39,9 kg/m² e obesidade grau III acima de 40 kg/m². O IMC normal varia entre 18,5 – 24,9 kg/m².

De acordo com a OMS “a obesidade está se tornando um dos mais importantes males da saúde” onde mais de um bilhão de adultos apresentam sobrepeso e, aproximadamente, 400 milhões são obesos. No Brasil, de acordo com a Pesquisa de Orçamentos Familiares do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), cerca de 40 milhões de pessoas estão acima do peso ideal e destes 10,5 milhões são obesos.

A obesidade está associada com o aumento no risco de mortalidade e redução na expectativa de vida (Fontaine *et al*, 2003; Olshansky *et al*, 2005) e numerosas comorbidades como, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias, resistência a insulina e doenças cardiovasculares como, hipertensão arterial, doença arterial coronariana, fibrilação arterial e insuficiência cardíaca (Malnick & Knobler, 2006; Poirier *et al*, 2006).

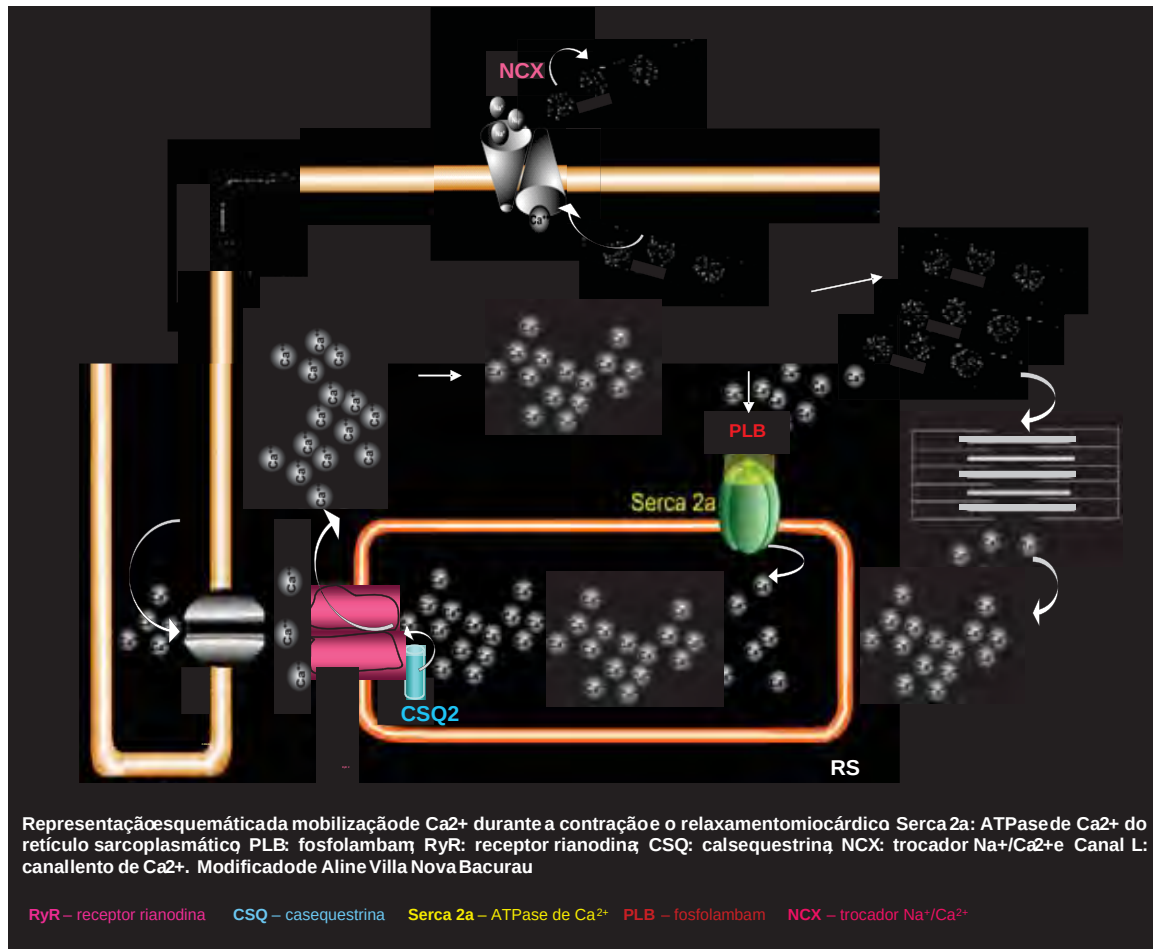
Estudos clínicos mostram que obesidade está associada à disfunção ventricular, geralmente diastólica (Pacual *et al*, 2003; Zarich *et al*, 1991). Pesquisas em animais

geneticamente obesos mostram, em sua maioria, disfunção contrátil e de relaxamento cardíaco (Dong *et al*, 2006; Young *et al*, 2002). Em modelos de obesidade induzida por dieta hipercalórica os resultados são divergentes, com alguns estudos mostrando função ventricular preservada (Dong *et al*, 2006; Carroll *et al*, 2006), diminuída (Carroll *et al*, 1997; Relling *et al*, 2006) ou aumentada (Ouwens *et al*, 2005).

Os mecanismos responsáveis pelas alterações do desempenho cardíaco em modelos de obesidade genética ou por dieta não estão estabelecidos. Assim, acúmulo de colágeno intersticial miocárdio (Carroll *et al*, 1999; Carroll *et al*, 2005; Cittadini *et al*, 1999), lipotoxicidade (Young *et al*, 2002; Christoffersen *et al*, 2003; Ouwens *et al*, 2005), apoptose (Okere *et al*, 2006), alterações na via β adrenérgica (Carroll *et al*, 1997; Minhas *et al*, 2005) e no trânsito de cálcio intracelular (Ren *et al*, 2000; Li *et al*, 2006; Relling *et al*, 2006; Minhas *et al*, 2005) são tidos como fatores responsáveis pelas anormalidades cardíacas.

O trânsito de cálcio é um dos principais mecanismos reguladores do ciclo de cálcio cardíaco (Opie, 1998). A elevação da concentração de Ca^{+2} sistólico induz a contração e sua diminuição provoca o relaxamento. A contração cardíaca inicia-se com a despolarização das células cardíacas pelo potencial de ação, abertura do canal de Ca^{+2} tipo L (Canal L); influxo de Ca^{+2} através desses canais (Bers, 2002) e o conseqüente influxo de Ca^{+2} desencadeia a liberação de grande quantidade de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático (RS) pelos receptores de Rianodina (RyR) (Bounstany-Kari *et al*, 2007). A intensidade da contração depende da quantidade e da responsividade dos miofilamentos ao Ca^{+2} ; inicia-se o relaxamento quando a concentração intracelular de Ca^{+2} é baixa, e pela recaptção do Ca^{+2} pela ATPase de Ca^{+2} do RS (SERCA). A função da Serca é regulada pela fosfolambam (PLB) que, em seu estado fosforilado, na serina 16 (pPLB ser16) via adenosina monofosfato cíclico (AMPC), ou na treonina 17 (PLB thr 17) via quinase depende de Ca^{+2} , calmodulina, permite a recaptura de Ca^{+2} pela SERCA para dentro do RS. (Bers, 2002; Bassani, 1994). O Ca^{+2} recapturado pela SERCA para dentro do RS é armazenado pela calsequestrina (CSQ), por sua capacidade de ligação com os íons de Ca^{+2} , tornando-o disponível para a próxima liberação pelos RyR. O trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (NCX) é outra proteína importante para a regulação do efluxo de Ca^{2+} celular que utiliza o gradiente de Na^+ transmembrana para catalisar a extrusão do Ca^{+2} . Assim a quantidade e/ou atividade de diferentes proteínas, localizadas no sarcolema e no RS, regulam o trânsito de cálcio celular, modulando a contração e o relaxamento do miocárdio (Opie, 1998; Bers, 2002). O trânsito de cálcio intracelular pode sofrer alterações decorrentes de prejuízos na expressão, função ou

regulação das proteínas, que podem ser ocasionados pelas modificações nos mecanismos de transcrição, tradução e/ou pós traducional.



A relação entre obesidade e o trânsito de Ca^{2+} intracelular tem sido estudada por meio de técnicas de biologia molecular, que tornam possível o entendimento dos mecanismos responsáveis pelas alterações no desempenho do miocárdio. Os raros estudos que avaliaram as proteínas envolvidas na homeostase intracelular de Ca^{2+} no miocárdio em modelos experimentais de obesidade, (Young *et al*, 2002; Li *et al*, 2006; Minhas *et al*, 2005) ou por dieta hipercalórica (Relling *et al*, 2006; Philip-Couderc *et al*, 2004) apresentaram resultados divergentes. Enquanto alguns autores utilizando ratos geneticamente obesos, Zucker e *lep/lep* (*ob/ob*), observaram que os níveis de expressão gênica e protéica da Serca2a estavam preservados (Young *et al*, 2002; Li *et al*, 2006), Minhas *et al* 2005 verificaram em ratos *ob/ob* há elevação da expressão protéica da Serca2a. Por outro lado, Relling e cols. (2006), avaliando a expressão das proteínas reguladoras do trânsito de cálcio na obesidade dietética, verificaram que ratos Sprague-Dawley, alimentados com dieta hipercalórica por 12 semanas, apresentaram aumento da expressão da Serca2a e do PLB. Entretanto Philip-Couderc e cols. (2004)

observaram diminuição da expressão gênica da Serca2a e do PLB em cães obesos alimentados por 9 semanas com dieta hipercalórica.

Os hormônios tireoidianos são imprescindíveis para a sobrevivência tanto em humanos quanto em roedores (Steppan et al, 2001) e podem influenciar a expressão das proteínas reguladoras do trânsito de cálcio no miocárdio. A glândula tireóide produz, principalmente, os hormônios tireoidianos triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4) e faz parte do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. A secreção dos hormônios tireoidianos é regulada pelo mecanismo clássico de *feedback* negativo, portanto, o hormônio liberador da tireóide (TRH), produzido predominantemente por neurônios do núcleo paraventricular no hipotálamo, estimula a liberação de hormônio estimulador da tireóide (TSH) na hipófise e este estimula a síntese e liberação dos hormônios tireoidianos. Nas concentrações séricas aumentadas dos hormônios tireoidianos há uma inibição da produção de ambos TRH e TSH, levando à diminuição da função da tireóide e a diminuição nos níveis séricos dos hormônios tireoidianos, por sua vez, estimula TRH e TSH, e aumenta novamente a concentração dos hormônios (Legradi et al, 1997).

Hormônios tireoidianos atuam no organismo acoplando-se aos seus receptores α ($TR\alpha$) e β ($TR\beta$), membros da superfamília de receptores nucleares que interagem com uma sequência específica de DNA, denominada elemento responsivo, na região promotora do gene alvo e regulam a transcrição gênica (Ahima et al, 1996). Geralmente são repressores na ausência do ligante T_3 e ativadores transcricionais na sua presença (Menendez et al, 2003).

O TSH e os hormônios tireoidianos periféricos (T_3 e T_4) podem estar aumentados na obesidade e a causa desse aumento não é bem definida. Essa elevação pode indicar resistência hormonal, semelhante com a resistência à insulina que ocorre na obesidade. Corroborando esta teoria está o fato de que na obesidade, os receptores para T_3 e o *feedback negativo* entre T_3 , T_4 e TSH encontram-se diminuídos (Meier & Gressner, 2004).

Não encontramos relatos na literatura que demonstrem que tratamento com hormônio tireoidiano na dose fisiológica ou supra-fisiológica poderia reverter esse estado de resistência ao hormônio tireoidiano e dessa forma melhorar a obesidade. Por outro lado, se a introdução desses hormônios for um benefício fica interrogado quais as consequências para o miocárdio.

A restrição alimentar é a estratégia mais comum para tratar a obesidade (Dahlman *et al*, 2005). Em animais, a restrição calórica é uma manipulação experimental que retarda o envelhecimento e aumenta a expectativa de vida. A restrição diminui os déficits psicomotores relacionados com a idade, perda de memória e reduz dano neuronal. Entretanto os mecanismos moleculares responsáveis por estes efeitos benéficos ainda não estão esclarecidos (Mattson, 2003).

Alguns estudos recentes têm levantado a questão que o efeito benéfico da restrição calórica em roedores pode ocorrer apenas se a restrição tiver início cedo na vida desses animais (Forster *et al*, 2003). Em contraste, outros estudos indicam que a restrição na meia idade ainda é benéfica (Takahashi & Goto, 2002). Sanz e cols sugerem ainda que a restrição possa ser benéfica mesmo em animais mais velhos porque ela diminui o estresse e dano oxidativo e mitocondrial.

Há muito tempo os pesquisadores acreditavam que o coração é poupado na presença de desnutrição e concentravam seus estudos em outros órgãos e sistemas, que são fortemente afetados pela restrição alimentar. Contudo, muitos estudos clínicos e experimentais têm mostrado que a estrutura, a função cardíaca e a contratilidade do miocárdio são afetadas pela restrição alimentar severa (Simone *et al*, 1994; Rossi *et al*, 1982).

Pesquisas recentes, em nosso laboratório, demonstraram que restrição alimentar de 50% promove disfunção ventricular esquerda e aumenta o tempo de contração e relaxamento do músculo papilar isolado em animais Wistar-Kyoto normotensos e espontaneamente hipertensos (Okoshi *et al*, 2004; Sugizaki *et al*, 2006). Sugizaki e col (2006) observaram que a disfunção do miocárdio em ratos com esta restrição calórica está relacionada ao trânsito do cálcio.

Poucos estudos têm analisado os mecanismos moleculares relacionados com o ciclo Ca^{2+} no coração de animais restritos (O'Brien *et al*, 1995; Rupp *et al*, 1997). O trânsito de cálcio intracelular é regulado pelo NCX, Canal L, RyR, SERCA2a, PLB. Assim, qualquer modificação na relacionada com a expressão destes genes poderia levar a anormalidades da homeostase Ca^{2+} e, conseqüentemente, disfunção contrátil no tecido cardíaco de ratos restritos.

Sendo assim, O'Brien e cols (1995) avaliaram ratos alimentados com dieta de baixo teor protéico para reduzir seu peso em aproximadamente 25% em 7 dias, e concluíram que a alimentação hipocalórica produz uma *down-regulation* compensatória, reversível, assimétrica do ciclo de cálcio, com atividade da RYR2 sendo,

preferencialmente, afetada. Rupp e cols (1997), analisaram o miocárdio de ratos submetidos à restrição alimentar por 5 semanas e mostraram uma redução na atividade de captação SR Ca^{2+} .

Segundo Kim e cols (2000), a fome está associada à depressão do eixo hipotálamo – hipófise – tireóide, sendo assim T3, T4, TSH e TRH estão reduzidos em humanos durante a restrição alimentar.

Os genes dependentes de T3 atuam, principalmente, gerando proteínas da estrutura e de organização da célula miocárdica. A regulação hormonal pode ser positiva (SERCA2) ou negativa (PLB) (Wagman *et al*, 2005).

Se a restrição está associada à diminuição dos hormônios tireoidianos circulantes e esses são essenciais para função de proteínas do ciclo de cálcio no miocárdio consideramos que a introdução de hormônios tireoidianos frente a uma restrição calórica de 25% poderia ser benéfica para a perda de peso e para o miocárdio em relação a essas proteínas. Por outro lado, a literatura inicia estudos do uso de análogos para o tratamento da obesidade. Esses análogos agiriam nos receptores β e não no α . Consequentemente, o miocárdio, que possui mais receptores α , seria poupado em relação ao aumento de contratilidade cardíaca exercida pela elevada concentração de hormônio tireoidiano circulante (Suzanne *et al*, 2000; Cao *et al*, 2001).

Contudo, não foram encontrados na literatura estudos que determinam as alterações gênicas e protéicas dessas proteínas na restrição alimentar de 25% em animais obesos, induzidos por dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos insaturados, e obesos submetidos à restrição alimentar.

2. Hipótese Geral

Obesidade e restrição alimentar moderada associadas a doses fisiológicas e suprafisiológicas de hormônio tireoidiano promovem alterações dose dependentes na expressão gênica e protéica das proteínas relacionadas ao trânsito de cálcio cardíaco.

3. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos de diferentes doses de T3 sobre a expressão gênica e protéica das proteínas relacionadas ao trânsito de cálcio cardíaco em animais obesos e obesos submetidos à restrição alimentar.

4. Materiais e Métodos

4.1- Protocolo Experimental

No início deste trabalho foram utilizados 130 ratos *Wistar* machos, pesando aproximadamente 150g, provenientes do biotério do Laboratório Experimental da Clínica Médica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” de Botucatu. Os ratos foram randomizados em dois grupos: controle (C, n= 15), obeso (OB, n= 115). Os animais C receberam dieta normocalórica (DN) e os OB um ciclo de quatro dietas hipercalóricas ricas em ácidos graxos insaturados (DH), de forma rotativa por 20 semanas. Após este período todos os animais foram caracterizados de acordo com seus grupos. Após as 20 semanas iniciais, os OB foram separados em seis grupos: animais obeso (OB), obeso com dose fisiológica de T3 (OF) de 0,5 µg/100 g de peso do animal, obeso com dose supra fisiológica de T3 (OS) de 25 µg/100 g de peso do animal, obesos submetidos à restrição calórica (ORC), ORC com dose fisiológica de T3 (ORF) de 0,5 µg/100 g de peso do animal e ORC com dose supra fisiológica de T3 (ORS) de 25 µg/100 g de peso do animal. O delineamento do estudo está apresentado abaixo (Figura 1).

Os animais obesos submetidos à restrição calórica passaram a ser alimentados com DN, a partir da 20ª semana, e receberam 75% da quantidade ingerida pelo grupo C. Assim, a restrição aplicada a esses grupos foi de 25% (Fernandez-Galaz et al, 2002). As diferentes doses de triiodotironina foram administradas por meio de injeções subcutâneas, durante 2 semanas (Minatoia et al, 2007, Kokkinos et al, 2007), volumes apropriados de solução salina foram administrados, por meio de injeções subcutâneas, nos grupos C, OB e ORC, como delineado na Figura 1.

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 de 12h) controladas. O consumo da dieta foi controlado diariamente e o peso aferido semanalmente, utilizando-se uma balança digital Mettler® modelo Spider 2.

O protocolo experimental seguiu as recomendações do “Guia para Cuidados e Usos de Animais Experimentais” e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, sob protocolo nº 702.

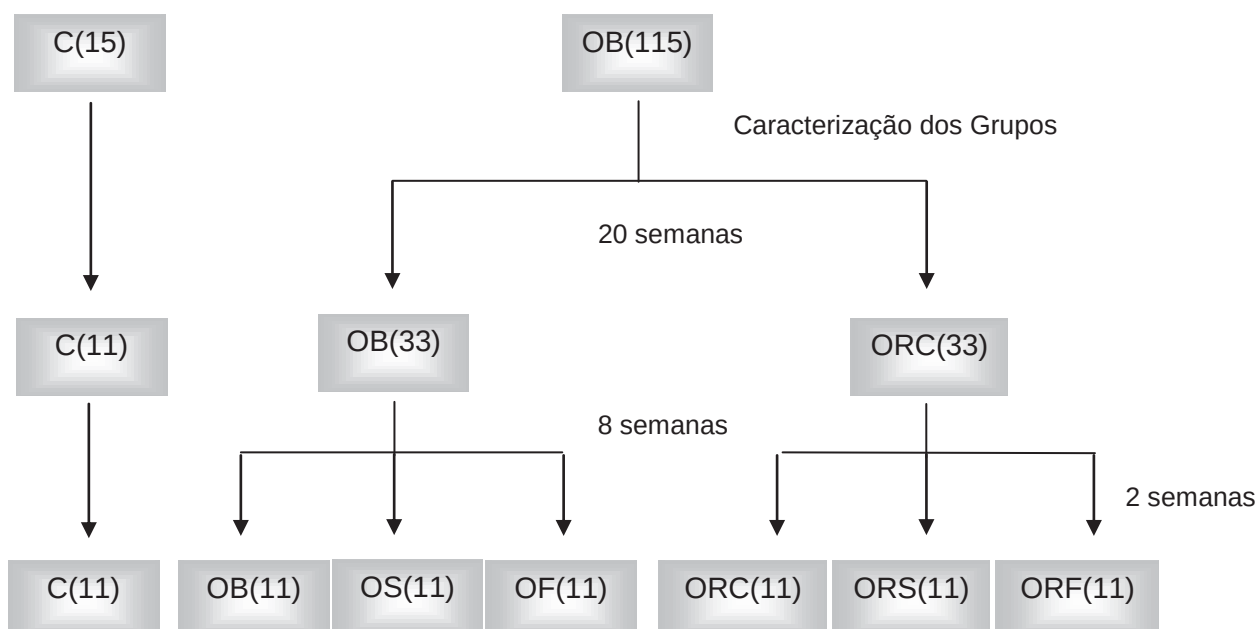


Figura 1. Protocolo experimental. C, controle; OB, obeso; OF, obeso com dose de triiodotironina na concentração de 0,5 µg/100 g de peso; OS, obeso com dose de triiodotironina na concentração de 25 µg/100 g de peso; ORC, obeso submetido à restrição calórica; ORF, ORC com dose de triiodotironina na concentração de 0,5 µg/100 g de peso; ORS, ORC com dose de triiodotironina na concentração de 25 µg/100 g de peso.

4.2- Composição das dietas padrão e hipercalórica

As dietas experimentais estão de acordo com as especificações do guia “Nutrient requirements of the laboratory rat” para ratos de laboratório (The National Academy of Sciences, 1995). As dietas hipercalóricas ricas em ácidos graxos insaturados foram padronizadas pela empresa Agrocere[®] Nutrição Animal, Rio Claro, SP, Brasil. A dieta padrão RC Focus 1765 é composta pelos seguintes ingredientes: fosfato bicálcico, óleo de soja degomado, cloreto de sódio, milho moído, aditivo antioxidante, farelo de soja, farelo de trigo, farinha de carne e ossos, farinha de peixe, premix mineral e vitamínico. As quatro dietas hipercalóricas apresentam a mesma composição nutricional, sendo constituídas por cloreto de sódio, caseína, soro de leite em pó, concentrado protéico de soja, milho integral moído, farinha de bolacha, fosfato bicálcico, carbonato de cálcio, aditivo emulsificante, óleo de milho, aditivos antioxidante e flavorizante, premix mineral e vitamínico, porém, acrescida com aromas e sabores diferentes, como queijo, bacon, chocolate e baunilha. A composição de macro e micronutrientes das dietas está apresentada no Quadro 1. Os perfis de ácidos graxos, aminoácidos, carboidratos e enriquecimento de micronutrientes das dietas estão apresentados na seção apêndice (A1).

Quadro 1. Composição de macro e micronutrientes das rações (%)

Componentes	Rações	
	Padrão	Hipercalórica*
Proteína	22,0	20,0
Carboidrato	42,7	26,4
Gordura	4,0	20,0
Vitaminas e Minerais	11,3	12,1
Fibras	8,0	9,0
Umidade	12,0	12,5
% Calorias da proteína	29,8	21,9
% Calorias do carboidrato	57,9	28,9
% Calorias da gordura	12,3	49,2
Calorias (Kcal/g)	2,95	3,65

* A dieta hipercalórica foi composta por quatro rações hipercalóricas nutricionalmente idênticas, com exceção do aditivo flavorizante adicionado (queijo, bacon, baunilha e chocolate).

4.3- Caracterização dos grupos

Para a caracterização dos grupos C e OB foi utilizado um critério estatístico aplicado sobre o peso corporal final (PCF), de acordo com estudo prévio (Nascimento et al, 2008). Resumidamente, o critério foi estabelecido da seguinte maneira: foi construído um intervalo de confiança (IC) de 95% para a média do PCF de ambos os grupos. Foi adotado como ponto de separação (PS) entre os grupos, o ponto médio entre o limite superior do controle e o limite inferior do obeso, sendo excluídos do grupo controle os animais com peso corporal acima do PS e do grupo obeso os animais com peso corporal abaixo do PS (Figura 2).

Os animais C foram utilizados, principalmente, para caracterização da obesidade, mas foram mantidos até o final do experimento, uma vez que foi o grupo referência para a restrição calórica.

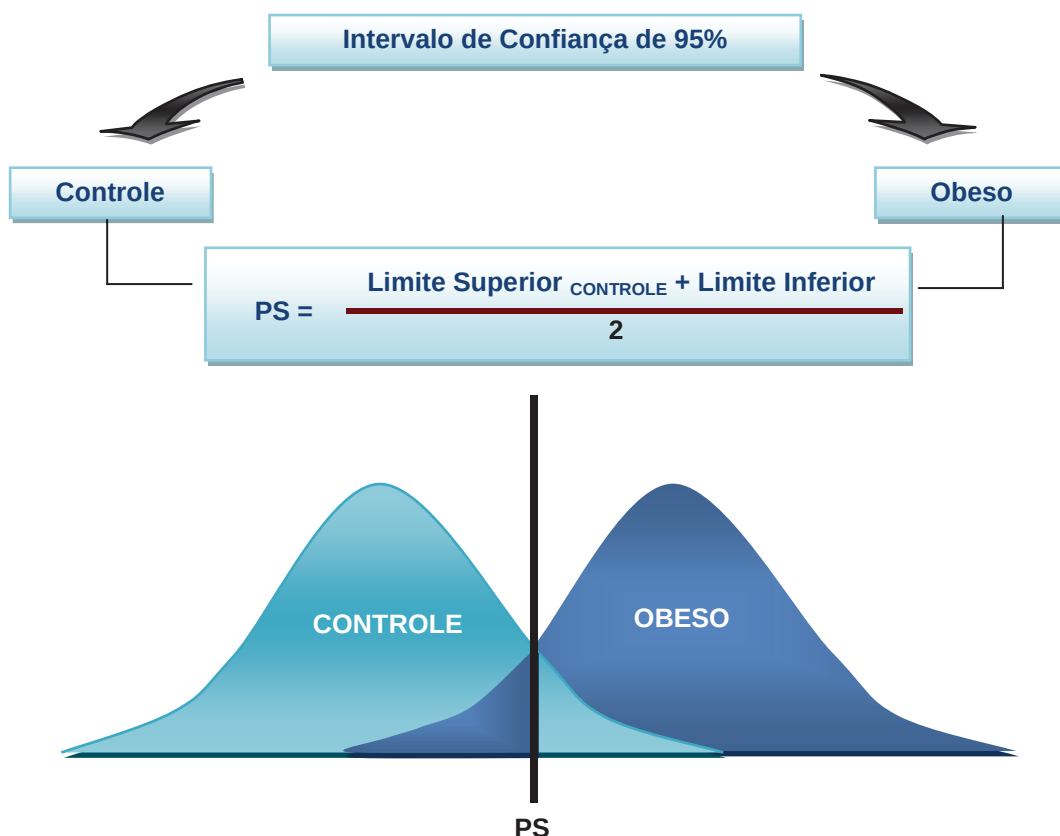


Figura 2. Representação esquemática do critério utilizado para a caracterização dos grupos controle e obeso. PS: ponto de separação (Nascimento et al, 2008).

4.4- Sacrifício dos animais

Todos os animais foram colocados em jejum por 12 a 15 horas, anestesiados com pentobarbital sódico, 50mg/kg, e sacrificados por decapitação.

4.5- Eficiências alimentar e ingestão calórica

Com a finalidade de analisar a capacidade de o animal converter a energia alimentar consumida em peso corporal, foi calculado a eficiência alimentar (EA) de todos os animais, dividindo-se o ganho total de peso dos animais (g) pela energia total ingerida (Kcal) (Schuwint et al, 2004). A ingestão calórica foi calculada da seguinte forma: ingestão alimentar semanal multiplicada pelo valor calórico de cada dieta (g x kcal).

4.6- Depósitos de gordura corporal

A gordura corporal total (GCT) foi mensurada em todos os animais, pela soma dos depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral (Levin & Dunn-Meynell, 2002). Este dado foi utilizado para confirmar a obesidade nos animais. Além disso, o índice de Lee [raiz cúbica do peso corporal final (gramas) sobre o comprimento naso-anal (CNA; milímetros) multiplicado por 10000 (Rogers & Webb, 1980) e o índice de adiposidade (gordura corporal total sobre o peso corporal final multiplicado por 100, adaptado de Boustany e cols (2004) foram calculados.

4.7- Análises bioquímicas sérica

Após o sacrifício o sangue de todos os animais foram coletados em tubos secos, em seguida, centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos e o soro armazenado à -80°C. As concentrações séricas de triacilglicerol (TG), colesterol total (COL), lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram determinadas por kits específicos (CELM[®], São Paulo, Brasil). As dosagens foram analisadas pelo método enzimático colorimétrico automatizado (Technicon, RA-XT[™] System, Global Medical Instrumentation, Minnessota, USA).

4.8- Dosagens Hormonais

Foram dosados no soro, de 5 animais de cada grupo, a concentração dos hormônios tireoidianos (T3, T4 e TSH).

As dosagens de T3 total, T4 livre e TSH foram obtidas por quimiluminescência, realizadas pela empresa Vidavet Laboratório de Análises Veterinárias LTDA (Botucatu, SP, Brasil).

4.9 - Expressões Gênicas por RT- PCR

4.9.1 Extração do ácido ribonucléico (RNA)

Fragmentos do tecido cardíaco do ventrículo esquerdo de 6 animais de cada grupo foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em Freezer a -80°C, após eutanásia dos animais. A amostra congelada foi homogeneizada em aparelho Polytron (Ika Ultra Turrax® T25 Basic, Wilmington, NC, USA) após adição de 1 ml de TRIzol® (Invitrogen Brasil, São Paulo) para cada 100 mg de tecido. O TRIzol®, solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, tem como finalidade manter a integridade do RNA durante a lise celular que ocorre no processo de homogeneização.

A amostra homogeneizada foi transferida para um tubo esterilizado de 1,5 mL e incubada à temperatura ambiente durante 5 minutos, para permitir a completa dissociação do complexo núcleo-protéico. Em seguida, adicionou-se clorofórmio (Merck KGaA, Damstadt, Germany) na proporção de 0,2 ml/1ml TRIzol®; a amostra foi agitada, manualmente, com vigor por 15 segundos e incubada por 3 minutos à temperatura ambiente. Após essa segunda incubação, o material foi centrifugado (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Germany) a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Este processo separou a amostra em três fases: a) uma inferior, de fenol-clorofórmio e de coloração rosada, contendo DNA; b) uma interfase branca com proteínas; e c) uma fase superior, aquosa, incolor, contendo RNA.

A porção de RNA foi transferida para um tubo esterilizado de 1,5 mL; a seguir, adicionou-se álcool isopropílico (Merck KGaA, Damstadt, Germany) na proporção de 0,5 ml/1ml de TRIzol®; a amostra foi, então, agitada manualmente 10 vezes por inversão, incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugada a 12.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Após desprezar o sobrenadante, o precipitado de RNA é visualizado como um gel esbranquiçado e semitransparente (*pellet*). Este foi

lavado com álcool etílico 75% (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) na proporção de 1mL/1mL de TRIzol® e centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. Após o álcool etílico ser descartado, o *pellet* foi seco por 10 minutos à temperatura ambiente. O sedimento de RNA foi diluído em 20 µL de água ultrapura e incubado por 10 minutos a 60°C em banho-maria (Fanem 100, São Paulo, Brasil); este procedimento teve como finalidade inativar a possível presença de RNase.

O RNA foi analisado com auxílio de um espectrofotômetro (NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific – Nanodrop Technologies, Inc-www.nanodrop.com). As amostras, cujas razões foram inferiores a 1,6, foram descartadas por apresentarem contaminação por proteínas. A concentração do RNA foi quantificada de acordo com a relação:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times 40 \times 70$$

[RNA] = concentração de RNA (µg/ml)

A_{260} = Absorbância em densidade óptica em 260 nm

40 = fator de conversão (1 unidade de densidade óptica $\approx$ 40 µg/ml RNA)

70 = fator de diluição

Para verificar a integridade do RNA, amostras de 1 µL do RNA total foram diluídas em 8 µL de água ultrapura e 1 µL de corante (Orange G, Acros Organics, New Jersey, USA), aplicadas em gel de agarose 1% (0,3 g agarose, 30 mL de TAE Buffer 1x, 3 µL de brometo de etídio) e submetidas a uma voltagem de 80 mV (Power Pac Basic™ Bio-Rad, Hercules, CA, USA) por 20 minutos. A integridade do RNA foi constatada pela visualização das bandas de RNA ribossômico, 28S e 18S, e ausência de rastros do RNA no gel. As amostras que se mostraram íntegras foram utilizadas como substrato para a transcrição reversa.

4.9.2- Transcrição reversa do RNA (RT)

Transcrição reversa é um processo que converte as moléculas do RNA em ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA). As amostras do RNA do tecido adiposo foram submetidas à transcrição reversa pela ação da enzima *transcriptase reversa*, utilizando-se o kit *SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR*[®] (Invitrogen, São Paulo, Brasil). As amostras utilizadas no experimento foram incubadas em um termociclador (Mastercycler[®] Gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany). Inicialmente, uma mistura contendo 1000 ng/ μ L de RNA total, 1 μ L de *dNTP mix* 10 mM, 1 μ L de random hexamers (50 ng/ μ L) e 7 μ L de H₂O DEPC (dietil pirocarbonato) foi incubada durante 5 minutos a 65 °C. A seguir, após adição de 9 μ L de uma solução contendo, 2 μ L de tampão RT 10x, 4 μ L de MgCl₂ 25 mM, 2 μ L de DTT 0,1 M e 1 μ L de inibidor de RNase, *RNaseOUT*[®], a mistura foi incubada por 2 minutos a 25°C. Após o acréscimo de 1 μ L da enzima *SuperScript II*[®], procedeu-se a nova incubação por 10, 50 e 15 minutos a 25°C, 42°C e 70°C, respectivamente. Após adição de 1 μ L de RNase H, a solução foi incubada por 20 minutos a 37°C.

Para checar a qualidade da transcrição reversa, foram empregados dois métodos: 1) controle positivo: o kit utilizado contém um RNA transcrito a partir do gene da cloranfenicol acetiltransferase e *primers* controles A e B. Esses primers, na reação em cadeia da polimerase geram um produto de 500 pares de base (pb); 2) controle negativo: para comprovar a ausência de DNA genômico residual, uma amostra de RNA foi submetida à reação de RT, porém, a enzima *SuperScript II*[®] foi substituída por 1 μ L de H₂O DEPC. Esse produto foi utilizado nas reações de PCR e a ausência de DNA genômico residual foi confirmada pela ausência de produtos de amplificação.

4.9.3- PCR em tempo real

O PCR em tempo real foi realizado com ensaios prontos (Applied Biosystems, CA, USA) contendo sonda TaqMan MGB (FAM) e primers específicos. A identificação dos ensaios está apresentada no Quadro 2. O sistema TaqMan utiliza uma sonda fluorescente que permite a detecção de um produto específico da PCR conforme seu acúmulo durante os ciclos da reação. A sonda é constituída por um corante *reporter*

fluorescente na extremidade 5' e um corante *quencher* (silenciador) na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do *quencher* reduz bastante a fluorescência emitida pelo corante *reporter* através da transferência de energia por ressonância de fluorescência. A sonda se anela à seqüência antes dos primers e é clivada por meio da atividade da nuclease 5' da Taq DNA polimerase enquanto o *primer* é estendido. A clivagem da sonda separa o corante *reporter* do corante *quencher*, aumentando o sinal da fluorescência emitida pelo corante *reporter*. A fluorescência foi monitorada em tempo real com um aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems, CA, USA). As amostras foram normalizadas pelo controle interno *Ciclofilina* e a quantificação da expressão realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, conforme manual do fabricante.

Quadro 2. Ensaios utilizados para PCR em Tempo Real (Applied Biosystems, CA, USA)

Gene	Ensaios
Serca	Rn00568762-m1
PLB	Rn01434045-m1
RyR	Rn01470303-m1
Ciclofilina	Rn00690933_m1
TR α	Rn00579692-m1
TR β	Rn00562044-m1
NCX	Rn00570527_m1
Cana L	Rn00709287_m1

4.10- Expressão das proteínas do trânsito de Ca²⁺

4.10.1- Extração das proteínas

Fragmentos do ventrículo esquerdo foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer - 80°C. A amostra congelada foi homogeneizada em aparelho Polytron (Ika Ultra Turrax™ T25 Basic, Wilmington, USA) com tampão de lise hipotônico (fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, sucrose 0,3 M, DTT 0,5 mM, EDTA 1 mM pH 8,0, PMSF 0,3 mM, NaF 10 mM e inibidor de fosfatase). O processo foi realizado três vezes durante 10 segundos a 4°C, com intervalos de 20 segundos. O produto da homogeneização foi centrifugado (Eppendorf 5804R,

Hamburg, Germany) a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante transferido para tubos *eppendorfs* e armazenados em freezer -80°C. A concentração de proteína foi analisada pelo método de Bradford (1976) utilizando as curvas de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão.

4.10.2- Western Blotting

A expressão das proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio miocárdico, ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático (Serca2a), Fosfolambam (PLB), Canal L e trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (NCX) foram analisada por *Western Blot*. Não foi possível a mensuração da proteína rianodina (RyR) por dificuldade de padronização da técnica. As amostras das proteínas foram diluídas em tampão Laemmli (Tris-HCL 240mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e β -mercaptoetanol 200mM) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris-HCL 240mM pH 6,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed) e de resolução (Tris-HCL 240mM pH 8,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed), na concentração de 6 a 10%, dependente do peso molecular da proteína analisada. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) para identificação do tamanho das bandas. A corrida eletroforética foi efetuada a 120V (Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), por aproximadamente 3 horas, com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini-Trans Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). As membranas foram lavadas duas vezes com tampão TBS (Tris-HCL 20mM pH 7,6 e NaCl 137mM). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução a 0,5% de leite em pó desnatado, dissolvido em tampão TBS-T pH 7,4 (Tris-HCL 20mM, NaCl 137mM e detergente Tween 20 0,1%) por 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em solução basal (Tris 1M pH2,8, NaCl 5M e Tween 20) e incubada com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora, sob agitação constante por 12 horas. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal e incubada com o

anticorpo secundário em solução bloqueadora por 2 horas sob agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal. Por fim, a imuno-deteção foi realizada por meio do método de quimiluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ-USA). As membranas de nitrocelulose foram expostas a filmes radiográficos X-Omat AR (Eastman Kodak Co., USA), nos tempos padronizados para cada proteína estudada.

Anticorpos para proteínas reguladoras do trânsito de cálcio

- *Ryanodine Receptor, mouse IgG1* (ABR, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 1:5000.
- *Serca2 ATPase, mouse IgG1* (ABR, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 1: 2500.
- *Phospholamban, mouse IgG2a* (ABR, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 2 µg/ml.
- *Exchanger Na⁺/Ca²⁺, mouse IgG2b* (Upstate, Lake Placid, NY, USA): Concentração recomendada pelo fabricante, 1:2000.
- *Calcium Channel, Voltage Gated Alpha 1C, rabbit* (Chemicon Internacional, Temecula, CA, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 1:100.

Anticorpo de normalização

- *β-actina, Mouse IgG1* (ABR, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 1:1000. (Padronizado em nosso laboratório).

Anticorpos secundários

Os anticorpos secundários, anti-rabbit IgG-HRP SC2004 e anti-mouse IgG-HRp SC2005 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA,USA)

4.10.3- Quantificação das proteínas

As análises quantitativas das bandas foram realizadas pelo programa *Scion Image* (Scion Corporation, Frederick, Maryland, EUA), *software* livre, disponível no endereço <http://www.scioncorp.com/>.

4.11- Análise Estatística

Para as variáveis apresentadas pela média e desvio padrão foi utilizada a técnica da análise de variância ANOVA complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey, (Zar, 1999). As variáveis apresentadas pela mediana e valores mínimos e máximos utilizou-se a ANOVA complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn (Zar, 1999). Todas as comparações foram discutidas no nível de significância de 5%.

5- Resultados

Os resultados abaixo serão apresentados em dois capítulos: Capítulo I: Obesidade e Doses Fisiológica e Suprafisiológica de Hormônio Tireoidiano e Capítulo II: Ratos Obesos Submetidos a Restrição Alimentar Moderada e Doses Fisiológicas e Suprafisiológicas de Hormônio Tireoidiano.

Capítulo I: Obesidade e Doses Fisiológica e Suprafisiológica de Hormônio Tireoidiano

Resumo

Obesidade define-se como uma doença endócrino-metabólica, crônica, heterogênia, caracterizada pelo excesso de gordura no organismo. 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. Estudos clínicos mostram que obesidade está associada à disfunção ventricular, geralmente, diastólica. A relação entre obesidade e o trânsito de Ca^{2+} intracelular tem sido estudada por técnicas de biologia molecular, as quais tornam possível o entendimento dos mecanismos responsáveis pelas alterações no desempenho do miocárdio. Os raros estudos que avaliaram as proteínas envolvidas na homeostase intracelular de Ca^{2+} do miocárdio em modelos experimentais de obesidade, apresentaram resultados divergentes. O trânsito de cálcio intracelular é regulado pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Canal do tipo L do retículo sarcoplasmático (SR), canal rianodina (RyR2), Ca^{2+} bomba ATPase do RS (SERCA), fosfolambam (PLB), e afinidade de miofilamentos pelo Ca^{2+} . Assim, qualquer modificação na expressão dessas proteínas poderiam levar a anormalidades da homeostase Ca^{2+} e, conseqüentemente, disfunção contrátil no tecido cardíaco de ratos. O objetivo deste estudo foi analisar a influência da obesidade com administração de diferentes doses de hormônio tireoidiano na expressão gênica e protéica de proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio cardíaco. Para isto, foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar inicialmente separados randomicamente em dois grupos: Controle (C) e Obeso (OB). O grupo C recebeu uma dieta padrão e os animais OB receberam dieta hiperlipídica por 20 semanas para desenvolver a obesidade. Após esse período os animais OB foram randomizados em grupos obeso (OB), obeso com $0,5\mu\text{g}/100\text{g}$ de T3 (OF), obeso com $25\mu\text{g}/100\text{g}$ de T3 (OS). Após esse período os animais OF e OS foram submetidos ao tratamento com T3 por duas semanas. Ao final do tratamento os animais foram eutanasiados e amostras do tecido ventricular esquerdo foram coletadas para análise da expressão gênica e protéica da PLB usando PCR em tempo real e Western Blot, respectivamente. Os resultados deste estudo mostram que a administração exógena de T3 aumentou os níveis séricos de T3 total e baixou os níveis de T4 livres mostrando a efetividade do tratamento, e diminuiu o peso corporal e índice de adiposidade nos grupos tratados. A administração

de T3 diminuiu a expressão gênica da PLB, Canal L, TR β e TR α nos animais OF e OS, enquanto a expressão de NCX e SERCA foi aumentada apenas nos animais OS em relação a OF e OB. Em relação à expressão protéica, apenas o gene PLB, nos animais alimentados com dieta hiperlipídica, apresentou diminuição nos grupos OF e OS, seguindo o mesmo comportamento da expressão gênica. Dessa forma concluímos que a obesidade e a administração de diferentes doses de hormônio tireoidiano alteram a expressão gênica da SERCA, RyR, Canal L e NCX, porém, não altera a expressão proteica dessas proteínas. A obesidade não altera a expressão gênica e proteica da PLB, porém, as diferentes doses de hormônio tireoidiano diminuem tanto a expressão gênica quanto a proteica.

I. Hipótese

Obesidade associada a doses fisiológicas e suprafisiológicas de hormônio tireoidiano promovem alterações dose dependentes na expressão gênica e proteica das proteínas relacionadas ao trânsito de cálcio cardíaco.

II. Objetivo Específico

O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos de diferentes doses de T3 sobre a expressão gênica e proteica das proteínas relacionadas ao trânsito de cálcio cardíaco em animais obesos.

III. Resultados

i) Constituição dos grupos

No início do estudo, o grupo C foi composto por 15 animais e OB por 57. Após a caracterização, a composição de cada grupo ficou da seguinte forma: 11 ratos no grupo C, 12 ratos nos grupos OB, OF, OS. Ao final do experimento, um animal do grupo OB, um do OF, um do OS foi sorteado aleatoriamente e excluído do estudo para que cada grupo experimental fosse composto por 11 animais (Figura 3).

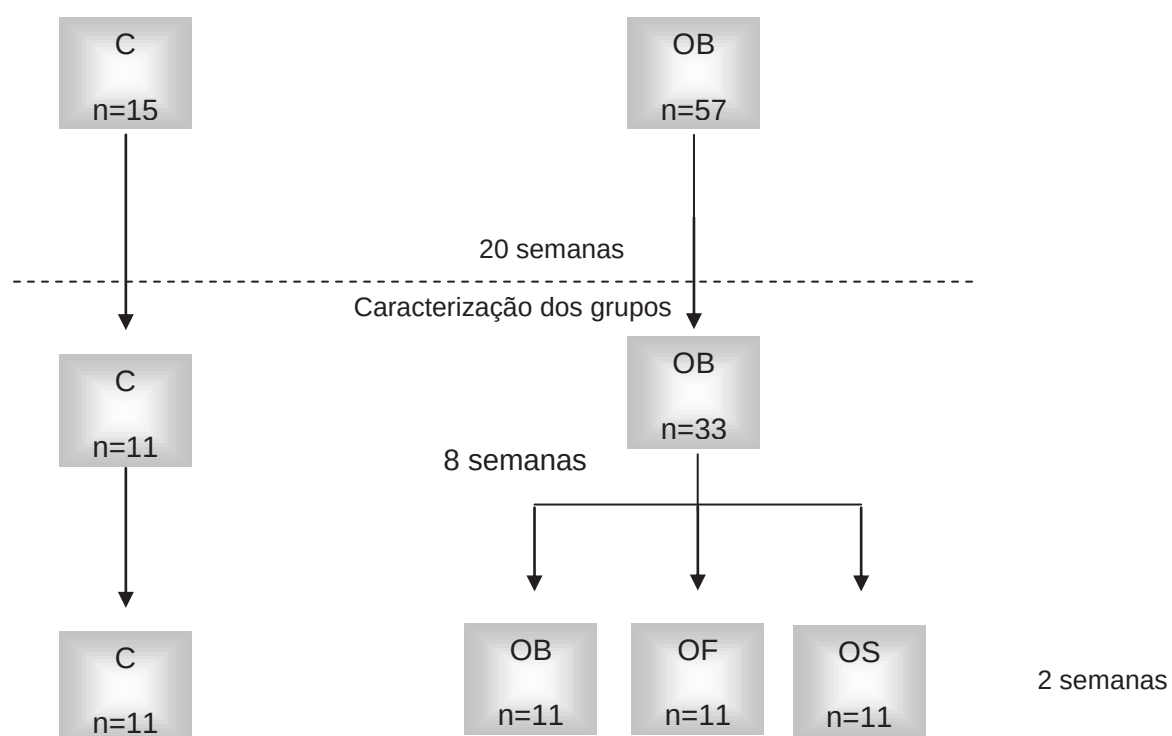


Figura 3. Composição dos grupos após o critério de exclusão. C, controle; OB, obeso; OF, obeso com dose de triiodotironina na concentração de 0,5 $\mu\text{g}/100$ g de peso; OS, obeso com dose de triiodotironina na concentração de 25 $\mu\text{g}/100$ g de peso;

ii) *Evolução de Peso*

A evolução do peso dos animais está representada na figura 4. Os animais que consumiam as dietas hipercalóricas apresentam maior ganho de peso a partir da 12ª semana de experimento. Administração de T3 reduziu o peso corporal nos grupos tratados (OF, OS).

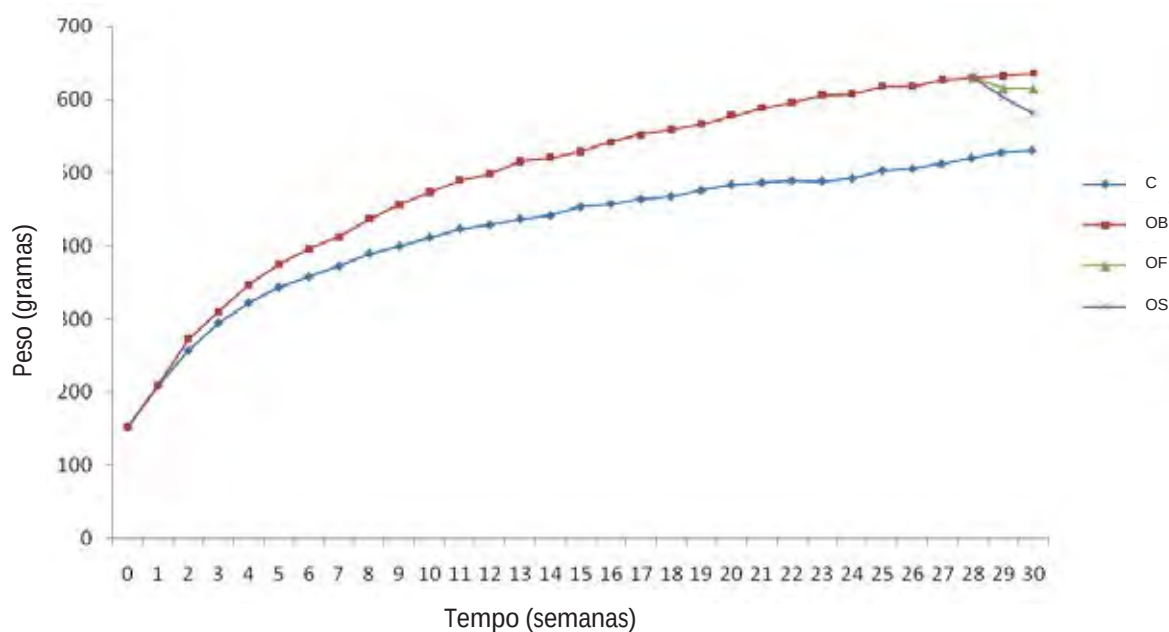


Figura 4. Evolução semanal do peso corporal dos grupos controle (n=11), obeso (OB, n=11), obeso com 25µg/100g de T3 (OS, n=11), obeso com 0,5µg/100g de T3 (OF, n=11). Dados expressos em média.

iii) Dosagens Hormonais

Os níveis séricos de T3 total aumentaram de maneira dose dependente, entretanto apenas a dose suprafisiológica apresentou aumento significativo em relação ao grupo OB. Os níveis de T4 livre diminuíram, seguindo inversamente o comportamento do T3. Os níveis de TSH não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Tabela 1. Dosagem hormonal de triiodotironina (T3), tiroxina (T4) e hormônio estimulador da tireóide (TSH).

Variável	Grupos			
	C	OB	OF	OS
T3	110,5±21,3	111,0±19,4A	179,1±15,2 AB	191,3± 45,9B
T4	0,86±0,103	0,818±0,12B	0,81±0,12 AB	0,31±0,14A
TSH	0,22±0,06	0,17±0,04A	0,19±0,03A	0,22±0,05A

T₃, triiodotironina; T4 tiroxina; TSH hormônio estimulador da tireóide; C, controle; OB, obeso; OF, obeso com 0,5µg/100g de T3; OS, obeso com 25µg/100g de T3 de triiodotironina. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em média ± desvio-padrão. * p<0,05 entre C e OB. Letras iguais = p>0,05.

iv) Características gerais

Todos os animais apresentavam pesos semelhantes no início do estudo. Após o período de indução de obesidade, os animais que consumiram dieta hipercalórica apresentaram peso corporal maior que os animais com dieta normocalórica. Administração das doses de T3 diminuiu o peso de acordo com a dose administrada (Tabela 2)

Tabela 2. Características morfométricas: peso corporal inicial e final, e comprimento naso-anal.

Variável	Grupos			
	Controle	OB	OF	OS
PCI (g)	153,42 ± 7,21	158,4 ± 20,20A	153,9 ± 9,52 A	152,0 ± 9,76 A
PCF (g)	510,09 ± 24,46*	635,8 ± 61,97 B	614,3 ± 61,97AB	581,3 ± 31,98A
CNA (cm)	25,0 ± 1,4	25,4 ± 1,4 A	25,6 ± 1,4 A	25,1 ± 0,8 A

PCI, peso corporal inicial; PCF, peso corporal final; CNA, comprimento naso-anal; C, controle; OB, obeso; OF, obeso com 0,5µg/100g de T3; OS, obeso com 25µg/100g de T3 de triiodotironina. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em média ± desvio-padrão. * p<0,05 entre C e OB. Letras iguais = p>0,05

A Tabela 3 apresenta as características de consumo alimentar (g), ingestão calórica (kg) e eficiência alimentar (EA) não apresentaram diferença estatística entre os grupos. O grupo OB apresenta maior ingestão alimentar em gramas e em calorias relação ao grupo controle. Em relação aos grupos tratados com o hormônio não houve diferença estatística. A eficiência alimentar dos animais OB foi maior que os animais C, OF e OS.

Tabela 3. Características nutricionais: consumo alimentar (g), ingestão calórica (kcal) e eficiência alimentar (EA).

Variável	Grupos			
	Controle	OB	OF	OS
Consumo alimentar(g)	28,0 ± 2,9*	31,5 ± 1,8 A	31,7 ± 2,0 A	31,6 ± 1,7 A
Ingestão(kcal)	82,6 ± 8,6*	115,2 ± 6,5A	115,7 ± 7,5A	115,5 ± 6,2 A
EA (g/kcal)	4,2± 0,5*	4,8 ± 0,6 B	4,2 ± 0,4 A	3,7 ± 0,4 A

EA, eficiência alimentar; C, controle; OB, obeso; OF, obeso com 0,5µg/100g de T3; OS, obeso com 25µg/100g de T3 de triiodotironina. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. * p<0,05 entre C e OB. Letras iguais = p>0,05.

A composição de gordura corporal mostrou aumento significativo em todas as variáveis, exceto índice de Lee, nos animais OB quando comparados aos C. O depósito de gordura epididimal não apresentou diferença estatística quando comparamos OB, OF e OS. Enquanto a gordura retroperitoneal apresentou diminuição apenas no grupo OS. A gordura visceral foi menor no grupo OS quando comparados aos animais OB, não apresentando diferença em relação a OF. O mesmo comportamento foi observado para gordura corporal total e índice de adiposidade, onde apenas OS apresentou diminuição significativa em relação à OB.

Quanto ao índice de Lee, não houve diferença estatística entre os grupos estudados. (Tabela 4)

Tabela 4. Composição de gordura corporal: depósitos de gordura retroperitoneal, epididimal, visceral, total, e índices de adiposidade e de Lee.

Variável	Grupos			
	C	OB	OF	OS
G. Epid	11,0±2,66*	15,87 ± 6,30 A	15,53 ± 3,83 A	14,08 ± 3,05 A
G. Retro	8,63±2,66*	21,65 ± 6,78 B	19,63 ± 7,40 B	14,05 ± 4,19 A
G. Visc.	6,12±1,39*	12,90 ± 5,01 B	11,83 ± 3,35 AB	9,74 ± 2,89 A
G. Total	25,8±5,09*	50,41 ± 16,52 B	46,98 ± 12,50 AB	37,87 ± 8,48 A
I. Adipos.	4,83± 0,72*	7,43 ± 1,53 B	7,37 ± 1,53 AB	6,20 ± 0,92 A
I. Lee	0,67±0,01	0,63 ± 0,03 A	0,63 ± 0,03 A	0,64 ± 0,02 A

T₃, triiodotironina; G. Epid, gordura epididimal; G. Retro, gordura retroperitoneal; G. Visc., gordura visceral; G. Total, gordura corporal total; I. Adipos., índice de adiposidade; I. Lee, índice de Lee; C, controle; OB, obeso; OF, obeso com 0,5µg/100g de T₃; OS, obeso com 25µg/100g de T₃ de triiodotironina. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em média ± desvio-padrão. * p<0,05 entre C e OB. Letras iguais = p>0,05.

v) Análise Bioquímica

A Tabela 5 apresenta valores para glicose, colesterol total (COL), triglicérides (TG), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL). Os níveis de glicose, TG e HDL, não apresentaram diferença estatística entre os grupos. Para colesterol total, foi maior nos Ob em relação ao C e houve diminuição significativa no grupo OS quando comparado ao OB. Os níveis de LDL foram significativamente diminuídos no grupo OS em relação à OB e OF.

Tabela 5. Análise bioquímica: glicose, colesterol total, triglicérides, HDL e LDL.

Variável	Grupos			
	C	OB	OF	OS
Glicose	163,9 ± 41,1	177,7 ± 38,9 A	175,5 ± 37,8 A	158,3 ± 33,6 A
COL	53,9±8,5*	68,0±11,3 B	62,8±8,5 AB	54,2±10,4 A
TG●	53,0(38,0;89,0)	83,0(37,0;131,0)A	82,5(35,0;130)A	93,5(63,0;219,0)A
HDL	26,1±6,2	29,8±9,1 A	32,1±4,0 A	30,9±9,9 A
LDL	8,7±1,9	10,8±2,7 B	12,1±2,8 B	6,4±1,7 A

T₃, triiodotironina; COL, colesterol total; TG, triglicérides; HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade; C, controle; OB, obeso; OF, obeso com 0,5µg/100g de T₃; OS, obeso com 25µg/100g de T₃ de triiodotironina. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em média ± desvio-padrão, ●mediana(valor máximo; valor mínimo) * p<0,05 entre C e OB. Letras iguais = p>0,05.

vi) Expressão gênica e protéica

Para verificação da expressão gênica, por PCR quantitativo, foi utilizado amostra de 6 animais por grupo (a qualidade da extração de RNA e visualização em gel de agarose 1% para todos os grupos estão apresentadas na seção apêndice – A2). As amostras foram normalizadas pelo controle interno (ciclofilina) e o grupo C foi normalizado para 1.

Para a expressão gênica da PLB (figura 5), Canal L (figura 12), $TR\beta$ (figura 20) e $TR\alpha$ (figura 22) houve diminuição nos grupos OF e OS em relação a OB. A expressão gênica de Serca2a e $TR\alpha$ apresentou aumento no grupo OB em relação ao C. E a dose suprafisiológica de hormônio tireoidiano aumentaram a expressão da Serca2a (figura 8) em relação à OB e OF. Em relação ao gene NCX (figura 15) houve aumento no OS em relação ao OB. Não houve diferença estatística entre os grupos na expressão gênica da RyR (figura 18).

Em relação à tradução das proteínas não houve alteração nos níveis de expressão da Serca2a (figura 10), nas razões Serca2a/PLB (figura 11), Canal L (figura 14) e NCX (figura 17) e não houve diferença estatística entre os grupos estudados. Na figura 7 mostra que houve diminuição significativa da expressão PLB em OS em relação à OB para a banda de 25 kdal. Para a proteína RYR não foi possível ser feita a análise da expressão pela dificuldade de padronização da técnica.

Abaixo estão apresentados as curvas de amplificação para PLB (figuras 5), Serca2a (figura 9), Canal L (figura 13), NCX (figura 16), RyR (figura 19), $TR\beta$ (figura 21) e $TR\alpha$ (figura 23).

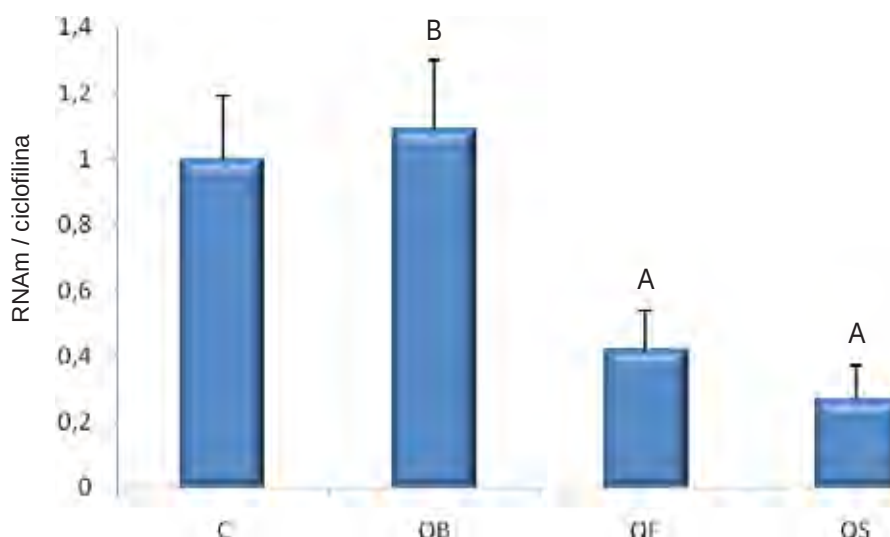


Figura 5. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão gênica da PLB no tecido cardíaco. C, controle; OB, obeso; OF, obeso com dose fisiológica de T_3 ; OS, obeso com dose suprafisiológica de T_3 . O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em médias. * $p < 0,05$ entre C e OB. Letras iguais = $p > 0,05$.

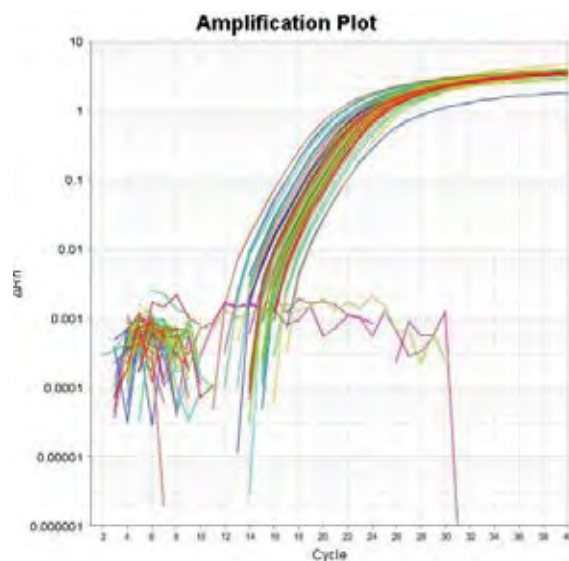


Figura 6. Curva de visualização do experimento de PCR em tempo real para o gene PLB.

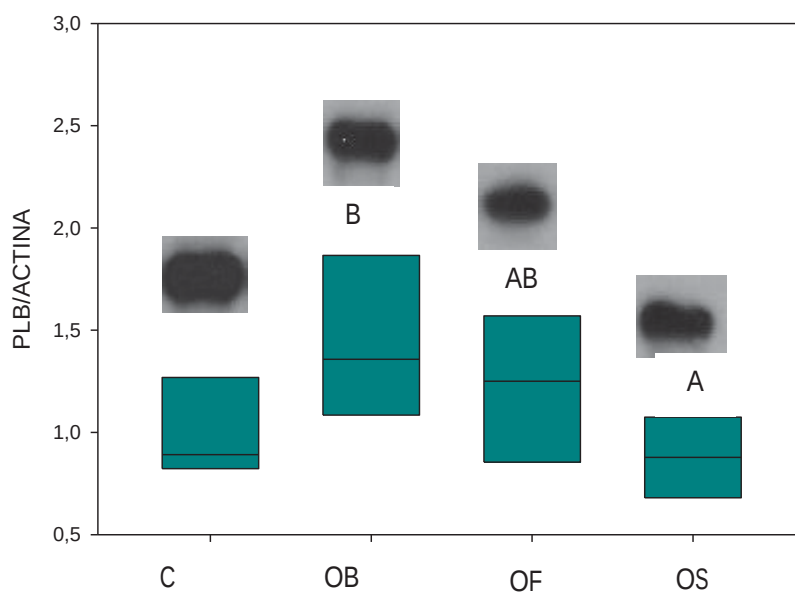


Figura 7. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão protéica da PLB no tecido cardíaco. C, controle; OB, obeso; OF, obeso com dose fisiológica de T_3 ; OS, obeso com dose supra-fisiológica de T_3 . O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Dados expressos em mediana (valor máximo, valor mínimo). * $p < 0,05$ entre C e OB. Letras iguais = $p > 0,05$.

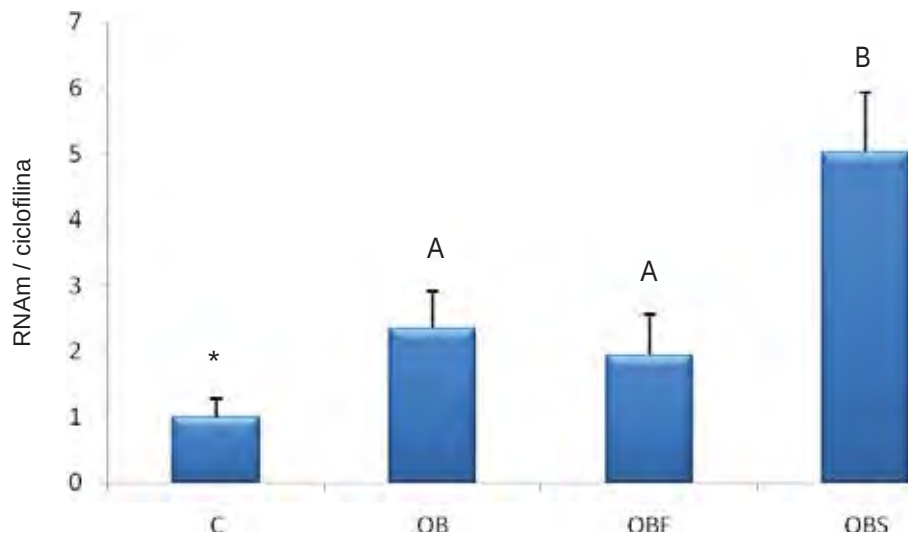


Figura 8. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão gênica da Serca2a no tecido cardíaco. C, controle; OB, obeso; OF, obeso com dose fisiológica de T_3 ; OBS, obeso com dose supra-fisiológica de T_3 . O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em médias. * $p < 0,05$ entre C e OB. Letras iguais = $p > 0,05$.

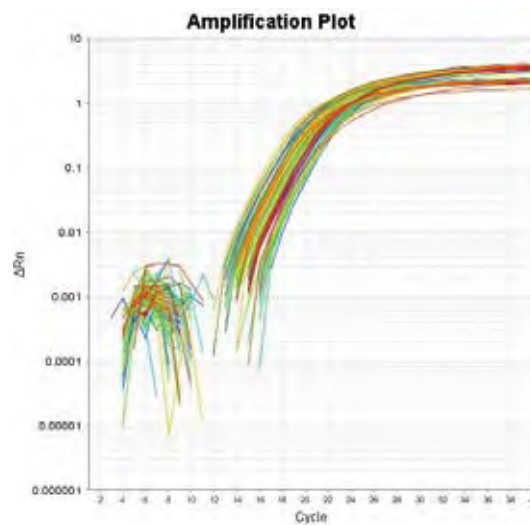


Figura 9. Curva de visualização do experimento de PCR em tempo real para o gene Serca2a.

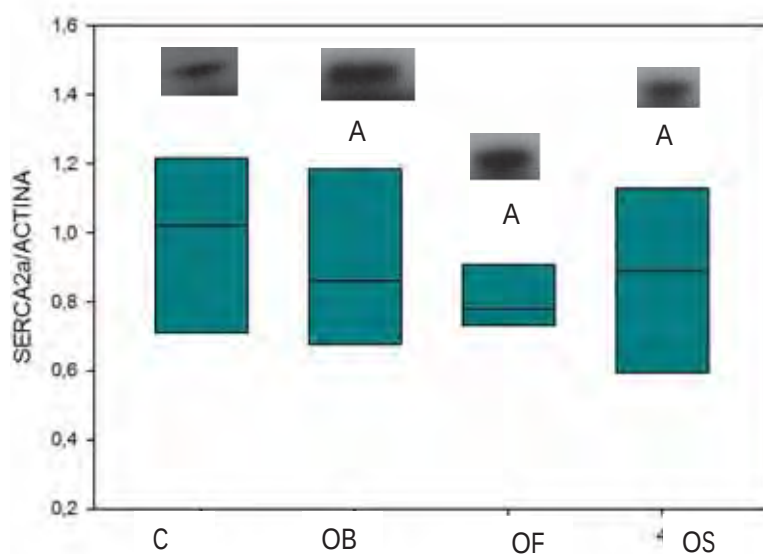


Figura 10. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão protéica da Serca2a no tecido cardíaco. C, controle; OB, obeso; OF, obeso com dose fisiológica de T_3 ; OBS, obeso com dose suprafisiológica de T_3 . O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Dunn. Dados expressos em mediana (valor máximo, valor mínimo). * $p < 0,05$ entre C e OB. Letras iguais = $p > 0,05$.

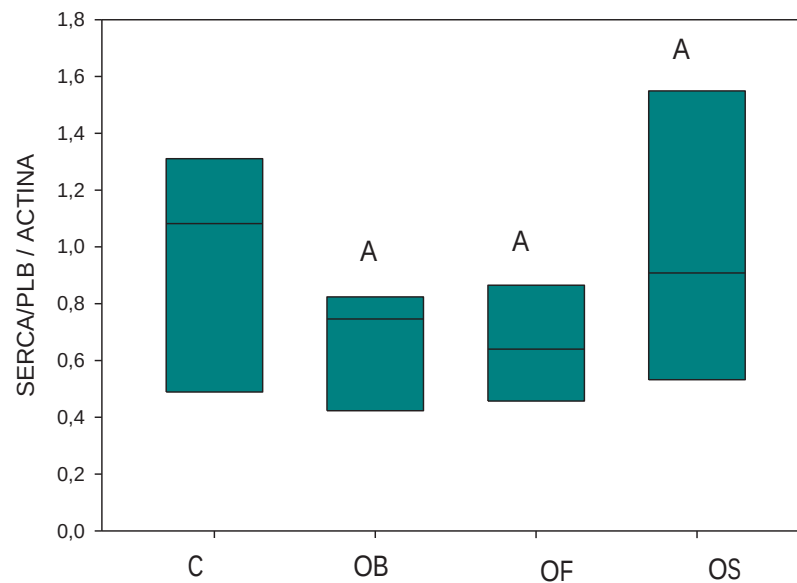


Figura 11. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão protéica na relação Serca2a/PLB no tecido cardíaco. C, controle; OB, obeso; OF, obeso com dose fisiológica de T_3 ; OBS, obeso com dose suprafisiológica de T_3 . O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Dados expressos em mediana (valor máximo, valor mínimo). * $p < 0,05$ entre C e OB. Letras iguais = $p > 0,05$.

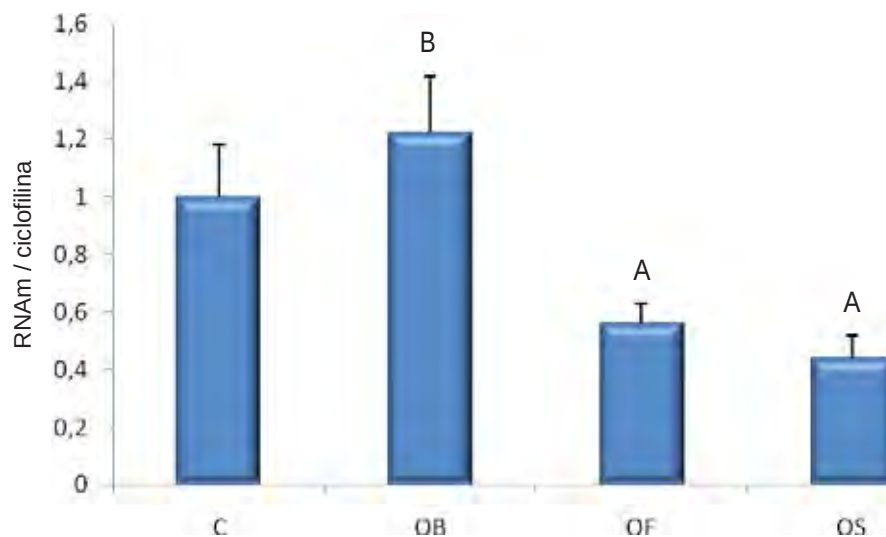


Figura 12. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão gênica da Canal L no tecido cardíaco. C, controle; OB, obeso; OF, obeso com dose fisiológica de T_3 ; OBS, obeso com dose suprafisiológica de T_3 . O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em médias. * $p < 0,05$ entre C e OB. Letras iguais = $p > 0,05$.

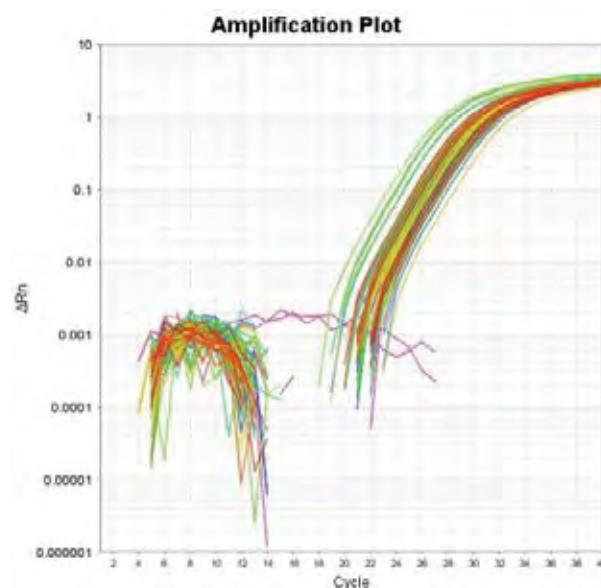


Figura 13. Curva de visualização do experimento de PCR em tempo real para o gene Canal L.

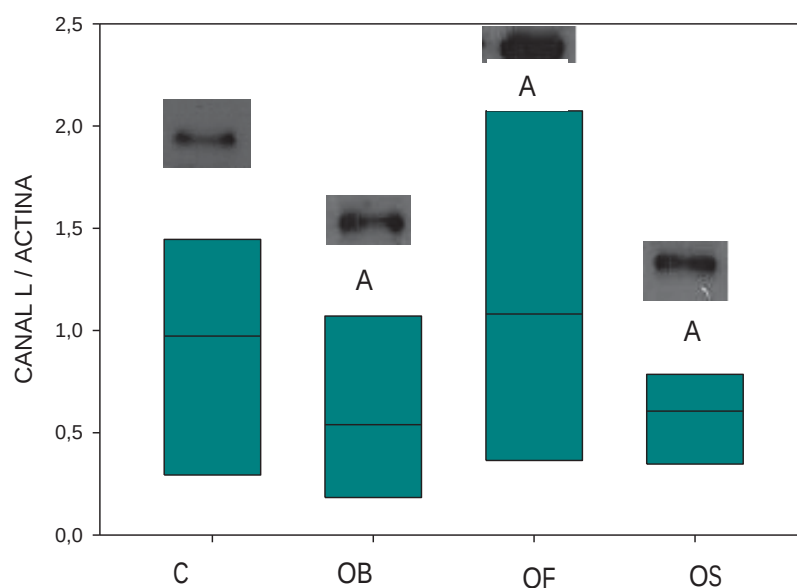


Figura 14. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão protéica do Canal L no tecido cardíaco. C, controle; OB, obeso; OF, obeso com dose fisiológica de T_3 ; OS, obeso com dose supra-fisiológica de T_3 . O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Dados expressos em mediana (valor máximo, valor mínimo). * $p < 0,05$ entre C e OB. Letras iguais = $p > 0,05$.

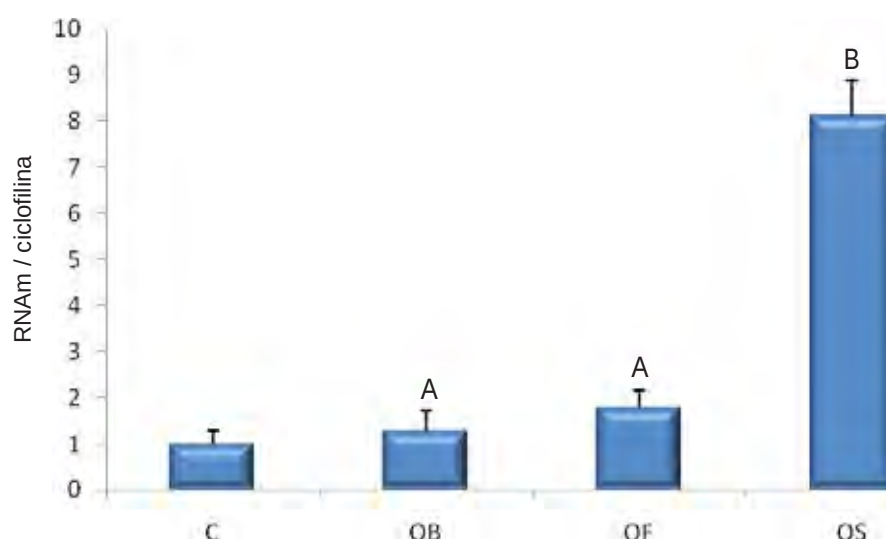


Figura 15. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão gênica da NCX no tecido cardíaco. C, controle; OB, obeso; OF, obeso com dose fisiológica de T_3 ; OS, obeso com dose supra-fisiológica de T_3 . O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em médias. * $p < 0,05$ entre C e OB. Letras iguais = $p > 0,05$.

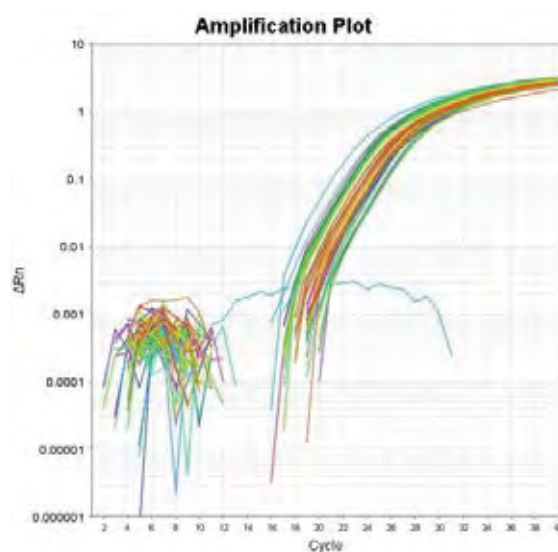


Figura 16. Curva de visualização do experimento de PCR em tempo real para o gene NCX.

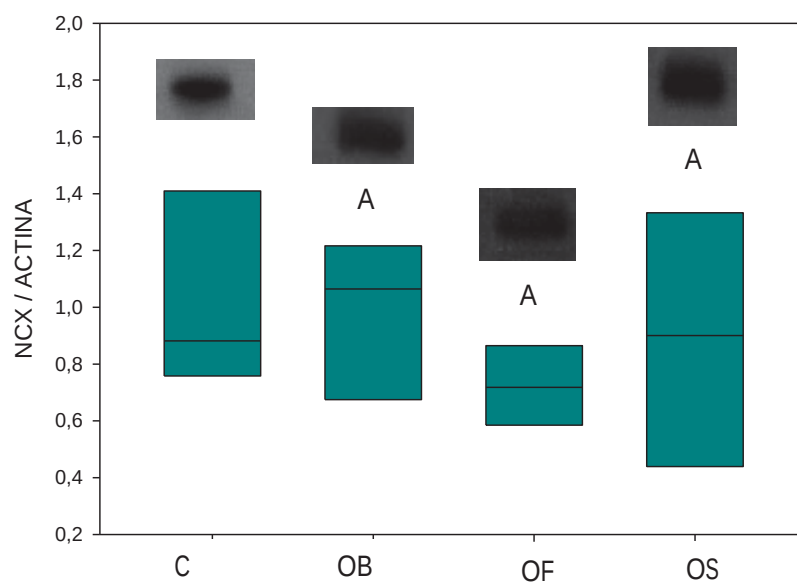


Figura 17. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão protéica do NCX no tecido cardíaco. C, controle; OB, obeso; OF, obeso com dose fisiológica de T_3 ; OBS, obeso com dose suprafisiológica de T_3 . O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Dados expressos em mediana (valor máximo, valor mínimo). * $p < 0,05$ entre C e OB. Letras iguais = $p > 0,05$.

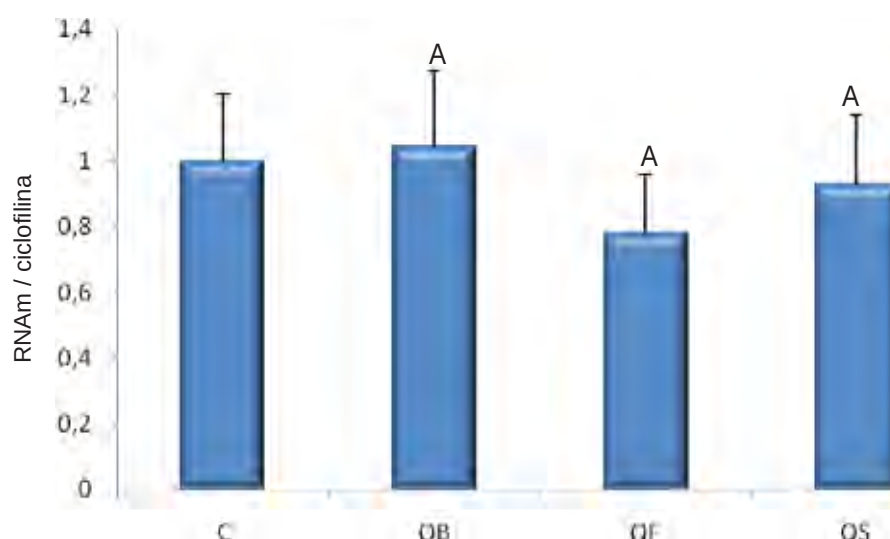


Figura 18. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão gênica da RyR no tecido cardíaco. C, controle; OB, obeso; OF, obeso com dose fisiológica de T_3 ; OBS, obeso com dose supra-fisiológica de T_3 . O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em médias. * $p < 0,05$ entre C e OB. Letras iguais = $p > 0,05$.

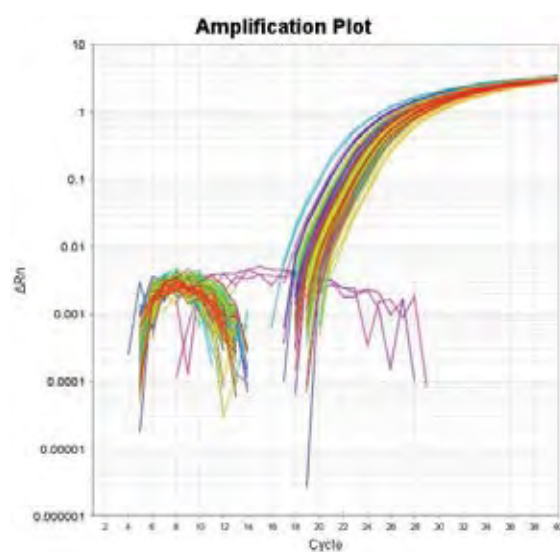


Figura 19. Curva de visualização do experimento de PCR em tempo real para o gene RyR

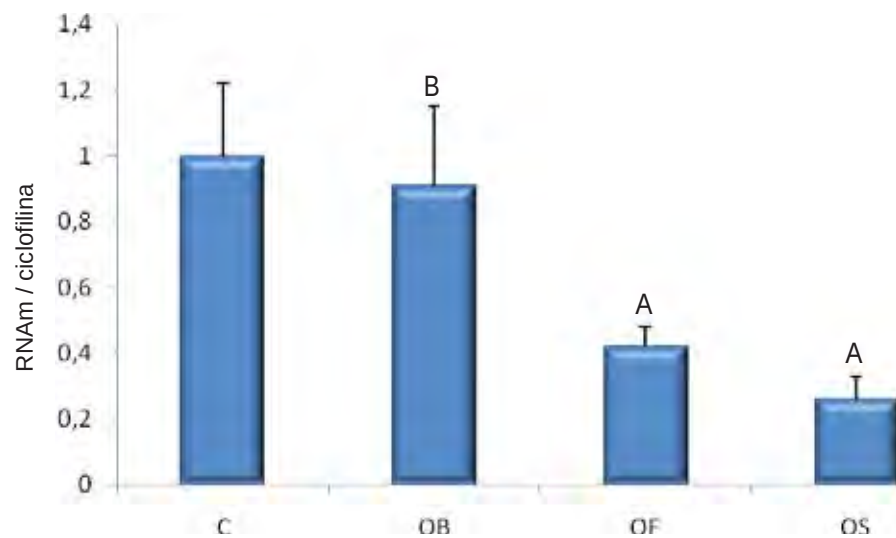


Figura 20. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão gênica da $TR\beta$ no tecido cardíaco. C, controle; OB, obeso; OF, obeso com dose fisiológica de T_3 ; OBS, obeso com dose suprafisiológica de T_3 ; ORC, obeso submetido à restrição calórica; ORF, obeso submetido a restrição calórica e dose fisiológica de T_3 ; O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em médias. * $p < 0,05$ entre C e OB. Letras iguais = $p > 0,05$.

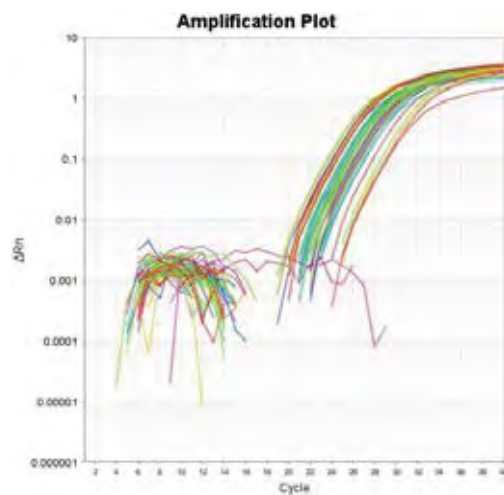


Figura 21. Curva de visualização do experimento de PCR em tempo real para o gene $TR\beta$.

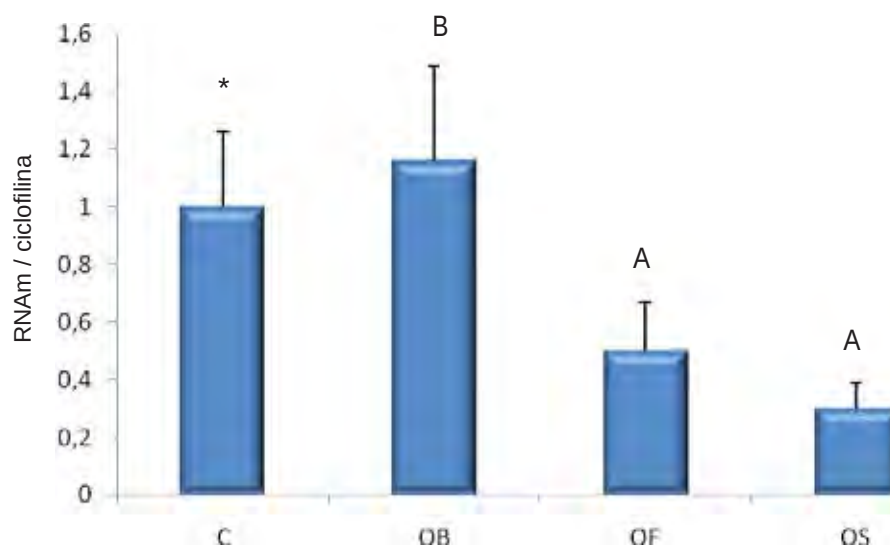


Figura 22. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão gênica da $TR\alpha$ no tecido cardíaco. C, controle; OB, obeso; OF, obeso com dose fisiológica de T_3 ; OBS, obeso com dose suprafisiológica de T_3 . O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em médias. * $p < 0,05$ entre C e OB. Letras iguais = $p > 0,05$.

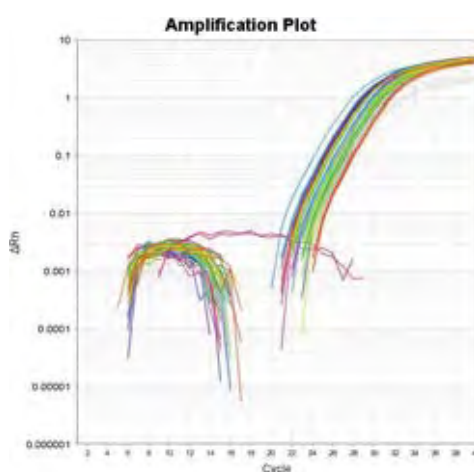


Figura 23. Curva de visualização do experimento de PCR em tempo real para o gene $TR\alpha$.

IV- Discussão

A relação entre a obesidade e o efeito de diferentes doses de hormônio tireoidiano sobre o trânsito de cálcio cardíaco ainda é controverso e não foi totalmente esclarecido. A obesidade é definida como um acúmulo excessivo de gordura corporal que deriva de um desequilíbrio crônico entre a energia ingerida e a energia gasta (Marques-Lopes et al, 2004). É considerado um problema de saúde mundial e sua prevalência está aumentando progressivamente em todo o mundo (Sokol, 2000).

Neste estudo, a dieta hipercalórica rica em ácidos graxos insaturados foi efetiva para o ganho de peso dos animais em relação aos animais tratados com dieta normocalórica, estando de acordo com outros estudos da literatura e do nosso grupo (Fitzgerald, 2001; Nascimento et al, 2008). Entretanto, alguns erros na classificação podem ocorrer em modelos experimentais de obesidade induzida por dieta, pois, ratos submetidos à dieta normocalórica e hipercalórica podem apresentar respostas semelhantes, assim os animais submetidos à dieta normocalórica podem ser classificados como controle, quando na realidade, exibem respostas semelhantes aos animais que se tornaram obesos pela dieta hipercalórica, ou vice e versa. Por este motivo, foi estabelecido um critério que possibilita a separação dos animais em controles e obesos. Recente estudo em nosso laboratório mostrou que o melhor indicador de obesidade é a índice de adiposidade corporal. Entretanto, foi demonstrado que o peso corporal, avaliado *in vivo*, apresenta boa correlação com o índice de adiposidade (Nascimento et al, 2008).

Os resultados desse estudo mostram que a administração de T3 foi efetiva, aumentando a concentração sérica de T3 de maneira dose dependente, e diminuindo a concentração de T4 da mesma maneira, portanto a administração exógena de T3 suprimiu a produção de T4 pela tireóide (Zabrocka et al, 2006). Porém as concentrações do TSH se mantiveram, talvez pelo curto período, de duas semanas, que não foram suficientes para alterar as concentrações do TSH.

Verificamos aumento na expressão do TR α nos animais OB em relação ao C no tecido cardíaco e esse dado não está associado à variação nas concentrações dos hormônios tireoidianos nesses animais, porém não encontramos na literatura trabalhos que mostram alterações na expressão do TR α na obesidade. Por outro lado a administração do hormônio tireoideano diminuiu a expressão tanto na dose fisiológica quanto na suprafisiológica do TR α e do TR β (Yen, 2007), demonstrando *down-regulation* dos receptores de hormônio tireoidiano provocada pelo excesso de hormônio

circulante. Esses dados ajudam a comprovar a eficácia do tratamento hormonal no experimento.

As dietas hipercalóricas utilizadas nos animais OB induziram ganho de peso e adiposidade, em relação ao grupo C (Krotkiewski, 2002; Elliott et al, 2004; Dourmashkin et al, 2005). Em relação ao tratamento com T3, apenas a dose suprafisiológica diminuiu estatisticamente o peso e adiposidade nos animais.

Estudos experimentais mostram que dietas ricas em gorduras promovem a obesidade em ratos (Minatoya et al, 2007). Os animais OB, OF e OS não apresentaram diferenças no consumo alimentar e na eficiência alimentar. Porém houve um aumento da ingestão tanto em calorias quanto em gramas nos animais OB em relação aos animais C, o principal motivo pelo qual os lipídios da dieta podem conduzir a hiperfagia é devido as suas propriedades organolépticas (Prentice, 1998), como alta palatabilidade, textura característica (Rolls & Shide, 1992) e grande utilidade e versatilidade como ingrediente culinário (Pike, 1994).

Nosso estudo mostrou que dietas ricas em ácidos graxos insaturados demonstraram aumento dos depósitos de gordura retroperitoneal, visceral e epididimal em relação ao C. Apenas a dose suprafisiológica de T3 diminuiu de maneira significativa os depósitos de gordura retroperitoneal e visceral, a gordura corporal total e o índice de adiposidade (Cioffi et al, 2010), acompanhando o peso corporal final, onde houve aumento de significativo nos animais tratados com dieta hiperlipídica, e perda de peso significativo conforme a dose de hormônio administrada.

Os níveis glicêmicos de jejum não apresentaram diferenças entre os grupos estudados. Sabe-se que o excesso de hormônio tireoidiano aumenta a glicose plasmática (Duntas, 2002), porém só realizamos a medida da glicemia de jejum, que poderia estar normal, devido à dieta hiperlipídica já que não houve variação desse parâmetro em relação ao controle. O excesso de hormônio tireoidiano poderia influenciar as glicemias pós-prandiais, dados que não avaliamos. Não houve diferença estatística para os níveis de HDL e TG, concordando com alguns autores que mostraram que dietas ricas em gordura insaturada não alteram o perfil lipídico (Tentolouris et al, 2008; Schrawen & Westerterp, 2000), e que o hormônio tireoidiano não influencia os níveis de TG (Estadella et al, 2004). Entretanto os animais do grupo OS apresentaram uma diminuição no colesterol total e LDL em relação a OB. O estado de hipertireoidismo aumenta a excreção de colesterol. Os hormônios tireoidianos podem estimular a enzima hidroximetil glutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima de

biossíntese do colesterol, e induzir o aumento na síntese de colesterol. Entretanto, os níveis séricos de colesterol são diminuídos, principalmente, devido ao aumento simultâneo da degradação de LDL. Além disso, a região promotora do receptor de LDL apresenta elemento responsivo ao hormônio tireoidiano (TER), que permite que o T3 module a expressão gênica do receptor de LDL resultando em um aumento do *clearance* de LDL (Fielding et al, 1995). Assim, a diminuição do colesterol total, provavelmente, foi consequência da diminuição dos níveis de LDL.

Nosso objetivo foi avaliar a influência de diferentes doses de hormônio tireoideano na obesidade sobre o RNAm e suas respectivas proteínas relacionadas ao trânsito de Ca^{2+} no miocárdio. A influência do hormônio tireoideano na função cardíaca é bem documentada, o aumento nos níveis de hormônio tireoideano resulta na melhora da contratilidade cardíaca e o oposto ocorre quando há um quadro de hipotireoidismo. Esta habilidade de regular a função cardíaca possivelmente está relacionada com os efeitos genômicos, por ser um modulador transcricional da miosina e das proteínas reguladoras do cálcio (Carr & Kranias, 2002). Os canais de cálcio são diretamente influenciados pela ação do T3 (Gotzsche, 1994).

O presente estudo demonstrou aumento na expressão gênica de SERCA nos animais OB em relação aos animais controles, porém sem alteração na expressão protéica, como já demonstrado em estudo anterior realizado em nosso laboratório (Lima-Leopoldo et al, 2008). As doses suprafisiológicas de hormônio tireoidiano aumentaram a expressão gênica dessa proteína em relação aos animais OB, sem alterar a expressão protéica, como relatado em outros estudos que mostram aumento da expressão gênica e protéica (Carr & Kranias, 2002; Reed et al, 2000, Hartong et al, 1994) dessas proteínas na presença de hormônio tireoidiano.

A obesidade não alterou a expressão gênica da PLB e as doses fisiológicas e supra-fisiológicas do hormônio tireoidiano diminuíram sua expressão. Essa mesma alteração foi observada em relação a expressão protéica e dose suprafisiológica do hormônio tireoidiano, porém esse aumento não foi visualizado na relação SERCA/PLB.

Estudos sugerem que a PLB regula a SERCA pela alta afinidade com o Ca^{2+} , e que o aumento da relação PLB/SERCA resulta na maior inibição da SERCA com isso uma menor contratilidade cardíaca, portanto sugerimos, em nosso estudo, que a contratilidade cardíaca possivelmente não foi prejudicada, já que não houve alteração da relação SERCA/PLB. (Periasamy et al, 2008)

Em relação ao NCX observamos aumento na expressão gênica apenas na dose suprafisiológica de T3 administrada por duas semanas, sem alterações na expressão protéica. Outros estudos demonstram que a administração de diferentes doses de hormônio tireoideano por seis semanas (Redd et al, 2000) diminui a expressão dessas proteínas (Carr & Kranias, 2002), porém em nosso laboratório foi demonstrado que não houve correlação entre as doses de hormônio, administradas por duas semanas, e essas proteínas do trânsito de cálcio.

A expressão gênica do Canal L não alterou em animais obesos em relação ao controle e diminuiu na presença das doses fisiológicas e suprafisiológicas de T3, porém não houve alteração na expressão protéica dessas proteínas. Em concordância com os nossos resultados, outro estudo do nosso laboratório já havia demonstrado que a dieta rica em gorduras poliinsaturadas não altera a expressão do Canal L (Leopoldo, 2010).

Portanto, tanto a obesidade como as doses de hormônio tireoideano administrada nesses animais não alteram essas proteínas do trânsito de cálcio. Resultado divergente entre a alteração na expressão gênica sem alteração na proteína, podemos associar à tradução celular. O RNAm é transcrito diretamente a partir do DNA (cadeia de ácido desoxirribonucleico), já as proteínas são sintetizadas nos ribossomos a partir de uma sinalização molecular específica (Alberts et al, 2002). Contudo, o aumento dos níveis de RNAm não necessariamente resulta na elevação da taxa protéica, pois, a eficiência do processo de tradução é regulado pelo comprimento da cauda poli A, que favorece o aumento da concentração local de ribossomos, colaborando para maior tradução de proteínas (Seraphim et al, 2007). Portanto, as diferenças entre as quantidades de RNAm e proteínas, no presente estudo, podem ser associadas ao comprimento da cauda poli A.

Em resumo, nossos estudos demonstram que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica a base de ácidos graxos insaturados não altera a expressão das proteínas do trânsito de cálcio, assim como as doses fisiológicas e suprafisiológicas de hormônio tireoideano também não são alteradas nessas condições.

Sabe-se que o hormônio tireoideano provoca a perda de peso por alterar a massa muscular e danos cardíacos (Biondi et al, 2000). Estudos demonstram que os análogos de T3 provocariam a perda de massa gorda sem agir na musculatura já que esses análogos agem em receptores β do hormônio tireoideano preservando os músculos que são ricos em receptores α . Análogo de hormônio tireoideano tem sido proposto como agente terapêutico seguro já que seus efeitos são insignificantes sobre o metabolismo e

freqüência cardíaca (Dourmashkin et al, 2005). Outras drogas, CG-1 e KB-141, que estão sendo desenvolvidas, são isoformas agonistas do TR β . Estas drogas não estimulam o TR α , protegendo o coração da ação deletéria do hormônio tireoidiano (Cao et al, 2001). Da mesma forma o coração possui mais receptores α e portanto os análogos não causariam elevado dano ao coração. Esse dado da literatura associado a não alteração das proteínas do trânsito de cálcio, demonstrada neste estudo, com o uso de hormônios tireoidianos, sugerem maior segurança do uso desses hormônios frente a uma dieta hiperlipídica com ácidos graxos insaturados.

V- Conclusão

Com esses resultados nossas conclusões foram que:

- A obesidade e a administração de diferentes doses de hormônio tireoidiano alteram a expressão gênica da SERCA, RyR, Canal L e NCX, porém, não altera a expressão dessas proteínas.
- A obesidade não altera a expressão gênica e protéica da PLB, porém, as doses fisiológica e suprafisiológica de hormônio tireoidiano diminuem tanto sua expressão gênica quanto sua expressão protéica.

Capítulo II: Ratos Obesos Submetidos à Restrição Alimentar Moderada e Doses Fisiológicas e Suprafisiológicas de Hormônio Tireoidiano

Resumo

A restrição alimentar é a estratégia mais comum para tratar a obesidade e têm papel central na redução de gordura em indivíduos obesos. Poucos estudos têm analisado os mecanismos moleculares relacionados com o ciclo de Ca^{2+} do miocárdio no coração de animais restritos. O trânsito de cálcio intracelular é regulado pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Canal do tipo L do retículo sarcoplasmático (SR), canal rianodina (RyR2), Ca^{2+} bomba ATPase do RS (SERCA), fosfolamban (PLB), e afinidade de miofilamentos pelo Ca^{2+} . Assim, quaisquer modificações na expressão dessas proteínas poderiam levar a anormalidades da homeostase Ca^{2+} e, conseqüentemente, disfunção contrátil no tecido cardíaco de ratos restrito. Não foram encontrados na literatura estudos que determinam as alterações gênicas e protéicas de proteínas relacionadas ao trânsito de cálcio cardíaco no modelo experimental proposto, bem como a importância da restrição alimentar nestas condições. O objetivo deste estudo foi analisar a influência da obesidade com restrição alimentar e administração de diferentes doses de hormônio tireoidiano na expressão gênica e protéica de proteínas relacionadas ao trânsito de cálcio cardíaco. Para isto, foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar inicialmente separados randomicamente em dois grupos: Controle (C) e Obeso (OB). O grupo C recebeu uma dieta padrão e os animais OB receberam dieta hiperlipídica por 20 semanas para desenvolver a obesidade. Após esse período os animais OB foram randomizados em grupos obeso (OB), obeso submetido à restrição alimentar (ORC), obeso submetido à restrição alimentar com dose de $0,5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ de T3 (ORF), obeso submetido à restrição calórica com dose de $25 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ de T3 (ORS). Os animais restritos receberam 75% da dieta consumida pelos animais do grupo C por oito semanas. Após esse período os animais ORF e ORS foram submetidos ao tratamento com T3 por duas semanas. Ao final do tratamento os animais foram eutanasiados e amostras do tecido ventricular esquerdo foram coletadas para análise da expressão gênica e protéica da PLB usando PCR em tempo real e Western Blot, respectivamente. Os resultados deste estudo mostram que a administração exógena de T3 aumentou os níveis séricos de T3 total e baixou os níveis de T4 livres mostrando a efetividade do tratamento, e diminuiu o peso corporal e índice de adiposidade nos grupos tratados. A expressão gênica de PLB diminuiu no grupo restrito em relação ao grupo obeso e o TRP

não apresentou diferença entre esses dois grupos. Porém a expressão gênica dessas duas proteínas apresentaram diminuição com as doses administradas de hormônio.

Para os genes SERCA e Canal L houve diminuição da sua expressão nos animais restritos em relação aos animais obesos e houve aumento da expressão de maneira dose dependente para a SERCA e aumento nas duas doses na expressão do Cana L. A expressão gênica de NCX aumentou no ORC em relação ao obeso e foi diminuída apenas nos animais ORS. A RyR diminuiu em ORC em relação ao OB e não apresentou diferença com as doses hormonais administradas. A restrição alimentar moderada e associada a diferentes doses de hormônio tireoidiano alteram a expressão gênica, porém não alteram a expressão das proteínas responsáveis pelo trânsito de cálcio cardíaco.

I. Hipótese

Restrição alimentar moderada com administração de doses fisiológicas e suprafisiológicas de hormônio tireoidiano promovem alterações dose dependentes na expressão gênica e protéica das proteínas relacionadas ao trânsito de cálcio cardíaco.

II- Objetivo Específico

O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos de diferentes doses de T3 sobre a expressão gênica e protéica das proteínas relacionadas ao trânsito de cálcio cardíaco em animais obesos submetidos à restrição alimentar.

III- Resultados

i. Constituição dos grupos

No início do estudo, o grupo C foi composto por 15 animais e OB por 57. Após a caracterização, a composição de cada grupo ficou da seguinte forma: 11 ratos no grupo C, ORC e ORF e 12 no ORS. Ao final do experimento, um animal do grupo ORS foi sorteado aleatoriamente e excluído do estudo para que cada grupo experimental fosse composto por 11 animais (Figura 24).

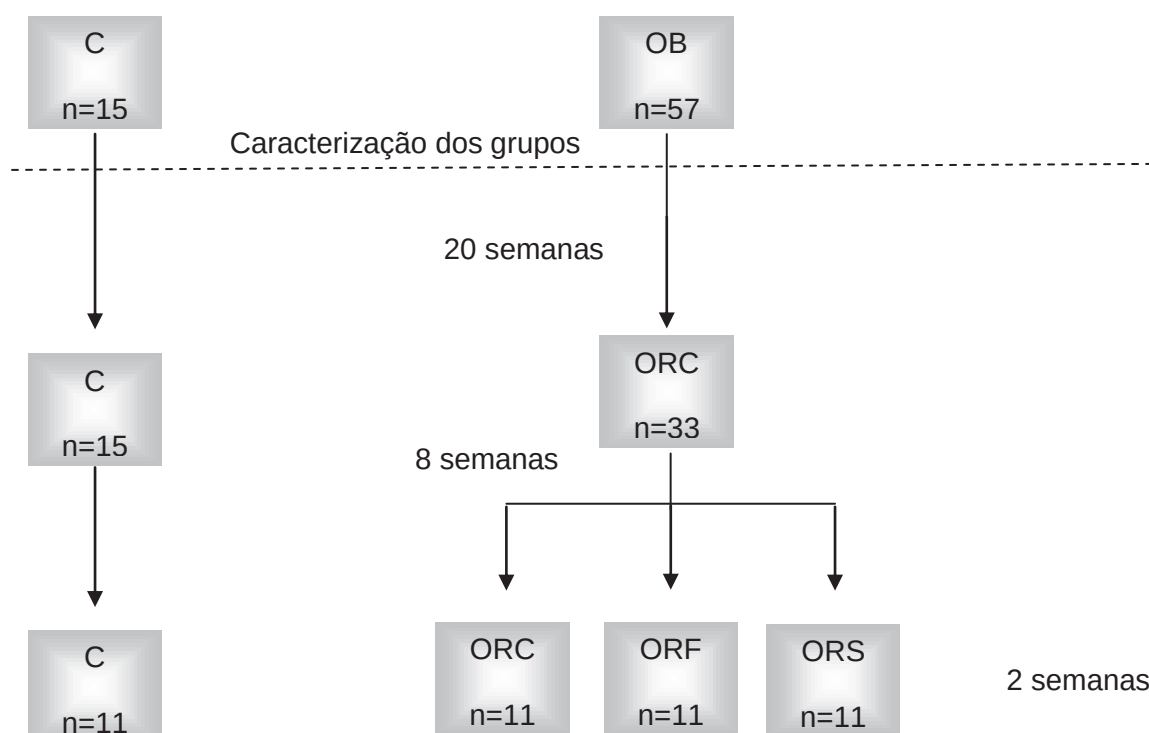


Figura 24. Composição dos grupos após o critério de exclusão. C, controle; OB, obeso, ORC, obeso submetido à restrição calórica; ORF, obeso submetido à restrição calórica com dose de triiodotironina na concentração de 0,5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de peso; ORS, obeso submetido à restrição calórica com dose de triiodotironina na concentração de 25 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de peso.

ii. Evolução de Peso

A evolução do peso dos animais está representada na figura 25. Os animais que consumiam as dietas hipercalóricas apresentaram maior ganho de peso a partir da 12ª semana de experimento. Após a 2ª semana de instauração da restrição alimentar o grupo ORC apresentou peso semelhante ao grupo C. Houve estabilização da perda de peso dos animais ORC a partir da 6ª semana de restrição alimentar. Administração de T3 reduziu o peso corporal dos grupos tratados (ORF e ORS). Os animais controle representados nessa curva não farão parte da análise dos demais resultados apresentados nesse trabalho. Isto porque a restrição de 25% foi instituída após a indução de obesidade, portanto as comparações serão feitas em relação a esse grupo.

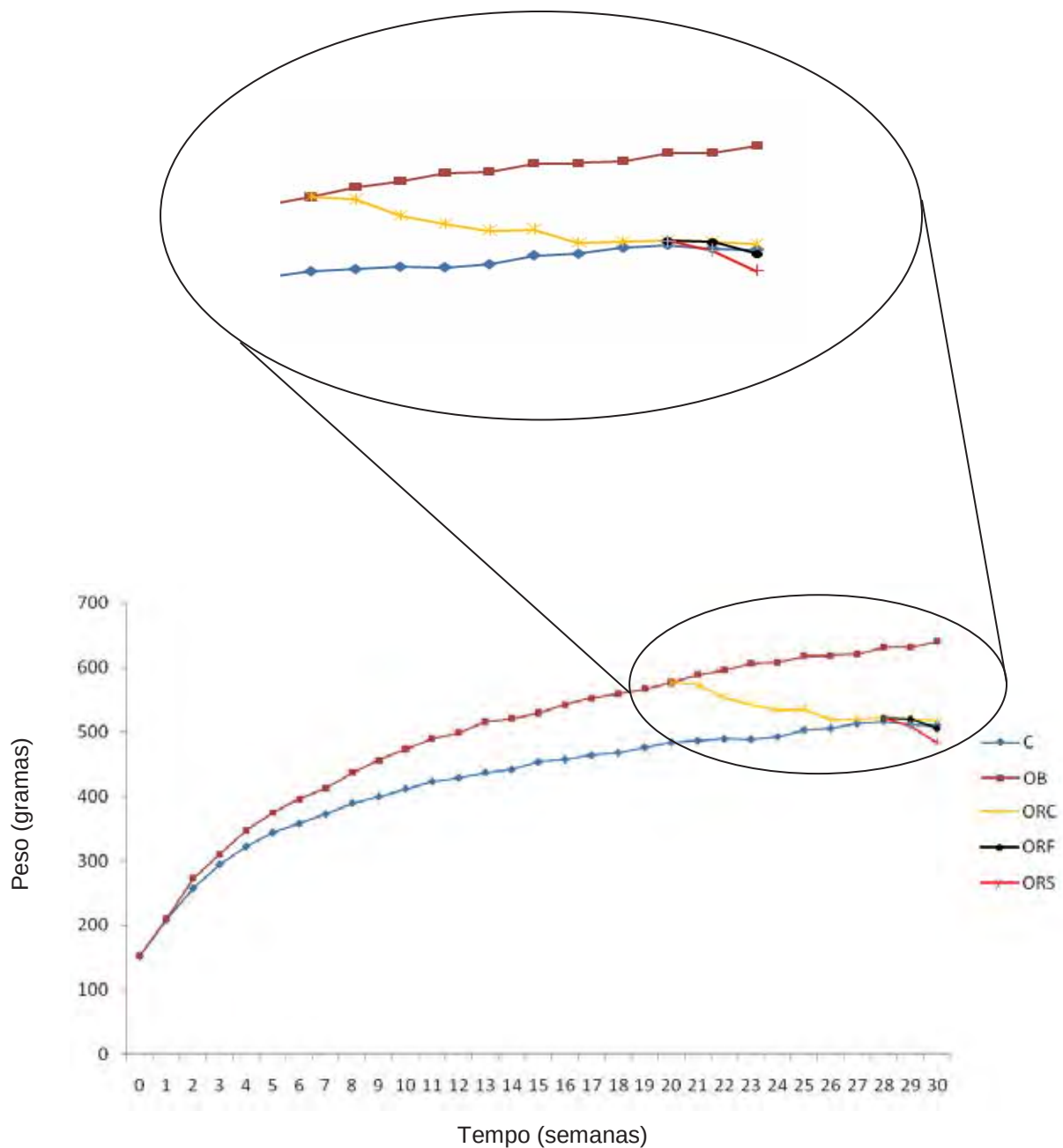


Figura 25. Evolução semanal do peso corporal dos grupos controle (n=11), obeso (Ob, n=11), obeso com restrição calórica (ORC, n=11), obeso com restrição calórica e dose de 25µg/100g de T3 (ORS, n=11) e obeso com restrição calórica e dose 0,5µg/100g de T3 (ORF, n=11). Dados expressos em média.

iii. Dosagens Hormonais

Os níveis séricos de T3 aumentaram de maneira dose dependente, entretanto apenas a dose suprafisiológica apresentou aumento significativo em relação ao grupo ORC, não houve diferença entre os níveis de T3 nos animais ORC em relação aos animais OB. Os níveis de T4 diminuíram, seguindo inversamente o comportamento do T3 e também não se alterou em ORC em relação a OB. Os níveis de TSH não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Tabela 6. Dosagem hormonal de triiodotironina (T3), tiroxina (T4) e hormônio estimulador da tireóide (TSH).

Variável	Grupos			
	OB	ORC	ORF	ORS
T3	111,0±19,4	85,5±50,1A	159,7±21,8AB	281,4±65,3B
T4	0,818±0,12	0,85±0,15B	0,56±0,15AB	0,19±0,04A
TSH	0,17±0,04	0,20±0,05A	0,22±0,05A	0,35±0,12A

T₃, triiodotironina; T₄ tiroxina; TSH hormônio estimulador da tireóide; C, controle; ORC, obesos submetidos à restrição calórica; ORF obesos submetidos à restrição calórica com 0,5µg/100g de T₃; ORS, obeso submetido à restrição calórica com 25µg/100g de triiodotironina. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em média ± desvio-padrão. * p<0,05 entre OB e ORC. Letras iguais = p>0,05.

iv. Características gerais

Todos os animais apresentavam pesos semelhantes no início do estudo. Após o período de restrição alimentar os animais ORC diminuíram significativamente o peso corporal final em relação aos animais OB. A dose administrada de T3 não alterou o peso corporal dos animais em nenhuma das doses administradas. Não houve diferença no comprimento naso-anal entre os grupos estudados. (Tabela 7)

Tabela 7. Características morfométricas: peso corporal inicial e final, e comprimento naso-anal.

Variável	Grupos			
	OB	ORC	ORF	ORS
PCI (g)	158,4 ±20,2	149,84 ±5,13 A	152,84 ±7,19 A	150,97 ±5,66 A
PCF (g)	635,8 ±61,9*	517,78 ± 41,49A	504,96 ±48,18 A	483,92 ± 29,14 A
CNA (cm)	25,4 ± 1,4	25,5 ± 1,5 A	24,7 ± 1,1 A	24,2 ± 1,3 A

T₃, triiodotironina; PCI, peso corporal inicial; PCF, peso corporal final; CNA, comprimento naso-anal; C, controle; ORC, obesos submetidos à restrição calórica; ORF obeso submetidos à restrição calórica com 0,5µg/100g de T3; ORS, obeso submetido à restrição alimentar com 25µg/100g de triiodotironina. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em média ± desvio-padrão. * p<0,05 entre OB e ORC. Letras iguais = p>0,05.

A Tabela 8 apresenta as características de consumo alimentar (g) e em ingestão calórica (kcal) e eficiência alimentar (EA). Não houve diferença estatística entre consumo alimentar e ingestão calórica entre os grupos. A eficiência alimentar dos animais ORS foi menor que dos animais ORC.

Tabela 8. Características nutricionais: consumo alimentar (g), ingestão calórica (kcal) e eficiência alimentar (EA).

Variável	Grupos			
	OB	ORC	ORF	ORS
Consumo alimentar(g)	31,5± 1,8	24,0 ± 0,5A	23,6 ± 1,5 A	24,2 ± 0,7 A
Ingestão(kcal)	115,2±6,5	79,9 ± 2,5 A	77,7 ± 5,5 A	80,0 ±2,5 A
EA	4,8± 0,6	4,6 ± 0,5 B	4,4 ± 0,5 AB	3,9 ± 0,4 A

EA, eficiência alimentar; C, controle; ORC, obesos submetidos à restrição calórica; ORF obesos submetidos à restrição calórica com 0,5µg/100g de T3; ORS, obeso submetido à restrição calórica com 25µg/100g de triiodotironina. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em média ± desvio-padrão. * p<0,05 entre OB e ORC. Letras iguais = p>0,05.

Os depósitos de gordura retroperitoneal, visceral, gordura total e índice de adiposidade diminuíram nos animais ORC em relação aos animais OB. Porém, os depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal, visceral, gordura total, índice de adiposidade e índice de Lee não apresentaram diferença significativa no grupo ORC em relação aos grupos ORF e ORS e estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Composição de gordura corporal: depósitos de gordura retroperitoneal, epididimal, visceral, total, e índices de adiposidade e de Lee.

Variável	Grupos			
	OB	ORC	ORF	ORS
G. Epid	15,8 ± 6,3	8,66 ± 3,16 A	7,47 ± 2,35 A	6,63 ± 2,97 A
G. Retro	21,6 ± 6,7*	7,21 ± 4,48 A	6,49 ± 4,81 A	4,87 ± 3,33 A
G. Visc.	12,9 ± 5,0*	4,66 ± 2,28 A	4,75 ± 2,28 A	3,53 ± 1,56 A
G. Total	50,4 ± 16,5*	20,52 ± 8,69 A	18,71 ± 8,88 A	15,02 ± 7,69 A
I. Adipos.	7,43 ± 1,5*	3,68 ± 1,49 A	3,41 ± 1,68 A	3,06 ± 1,47 A
I. Lee	0,63 ± 0,03	0,662 ± 0,016 A	0,672 ± 0,022 A	0,679 ± 0,019 A

T₃, triiodotironina; G. Epid, gordura epididimal; G. Retro, gordura retroperitoneal; G. Visc., gordura visceral; G. Total, gordura corporal total; I. Adipos., índice de adiposidade; I. Lee, índice de Lee; C, controle; ORC, obesos submetidos à restrição calórica; ORF obesos submetidos à restrição calórica com 0,5µg/100g de T₃; ORS, obeso submetido à restrição calórica com 25µg/100g de triiodotironina. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em média ± desvio-padrão. * p<0,05 entre OB e ORC. Letras iguais = p>0,05.

v. Análise Bioquímica

A Tabela 10 apresenta valores para glicose, colesterol total (COL), triglicérides (TG), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL). Não houve diferença entre OB e ORC para as dosagens bioquímicas. Os níveis de glicose nos animais ORS apresentaram diminuição significativa em relação aos grupos ORC e ORF. Para colesterol total houve diminuição significativa no grupo ORS em relação ao ORC. Os níveis de TG, HDL não apresentaram diferença significativa entre os grupos e LDL apresentou níveis baixos no grupo ORS em relação ao ORF.

Tabela 10. Análise bioquímica: glicose, colesterol total, triglicérides, HDL e LDL.

Variável	Grupos			
	OB	ORC	ORF	ORS
Glicose	177,7±38,9	147,5±39,0 B	152,1±51,1B	103,2± 31,4 A
COL	68,0±11,3	66,4±9,8 B	62,3±9,3 AB	52,0±9,8 A
TG●	83,0(37,0;131,0)	58,0(32,0;153,0)A	64,5(38,0;96,0)A	47,0(38,0;102,0)A
HDL	28,9±9,1	29,6±5,7 A	28,6±4,7 A	29,4±9,9 A
LDL	10,8±2,7	11,3±2,7 AB	12,5±3,0 B	8,3±1,8 A

T₃, triiodotironina; COL, colesterol total; TG, triglicérides; HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade. C, controle; ORC, obesos submetidos à restrição calórica; ORF obesos submetidos à restrição calórica com 0,5µg/100g de T₃; ORS, obeso submetido à restrição calórica com 25µg/100g de triiodotironina. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em média ± desvio-padrão e ● mediana (valor máximo; valor mínimo). * p<0,05 entre OB e ORC. Letras iguais = p>0,05.

vi. Expressão gênica e protéica

Para verificação da expressão gênica, por PCR quantitativo, foi utilizada amostra de 6 animais por grupo (a qualidade da extração de RNA e visualização em gel de agarose 1% para todos os grupos estão apresentadas na seção apêndice – A2). As amostras foram normalizadas pelo controle interno (ciclofilina) e o grupo C foi normalizado para 1. As expressões gênicas da PLB, SERCA, Canal L, NCX, RyR e TR β foram realizadas no tecido cardíaco.

A expressão gênica da PLB (figura 26), SERCA (figura 29), Canal L (figura 33) RyR (figura 39), apresentaram uma diminuição significativa no grupo ORC em relação ao OB. A expressão gênica do NCX (figura 36) apresenta aumento significativo da expressão em relação ao OB. Para a expressão gênica do TR β não há diferença no ORC em relação ao OB. A expressão gênica da PLB e TR β (figura 41) apresentaram diminuição da expressão nas duas doses administradas. Já a SERCA teve seus níveis de expressão aumentados de maneira dose dependente e Canal L sua expressão aumentou nas duas doses administradas. A expressão gênica do NCX apresentou diminuição significativa no grupo ORS em relação à ORC. Não houve diferença estatística entre os grupos com hormônio para a expressão gênica de RyR.

A expressão das proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio intracelular mostra que não houve alteração nos níveis protéicos da PLB (figura 28), Serca2a (figura 31), as razões Serca2a/PLN (figura 32), Canal L (figura 35) e NCX (figura 38) em nenhum dos grupos estudados. Não foi possível a análise da expressão proteína na RYR pela dificuldade de padronização da técnica.

Abaixo estão apresentados as curvas de amplificação para PLN (figura 27), Serca2a (figura 30), Canal L (figura 34), NCX (figura 37), RyR (figura 40), TR β (figura 42).

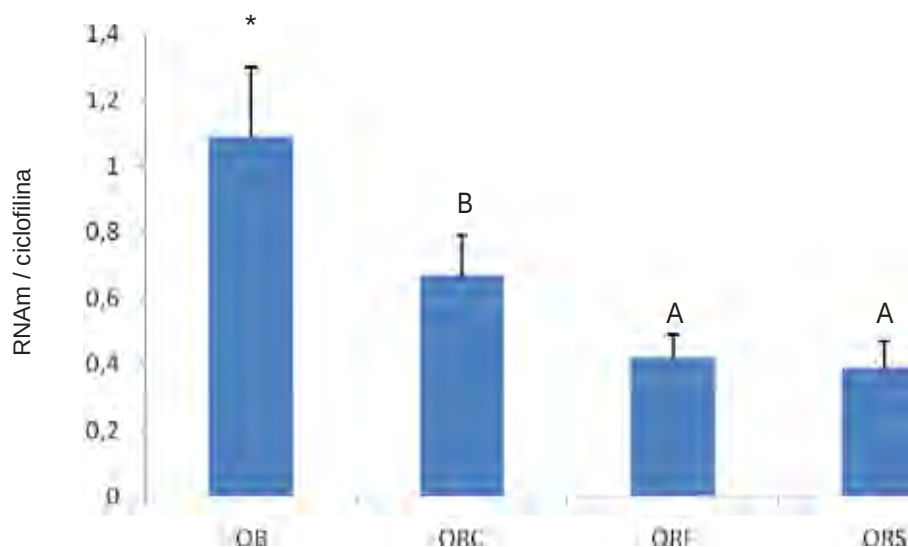


Figura 26. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão gênica da PLB no tecido cardíaco; ORC, obeso submetido à restrição calórica; ORF, obeso submetido a restrição calórica e dose fisiológica de T_3 ; ORS, obeso submetido a restrição caloria e dose suprafisiológica de T_3 ; T_3 , triiodotironina. O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em médias. * $p < 0,05$ entre OB e ORC. Letras iguais = $p > 0,05$.

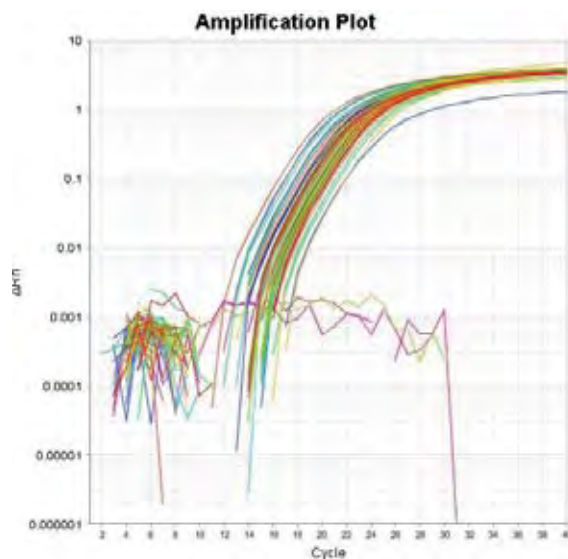


Figura 27. Curva de visualização do experimento de PCR em tempo real para o gene PLB.

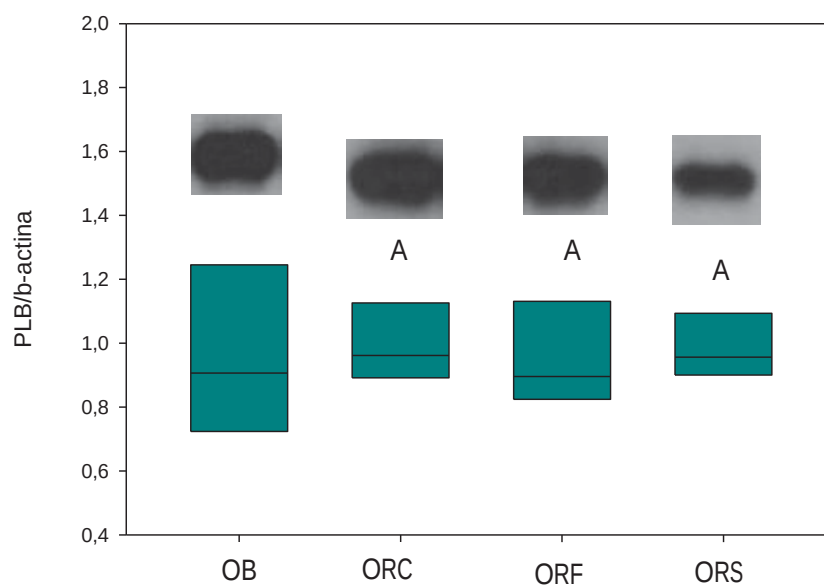


Figura 28. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão protéica da PLB no tecido cardíaco ORC, obeso submetido à restrição calórica; ORF, obeso submetido a restrição calórica e dose fisiológica de T_3 ; ORS, obeso submetido a restrição caloria e dose suprafisiológica de T_3 ; T_3 , triiodotironina. O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Dados expressos em mediana (valor máximo, valor mínimo* $p < 0,05$ entre OB e ORC. Letras iguais = $p > 0,05$).

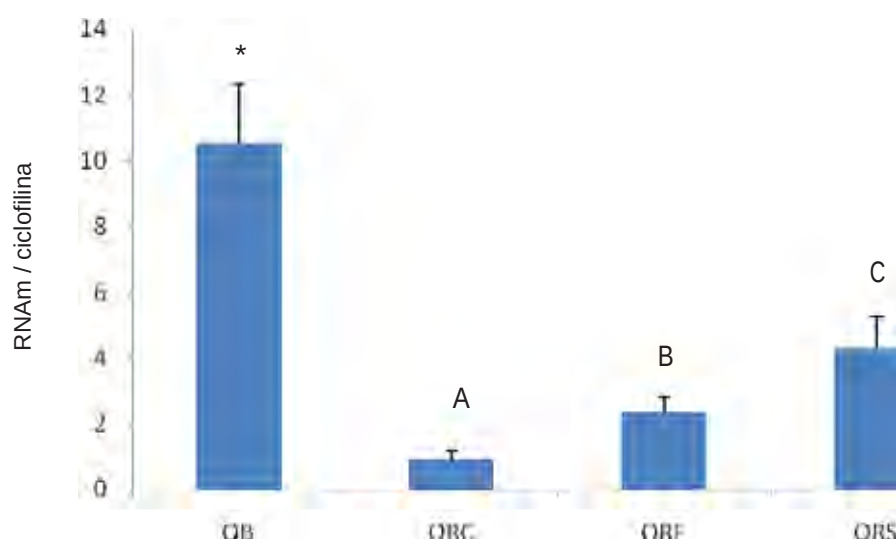


Figura 29. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão gênica da Serca2a no tecido cardíaco. ORC, obeso submetido à restrição calórica; ORF, obeso submetido a restrição calórica e dose fisiológica de T_3 ; ORS, obeso submetido a restrição caloria e dose suprafisiológica de T_3 ; T_3 , triiodotironina. O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em médias. * $p < 0,05$ entre OB e ORC. Letras iguais = $p > 0,05$.

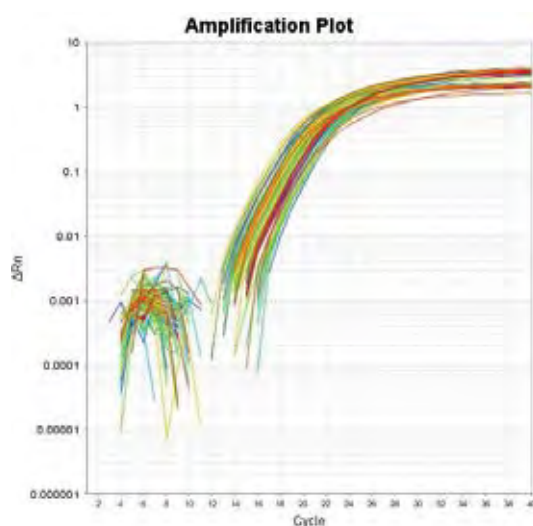


Figura 30. Curva de visualização do experimento de PCR em tempo real para o gene Serca2a.

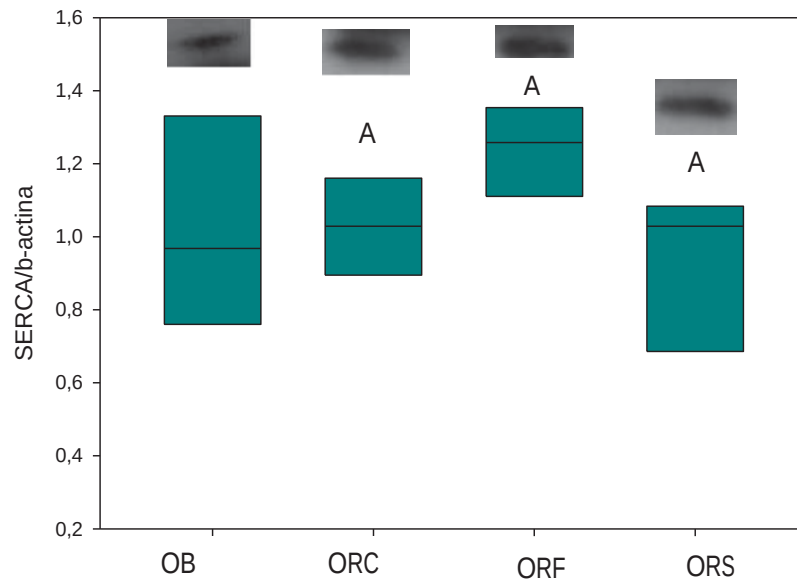


Figura 31. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão protéica da Serca2a no tecido cardíaco. ORC, obeso submetido à restrição calórica; ORF, obeso submetido a restrição calórica e dose fisiológica de T_3 ; ORS, obeso submetido a restrição caloria e dose suprafisiológica de T_3 ; T_3 , triiodotironina. O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Dados expressos em mediana (valor máximo, valor mínimo). * $p < 0,05$ entre OB e ORC. Letras iguais = $p > 0,05$.

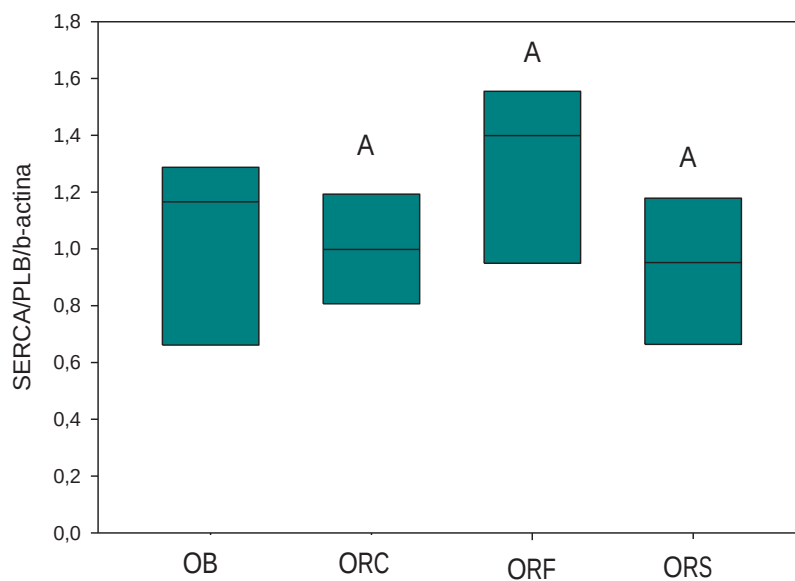


Figura 32. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão protéica na relação Serca2a/PLN no tecido cardíaco. ORC, obeso submetido à restrição calórica; ORF, obeso submetido a restrição calórica e dose fisiológica de T_3 ; ORS, obeso submetido a restrição calórica e dose suprafisiológica de T_3 ; T_3 , triiodotironina. O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Dados expressos em mediana (valor máximo, valor mínimo). * $p < 0,05$ entre OB e ORC. Letras iguais = $p > 0,05$.

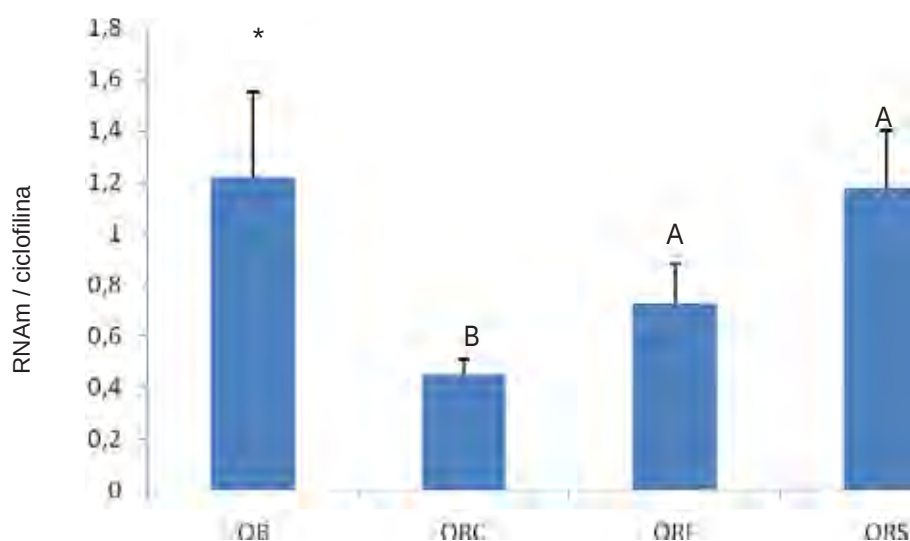


Figura 33. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão gênica da Canal L no tecido cardíaco; ORC, obeso submetido à restrição calórica; ORF, obeso submetido a restrição calórica e dose fisiológica de T_3 ; ORS, obeso submetido a restrição caloria e dose suprafisiológica de T_3 ; T_3 , triiodotironina. O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em médias. * $p < 0,05$ entre OB e ORC. Letras iguais = $p > 0,05$.

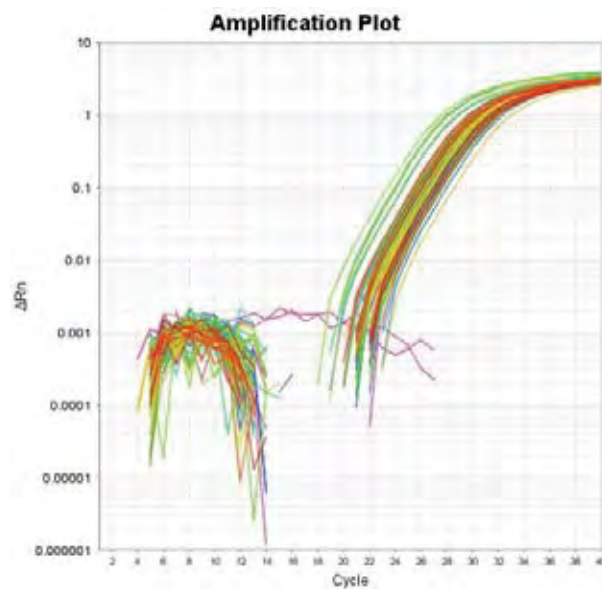


Figura 34. Curva de visualização do experimento de PCR em tempo real para o gene Cana L.

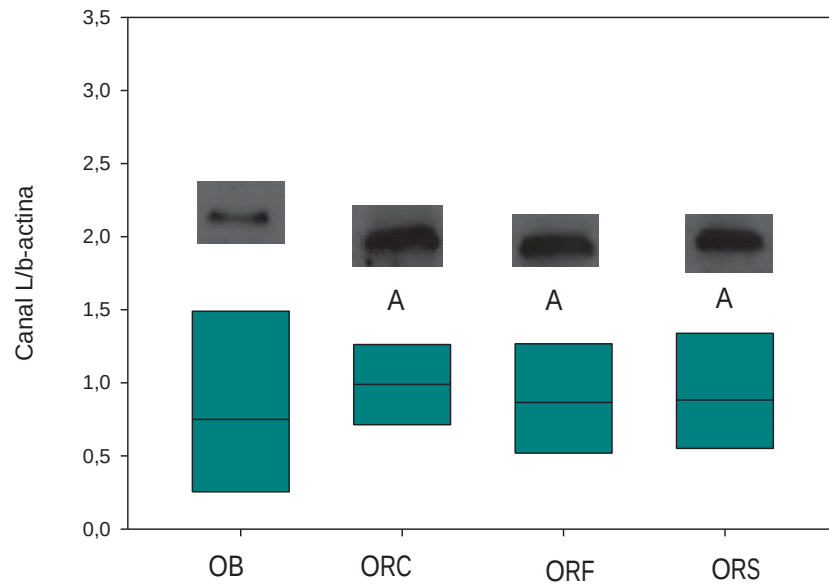


Figura 35. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão protéica do Canal L no tecido cardíaco. ORC, obeso submetido à restrição calórica; ORF, obeso submetido a restrição calórica e dose fisiológica de T_3 ; ORS, obeso submetido a restrição calórica e dose suprafisiológica de T_3 ; T_3 , triiodotironina. O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Dados expressos em mediana (valor máximo, valor mínimo). * $p < 0,05$ entre OB e ORC. Letras iguais = $p > 0,05$.

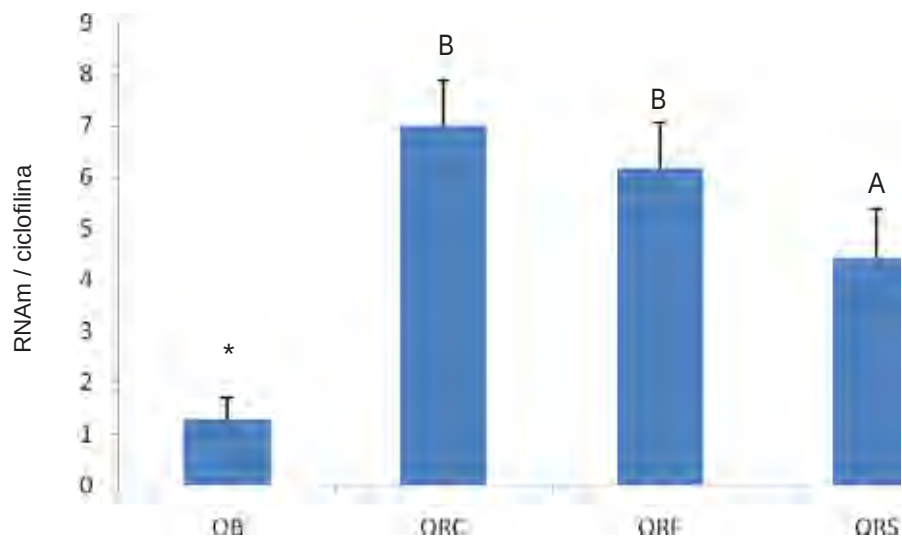


Figura 36. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão gênica da NCX no tecido cardíaco; ORC, obeso submetido à restrição calórica; ORF, obeso submetido à restrição calórica e dose fisiológica de T_3 ; ORS, obeso submetido a restrição calórica e dose suprafisiológica de T_3 ; T_3 , triiodotironina. O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em médias. * $p < 0,05$ entre OB e ORC. Letras iguais = $p > 0,05$.

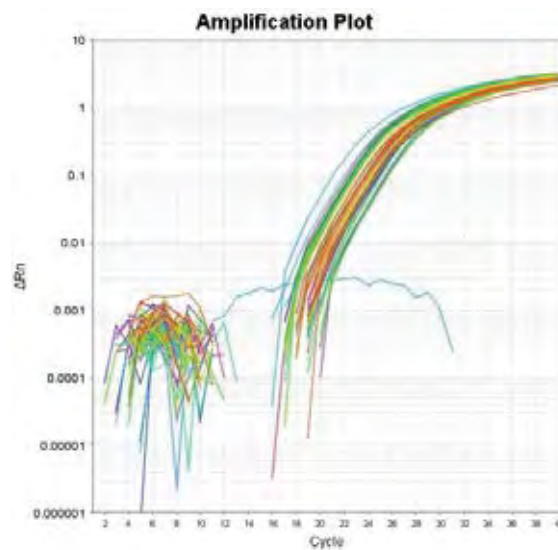


Figura 37. Curva de visualização do experimento de PCR em tempo real para o gene NCX.

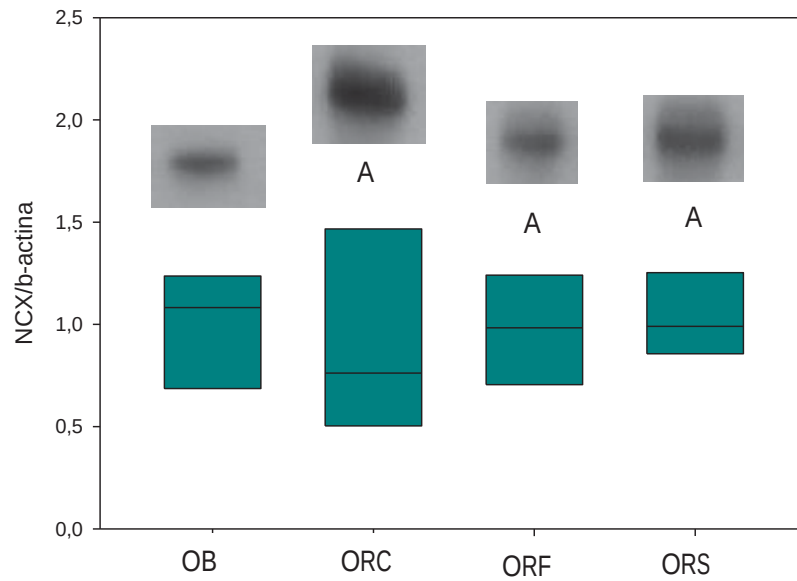


Figura 38. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão protéica do NCX no tecido cardíaco ORC, obeso submetido à restrição calórica; ORF, obeso submetido à restrição calórica e dose fisiológica de T_3 ; ORS, obeso submetido a restrição caloria e dose suprafisiológica de T_3 ; T_3 , triiodotironina. O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Dados expressos em mediana (valor máximo, valor mínimo). * $p < 0,05$ entre OB e ORC. Letras iguais = $p > 0,05$.

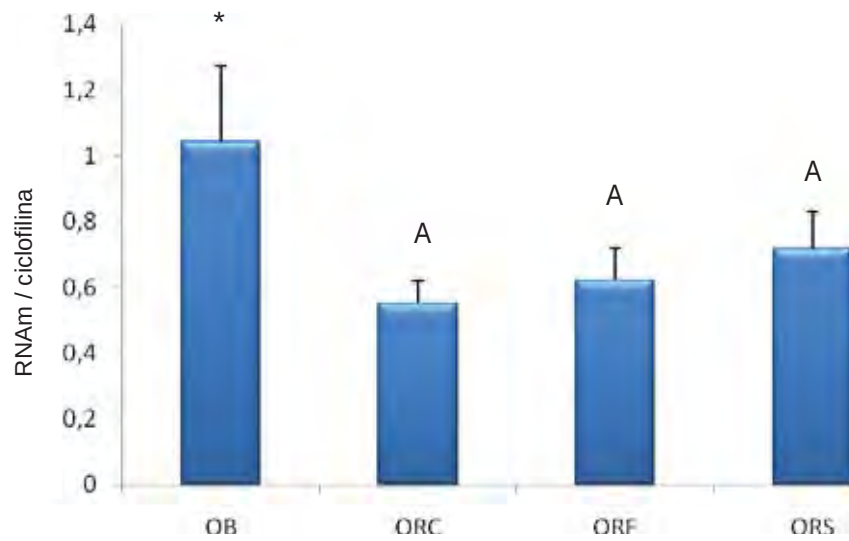


Figura 39. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão gênica da RYR no tecido cardíaco. ORC, obeso submetido à restrição calórica; ORF, obeso submetido à restrição calórica e dose fisiológica de T_3 ; ORS, obeso submetido à restrição caloria e dose suprafisiológica de T_3 ; T_3 , triiodotironina. O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em médias. * $p < 0,05$ entre OB e ORC. Letras iguais = $p > 0,05$.

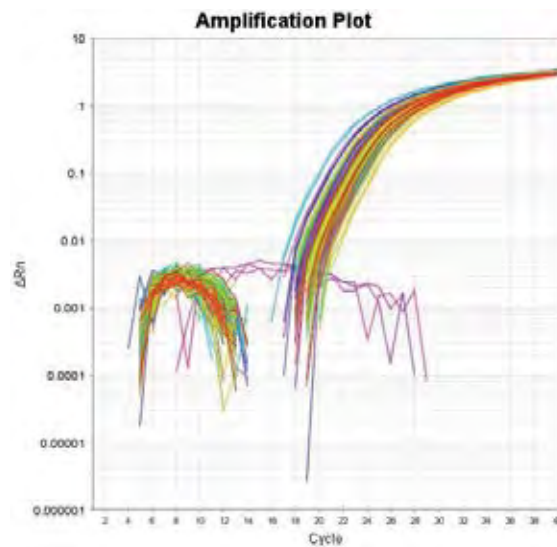


Figura 40. Curva de visualização do experimento de PCR em tempo real para o gene RyR

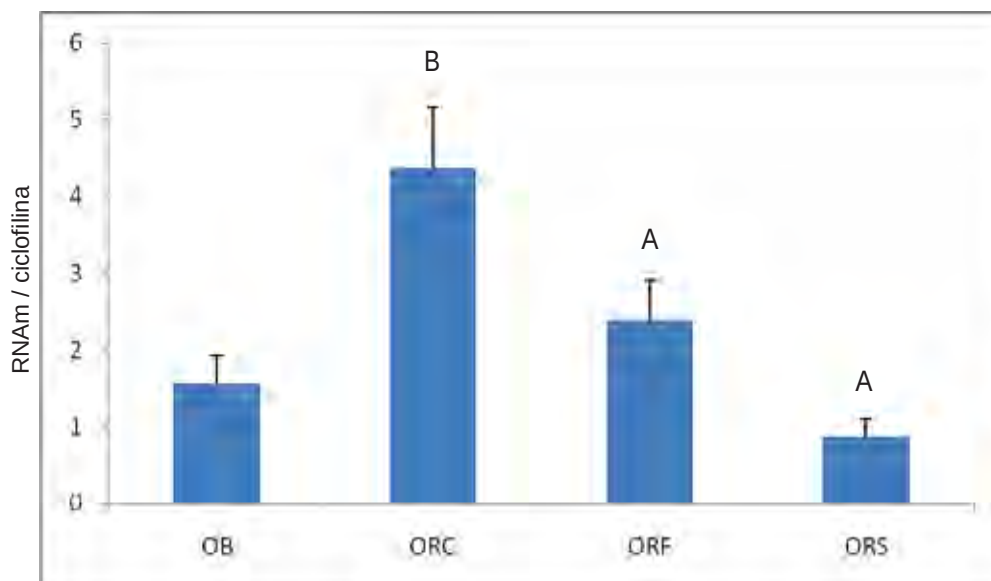


Figura 41. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão gênica da $TR\beta$ no tecido cardíaco. ORC, obeso submetido à restrição calórica; ORF, obeso submetido à restrição calórica e dose fisiológica de T_3 ; ORS, obeso submetido a restrição caloria e dose suprafisiológica de T_3 ; T_3 , triiodotironina. O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Dados expressos em médias. * $p < 0,05$ entre OB e ORC. Letras iguais = $p > 0,05$.

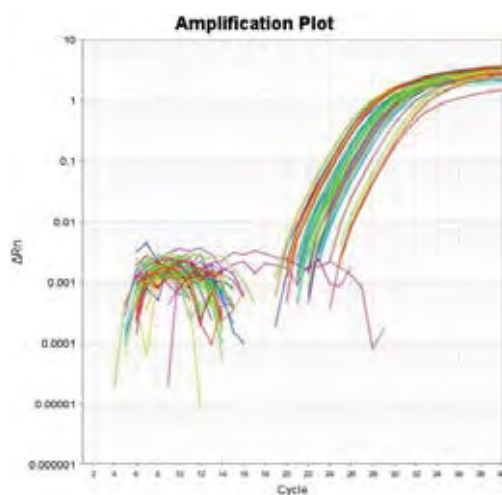


Figura 42. Curva de visualização do experimento de PCR em tempo real para o gene $TR\beta$.

IV- Discussão

A restrição alimentar moderada e os efeitos de diferentes doses de hormônio tireoidiano sobre o trânsito de cálcio cardíaco é controverso e ainda não foi totalmente esclarecido. Estudos com restrição alimentar de 30-50% em ratos mostraram aumento na expectativa de vida e prevenção de doenças associadas à idade (Dourmashkin et al, 2005), além de reduzir a incidência de alguns cânceres relacionados com a idade, doenças cardiovasculares e deficiências em funções imunes em animais. (Woods et al, 2003)

Os animais submetidos à restrição alimentar apresentaram peso semelhante aos animais controle no final do experimento, demonstrando que a restrição calórica de 25% foi eficaz para a redução do peso e adiposidade como demonstrado anteriormente em outros estudos. (Dourmashkin et al, 2005; Borts & Conover, 2005; Flatt, 1987)

Os animais ORC apresentaram diminuição no peso corporal final em relação aos animais obesos, mostrando a eficiência da restrição alimentar moderada. (Dourmaskin et al 2005; Borts & Conover, 2005; Flat, 1987). Essa diminuição de peso corporal foi acompanhada pela diminuição das gorduras retroperitoneal, gordura visceral, gordura total e índice de adiposidade.

Os resultados deste estudo mostram que a administração de T3 foi efetiva, aumentando a concentração sérica de T3 nos animais com dose suprafisiológica, e diminuindo a concentração de T4 da mesma maneira, portanto a administração exógena de T3 suprimiu a produção de T4 pela tireóide. (Schwint et al, 2004) Porém as concentrações do TSH se mantiveram, talvez pelo curto período, de duas semanas, que não foram suficientes para provocarem o *feed-back* negativo e alterarem as concentrações do TSH.

Associado aos resultados das dosagens hormonais, verificamos para a expressão gênica do TR β que a administração do hormônio tireoideano diminuiu a expressão tanto na dose fisiológica quanto na suprafisiológica do TR β , demonstrando *down-regulation* dos receptores de hormônio tireoidiano provocada pelo excesso de hormônio circulante. Esses dados ajudam a comprovar a eficácia do tratamento hormonal.

As doses fisiológicas e suprafisiológicas de T3 não alteraram o peso final dos animais de maneira significativa, provavelmente pelo tempo de uso do hormônio. Os animais ORC, ORF e ORS não apresentaram diferenças na eficiência alimentar,

ingestão calórica, porém, a eficiência alimentar diminuiu na dose suprafisiológica de T3. Estudos em nosso laboratório mostraram que o T3 aumenta os níveis de leptina, hormônio responsável pela saciedade, e a restrição diminui os níveis desse hormônio, com isso a eficiência alimentar dos animais poderia estar sendo modulada por esse hormônio, no entanto não avaliamos os níveis de leptina nos nossos animais. (Luvizotto et al, 2010)

Os níveis glicêmicos de jejum foram diminuídos no grupo ORS. Apesar de relatado que o excesso de hormônio tireoidiano aumenta a glicose plasmática (Shepherd & Kahn, 1999), a restrição alimentar diminuiu significativamente os níveis glicêmicos (Bronwen et al, 2010) e esses animais mesmo com a dose de hormônio, não conseguiram retornar aos níveis glicêmicos normais. Os hormônios tireoidianos regulam o metabolismo de lipídeos (Haber et al, 2001) e que seu excesso aumenta a lipólise, a concentração plasmática de lipídeos intermediários e oxidação lipídica. (Tentolouris et al, 2008), os animais com restrição alimentar apresentaram uma diminuição no colesterol total de maneira dose dependente, porém não houve alteração nos níveis de TG e HDL. Estes dados estão de acordo com outros trabalhos que mostram que dietas ricas em gordura insaturada não alteram o perfil lipídico. (Scrauwen & Westertero, 2000; De Tomasi et al, 2009)

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de diferentes doses de hormônio tireoideano na restrição alimentar moderada sobre o RNAm e suas respectivas proteínas relacionadas ao trânsito de Ca^{2+} no miocárdio. Em relação às expressões gênicas das proteínas relacionadas ao trânsito de cálcio cardíaco, houve uma menor expressão na PLB (Brown et al, 2010), SERCA, Canal L (De Tomasi et al, 2009) e RyR (Vizotto et al, 2007) nos animais submetidos a restrição em relação aos animais obesos, e um aumento na expressão do NCX nos submetidos nos ORC em relação aos OB (Mgyar et al, 1995). O $\text{TR}\beta$ não se alterou nos animais quando submetidos à restrição alimentar de 25 %. O aumento do hormônio tireoideano aumenta os níveis de expressão gênica da SERCA de maneira dose dependente (Periasamy et al, 2008; Carr & Kranias, 2002; Reed et al, 2000) e diminui a do seu inibidor, PLB e a do NCX (Bronwen et al, 2010) da mesma maneira que foi demonstrado em nosso estudo. A influência do hormônio tireoideano na função cardíaca é bem documentada, mostrando que o aumento nos níveis de hormônio tireoideano resulta na melhora da contratilidade cardíaca e o oposto ocorre quando há um quadro de hipotireoidismo. Esta habilidade de regular a função cardíaca possivelmente está relacionada com os efeitos genômicos do hormônio tireoidiano, já que o T3 pode agir como modulador transcricional de proteínas

importantes para essa função (Carr & Kranias, 2002). No entanto, apesar de verificar diferenças importantes na expressão gênica tanto na influência da dieta, como na presença das doses de hormônio tireoidiano, não observamos as mesmas alterações na tradução dessas proteínas estudadas.

Estudos sugerem que a PLB regula a SERCA pela alta afinidade com o Ca^{2+} , e que o aumento da relação PLB/SERCA resulta na maior inibição da SERCA com isso uma menor contrabilidade cardíaca, portanto sugerimos em nosso estudo que a contrabilidade cardíaca possivelmente não foi prejudicada, já que não houve alteração da relação SERCA/PLB. (Periasamy et al, 2008)

Estudo com restrição alimentar de 50% em ratos demonstrou que a restrição promoveu a diminuição dos níveis de RNAm e proteínas do Cana L em ratos. Entretanto, esses experimentos foram conduzidos com 50% de restrição. Não foram encontrados na literatura, estudos que avaliam a expressão gênica e protéica de SERCA, PLB e RyR em animais obesos por dieta rica em ácidos graxos insaturados e submetidos à restrição alimentar moderada (25%). Em relação aos hormônios tireoidianos administrados na restrição alimentar, eles foram efetivos em diminuir a adiposidade e não provocaram alteração na expressão das proteínas do trânsito de cálcio.

Em relação aos resultados divergentes entre a alteração na expressão gênica sem alteração na proteína nesse tratamento, podemos associar a tradução celular. O RNAm é transcrito diretamente a partir do DNA (cadeia de ácido desoxirribonucléico), já as proteínas são sintetizadas nos ribossomos a partir de uma sinalização molecular específica. (Alberts et al, 2002) Contudo, o aumento dos níveis de RNAm não necessariamente resulta na elevação da taxa protéica, pois, a eficiência do processo de tradução é regulado pelo comprimento da cauda poli A, que favorece o aumento da concentração local de ribossomos, colaborando para maior tradução de proteínas. (Seraphim et al, 2007) Portanto, as diferenças entre as quantidades de RNAm e proteínas, no presente estudo, podem ser associadas ao comprimento da cauda poli A.

Análogo de hormônio tireoidiano tem sido proposto para ser um agente terapêutico seguro já que seus efeitos são insignificantes sobre o metabolismo e frequência cardíaca (Talukder et al, 2010). Outras drogas, CG-1 e KB-141, que estão sendo desenvolvidas, são isoformas agonistas do $\text{TR}\beta$. Estas drogas não estimulam o $\text{TR}\alpha$, protegendo o coração da ação deletéria do hormônio tireoidiano (Grover et al, 2003). Nossos resultados mostram que não houve ação dos hormônios tireoidianos na expressão protéica da SERCA, PLB, Canal L e NCX em animais sob restrição alimentar

de 25%, e podem colaborar com a indicação do uso de análogos de hormônio tireoidiano para auxiliar a perda de peso.

V- Conclusão

Com esses resultados concluímos que em animais obesos submetidos a restrição alimentar moderada e a administração de doses fisiológicas e suprafisiológicas de hormônio tireoidiano alteram a expressão gênica, porém não alteram a expressão das proteínas relacionadas ao trânsito de cálcio cardíaco.

6. Conclusões Gerais

Com esses resultados nossas conclusões gerais foram que:

- A obesidade e a administração de diferentes doses de hormônio tireoidiano alteram a expressão gênica da SERCA, RyR, Canal L e NCX, porém, não altera a expressão dessas proteínas.
- A obesidade não altera a expressão gênica e protéica da PLB, porém, as doses fisiológica e suprafisiológica de hormônio tireoidiano diminuem tanto sua expressão gênica quanto sua expressão protéica.
- Em animais obesos submetidos a restrição alimentar moderada e a administração de doses fisiológicas e suprafisiológicas de hormônio tireoidiano alteram a expressão gênica, porém não alteram a expressão das proteínas relacionadas ao trânsito de cálcio cardíaco.

7. Referências Bibliográficas

*Vancouver

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.

Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 1996;382:250-2.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. How cells read the genome: from DNA to protein. In: Alberts B. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland; 2002.p.299-374.

Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbits and rats cardiac cells. Species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol*. 1994; 475: 279-93.

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

Bers DM. Cardiac excitation- contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198-205.

Biondi B, Palmieri EA, Fazio S, Cosco C, Nocera M, Saccà L, et al. Endogenous subclinical hyperthyroidism affects quality of life and cardiac morphology and function in young and middle-aged patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:4701-5.

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

Boustany-Kari CM, Gong M, Akers WS, Guo Z, Cassis LA. Enhanced vascular contractility and diminished coronary artery flow in rats made hypertensive from diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2007; 31: 1652-9.

Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287:R943.

Bronwen M, Sunggoan J, Stuart M, And Mark P. "Control" laboratory rodents are metabolically morbid: Why it matters. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:6127-33.

Brasil: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de geografia e Estatística. Pesquisa e orçamentos Familiares 2002-2003. Antropometria e análise do estado nutricional de crianças e adolescentes no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE;2006.

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.

Carr AN, Kranias EG. Thyroid hormone regulation of calcium cycling proteins. *Thyroid*. 2002 ;12:453-7.

Carroll JF, Zenebe WJ, Strange T. Cardiovascular function in rat model of diet-induced obesity. *Hypertension*. 2006;48:65-72.

Carroll JF, Jones AE, Hester RL, et al. Reduced cardiac contractile responsiveness to isoproterenol in obese rabbits. *Hypertension*. 1997;30:1376-1381.

Carroll JF, Summers RL, Dzielak DJ, Cockrell K, Montani JP, Mizelle HL. Diastolic compliance is reduced in obese rabbits. *Hypertension*. 1999;33:811-5.

Carroll JF, Tyagi SC. Extracellular matrix remodeling in the heart of the homocysteinemic obese rabbits. *Am J Hypertens*. 2005;18:692-8.

Christoffersen C, Bollano E, Lindegaard MLS, Bartels ED, Goetze JP, Andersen CB, et al. Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. *Endocrinology*. 2003;44:3483-90.

Cioffi F, Zambad SP, Chhipa L, Senese R, Busiello RA, Tuli D, et al. TRC150094, a novel functional analog of iodothyronines, reduces adiposity by increasing energy expenditure and fatty acid oxidation in rats receiving a high-fat diet. *FASEB J*. 2010;24:3451-61.

Cittadini A, Mantzoros CS, Hampton TG, Travers KE, Katz SE, Morgan JP, et al. Cardiovascular abnormalities in transgenic mice with reduced brown fat. *Circulation*. 1999;100:2177-83.

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.

De Tomasi LC, Bruno A, Sugisaky MM, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, Junior SA, et al. Food restriction promotes downregulation of L-Type Ca^{2+} channels. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009;87:426-31.

Dong F, Zhang X, Yang X, et al. Impaired cardiac contractile function in ventricular myocytes from leptin-deficient ob/ob obese mice. *J Endocrinol*. 2006;188:25-36.

Dourmashkin JT, Chang GQ, Gayles EC, Hill JO, Fried SK, Julien C, et al. Different forms of obesity as a function of diet composition. *Int J Obes*. 2005; 29:1368-78.

Duntas LH. Thyroid disease and lipids. *Thyroid*. 2002;12: 287-93.

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.

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.

Fitzgerald GA. Bioactive lipids and atherothrombosis. *Haematologica*. 2001;86(11 Suppl 2):3-7.

Flatt JP. Dietary fat, carbohydrate balance, and weight maintenance: effects of exercise. *Am J Clin Nutr*. 1987;45:296-306.

Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA*. 2003;289:187-93.

Forster MJ, Morris P, Sohal RS. Genotype and age influence the effect of caloric intake on mortality in mice. *FASEB J*. 2003;17:690-2.

Gotzsche LB. L-triiodothyronine acutely increases Ca²⁺ uptake in the isolated, perfused rat heart. Changes in L-type Ca²⁺ channels and beta-receptors during short- and long-term hyper- and hypothyroidism. *Eur J Endocrinol*. 1994;130:171-9.

Grover GJ, Mellstrom K, Ye L, Malm J, Li YL, Bladh LG, et al. Selective thyroid hormone receptor-beta activation: a strategy for reduction of weight, cholesterol, and lipoprotein(a) with reduced cardiovascular liability. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:10067-72.

Haber EP, Curi R, Carvalho CRO, Carpinelli AR. Secreção de insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. *Arq Brás Endocrinol Metab*. 2001;45:219-27.

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.

Hartong R, Wang N, Kurokawa R, Lazar MA, Glass CK, Apriletti JW, et al. Delineation of three different thyroid hormone-response elements in promoter of rat sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase gene. Demonstration that retinoid X receptor binds 59 to thyroid hormone receptor in response element 1. *J Biol Chem* 1994.269:13021–9.

Kokkinos A, Mourouzis I, Kyriaki D, Pantos C, Katsilambros N, Cokkinos DV. Possible implications of leptin, adiponectin and ghrelin in the regulation of energy homeostasis by thyroid hormone. *Endocrine*. 2007;32:30-2.

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

Leopoldo AS. Influência da duração da obesidade sobre a função cardíaca de ratos [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual paulista; 2010.

Levin BE, Dunn-Meynell AA. Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;283:R941-8.

Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Carvalho RF, Nogueira CR, Nascimento AF, et al. Obesity induces upregulation of genes involved in myocardial Ca²⁺ handling. *Braz J Medi Biol Res.* 2008;41:615-20.

Li SY, Yang X, Ceylan-Isik AF, Du M, Sreejayan N, Ren J. Cardiac contractile dysfunction in Lep/Lep obesity is accompanied by NADPH oxidase activation, oxidative modification of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and myosin heavy chain isozyme switch. *Diabetologia.* 2006;49:1434-46.

Luvizotto RA, Conde SJ, Síbio MT, Nascimento AF, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Padovani CR, Cicogna AC, Nogueira CR Administration of physiologic levels of triiodothyronine increases leptin expression in calorie-restricted obese rats, but does not influence weight loss. *Metabolism.* 2010;59:1-6.

Magyar CE, Wang J, Azuma KK, Mcdonough AA. Reciprocal regulation of cardiac Na-K-ATPase and Na/Ca exchanger: hypertension, thyroid hormone, development. *Am J Physiol.*1995; 269:C675-82.

Malnick SD, Knobler H. The medical complications of obesity. *QJM.* 2006;99:565-79.

Marques-Lopes, I; Marti A; Moreno A, María J; Martinez, A. Aspectos genéticos da obesidade. *Rev.Nutr;* 2004,17:327-38.

Mattson MP. Dietary restriction at old age lowers mitochondrial oxygen radical production and leak at complex i and oxidative dna damage in rat brain. *Neurology.* 2003;60:690–5.

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.

Menendez C, Baldelli R, Camina JP, Escudero B, Peino R, Dieguez C, et al. TSH stimulates leptin secretion by a direct effect on adipocytes. *J Endocrinol*. 2003; 176:7-12.

Minatoya Y, Ito K, Kagaya Y, Asaumi Y, Takeda M, Nakayama M, et al. Depressed contractile reserve and impaired calcium handling of cardiac myocytes from chronically unloaded hearts are ameliorated with the administration of physiological treatment dose of T3 in rats. *Acta Physiol*. 2007;189:221–31.

Minhas KM, Khan SA, Raju SVY, Phan AC, Gonzalez DR, Skaf MW, et al. Leptin repletion restores depressed b-adrenergic contractility in ob/ob mice independently of cardiac hypertrophy. *J Physiol*. 2005;565:463-74.

Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RAM, Nogueira CR, et al. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008;52:968-74.

O'brien PJ, Shen H, Bissonette D, Jeejeebhoy KN. Effects of hypocaloric feeding and refeeding on myocardial Ca and ATP cycling in the rat. *Mol Cell Biochem*. 1995;142:151-61.

Okere IC, Chandler MP, Mcelfresh TA, Rennison JH, Sharov V, Sabbah HN, et al. Differential effects of saturated and unsaturated fatty acid diets on cardiomyocyte apoptosis, adipose distribution, and serum leptin. *Am J Physiol Heart Circul Physiol*. 2006;291:38-44.

Okoshi K, Fioretto JR, Okoshi MP, Cicogna AC, Aragon FF, Matsubara LS, et al. Food restriction induces in vivo ventricular dysfunction in spontaneously hypertensive rats without impairment of in vitro myocardial contractility. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37:607-13.

Olshansky SJ, Passaro DJ, Hershow RC, Layden J, Carnes BA, Brody J, et al. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med*. 2005;352:1138-45.

Opie LH. Myocardial contraction and relaxation . In: *The heart. Physiology from cell to circulation*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott- Raven;1998. p.209-31.

Organização Mundial da Saúde. [internet]. Obesity and overweight. Geneva: WHO; 2010 [acessado abr 2010]. Disponível em <http://www.who.int/en>

Ouwens DM, Boer C, Fodor M, De Galan P, Heine RJ, Maassen JA, et al. Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia*. 2005.;48:1229-37.

Pascual M, Pascual DA, Soria F, et al. Effects of isolated obesity on systolic and diastolic left ventricular function. *Heart*. 2003;89:1152-6.

Periasamy M, Poornima B, Gopal JB. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovascular Research*. 2008;77:265-73.

Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;5:968-76.

Philip-Couderc P, Smih F, Hall JE, Pathak A, Roncalli J, Harmanccy R, et al. Kinetics analysis of cardiac transcriptome regulation during chronic high-fat diet in dogs. *Physiol Genomics*. 2004;19:32-40.

Pike M. *Industrial nutrition*. London: MacDonald; 1950.

Prentice AM. Manipulation of dietary fat and energy density and subsequent effects on substrate flux and food intake. *Am J Clin Nutr*. 1998;67:535-41.

Reed TD, Babu GJ, Ji Y, Zilberman A, Ver Heyen M, Wuytack F, et al. The expression of SR calcium transport ATPase and the Na(1)/Ca(21) Exchanger are antithetically regulated during mouse cardiac development and in hypo/hyperthyroidism. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32:453– 64.

Ren J, Walsh MF, Jefferson L, Natavio M, Lig KJ, Sowers JR, et al. Basal and ethanolinduced cardiac contractile response in lean and obese zucker rat hearts. *J Biomed Sci.* 2000;7:390-400.

Relling DP, Esberg LB, Frang CX, Johnson WT, Murphy J, Carlson EC, et al. High-fatdiet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. *J Hyperten.* 2006;24:549-61.

Rogers P, Webb GP. Estimation of body fat in normal and obese mice. *Br J Nutr.* 1980;43: 83- 6.

Rolls BJ, Shide DJ. The influence of dietary fat on food intake and body weight. *Nutr Rev.* 1992;5:283-90.

Rossi MA, Zucoloto S. Ultrastructural changes in nutritional cardiomyopathy of protein-calorie malnourished rats. *Br J Exp Pathol.* 1982;63:242-53.

Rupp H, Maisch B, Brilla CG. Schedule-induced psychological stress and molecular structures of cardiomyocytes. *Am J Physiol.*1997;272:R776-82.

Sanz A, Caro P, Ibanez J, Ibanez J, Gredilla R, Baria G. dietary restriction at old age lowers mitochondrial oxygen radical production and leak at complex i and oxidative dna damage in rat brain. *J Bioenerg Biomemb.* 2005; 37(2).

Sedova L, Seda O, Krenova D, Kren V, Kazdova L. Isotretinoin and fenofibrate induce adiposity with distinct effect on metabolic profile in a rat model of the insulin resistance syndrome. *Int J Obes.*2004; 28:719-25.

Schwint OA, Labraga M, Cervino CO, Haffar M, Sequeiros PH, Marcos HJ. A modification of the staining technique of reticular fibres for image analysis of the cardiac collagen network. *Cardiovasc Pathol*. 2004;13:213-20.

Seraphim PM, Nunes MT, Giannocco G, Machado UF. Age related obesity-induced shortening of GLUT 4 mRNA poly(A) tail length in rat gastrocnemius skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;276:80-7.

Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action-implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1999;341:248-57.

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.

Simone G, Scalfi L, Galderisi M. Cardiac abnormalities in young women with anorexia nervosa. *Bri Heart J*. 1994;71:278-92.

Sokol RJ. The chronic disease of childhood obesity: the sleeping giant has awakened. *J Pediatr*. 2000;136:739-43

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001;409:307-12.

Sugizaki MM, Dal Pai-Silva M, Carvalho RF, Padovani CR, Bruno A, Nascimento AF, et al. Exercise training increases myocardial inotropic response in food restricted rats. *Int J Cardiol*. 2006;112:191-201.

Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, Sutherland A, Petro AE, Opara EC, et al. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism*. 1995;44:645-51.

Suzanne U, Thomas S, Scanlan and Wolfgang H. Dillmann et al. The Thyroid Hormone Receptor-b-Selective Agonist GC-1 Differentially Affects Plasma Lipids and Cardiac Activity. *Endocrinology*. 2000;141:3057-64.

Takahashi R, Goto S. Effect of dietary restriction beyond middle age: accumulation of altered proteins and protein degradation. *Microsc Res Tech*. 2002;59:278-81.

Talukder MA, Yang F, Nishijima Y, Chen CA, Xie L, Mahamud SD, et al. Detrimental effects of the thyroid hormone analog, DITPA, in the mouse heart: increased mortality with in vivo acute myocardial ischemia/reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 300:H702-11.

The National Academy Of Sciences. Nutrient requirements of the laboratory rat. 1995;4th ed. Washington;1995.

Tentolouris N, Pavlatos S, Kokkinos A, Perrea D, Pagoni S, Katsilambros N. Diet-induced thermogenesis and substrate oxidation are not different between lean and obese woman after two different isocaloric meals, one rich in protein and one rich in fat. *Metabolism*. 2008;57:313-20.

Yen PM. New insights into thyroid hormone action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2007;21:193-208.

Young ME, Guthrie PH, Razeghi P, et al. Impaired long chain fatty oxidation and contractile dysfunction in the obese Zucker rat heart. *Diabetes*. 2002;51:2587-95.

Young ME, Guthrie PH, Razeghi P, Leighton B, Abbasi S, Patil S, et al. Impaired longchain fatty oxidation and contractile dysfunction in the obese zucker rat heart. *Diabetes*. 2002;51:2587-95.

Wagman MB. Avaliação cardiovascular e clínica no hipertireoidismo subclínico. [tese]. Rio de Janeiro: Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2005.

Waitzberg DL. nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. 3^a Ed. São Paulo: Atheneu; 2000.

Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'alesso DA, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr*. 2003;133:1081-7.

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;79:1114-2

Zar JH. *Biostatistical Analysis*. 4th ed. New Jersey: Prentice-Hall; 1999.

Zarich SW, Kowalchuk GJ, McGuire MP, Benotti PN, Mascioli EA, Nesto RW. Left ventricular filling abnormalities in asymptomatic morbid obesity. *Am J Cardiol.* 1991;68:377-81.

Apêndices

A1 - Perfis de ácidos graxos, aminoácidos, carboidratos e enriquecimento de micronutrientes das dietas padrão e hipercalórica

Quadro A. Composição percentual de ácidos graxos saturados e insaturados das rações padrão e hipercalórica

Ácido graxo	Rações	
	Padrão	Hipercalórica*
Láurico (C12:0)	0,33	0,25
Mirístico (C14:0)	0,30	0,33
Palmítico (C16:0)	16,56	15,09
Palmitoleico (C16:1)	0,06	0,15
Esteárico (C18:0)	3,90	4,36
Oleico (C18:1n9c)	27,96	37,94
Linoleico (C18:2n6)	47,10	40,83
Linolênico (C18:3n3)	3,72	0,87
Outros	0,07	0,18

* A dieta hipercalórica foi composta por quatro rações hipercalóricas nutricionalmente idênticas, com exceção do aditivo flavorizante adicionado (queijo, bacon, baunilha e chocolate).

Quadro B. Composição percentual de aminoácidos das rações padrão e hipercalórica

Aminoácidos	Rações	
	Padrão	Hipercalórica*
Ácido Aspártico	10,82	9,92
Ácido Glutâmico	20,15	18,98
Serina	5,24	5,06
Glicina	4,49	4,32
Histidina	2,51	2,43
Arginina	7,39	7,07
Treonina**	3,39	4,01
Alanina	4,53	4,69
Prolina	5,94	5,80
Tirosina	3,34	3,48
Valina**	5,06	5,33
Metionina**	1,89	2,43
Cistina	1,58	1,85
Isoleucina**	4,22	4,38
Leucina**	7,79	7,96
Fenilalanina**	5,02	5,01
Lisina**	5,63	6,59
Triptofano**	1,01	0,69

* A dieta hipercalórica foi composta por quatro rações hipercalóricas nutricionalmente idênticas, com exceção do aditivo flavorizante adicionado (queijo, bacon, baunilha e chocolate).

** Aminoácidos essenciais.

Quadro C. Composição percentual de carboidratos das rações padrão e hipercalórica

Carboidratos	Rações	
	Padrão	Hipercalórica*
Raffinose	1,74	0,81
Maltose	1,07	1,60
Glicose Livre	0,82	1,63
Glicose	46,59	42,35
Frutose Livre	0,62	0,96
Frutose	20,93	16,46
Sacarose	8,83	11,57
Lactose	0,65	4,48
Fucose	0,17	0,15
Arabinose	5,55	6,78
Galactose	4,55	6,08
Xilose	5,47	4,27
Rhamnose	0,22	0,26
Manose	2,79	2,59

* A dieta hipercalórica foi composta por quatro rações hipercalóricas nutricionalmente idênticas, com exceção do aditivo flavorizante adicionado (queijo, bacon, baunilha e chocolate).

Quadro D. Enriquecimento de micronutrientes, por quilograma, das rações padrão e hipercalórica.

Componentes	Rações	
	Padrão	Hipercalórica*
Ferro (mg)	100	100
Manganês (mg)	75	75
Magnésio (mg)	2	-
Zinco (mg)	60	100
Cobre (mg)	10	10
Iodo (mg)	2	2
Cobalto (mg)	1,5	1,5
Selênio (mg)	0,2	0,2
Colina (mg)	500	600
Vitamina A (UI)	12600	12750
Vitamina D (UI)	2500	2500
Vitamina E (mg)	60	60
Vitamina K (mg)	10	10
Vitamina B1 (mg)	5	10
Vitamina B2 (mg)	6	6
Vitamina B6 (mg)	8	8
Vitamina B12 (mcg)	30	30
Niacina (mg)	65	65

Ácido Pantotênico (mg)	25	25
Ácido Fólico (mg)	3	4,5
Biotina (mg)	0,4	0,4

* A dieta hipercalórica foi composta por quatro rações hipercalóricas nutricionalmente idênticas, com exceção do aditivo flavorizante adicionado (queijo, bacon, baunilha e chocolate).

A2 - Qualidade da extração de RNA e visualização em gel de agarose 1%

Quadro D. Quantificação de RNA para animais controle

Animal	A ₂₆₀	A ₂₈₀	260/280	260/230	[] RNA
C01	89,4	42,7	2,09	2,20	3577,2
C03	83,7	40,6	2,06	2,21	3351,5
C04	87,4	43,1	2,02	2,18	3496,8
C05	66,6	32,5	2,05	2,13	2664,7
C06	41,8	20,5	2,04	1,60	1674,9
C07	48,7	23,2	2,09	2,12	1951,2

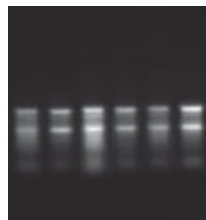


Figura A. Visualização em gel de agarose 1% da integridade do RNA para o grupo C

Quadro E. Quantificação de RNA para animais obeso

Animal	A ₂₆₀	A ₂₈₀	260/280	260/230	[] RNA
OB 49	92,9	44,6	2,08	2,25	3716,5
OB 51	116,6	55,9	2,09	2,22	4665,9
OB 52	81,5	38,7	2,10	2,11	3260,4
OB 56	50,5	24,9	2,03	2,12	2022,1
OB 57	55,9	27,3	2,05	2,02	2238,7
OB 58	68,6	33,6	2,04	2,11	2747,7

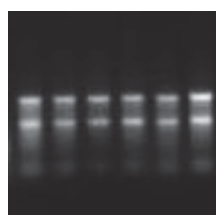


Figura B. Visualização em gel de agarose 1% da integridade do RNA para o grupo OB

Quadro F. Quantificação de RNA para animais com restrição alimentar

Animal	A ₂₆₀	A ₂₈₀	260/280	260/230	[] RNA
ORC 108	72,2	35,5	2,03	1,91	2889,6
ORC 110	82,4	40,5	2,03	2,22	3297,2
ORC 111	26,3	12,6	2,08	1,86	1054,4
ORC 114	44,4	21,9	2,03	1,64	1779,4
ORC 115	84,8	41,4	2,05	2,12	3394,2
ORC 118	89,1	43,1	2,07	1,81	3565,5

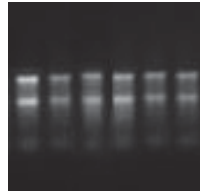


Figura C. Análise em gel de agarose 1% da integridade do RNA para o grupo ORC

Quadro G. Quantificação de RNA para animais obesos com 0,5µg/100g de T₃

.Animal	A ₂₆₀	A ₂₈₀	260/280	260/230	[] RNA
OF 68	95,1	46,1	2,06	2,18	3807,7
OF 70	80,6	39,2	2,05	2,22	3226,0
OF 71	106,5	51,8	2,05	2,24	4260,9
OF 74	70,3	33,9	2,07	1,98	2812,5
OF 75	92,5	45,5	2,03	2,25	3701,3
OF 78	60,5	30,0	2,02	2,05	2423,3

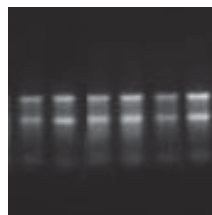


Figura D. Análise em gel de agarose 1% da integridade do RNA para o grupo OF

Quadro H. Quantificação de RNA para animais restritos com 0,5µg/100g de T₃

Animal	A ₂₆₀	A ₂₈₀	260/280	260/230	[] RNA
ORF 120	107,2	53,1	2,02	2,18	4288,2
ORF 125	101,1	48,2	2,09	2,10	4044,5
ORF 127	57,6	28,0	2,06	1,97	2306,9
ORF 128	37,8	18,7	2,02	1,86	1515,7
ORF 130	78,2	38,1	2,05	2,23	3129,5
ORF 132	36,5	17,8	2,05	1,97	1460,1

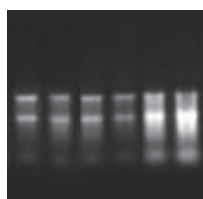


Figura E. Análise em gel de agarose 1% da integridade do RNA para o grupo ORF

Quadro I. Quantificação de RNA para animais obesos com 25µg/100g de T₃

Animal	A ₂₆₀	A ₂₈₀	260/280	260/230	[] RNA
OS 88	38,3	18,9	2,02	2,03	1532,1
OS 90	35,2	17,6	2,00	1,75	1408,9
OS 94	222,1	107,2	2,07	2,19	8884,4
OS 96	99,4	48,1	2,06	2,24	3979,0
OS 99	47,7	23,3	2,04	2,17	1909,5
OS 102	88,9	43,1	2,06	2,10	3557,6

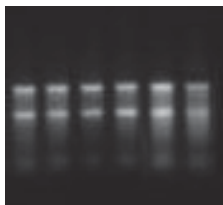


Figura F. Análise em gel de agarose 1% da integridade do RNA para o grupo OS

Quadro J. Quantificação de RNA para animais restritos com 25µg/100g de T₃

Animal	A ₂₆₀	A ₂₈₀	260/280	260/230	[] RNA
ORS 121	57,3	28,2	2,03	1,98	2295,5
ORS 145	76,9	38,0	2,02	2,11	3078,7
ORS 147	82,4	40,1	2,05	2,18	3299,9
ORS 148	65,4	32,4	2,02	2,12	2619,8
ORS 154	96,3	46,6	2,06	2,12	3853,9
ORS 155	129,8	62,8	2,07	2,12	5193,9

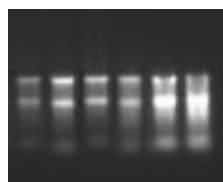


Figura G. Análise em gel de agarose 1% da integridade do RNA para o grupo ORS.