

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

Giovani Colombo

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DA DIETA E DA
ADMINISTRAÇÃO DE PIOGLITAZONA NO PESO, NA
INTENSIDADE DA RESISTÊNCIA À INSULINA E NOS NÍVEIS
CIRCULANTES DE GLICOSE, INSULINA, ADIPONECTINA E
GRELINA EM RATOS.**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Médicas
da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Ciências Médicas

Orientador:
Prof. Dr. Armando José d'Acampora

Co-orientador:
Prof. Dr. Leonardo de Lucca Schiavon

Florianópolis
2011

Catálogo na fonte elaborada pela biblioteca da
Universidade Federal de Santa Catarina

C718e

Colombo, Giovani

Estudo da influência da composição da dieta e da administração de pioglitazona no peso, na intensidade da resistência à insulina e nos níveis circulantes de glicose, insulina, adiponectina e grelina em ratos [dissertação] / Giovani Colombo ; orientador, Armando José d'Acampora. – Florianópolis, SC, 2011.

88 p.: graf., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas.

Inclui referências

1. Ciências médicas. 2. Obesidade. 3. Síndrome metabólica. 4. Adiponectina. 5. Grelina. 6. Pioglitazona. I. D'Acampora, Armando José. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. III. Título.

CDU 61

Giovani Colombo

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DA DIETA E DA
ADMINISTRAÇÃO DE PIOGLITAZONA NO PESO, NA
INTENSIDADE DA RESISTÊNCIA À INSULINA E NOS NÍVEIS
CIRCULANTES DE GLICOSE, INSULINA, ADIPONECTINA E
GRELINA EM RATOS.**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de
“Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas

Florianópolis, 14 de outubro de 2011.

Prof.^a, Dr.^a Márcia Margaret Menezes Pizzichini
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Banca Examinadora:

Prof., Dr. Armando José d’Acampora,
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof., Dr. Leonardo de Lucca Schiavon,
Co-Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a, Dr.^a. Esther Buzaglo Dantas Correa,
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a, Dr.^a. Leila John Marques Steidle,
Universidade Federal de Santa Catarina

Ao meu pai que tão cedo se foi,
quando a pouca idade não permitia
ainda entender a profundidade das
palavras.

AGRADECIMENTOS

A Daniela, Elisa e Stella pela paciência e apoio.

Aos profissionais que ajudaram a fazer de uma ideia um trabalho completo: Prof. Dr. Armando José d'Acampora, Prof. Dr. Leonardo de Lucca Schiavon, Prof^ª. Dra Maria Luiza Bazzo e Mestranda Christiane Lourenço Nogueira.

A natureza é tão generosa em variedade, e tão avarenta em inovação.

(Charles Darwin, 1872)

RESUMO

Introdução: Nos últimos anos, grandes esforços têm sido deflagrados no sentido da elucidação dos mecanismos relacionados ao aparecimento e perpetuação da obesidade. Neste contexto, dois hormônios, a grelina e a adiponectina, estão intimamente relacionados ao controle da ingestão alimentar, e conseqüentemente ao aparecimento da síndrome metabólica, do *diabetes mellitus* e das complicações cardiovasculares. Com o intuito de aumentar a sensibilidade celular sistêmica à ação da insulina, e contrabalançar os efeitos deletérios da síndrome metabólica, a pioglitazona tem sido utilizada na prática clínica diária. **Objetivos:** Identificar o impacto de uma dieta hipercalórica e hiperlipídica (dieta de cafeteria) sobre a variação do peso corporal, a resistência à ação da insulina, os níveis séricos de adiponectina, grelina total e grelina acetilada. Analisar as conseqüências da administração de pioglitazona sobre os níveis de adiponectina, grelina total e grelina acetilada. **Métodos:** Estudo analítico experimental controlado e com intervenção, envolvendo um total de 24 ratos machos *Wistar*, distribuídos em 04 subgrupos de 06 animais: subgrupo cafeteria – SGC, recebeu dieta de cafeteria, ração e pioglitazona; subgrupo cafeteria controle - SGCC, recebeu dieta de cafeteria, ração e solução salina; subgrupo ração - SGR, recebeu ração e pioglitazona e subgrupo ração controle - SGRC, recebeu ração e solução salina. O estudo teve a duração de 5 semanas e o peso dos animais foi registrado semanalmente. Os níveis séricos de insulina, adiponectina e grelina foram determinados por ELISA, no momento do sacrifício. Na análise estatística foram empregados os testes ANOVA com correção de Bonferroni e t pareado. **Resultados:** Foi observado um aumento significativo do peso corporal ao longo do estudo em todos os subgrupos ($P < 0,05$). Quando o peso dos animais na semana 3, momento inicial da intervenção, foi comparado ao peso na semana 5, apenas os animais do SGCC apresentaram tendência a ganho de peso ($P = 0,073$). No SGCC a média de peso final foi significativamente maior do que nos SGR ($P = 0,035$) e SGRC ($P = 0,017$). As médias de glicemia e insulina, bem como o modelo de avaliação da homeostase para resistência à insulina (HOMA-IR) entre os subgrupos no final do acompanhamento não foram diferentes ($P > 0,05$). Quanto à adiponectina sérica final, o SGR apresentou média significativamente maior do que os SGCC ($P = 0,027$) e SGRC ($P = 0,014$). Em relação à grelina total sérica final, o SGC apresentou média significativamente maior do que o SGR ($P = 0,006$). Quando avaliada a grelina acetilada sérica final, o SGC apresentou média significativamente maior do que os SGCC ($P =$

0,047) e SGR ($P = 0,009$). **Conclusão:** A dieta de cafeteria por 35 dias levou a uma média de peso superior nos animais a ela submetidos sem, no entanto, induzir a um aumento expressivo da resistência à ação da insulina. A pioglitazona aumentou os níveis de adiponectina nos ratos que receberam dieta balanceada e de grelina nos animais que receberam dieta de cafeteria. No entanto, os maiores níveis de grelina nestes animais parecem ter sido secundários à estabilização do ganho de peso nas semanas finais do tratamento.

Palavras-chave: Obesidade. Síndrome metabólica. Adiponectina. Grelina. Pioglitazona.

ABSTRACT

Introduction: In recent years considerable efforts have been set off towards the elucidation of the mechanisms related to the onset and perpetuation of obesity. In this context, two hormones, ghrelin and adiponectin, are closely related to control of food intake and consequently the onset of metabolic syndrome, *diabetes mellitus* and cardiovascular complications. In order to increase the systemic cellular sensitivity to insulin, and counterbalancing the deleterious effects of metabolic syndrome, pioglitazone has been used in clinical practice.

Objectives: Identify the impact of a hypercaloric and hyperlipidic diet (cafeteria diet) on body weight variation, resistance to insulin, serum adiponectin, total ghrelin, and acylated ghrelin. Assess the impact of the administration of pioglitazone on the levels of adiponectin, total ghrelin, and acylated ghrelin. **Methods:** Analytical controlled experimental intervention study involving a total of 24 male Wistar rats, divided into 04 subgroups of 06 animals: the Cafeteria Group (CAFG) received cafeteria diet, chow and pioglitazone; the Control Cafeteria Group (CCAFG) received cafeteria diet, chow and saline; the Chow Group (CG) received chow and pioglitazone; the Control Chow Group (CCG) received chow and saline. The study lasted five weeks and the weight of the animals was recorded weekly. Serum insulin, ghrelin and adiponectin were determined by ELISA at the time of sacrifice. In the statistical analysis the ANOVA test was applied with Bonferroni correction and paired t test. **Results:** We observed a significant increase in body weight throughout the study in all subgroups ($P < 0.05$). When the weight of the animals at week 3 (initial stage of the intervention) was compared to the weight at week 5, only animals of the CCAFG tended to gain weight ($P = 0.073$). The CCAFG average final weight was significantly higher than in the CG ($P = 0.035$) and CCG ($P = 0.017$). Mean blood glucose, insulin and homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) between the subgroups at the end of follow-up were not different ($P > 0.05$). As for the final serum adiponectin, the CG had significantly higher average than the CCAFG ($P = 0.027$) and CCG ($P = 0.014$). In relation to total serum ghrelin, the CAFG had significantly higher average than the CG ($P = 0.006$). When assessed in the final serum acylated ghrelin levels, the CAFG had significantly higher average than the CCAFG ($P = 0.047$) and CG ($P = 0.009$). **Conclusion:** The cafeteria diet for 35 days led to a higher average weight in the animals submitted to it without, however,

inducing a significant increase in resistance to insulin action. Pioglitazone increased adiponectin levels in mice that received a balanced diet, and ghrelin in animals fed with cafeteria diet. However, higher levels of ghrelin in these animals appear to have been secondary to stabilization of weight gain in the final weeks of treatment.

Keywords: Obesity. Metabolic syndrome. Adiponectin. Ghrelin. Pioglitazone.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Organograma representando a divisão dos grupos experimentais.....50
- Figura 2: Evolução das médias dos pesos em gramas nos diferentes subgrupos desde o início do estudo, quando os animais apresentavam 60 dias de vida, até o dia do sacrifício quando estavam com 95 dias de vida.....55
- Figura 3: Peso corporal (Média \pm Desvio Padrão) ao final do acompanhamento (gramas) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC).....56
- Figura 4: Glicemia (Média \pm Desvio Padrão) ao final do acompanhamento (mg/dL) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC).....57
- Figura 5: Insulina (Média \pm Desvio Padrão) ao final do acompanhamento (ng/mL) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC).....58
- Figura 6: HOMA-IR (Média \pm Desvio Padrão) ao final do acompanhamento nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC).59
- Figura 7: Adiponectina (Média \pm Desvio Padrão) ao final do acompanhamento (ng/mL) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC).....60

Figura 8: Grelina total (Média ± Desvio Padrão) ao final do acompanhamento (ng/mL) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC).....61

Figura 9: Grelina acetilada (Média ± Desvio Padrão) ao final do acompanhamento (pg/mL) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC).....62

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Peso corporal (gramas) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC).....56
- Tabela 2: Glicemia (mg/dL) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC)57
- Tabela 3: Insulina (ng/mL) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC)58
- Tabela 4: HOMA-IR nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC)59
- Tabela 5: Adiponectina (ng/mL) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC)..... 60
- Tabela 6: Grelina total (ng/mL) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC).....61
- Tabela 7: Grelina acetilada (pg/mL) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC).....62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACRP30	Proteína do Adipócito Relacionada ao Complemento
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AdipoR1	Receptores de Adiponectina tipo 1
AdipoR2	Receptores de Adiponectina tipo 2
ADP	Adenosina Difosfato
AgRP	Peptídeo Relacionado ao Gene Agouti
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPK	Proteína Quinase Ativada por Adenosina Monofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
BAT	Tecido Adiposo Marrom
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
GH	Hormônio do Crescimento
GHRH	Hormônio Regulador do GH Hipotalâmico
GHS-R	Receptores Secretagogos do Hormônio do Crescimento
GOAT	Grelina-O-Acetil-Transferase
G6P	Glicose-6-Fosfato
G6PDH	Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HK	Hexoquinase
HMW	Alto Peso Molecular
HOMA	Modelo de Avaliação da Homeostase
HOMA-IR	Modelo de Avaliação da Homeostase para Resistência à Insulina
IDF	Federação Internacional de Diabetes
IMC	Índice de Massa Corporal
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade
MAP quinase	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
MMIF	Fator Inibidor da Migração de Macrófagos
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Forma Reduzida
NPY	Neuropeptídeo Y
PAI-1	Fator Inibidor do Ativador do Plasminogênio
PPAR- α	Receptor Alfa Ativado pelo Proliferador de Peroxissomo
PPAR- γ	Receptor Gama Ativado pelo Proliferador de Peroxissomo
SGC	Subgrupo Cafeteria
SGCC	Subgrupo Cafeteria Controle
SGR	Subgrupo Ração

SGRC	Subgrupo Ração Controle
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TOCE	Laboratório da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental
UCP1	Proteína Desacopladora 1
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
WAT	Tecido Adiposo Branco

SUMÁRIO

I. REFERENCIAL TEÓRICO.....	35
1. INTRODUÇÃO.....	35
1.1 Considerações gerais	35
1.2 A adiponectina e seu papel na resistência à insulina e no balanço energético	36
1.3 A grelina e suas funções fisiológicas.....	40
1.4 A dieta de cafeteria como modelo experimental de obesidade	44
1.5 A pioglitazona e seus efeitos sobre os níveis de adiponectina e grelina	45
2. JUSTIFICATIVA	47
II. OBJETIVOS.....	48
1. GERAL.....	48
2. ESPECÍFICOS	48
III. MÉTODOS	49
1. DELINEAMENTO DO ESTUDO	49
2. AMOSTRA	49
3. PROTOCOLO DE ALIMENTAÇÃO.....	50
3.1 Dieta de cafeteria.....	51
3.2 Ração para ratos	51
4. ASPECTOS ÉTICOS	51
5. INTERVENÇÕES	51
5.1 Gavagem.....	51
5.2 Procedimento anestésico.....	52
5.3 Obtenção das amostras de soro.....	52
5.4 Eutanásia	52
6. ANÁLISES LABORATORIAIS.....	53

6.1 Determinação dos níveis séricos de grelina acetilada, grelina total, insulina e adiponectina.....	53
6.2 Determinação da glicemia	53
6.3 Cálculo do modelo de avaliação da homeostase para resistência à insulina (HOMA-IR).....	54
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
IV RESULTADOS	55
V DISCUSSÃO	63
1. A dieta de cafeteria e o peso corporal	63
2. A pioglitazona e o peso corporal	64
3. Dieta de cafeteria e os níveis séricos de glicose.....	64
4. A pioglitazona e o controle glicêmico	65
5. A dieta de cafeteria e a insulinemia	66
6. A pioglitazona e a insulinemia.....	66
7. A dieta de cafeteria e o HOMA-IR	67
8. A pioglitazona e o HOMA-IR.....	68
9. A dieta de cafeteria e a adiponectina sérica	69
10. A pioglitazona e a adiponectina sérica.....	70
11. A dieta de cafeteria, a grelina total e acetilada.....	71
12. A pioglitazona, a grelina total e acetilada	73
13. Limitações do estudo	74
VI CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES.....	76
VII REFERÊNCIAS	78
ANEXO A - PROTOCOLO APROVADO PELA CEUA/UFSC.....	88

I. REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais:

Os seres humanos desenvolveram-se muito bem adaptados, como caçadores coletores, durante um período que vai de 6 milhões a 25 mil anos antes de Cristo, até o despertar da agricultura. Recentemente, o ambiente no qual o *homo sapiens* vive foi alterado drasticamente. Como consequência os homens foram expostos a fatores para os quais o seu genótipo era mal adaptado. O desfecho, com o incremento da urbanização, é uma epidemia global de obesidade, síndrome metabólica, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (1). Projeções da Organização Mundial de Saúde indicam que a obesidade, definida como um índice de massa corporal maior ou igual a 30, possa atingir mais de 700 milhões de adultos em todo o mundo no ano de 2015 (2).

A síndrome metabólica é um conjunto dos mais poderosos fatores de risco para a morte cardiovascular. Os critérios para seu diagnóstico, de acordo com a Federação Internacional de Diabetes (IDF), são a presença de obesidade central, associada a 2 ou mais dos seguintes achados: altos níveis de triglicédeos, valores reduzidos de lipoproteínas de alta densidade (HDL), pressão arterial aumentada e glicemia de jejum elevada. As causas da síndrome metabólica continuam a desafiar os especialistas, mas a resistência à insulina, obesidade central, fatores genéticos, sedentarismo, envelhecimento, estados pró-inflamatórios e alterações hormonais são considerados agentes causais. A resistência à insulina ocorre quando as diferentes células do organismo se tornam menos sensíveis, ou eventualmente resistentes à insulina, o hormônio produzido pelas células beta do pâncreas para facilitar a absorção de glicose (3).

Existe um tênue balanço entre a resistência à insulina e a massa efetiva de células beta no pâncreas, para compensar as alterações metabólicas. Contudo, em indivíduos suscetíveis, estas células podem ficar sobrecarregadas, falhar em contrabalançar a resistência à insulina e levar ao aparecimento do diabetes. Tem-se proposto que esta falha seja causada por um aumento na apoptose das células beta, provocado pela combinação de hiperglicemia crônica, hiperlipidemia, e certas citocinas que interferem nas vias de sinalização que mantêm o crescimento e sobrevivência celular adequados (4).

Pesquisas realizadas na última década, mostraram que vários tipos celulares dos mamíferos podem detectar diretamente as mudanças nos níveis de uma variedade de nutrientes, e traduzir este sinal por meio de interações metabólicas, que parecem operar de formas independente e coordenada com as vias hormonais (5).

Ao longo das últimas duas décadas, foi estabelecido o conceito de que o tecido adiposo é um órgão endócrino, que libera fatores conhecidos como adipocinas (6-7). São exemplos de adipocinas: leptina, adiponectina, resistina, visfatina, apelina, vaspina e omentina (6). Enquanto aparentemente a leptina e a adiponectina estão mais intimamente relacionadas à resistência à insulina e obesidade central, ou seja, ao cerne da síndrome metabólica, por sua vez a visfatina, o fator de necrose tumoral α (TNF α) e a resistina parecem exercer seus efeitos sobre o sistema cardiovascular, através de vários mecanismos como inflamação, vasoconstrição e efeitos trombóticos (6). Os adipócitos humanos produzem também o TNF α , e esta citocina, além de causar diretamente um incremento da resistência à insulina, pode levar, de forma autócrina, a um aumento da expressão do fator inibidor do plasminogênio (PAI-1) pelo próprio tecido adiposo (8). Outro hormônio relacionado também a resistência à insulina é a grelina, que apesar de ser produzida principalmente no estômago, age em conjunto com a leptina e a adiponectina, modulando a sensibilidade celular à insulina (6).

1.2. A adiponectina e seu papel na resistência à insulina e no balanço energético:

A adiponectina foi descrita em 1995, como uma nova proteína de função desconhecida, então denominada proteína do adipócito relacionada ao complemento (ACRP30), já que é estruturalmente similar ao fator do complemento C1Q. O fato de sua expressão ter sido encontrada somente em adipócitos, o aumento de sua secreção pela ação da insulina e a sua presença fisiológica no plasma sugeriram que ela estava envolvida no controle do *status* nutricional do organismo (9).

A adiponectina é uma proteína de 244 aminoácidos, sintetizada a partir de um gene localizado no braço longo do cromossoma 3 (3q27), secretada por adipócitos e que circula de forma copiosa no plasma (10-11). Ela representa a proteína mais abundante secretada pelo tecido adiposo (12). Seus efeitos benéficos são mediados principalmente por dois receptores celulares de membrana, os receptores tipo 1 (AdipoR1) e 2 (AdipoR2). Apesar dos receptores da adiponectina serem encontrados

sistemicamente, a importância da expressão de seus subtipos varia conforme o tecido estudado, o que também regula a ação do hormônio. A predominância dos subtipos de receptores varia quando comparamos espécies diferentes, como o camundongo e o homem. A presença do receptor tipo 1 é maior na musculatura esquelética, tanto em homens quanto em camundongos. O receptor tipo 2, por sua vez, é predominante no tecido adiposo humano, enquanto em camundongos sua maior expressão ocorre no fígado. Esta diferença com relação à expressão dos receptores parece ser importante, pois pode influenciar a ação de drogas que agem nos receptores da adiponectina, como as tiazolinedionas (10, 13).

Uma característica singular da estrutura da adiponectina é sua capacidade de se agrupar, em várias isoformas oligoméricas características. Podemos encontrar a adiponectina na circulação predominantemente na forma de três complexos oligoméricos, incluindo o formato trimérico, hexamérico e o de alto peso molecular (HMW); este último configura a isoforma mais ativa na sensibilização à ação da insulina (14). Entre todas as espécies em que a sequência primária de aminoácidos da adiponectina foi clonada, se evidenciou uma semelhança de mais de 80% em sua estrutura (14).

O promotor do gene da adiponectina contém múltiplos sítios de ligação, para fatores transcricionais que modulam sua atividade. A transcrição do gene pode ser estimulada pela ação destes fatores; dentre eles podemos destacar a ativação do receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissomo (PPAR- γ), que constitui o alvo da ação dos medicamentos da classe tiazolinedionas, usados no tratamento do *diabetes mellitus* tipo 2 (15). Muitas outras drogas também aumentam os níveis de adiponectina, muitas vezes por mecanismos desconhecidos. Dentre estes fármacos podemos citar as estatinas, os inibidores da enzima conversora de angiotensina, bloqueadores dos receptores de angiotensina, fenofibrato, niacina, ezetimiba, acarbose, sulfoniluréias, bloqueadores androgênicos e o rimonabanto (15-16). Podemos também observar uma redução da transcrição em estados crônicos de inflamação e oxidação, como os encontrados na obesidade, e em caso do *stress* do retículo endoplasmático, que resulta de condições como o excesso de aporte nutricional e obesidade (15). O fator inibidor da migração de macrófagos (MMIF) é uma adipocina que se encontra elevada na obesidade e na resistência à insulina, e está envolvida na infiltração por macrófagos. A relação inversa dos níveis de adiponectina, derivados de tecido adiposo visceral, e do fator inibidor da migração de macrófagos,

sugere que na obesidade a inflamação poderia ser responsável pelos baixos níveis desta adipocina (13).

Em relação ao mecanismo molecular da sensibilização ao efeito da insulina, promovido pela adiponectina, podemos destacar a estimulação da AMPK (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato) pelo hormônio (17). Para a manutenção da vida celular, é imprescindível que haja um equilíbrio na relação entre a adenosina trifosfato (ATP) e a adenosina difosfato (ADP) (18). Situações que consomem o ATP ou impedem a sua síntese acabam gerando ADP e AMP (adenosina monofosfato) (19). Entre estas situações, podemos destacar os fatores que interferem com a produção de ATP, como a hipóxia, hipoglicemia e a isquemia, e os que aumentam o consumo de ATP, como a contração muscular. A AMPK também pode ser ativada pela leptina, e por hormônios que agem via receptores acoplados à proteína G (19). Uma vez ativada, a AMPK leva a uma reação em cascata, que inibe os processos metabólicos celulares que não são essenciais à sobrevivência da célula em curto prazo, como a síntese de lipídeos, carboidratos e proteínas. Independente do estímulo inicial, a ativação da AMPK leva a mudanças metabólicas que seriam benéficas em indivíduos com *diabetes mellitus* tipo 2 e síndrome metabólica, como um incremento da captação e metabolismo da glicose no músculo e em outros tecidos, diminuição da produção de glicose pelo fígado e inibição da síntese e aumento da oxidação de ácidos graxos (19). A adiponectina também estimula a degradação de ácidos graxos e o consumo de energia, em parte via ativação do receptor nuclear alfa ativado pelo proliferador de peroxissomo (PPAR- α), o que leva a uma diminuição do conteúdo de triglicerídeos dos músculos esqueléticos e fígado, e conseqüentemente a um aumento da sensibilidade à ação da insulina *in vivo* (17). A administração de adiponectina recombinante em roedores resulta em um aumento da captação de glicose, e na oxidação de ácidos graxos no músculo, redução da produção de glicose hepática e uma maior sensibilidade à ação da insulina sistemicamente (12).

Os níveis basais baixos de adiponectina são fortes preditores do aparecimento futuro de *diabetes mellitus*, em humanos com alto risco para a doença, mesmo após o ajuste para o peso corporal (20). Em uma metanálise de estudos prospectivos, encontrou-se uma forte associação inversa entre os níveis de adiponectina plasmática e a incidência de *diabetes mellitus* tipo 2. Os resultados não diferiram substancialmente em relação ao ensaio de mensuração do hormônio, método de diagnóstico do diabetes, tamanho do estudo, duração do seguimento, índice de massa corporal ou proporção de homens e mulheres. Entre as

variáveis confundidoras, destacam-se dados demográficos e variações do estilo de vida dos pacientes incluídos nos trabalhos, a dúvida se a adiponectina é um marcador causal para o *diabetes mellitus* ou só um fator paralelo com outras atividades biológicas, os erros diagnósticos e a heterogeneidade dos vários estudos que deram origem a esta metanálise (21).

Os baixos níveis plasmáticos de adiponectina são um dos mais fortes e consistentes preditores da progressão, em curto prazo, de doença coronariana aterosclerótica em homens e mulheres assintomáticos (22). O tecido adiposo, especialmente o visceral, expressa numerosos genes para proteínas secretadas na circulação, entre elas o fator inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), que funciona como um regulador do sistema fibrinolítico. Em modelos animais de obesidade, a expressão do gene relacionado ao PAI-1 encontra-se aumentada. A expansão do tecido adiposo visceral levaria à diminuição da adiponectina circulante e também aumentaria os níveis plasmáticos do PAI-1, assim favorecendo os eventos trombóticos (23).

O efeito da adiponectina no sistema nervoso central permanece controverso, porém demonstrou-se no hipotálamo a presença das duas principais isoformas de seus receptores (Adipo R1 e R2), de forma tão abundante quanto no fígado (24). A adiponectina, em suas formas trimérica e hexamérica, a partir da circulação atravessaria a barreira hematoencefálica, ao contrário de sua forma multimérica. No hipotálamo, o hormônio ativaria a AMPK, estimulando a ingestão alimentar e reduzindo o gasto energético. No jejum, os níveis séricos e líquóricos de adiponectina, assim como a expressão de seu receptor R1 no núcleo arqueado do hipotálamo, estão aumentados, diminuindo após a oferta de alimentos (24). O papel fundamental da leptina e da adiponectina seria preservar uma reserva gordurosa adequada. A leptina funcionaria como um sinal de saciedade, e a adiponectina de inanição. Ao longo do processo de evolução das espécies, os marcadores de inanição seriam essenciais para a sobrevivência, enquanto os sinais de saciedade, que apareceram posteriormente, agiriam como um sistema complementar, em períodos de excesso de aporte alimentar e de estoque de gordura. Isto poderia explicar porque, ao contrário dos receptores da leptina, aqueles da adiponectina teriam preservado sua homologia dos fungos até os humanos (24-25).

Os pacientes que apresentam doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), especialmente aqueles com esteatohepatite, tem concentrações de adiponectina plasmática significativamente mais baixas do que os indivíduos saudáveis. Os baixos níveis desta adipocina

são preditores independentes de esteatose hepática e necroinflamação (26). Em células hepáticas estelares ativadas sob cultura, a adiponectina, especialmente a isoforma multimérica, apresenta efeito antifibrótico mediado pela ativação da AMPK (27). Em aparente contraste com seu efeito hepatoprotetor, demonstrou-se que em humanos e ratos com cirrose a adiponectina está aumentada (28).

Portanto, conforme o que foi acima discutido, a adiponectina, que constitui a proteína mais abundante secretada pelo adipócito, apresenta um papel crucial na modulação do aporte alimentar e do gasto energético. Os baixos títulos plasmáticos desta adipocina estariam associados ao aparecimento de diversas patologias, como o *diabetes mellitus*, a doença coronariana aterosclerótica e a DHGNA.

1.3. A grelina e suas funções fisiológicas:

A grelina foi purificada e identificada em 1999, a partir do estômago de ratos, como um peptídeo de 28 aminoácidos, e sua correspondente humana difere da murina por apenas dois aminoácidos. Ela é o ligante endógeno específico para o receptor secretagogo do hormônio do crescimento (29-30).

A designação grelina é formada a partir do proto-indo-europeu *ghre* que originou em inglês a palavra “*grow*”, que em português significa crescer (29).

O gene humano da grelina está localizado no cromossoma 3 (3p25-26), contendo 4 exons e 3 introns (31).

A investigação morfológica das células imunorreativas para grelina evidenciou tipos celulares endócrinos desconhecidos no estômago, identificados como células neuroendócrinas X(A *like*) em roedores e cães e células P/D1 em humanos, as células da grelina (30, 32).

O estômago é o principal sítio de produção de grelina, sintetizando dez vezes mais hormônio por grama de tecido do que a segunda maior fonte, o duodeno (33). Apesar de ter sido demonstrado que o fundo gástrico é a fonte mais abundante de grelina, a expressão de seu gene foi encontrada também em vários outros tecidos, como no duodeno, jejuno, antro gástrico, pulmões, e em quantidades menos significantes no esôfago, íleo, ceco, cólon, reto, fígado, cérebro, coração, músculo esquelético, timo, baço, rins, placenta e leucócitos (33-35).

O receptor da grelina é o receptor secretagogo do hormônio do crescimento (GHS-R), e pode ser dividido em tipo 1a e 1b. O tipo 1a faz parte do grupo de receptores denominados 7 domínios transmembrana acoplados a proteína G. Inicialmente, este receptor foi identificado em vários núcleos cerebrais, em particular no hipotálamo e hipófise anterior, bem como em baixos níveis no pâncreas; posteriormente sua expressão também foi evidenciada na tireóide, baço, miocárdio e glândula adrenal. O GHS-R tipo 1b é um variante inativo do receptor. A ativação do GHS-R tipo 1a gera um estímulo à liberação do hormônio do crescimento (GH), de forma mais potente do que o promovido pelo hormônio regulador do GH hipotalâmico (GHRH). Em humanos, a grelina não é específica para o GH, também estimulando a secreção de prolactina e ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) (35-37).

Quando acetilada, a grelina libera GH *in vivo* e *in vitro*, e a acetilação na forma n-octano ocorre junto à posição 3 na serina (Ser³), sendo essencial para a ligação ao GHS-R tipo1, e conseqüentemente para a sua atividade (29, 36). Dados sugerem que a grelina acetilada tem ações metabólicas independentes do GH no metabolismo hepático da glicose e na secreção de insulina. A grelina não acetilada não se liga ao receptor tipo 1a, e parece agir como um antagonista da forma acetilada no controle glicêmico (38). A acetilação da grelina ocorre por ação da enzima O-acetiltransferase (GOAT) (39).

A cadeia acetil primária no resíduo de serina (Ser³) em humanos e roedores é predominantemente n-octano (O-grelina) (40-41), contudo outras formas de acetilação, incluindo a n-decano (D-grelina) e n-deceno, também são encontradas em humanos, roedores e felinos (42). Dados obtidos em um trabalho com camundongos evidenciaram que no jejum ocorre um aumento da isoforma D-grelina, no estômago e no plasma, porém a O-grelina encontra-se diminuída no sítio gástrico e aumentada na circulação. Isto indicaria uma discrepância na cinética das diferentes formas, embora ambas sejam produzidas pela mesma população celular. Sob um balanço energético negativo, como no jejum, a produção e secreção de D-grelina aumenta, para melhorar as condições energéticas através de seu efeito orexígeno e de possíveis efeitos desconhecidos em harmonia com a O-grelina (42).

A concentração de grelina aumenta no jejum e brevemente antes das refeições, e é suprimida pela ingestão de alimentos. Os mecanismos responsáveis pela supressão pós-prandial da grelina são obscuros, e resultados conflitantes foram encontrados em diferentes experimentos (43). A intensidade e a duração da supressão pós-prandial da grelina dependem da quantidade de calorias ingeridas, isto se as outras

características da dieta forem mantidas constantes (44). Um trabalho realizado com indivíduos saudáveis não obesos demonstrou que a magnitude de supressão pós alimentar da grelina era diferente, conforme a composição dos macronutrientes da dieta. A intensidade da supressão do hormônio era maior com as proteínas, seguida pelos carboidratos, e por último pelos lipídeos (45). Apesar de estar claro que a secreção de grelina é controlada em parte pelo *status* nutricional, um trabalho experimental evidenciou que ela também é regulada pela previsão condicionada da alimentação. Isto significa que um dos fatores relacionados à secreção da grelina poderia ser aprendido. A padronização do regime alimentar, se *ad libitum* ou em horários determinados, influencia os níveis plasmáticos pré e pós-prandiais de grelina, e significaria que a reação pós-prandial do hormônio não está simplesmente relacionado ao número de calorias ingeridas (46). Um estudo com ratos Wistar demonstrou que a ativação do sistema nervoso simpático no intestino é um dos mecanismos possíveis para explicar o pico pré-prandial de grelina, observado em humanos e em outros animais. Esse efeito é resultante da estimulação direta dos nervos simpáticos sobre as células produtoras de grelina, e não por uma inibição indireta da secreção de insulina (47). O índice de massa corporal (IMC) não está associado independentemente com a concentração de grelina, o que pode indicar que a relação entre obesidade e grelina é mediada pela resistência à insulina e pela hiperinsulinemia compensatória, e que a adipocidade por si não afetaria a concentração de grelina (48-49).

Achados em diversos estudos levaram a um consenso de que a grelina é um potente estimulador natural da ingestão alimentar, e seu efeito parece ser mediado em parte pelo estímulo à expressão dos peptídeos estimuladores do apetite: neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo relacionado ao gene *agouti* (AgRP) no núcleo arqueado do hipotálamo (43, 46). Em humanos a grelina é o único peptídeo orexígeno periférico bem definido (33).

Um modelo proposto para a ação fisiológica da grelina é de que ela não seria necessariamente, ou exclusivamente, um sinal que reflete o estômago repleto de alimentos. É mais provável que o sistema GOAT-grelina aja como um sensor ativado pelos ácidos graxos de cadeia média, que comunica ao cérebro que alimentos de alto valor calórico estão disponíveis (39). Os ácidos graxos de cadeia média e os triacilgliceróis de cadeia média exógenos são usados na acetilação da grelina (50).

A grelina foi caracterizada em estudos mais antigos como um potencializador da secreção de insulina. Ela atuaria nas células beta do pâncreas, e o cálcio seria o mediador de sua atividade; desta forma a grelina agiria como um fator trófico nas ilhotas pancreáticas (51-52). Trabalhos mais recentes com ratos demonstraram que a grelina é um hormônio autócrino e parácrino nas ilhotas pancreáticas, e que o antagonismo de seus efeitos poderia promover a secreção de insulina, e prevenir a intolerância à glicose induzida pela dieta com altos teores lipídicos (53-54). Um estudo em humanos saudáveis demonstrou que a administração de grelina exógena reduziu a secreção de insulina estimulada pela glicose, e que os antagonistas da grelina poderiam melhorar a função da célula beta pancreática (55).

A ação da grelina em sua forma acetilada e não acetilada no adipócito permanece assunto controverso na literatura. O tecido adiposo é encontrado em duas diferentes formas em mamíferos, com características morfológicas e funcionais distintas. O tecido adiposo marrom (BAT), também presente em adultos humanos, está principalmente envolvido em dissipação energética por meio da termogênese. Já o tecido adiposo branco (WAT) possui uma importante capacidade de depósito de energia na forma de triglicerídeos, a partir de onde os lipídeos são mobilizados para a utilização sistêmica. Ele é bem vascularizado e innervado, e contém também numerosas células imunes (56). Um trabalho experimental com células que superexpressam grelina demonstrou que este hormônio inibe a adipogênese, estimulando a proliferação de pré-adipócitos e inibindo sua diferenciação à adipócitos, provavelmente atuando em um subtipo desconhecido de receptor. A ativação deste subtipo de receptor pela grelina levaria a uma sequência de sinalização das vias intracelulares que envolvem a fosforilação da proteína quinase ativada por mitógenos (MAP quinase,) e uma inibição da atividade do PPAR- γ (57). Em um trabalho com ratos transgênicos que superexpressam grelina não acetilada, demonstrou-se uma inibição do desenvolvimento do tecido adiposo branco, melhorando a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina (58). Outro estudo realizado *in vitro* com células humanas, retiradas em cirurgias eletivas, demonstrou que a expressão da grelina em adipócitos era inversamente proporcional ao IMC. De forma similar com o que ocorria com os níveis plasmáticos, a expressão da grelina no tecido adiposo de indivíduos obesos parecia estar diminuída. Neste experimento, ambas as isoformas de grelina pareciam estar associadas ao depósito de lipídeos (59). Em outro estudo com oitenta indivíduos observou-se, em concordância com dados da literatura, que pacientes obesos, diabéticos ou não, apresentavam baixos

níveis de grelina total. Por outro lado, os títulos de grelina acetilada neste trabalho estavam elevados, o que poderia ter um papel na adiposidade e hiperfagia, e estar associado à relação positiva que foi evidenciada entre os níveis de grelina acetilada, o IMC e a medida da cintura dos pacientes. As formas acetilada e não acetilada do hormônio estavam relacionadas à deposição de lipídeos nos adipócitos viscerais humanos (60). Um estudo experimental demonstrou que a grelina acetilada estimulou o depósito de tecido adiposo branco no abdome, via receptor tipo 1a da grelina. Isto ocorreu provavelmente por inibição da exportação de lipídeos, e não por inibição da lipólise. Este experimento também concluiu que ainda é cedo para determinar o papel da grelina não acetilada na adiposidade (61). Com relação ao tecido adiposo marrom, um trabalho com camundongos demonstrou que o tratamento com baixas doses de grelina diminuía a expressão da proteína desacopladora 1 (UCP1) do BAT. A UCP1 é um dos marcadores de gasto energético, e considerando o balanço energético, a diminuição deste marcador poderia contribuir para o aumento do peso corporal e da adiposidade (62).

Considerando o que foi exposto acima, a grelina pode ser caracterizada como um hormônio orexígeno circulante, relacionado ao balanço energético, produzido principalmente no estômago, que quando acetilado adquire a sua forma ativa e se liga ao receptor secretagogo do hormônio do crescimento, exercendo muitos de seus efeitos. Como vimos, os níveis de grelina aumentam no jejum e são suprimidos pela ingestão de alimentos, e isto parece sinalizar ao sistema nervoso central que nutrientes calóricos estão disponíveis para a absorção. Entretanto, muitos aspectos relacionados ao controle fisiológico da grelina e seus efeitos biológicos são controversos.

1.4. A dieta de cafeteria como modelo experimental de obesidade:

A dieta de cafeteria representa um modelo útil para os estudos da obesidade humana, pois é uma dieta hipercalórica e hiperlipídica, palatável, que induz hiperfagia voluntária e ganho de peso corporal rápido. Ainda que por períodos curtos, como o de quinze dias, esta dieta é suficiente para produzir um aumento significativo na adiposidade de ratos Wistar (63). A alta adiposidade está relacionada mais a um incremento da gordura visceral do que dos depósitos subcutâneos (63). Apesar da dieta de cafeteria ser capaz de promover um estado pré-diabético, com aumentos da glicose, insulina e ácidos graxos não esterificados no plasma (64), alguns trabalhos demonstraram que a

ingestão alimentar é menor após o consumo de uma dieta rica em lipídeos, provavelmente por uma inibição da gordura sobre o esvaziamento gástrico, e um aumento da oxidação dos lipídeos durante a ingestão desta dieta (65-67). A secreção de adiponectina, em contraste com a secreção de outras adipocinas, está paradoxalmente diminuída na obesidade (68). Entretanto, trabalhos associando a dieta de cafeteria com a adiponectina demonstraram um aumento de sua expressão no tecido adiposo, e um incremento de seus títulos plasmáticos. Este fenômeno poderia representar um mecanismo de adaptação inicial à dieta altamente calórica, que, com a manutenção desta dieta por períodos maiores de tempo, quando então a deposição de gordura estivesse plenamente estabelecida, levaria finalmente a redução da capacidade de secreção de adiponectina pelo tecido adiposo. Assim, a diminuição dos níveis de adiponectina, nesta situação, seria mais uma consequência do que uma causa de obesidade (69-70).

Na obesidade, o aparecimento da resistência à insulina e da hiperinsulinemia compensatória provavelmente são a razão da supressão dos níveis de grelina (48). Entretanto, em animais submetidos a uma dieta prévia com alto teor de lipídeos (45% do total energético na forma de gorduras), durante duas semanas e sob um jejum de oito horas, houve um aumento significativo da expressão do gene da grelina no estômago, quando comparado a uma dieta standard (12% do total energético na forma de gorduras). Por outro lado, a dieta com alto teor de lipídeos em ratos fora do jejum mostrou uma tendência a diminuir a expressão do gene da grelina no estômago, quando comparada à dieta *standard*, ainda que sem significância estatística (71).

Apesar da dieta de cafeteria ser útil no estudo do impacto da dieta humana, ao se utilizar animais como modelos biológicos, os trabalhos tem mostrado resultados distintos quando ela é relacionada a aspectos como o peso, níveis de adiponectina e grelina.

1.5. A pioglitazona e seus efeitos sobre os níveis de adiponectina e grelina:

A pioglitazona é uma droga da classe das tiazolinedionas, que tem demonstrado nos estudos ter uma série de ações metabólicas, como a diminuição dos níveis plasmáticos de triglicerídeos e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), um aumento no tamanho das partículas de LDL, um incremento da concentração de lipoproteínas de alta densidade e

uma diminuição na lipogênese hepática *de novo* em mais de 40% (72-73).

Como já foi mencionado, a pioglitazona pode elevar os níveis plasmáticos de adiponectina, através da ativação do receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissomo (PPAR- γ) (15). A administração de pioglitazona por duas semanas a ratos inibe a resistência à ação da insulina no fígado, provocada pelos ácidos graxos livres (74). Parece que a atividade da pioglitazona é dose e tempo dependente, inicialmente afetando a ação da insulina no fígado, e, após, sistemicamente (74). Um experimento com células murinas e humanas demonstrou que a adiponectina é estimulada pela pioglitazona, de uma forma aguda e dose dependente, após apenas 2 horas de exposição à droga (75). Em homens normoglicêmicos que receberam pioglitazona, os níveis de adiponectina aumentaram significativamente em 3 dias após a administração da droga, o que precedeu qualquer mudança no *status* do metabolismo glicolipídico ou inflamatório (76). Em pacientes portadores de *diabetes mellitus* tipo 2 a administração de pioglitazona por 4 semanas aumentou significativamente os níveis de adiponectina, e melhorou a disfunção vascular (77-78).

O efeito da pioglitazona nos níveis de grelina na ausência de ganho de peso ainda é incerto. A maior supressão da grelina em pacientes diabéticos em uso de pioglitazona, após a ingestão de alimentos, é dependente das mudanças do peso corporal e não do tratamento com a droga (79). Também em indivíduos diabéticos, a metformina, ao contrário da pioglitazona, diminuiu os níveis séricos de grelina, após 75 gramas de glicose por via oral. Isto ocorreu provavelmente pela maior estabilidade do peso em pacientes tratados com metformina (80). Em outro ensaio clínico com pacientes portadores de *diabetes mellitus*, os níveis pós-prandiais de grelina total e acetilada foram similares em pacientes diabéticos tratados com metformina, pioglitazona ou apenas dieta (81).

Considerando o que foi acima descrito sobre a pioglitazona, pode-se concluir que, ao contrário de sua relação com a adiponectina, o efeito da droga sobre a grelina é mais controverso, já que os trabalhos demonstraram resultados conflitantes.

2. JUSTIFICATIVA

As interações entre o peso corporal, as características nutricionais da dieta e a resistência à insulina com os níveis plasmáticos de grelina e adiponectina, e, conseqüentemente, com o balanço energético celular, permanecem como objeto de controvérsia na literatura. A dieta de cafeteria é um modelo útil para o estudo da obesidade, pois é hipercalórica e hiperlipídica, e induz hiperfagia voluntária e rápido ganho de peso. Por outro lado, a dieta com alto teor de lipídeos pode ocasionar hipofagia, em decorrência da lentificação do esvaziamento gástrico e da maior oxidação das gorduras. O conhecimento do impacto da dieta de cafeteria sobre os níveis de grelina e adiponectina permitirá um avanço no entendimento da dinâmica desses hormônios em relação à composição dos alimentos ingeridos. Os hábitos alimentares inapropriados, que se encontram padronizados no modelo da dieta de cafeteria, precisam ser mais bem estudados, já que o aumento da obesidade em escala mundial não pode ser explicado somente por mudanças na bagagem genética. A secreção de adiponectina, em contraste com a secreção de outras adipocinas, está paradoxalmente diminuída na obesidade. Entretanto, trabalhos associando a dieta de cafeteria com a adiponectina demonstraram um aumento de sua expressão nos adipócitos, e um incremento de seus títulos plasmáticos, talvez como uma adaptação inicial não duradoura à expansão do tecido adiposo. Tanto a grelina quanto a adiponectina são hormônios relacionados ao balanço energético, e, provavelmente em conjunto com o comportamento alimentar atual, estão relacionados ao aumento global da obesidade e suas implicações secundárias à saúde humana. Além disso, estudos avaliando as conseqüências da administração de pioglitazona sobre os níveis sérico de grelina são escassos e com resultados divergentes. Também pouco numerosos são os trabalhos que avaliaram os efeitos da grelina sobre a secreção de adiponectina. Evidências sugerem que a pioglitazona é capaz de aumentar rapidamente os níveis de adiponectina em animais e humanos, mas seus efeitos benéficos sobre o metabolismo dos carboidratos não ocorrem de forma tão imediata. Por estes motivos, a compreensão da interação dos mecanismos de ação da pioglitazona e de seus efeitos terapêuticos desejados, como a diminuição da resistência à ação da insulina, com os níveis de grelina e adiponectina trariam luz às intrincadas interações existentes entre fatores ambientais, como o aporte alimentar, e o balanço energético celular, sob a influência de vias hormonais específicas.

II. OBJETIVOS

1 GERAL:

- Identificar o impacto das características da dieta por 5 semanas e da administração de pioglitazona sobre fatores relacionados ao controle metabólico (glicose, insulina, adiponectina e grelina) em modelo animal.

2 ESPECÍFICOS:

- Identificar o impacto da dieta de cafeteria sobre a variação do peso corporal e a resistência à ação da insulina (glicose, insulina e HOMA-IR).
- Estudar o efeito da dieta de cafeteria sobre os níveis séricos de adiponectina, grelina total e grelina acetilada.
- Analisar as consequências da administração de pioglitazona sobre os títulos séricos de adiponectina, grelina total e grelina acetilada.

III MÉTODOS

1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este é um estudo analítico experimental controlado e com intervenção envolvendo animais, que foi desenvolvido no Laboratório da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental (TOCE) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

2. AMOSTRA

Um total de 24 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem *Wistar*, machos adultos, com 60 dias de vida e peso médio entre 250 e 300 gramas, provenientes do biotério central da UFSC, permaneceram em regime de adaptação no laboratório por um período de sete dias antes do início das atividades. Durante todo o experimento foram controlados os níveis de ruído, luz e se manteve o ciclo dia e noite bem definido (com fotoperíodo de 12 horas). A umidade foi mantida a $55\pm 10\%$ e a temperatura entre 20 e 24°C (82). O peso dos ratos foi aferido e registrado semanalmente, sempre no mesmo dia e no mesmo período, bem como no momento do sacrifício por meio de balança digital (**Precision®**, **PR 1000**).

Os animais foram distribuídos em 04 subgrupos, a saber (figura 1):

Subgrupo cafeteria SGC (n=6)

Esse subgrupo de ratos recebeu uma dieta hipercalórica (dieta de cafeteria) e ração por 05 semanas. Nos últimos 14 dias previamente a eutanásia estes animais receberam pioglitazona na dose de 10mg/Kg de peso. A escolha da dose de pioglitazona teve por base outros trabalhos similares da literatura (83-84).

Subgrupo cafeteria controle SGCC (n=6)

Esse subgrupo de animais recebeu uma dieta hipercalórica (dieta de cafeteria) e ração por 05 semanas. Nos últimos 14 dias previamente à eutanásia estes animais receberam solução salina.

Subgrupo ração SGR (n=6)

Esse subgrupo recebeu uma dieta balanceada (ração específica para ratos) por 05 semanas. Nos últimos 14 dias previamente à eutanásia estes animais receberam pioglitazona na dose de 10 mg/Kg de peso.

Subgrupo ração controle SGRC (n=6)

Esse subgrupo recebeu uma dieta balanceada (ração específica para ratos) por 05 semanas. Nos últimos 14 dias, previamente à eutanásia, estes animais receberam solução salina.

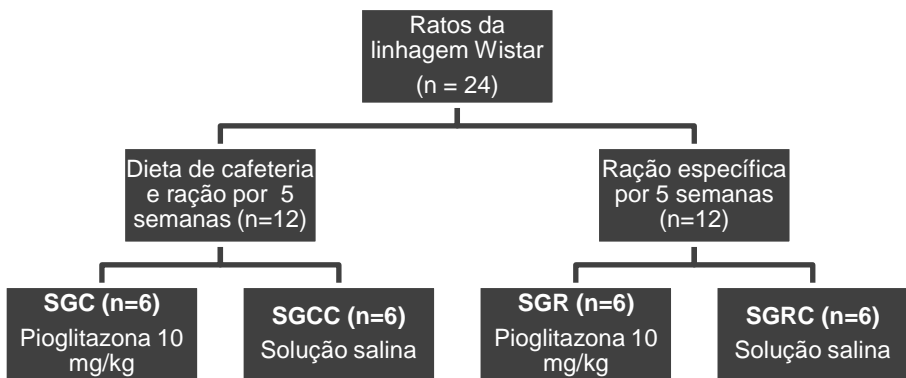


Figura 1. Organograma representando a divisão dos grupos experimentais.

3. PROTOCOLO DE ALIMENTAÇÃO

Após a divisão dos animais em 4 grupos experimentais, os ratos do SGC e SGCC receberam diariamente dieta de cafeteria e ração específica para ratos *ad libitum*, enquanto os do SGR e SGRC receberam apenas ração específica para ratos, também *ad libitum*.

3.1. Dieta de Cafeteria

Teve como base as dietas utilizadas em trabalhos e publicadas na literatura (63-64), e era constituída de:

- Alimentos sólidos altamente energéticos, incluindo chocolate, bala de leite, *donuts*, biscoito recheado, pão, bacon, salame, presunto cozido, queijo gordo, amendoim.

- Dieta líquida: incluía água *ad libitum* e refrigerante.

A distribuição dos alimentos respeitou uma proporção de 45% de carboidratos, 45% de lipídeos e 10% de proteínas.

3.2. Ração para Ratos

A dieta balanceada utilizada para a alimentação dos ratos foi a ração Nuvilab Cr-1®, específica para ratos e camundongos, com a seguinte composição: Proteína Bruta 22 a 22,5%, lipídeos 4,4 a 4,6% e carboidratos de 53 a 55%

- A dieta *Standard* (ração) foi administrada *ad libitum*
- A água foi oferecida *ad libitum*

4. ASPECTOS ÉTICOS

Os procedimentos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC sob o número PP00552 (Anexo A).

5. INTERVENÇÕES

5.1. Gavagem

Procedimento em que a substância é introduzida na cavidade oral ou no aparelho digestivo, por meio de um tubo esofágico ou estomacal. Um tubo flexível (ou agulha) com a ponta arredondada é introduzido na boca do animal, e gentilmente empurrado pelo esôfago até o estômago. No trabalho em questão foi escolhido o uso de um tubo fino acoplado a um *ependorf*, que serviu de bocal, para a administração de pioglitazona

(10mg/Kg de peso) ou salina até o estômago, por se mostrar menos traumático do que as agulhas rígidas.

5.2. Procedimento Anestésico

Previamente à anestesia, foi administrada em cada animal uma dose de atropina na quantidade de 0.05 miligramas/Kg de peso por via subcutânea, um anticolinérgico visando evitar a sialorréia excessiva durante o ato anestésico (85). Após identificação dos animais, a anestesia foi realizada com uma solução de ketamina 50mg/Kg, associada à xilazina 10mg/Kg injetada intramuscular, na face interna de uma das patas traseiras (85). A efetividade da anestesia foi avaliada pela ausência de reflexo córneo-palpebral e reação motora após prensão com pinça do coxim adiposo de uma pata dianteira. Os animais foram então devidamente pesados.

5.3. Obtenção das amostras de soro

As amostras para a determinação dos níveis séricos de glicose, insulina, grelina e adiponectina foram obtidas por punção cardíaca, após o procedimento anestésico e depois de um jejum de 8 horas. Após a coleta, o sangue foi centrifugado, depois de meia hora em temperatura ambiente, para a obtenção do soro. As amostras para a aferição da grelina total e acetilada foram coletadas em um tubo separado, onde foi acrescentado o inibidor da protease Cloridrato de fluoreto de 4-(2-aminoetil) benzenossulfonila da **Sigma Aldrich Brasil®**, em razão da instabilidade do hormônio.

Todas as amostras foram congeladas a -70°C , e descongeladas apenas no dia da realização dos ensaios. Antes do congelamento, o soro destinado à aferição da grelina total e acetilada foi acidificado.

5.4. Eutanásia

Foram utilizadas no experimento as doses de 150mg/kg de Ketamina e 30 mg/kg de Xilazina IM (85).

6. ANÁLISES LABORATORIAIS

6.1. Determinação dos níveis séricos de insulina, adiponectina, grelina total e grelina acetilada

Os níveis de insulina foram definidos através do KIT insulina rato-camundongo da marca Millipore® (ensaio ELISA), os de adiponectina pelo Kit adiponectina-rato da marca Millipore® (ensaio ELISA), e os de grelina pelos KITS grelina total e grelina active rato-camundongo, também da marca Millipore® (ensaio ELISA). Os limites inferiores de detecção para os ensaios e as variações ideais de valores eram:

- Insulina – 0,2 ng/mL e 0,2 a 10 ng/mL
- Adiponectina – 0,155 ng/mL e 3,125 a 200 ng/mL
- Grelina total – 0,02 ng/mL e 0,1 a 10 ng/mL
- Grelina active – 6 pg/mL e 25 a 2000 pg/mL

O ensaio ELISA utilizado foi do tipo sanduíche, em que um anticorpo conhecido (anticorpo de captura), neste caso direcionado ao antígeno (hormônio) que se quer mensurar, está fixado a uma placa de poliestireno. Faz-se uma primeira lavagem para retirar o anticorpo livre. Adiciona-se a amostra com o antígeno que se quer identificar e quantificar, que se liga ao anticorpo dentro dos poços da placa. Segue-se nova lavagem para eliminar o antígeno não ligado ao anticorpo. Acrescenta-se então um conjugado composto de outro anticorpo dirigido contra o antígeno, associado a uma enzima. Lava-se para retirar o conjugado livre. Adiciona-se por fim um cromógeno, e um substrato que, no caso de atividade enzimática, muda de cor e pode ser detectado por espectrofotometria. Foram utilizados os filtros de 450nm e 590nm na leitora de ELISA (espectrofotômetro), e todos os procedimentos relacionados à análise do material biológico colhido seguiram rigorosamente as instruções do fabricante dos Kits de exame e foram realizados em duplicata.

6.2. Determinação da glicemia

A glicemia foi determinada através do método da hexokinase da Siemens Healthcare Diagnostics Inc.®. A glicose é fosforizada com adenosina trifosfato (ATP) na reação catalisada pela hexoquinase (HK). O produto glicose-6-fosfato (G6P) é então oxidado com a redução concomitante da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP)

para NADPH (forma reduzida da coenzima), na reação catalisada pela glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH). Um mol de NADP é reduzido a um mol de NADPH para cada mol de glicose presente. A absorbância em relação aos níveis de NADPH, e consequentemente da concentração de glicose, é então determinada.

6.3. Cálculo do modelo de avaliação da homeostase para resistência à insulina (HOMA-IR)

Os valores do HOMA-IR foram calculados por meio da seguinte fórmula: $\text{HOMA-IR} = \text{Glicemia de jejum (mg/dL)} \times \text{Insulina sérica de jejum (\mu\text{U/mL})} / 405$.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Após a constatação de que os dados assumiam uma distribuição normal, por meio do teste de Shapiro-Wilk, a comparação das médias dos diferentes subgrupos foi realizada utilizando o método estatístico ANOVA com correção de Bonferroni. O teste t pareado foi utilizado para comparação das médias entre diferentes semanas de tratamento em cada subgrupo. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando software SPSS versão 17.0. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

IV. RESULTADOS

Varição do peso corporal nos diferentes grupos ao longo das semanas de estudo e peso médio final no dia do sacrifício dos animais nos diferentes subgrupos:

A Figura 2 mostra a evolução das médias dos pesos em gramas nos diferentes subgrupos ao longo do estudo. Quando foi comparado o peso médio ao final do acompanhamento com o peso inicial foi observado um aumento significativo do peso corporal durante o período do estudo nos animais dos quatro subgrupos ($P < 0,05$). Quando o peso dos animais na semana 3, momento em que foi iniciada a intervenção (pioglitazona ou salina), foi comparado ao peso na semana 5, apenas os animais do SGCC apresentaram ganho de peso com tendência à significância estatística ($P = 0,073$). Não foram observadas diferenças entre os pesos da semana 3 e 5 nos demais subgrupos ($P > 0,100$).

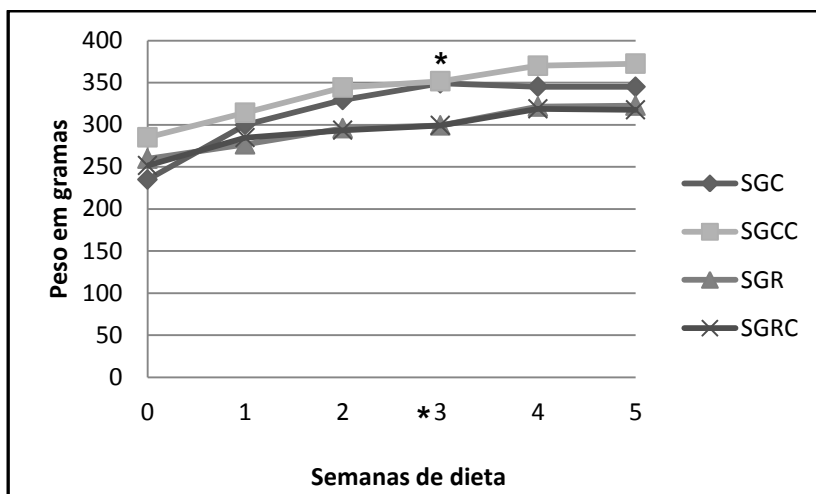


Figura 2. Evolução das médias dos pesos em gramas nos diferentes subgrupos desde o início do estudo, quando os animais apresentavam 60 dias de vida, até o dia do sacrifício quando estavam com 95 dias de vida. *Início da intervenção.

As médias de peso ao final do acompanhamento são exibidas na Tabela 1. Quando comparados quanto ao peso corporal final, os animais do subgrupo SGCC apresentaram médias significativamente maiores do que aquelas observadas para o subgrupo SGR ($P = 0,035$) e SGRC ($P = 0,017$). Não foram observadas diferenças na comparação do peso corporal entre os demais grupos ($P > 0,05$) (Figura 3).

Tabela 1 – Peso corporal (gramas) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC):

Grupos	SGC	SGCC	SGR	SGRC
Final*	345,00	372,50	322,66	317,66
DP*	± 35,19	± 21,01	± 28,42	± 25,11

*Média ± Desvio Padrão (DP)

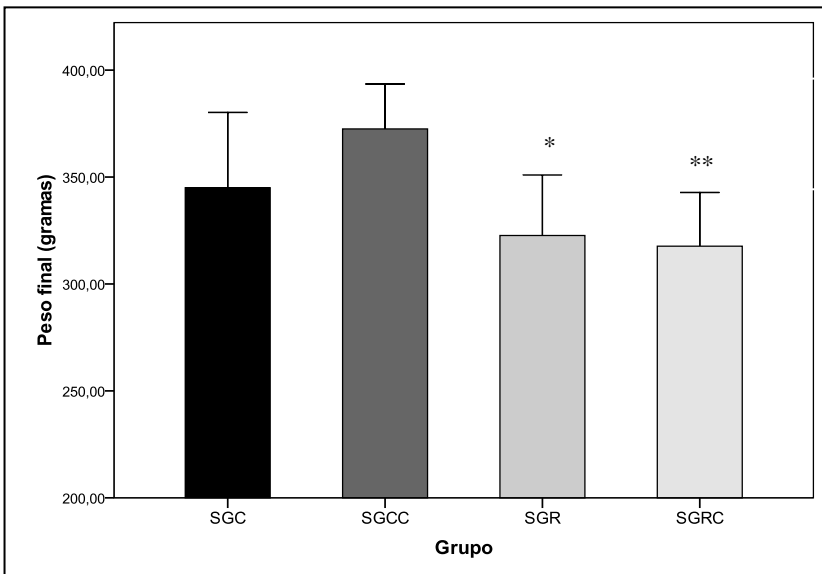


Figura 3. Peso corporal (Média ± Desvio Padrão) ao final do acompanhamento (gramas) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC). * $P = 0,035$ para comparação entre SGR e SGCC. ** $P = 0,017$ para comparação entre SGRC e SGCC.

Níveis médios das glicemias em amostras de sangue colhidas no dia do sacrifício dos animais nos diferentes subgrupos:

As médias de glicemia das amostras de sangue colhidas no final do acompanhamento nos diferentes grupos de animais são exibidas na Tabela 2. Não foram observadas diferenças na comparação das médias glicêmicas entre os grupos ($P>0.05$) (Figura 4).

Tabela 2 – Glicemia (mg/dL) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC):

Grupos	SGC	SGCC	SGR	SGRC
Média*	219,66	211,66	231,16	249,83
DP*	± 86,93	± 58,16	± 48,39	± 71,98

*Média ± Desvio Padrão (DP)

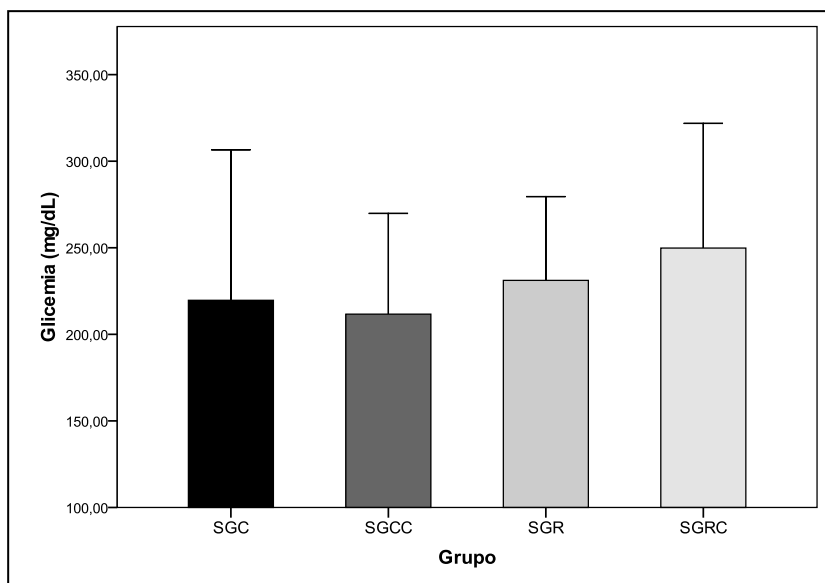


Figura 4. Glicemia (Média ± Desvio Padrão) ao final do acompanhamento (mg/dL) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC).

Níveis médios da insulina nos diferentes subgrupos em amostras de sangue colhidas no dia do sacrifício dos animais:

As médias de insulina das amostras de sangue colhidas no final do acompanhamento nos diferentes grupos de animais são exibidas na Tabela 3. Não foram observadas diferenças na comparação das médias da insulina entre os grupos ($P>0.05$) (Figura 5).

Tabela 3 – Insulina (ng/mL) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC):

Grupos	SGC	SGCC	SGR	SGRC
Final*	0,49	0,44	0,25	0,31
DP*	± 0,10	± 0,22	± 0,16	± 0,30

*Média ± Desvio Padrão (DP)

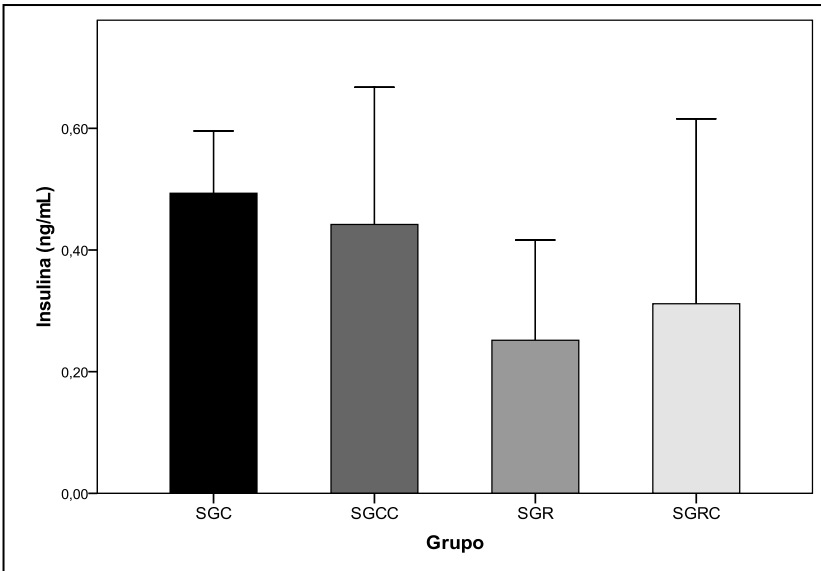


Figura 5. Insulina (Média ± Desvio Padrão) ao final do acompanhamento (ng/mL) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC).

Níveis médios do modelo de avaliação da homeostase para resistência à insulina (HOMA-IR):

As médias do HOMA-IR ao final do acompanhamento nos diferentes grupos de animais são exibidas na Tabela 4. Não foram observadas diferenças na comparação das médias do HOMA-IR entre os grupos ($P>0.05$) (Figura 6).

Tabela 4 – HOMA IR nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC):

Grupos	SGC	SGCC	SGR	SGRC
Final*	5,76	5,42	2,92	4,82
DP*	± 2,26	± 3,07	± 1,94	± 5,32

*Média ± Desvio Padrão (DP)

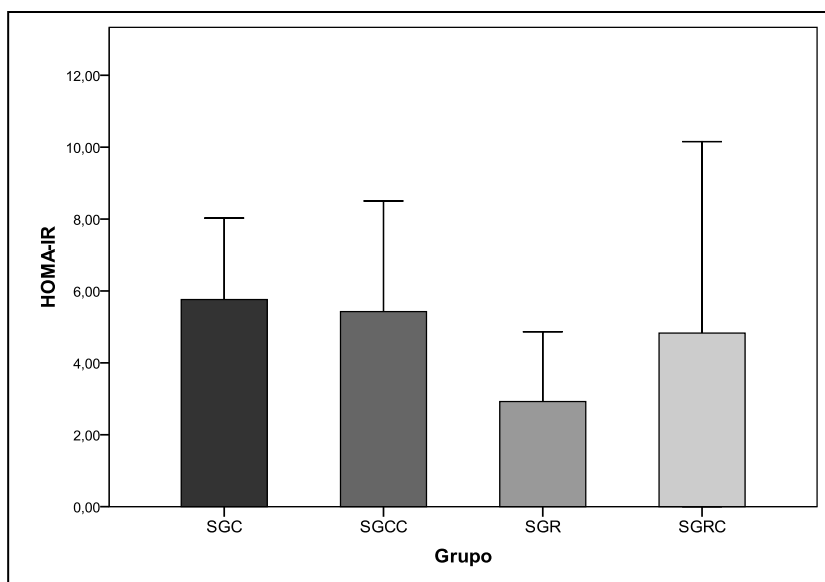


Figura 6. HOMA-IR (Média ± Desvio Padrão) ao final do acompanhamento nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC).

Níveis médios da adiponectina nos diferentes subgrupos em amostras de sangue colhidas no dia do sacrifício dos animais:

As médias de adiponectina das amostras de sangue colhidas no final do acompanhamento são exibidas na Tabela 5. Quando comparados quanto à adiponectina sérica final, os animais do subgrupo SGR apresentaram médias significativamente maiores do que as observadas no subgrupos SGCC ($P=0,027$) e SGRC ($P = 0,014$). Não foram observadas diferenças na comparação da adiponectina entre os demais grupos ($P>0,05$) (Figura 7).

Tabela 5 – Adiponectina (ng/mL) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC):

Grupos	SGC	SGCC	SGR	SGRC
Final*	50,76	32,54	55,91	30,52
DP*	± 9,29	± 9,03	± 20,62	± 6,97

*Média ± Desvio Padrão (DP)

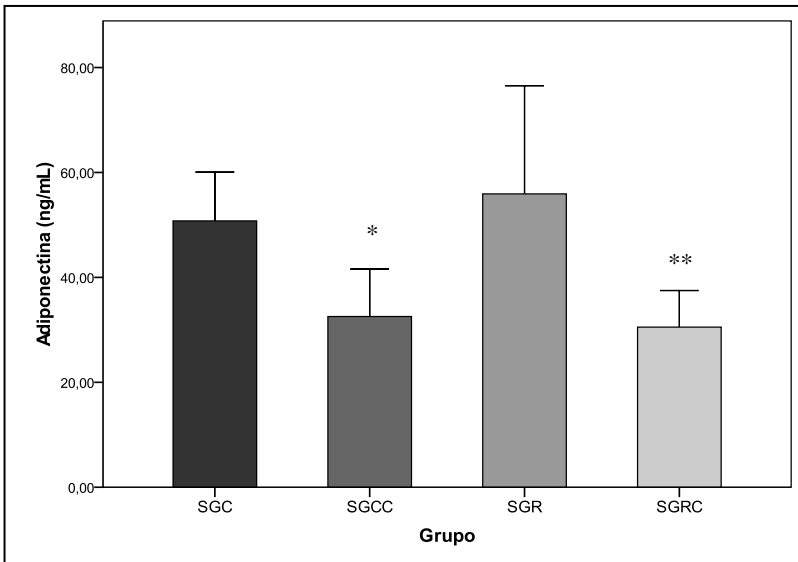


Figura 7. Adiponectina (Média ± Desvio Padrão) ao final do acompanhamento (ng/mL) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC). * $P = 0,027$ para comparação entre SGCC e SGR. ** $P = 0,014$ para comparação entre SGRC e SGR.

Níveis médios da grelina total nos diferentes subgrupos em amostras de sangue colhidas no dia do sacrifício dos animais:

As médias da grelina total das amostras de sangue colhidas no final do acompanhamento são exibidas na Tabela 6. Quando comparados quanto à grelina total sérica final, os animais do subgrupo SGC apresentaram médias significativamente maiores do que aquelas observadas para o subgrupo SGR ($P = 0,006$). Não foram observadas diferenças na comparação da grelina total entre os demais grupos ($P > 0,05$) (Figura 8).

Tabela 6 – Grelina total (ng/mL) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC):

Grupos	SGC	SGCC	SGR	SGRC
Final*	1,65	1,21	0,65	1,15
DP*	± 0,69	± 0,34	± 0,36	± 0,29

*Média ± Desvio Padrão (DP)

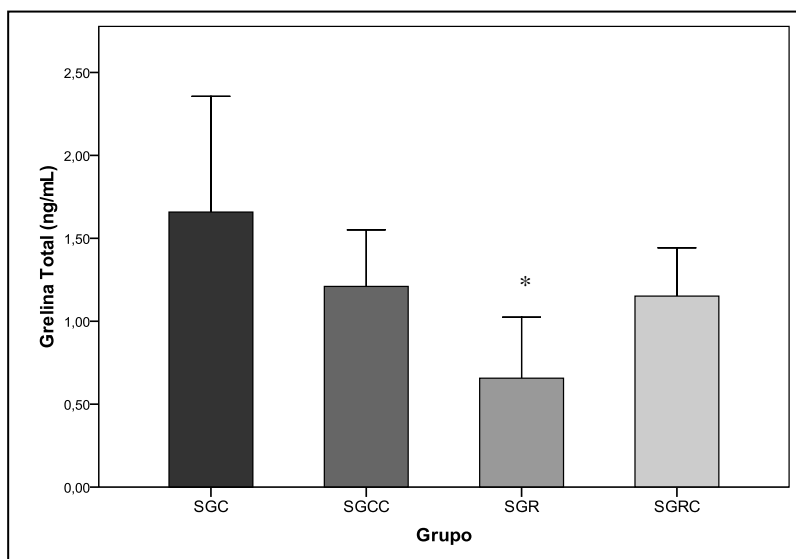


Figura 8. Grelina total (Média ± Desvio Padrão) ao final do acompanhamento (ng/mL) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC). * $P = 0,006$ para comparação entre SGR e SGC.

Níveis médios da grelina acetilada nos diferentes subgrupos em amostras de sangue colhidas no dia do sacrifício dos animais:

As médias de grelina acetilada das amostras de sangue colhidas no final do acompanhamento são exibidas na Tabela 7. Quando comparados quanto à grelina acetilada sérica final, os animais do subgrupo SGC apresentaram médias significativamente maiores do que aquelas observadas para o subgrupo SGCC ($P = 0,047$) e SGR ($P = 0,009$). Não foram observadas diferenças na comparação da grelina acetilada entre os demais grupos ($P > 0,05$) (Figura 9).

Tabela 7 – Grelina acetilada (pg/mL) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC):

Grupos	SGC	SGCC	SGR	SGRC
Final*	471,52	259,44	193,01	268,48
DP*	± 195,09	± 86,36	± 87,61	± 78,97

*Média ± Desvio Padrão

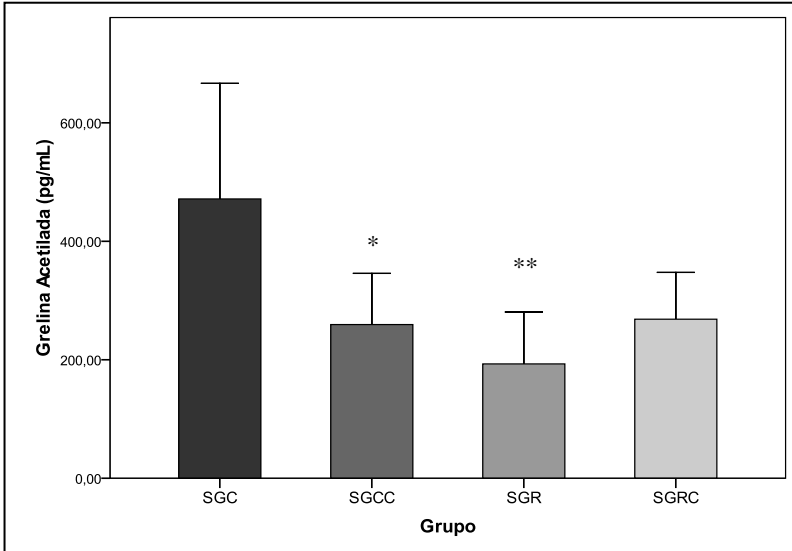


Figura 9. Grelina acetilada (Média ± Desvio Padrão) ao final do acompanhamento (pg/mL) nos subgrupos cafeteria (SGC), cafeteria controle (SGCC), ração (SGR) e ração controle (SGRC). * $P = 0,047$ para comparação entre SGCC e SGC. ** $P = 0,009$ para comparação entre SGR e SGC.

V. DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi examinar uma parte do balanço energético celular, sob um contexto hormonal, em grupos de animais submetidos a uma dieta hipercalórica e hiperlipídica e à intervenção farmacológica. O estudo da influência dos fatores exógenos, como a dieta, no aparecimento da obesidade é de grande importância, visto que em humanos, o excesso de peso, apesar do nítido componente genético, raramente é monogênico (86). A relevância das pesquisas relacionadas à obesidade tem como base o aumento na sua prevalência global, e a sua conexão com o aparecimento da síndrome metabólica e das complicações cardiovasculares. As controvérsias na literatura envolvendo a descrição de novos hormônios, e sua relação com a obesidade e síndrome metabólica, tornam de máxima importância, na atualidade, o assunto abordado. A realização do estudo como experimento em cobaias permite uma intervenção adequada, e um controle mais rígido do meio onde se desenvolve o trabalho.

1. A DIETA DE CAFETERIA E O PESO CORPORAL

Quando foi avaliada a média ponderal ao final do acompanhamento nos diferentes subgrupos de animais, foi observada uma diferença significativa, com peso superior no SGCC, que recebeu dieta de cafeteria, ração e solução salina, em relação ao SGR, que recebeu ração balanceada para a espécie e pioglitazona ($P= 0,035$) e ao SGRC, que recebeu dieta balanceada e solução salina ($P=0,017$). Este achado vai ao encontro do que foi demonstrado na literatura, onde um curto período de dieta de cafeteria (15 dias) foi suficiente para levar a um aumento significativo na adiposidade em ratos Wistar, e esta adiposidade aumentada estava mais relacionada à obesidade visceral do que aos depósitos subcutâneos de gordura (63). No entanto, quando comparados aos demais grupos, não foi observada diferença estatística na média de peso final dos ratos do SGC. Estudos anteriores indicam que dietas ricas em gorduras, portanto com alto teor calórico, podem gerar hipofagia e uma supressão do ganho de peso (65-67). É possível que este fenômeno esteja relacionado à ausência de diferença e até mesmo à tendência numérica de perda de peso observada no SGC, que ainda sofreu o efeito adicional da administração de pioglitazona, conforme descrito no tópico pioglitazona e o peso corporal. Corroborando a inferência anterior, ao comparar o peso na terceira semana, quando se iniciou a intervenção com pioglitazona, e na quinta

semana, existe uma tendência a ganho de peso apenas para o SGCC ($p=0,073$), embora o SGC também tenha recebido a dieta hipercalórica. Foi notável no presente estudo a necessidade de adotar versões diferentes da dieta de cafeteria para que não houvesse uma diminuição da ingestão alimentar.

2. A PIOGLITAZONA E O PESO CORPORAL

Com relação à interferência da pioglitazona no peso, não se encontrou qualquer diferença estatística ao se comparar os diferentes subgrupos, mesmo quando se relacionou o SGR, que recebeu pioglitazona, ao SGRC, que recebeu solução salina, sem a interferência do aporte de gorduras da dieta de cafeteria. Vários trabalhos realizados em indivíduos diabéticos constataram um aumento de peso associado ao uso de drogas da classe das tiazolinedionas, da qual faz parte a pioglitazona, atribuído a múltiplos fatores relacionados à ação destas drogas (87-90). Outros autores, ao contrário, não encontraram qualquer associação entre a administração desta classe de drogas e o incremento do peso corporal em animais e humanos (84, 90-91). Um fato importante, que deve ser destacado, é que os animais do SGC apresentaram diarreia após a introdução da pioglitazona, diarreia esta que pode ter sido o resultado da associação da dieta de cafeteria, rica em lipídeos e carboidratos, com a pioglitazona. Corroborando esta inferência, encontramos na literatura que entre os fatores relacionados ao abandono do uso desta droga estão a diarreia e as náuseas (92). Em humanos, existem múltiplas evidências que dietas ricas em carboidratos nas formas de sucos e refrigerantes possam causar diarreia (93-94). Da mesma forma, a ingestão de alimentos ricos em gorduras também pode causar diarreia. Lipídeos e ácidos graxos não digeridos que alcançam o íleo distal ou o cólon, quando fermentados por bactérias, levam à produção de hidroxíácidos graxos, que podem lesar a mucosa intestinal ou causar diarreia osmótica (95).

3. A DIETA DE CAFETERIA E OS NÍVEIS SÉRICOS DE GLICOSE

Não foram encontradas diferenças estatísticas nos níveis de glicose sérica de jejum entre os diferentes grupos estudados. Quando comparados o SGCC ao SGRC, que receberam dietas distintas sem a

administração de pioglitazona, não se encontrou qualquer diferença. Os trabalhos publicados na literatura que abordaram o efeito da dieta de cafeteria sobre os níveis glicêmicos de jejum mostraram resultados diversos. Um experimento com ratos da linhagem Wistar, submetidos à dieta de cafeteria ou dieta balanceada (ração) por curto período de tempo, mostrou até mesmo uma diminuição das glicemias de jejum no grupo de ratos machos alimentados com a primeira dieta, achado este que não foi discutido no trabalho (63). Outros experimentos, também com ratos Wistar, não mostraram diferenças estatísticas nas glicemias de jejum, quando se comparou os grupos de animais que receberam uma dieta balanceada para a espécie aos que receberam dieta de cafeteria, ainda que nestes trabalhos a dieta hipercalórica tenha sido mantida por maiores períodos de tempo, variando de 7 a 12 semanas (64, 96). O trabalho que não demonstrou diferença nas médias glicêmicas de jejum dos ratos submetidos à dieta de cafeteria por 7 semanas encontrou esta diferença estatística, com aumento dos níveis glicêmicos, quando a dieta em questão foi estendida por 15 semanas (64). É provável que a alteração da glicemia de jejum esteja relacionada à duração da dieta de cafeteria, e que os desfechos distintos nos diferentes trabalhos estejam também relacionados à falta de padronização das dietas instituídas, que algumas vezes assumem até aspectos regionais, assim como a alimentação humana.

4. A PIOGLITAZONA E O CONTROLE GLICÊMICO

Quando comparados os grupos que receberam pioglitazona (SGC, SGR) aos que não a receberam (SGCC, SGRC), nenhuma diferença foi encontrada com relação às médias glicêmicas de jejum. Dois trabalhos experimentais com ratos machos Wistar, alimentados com dieta balanceada para a espécie, que receberam pioglitazona na dose de 10mg/Kg por 2 e 12 semanas, respectivamente, também demonstraram ausência de diferenças estatísticas nos valores médios das glicemias de jejum (84, 97). Nem mesmo quando foi adicionada frutose à dieta a pioglitazona foi capaz de diminuir os níveis de glicose em jejum (84). Estudos com pacientes diabéticos evidenciaram diminuição das glicemias médias de jejum com a administração de pioglitazona por períodos de 2 a 4 semanas (98-99). No entanto, outro estudo, também com pacientes diabéticos, que receberam pioglitazona por 4 semanas não encontrou nenhuma diferença nas médias glicêmicas de jejum, quando comparados os grupos placebo ao pioglitazona (77). É possível que fatores, como o valor da glicemia basal antes do tratamento com a

pioglitazona, possam interferir na diminuição ou não das médias glicêmicas após a administração de pioglitazona. Assim peculiaridades da amostra estudada, como a gravidade no distúrbio do metabolismo dos carboidratos e a idade, poderiam explicar a variação dos resultados encontrados. Em modelos animais de *diabetes mellitus* tipo 2 (ratos Zucker) a resposta à pioglitazona será mais efetiva quanto mais jovem for o animal no início da administração da droga (100).

5. A DIETA DE CAFETERIA E A INSULINEMIA

Não foram observadas diferenças entre as médias dos títulos de insulina dos diferentes grupos de animais estudados. Assim como aconteceu com as médias glicêmicas, é provável que a ausência de diferença em relação às médias de insulina de jejum também esteja relacionada ao tempo de administração da dieta, e que a diversidade de resultados encontrados na literatura decorra das peculiaridades da composição das diferentes dietas de cafeteria. Um experimento com ratos Wistar comparando a dieta de cafeteria por período curto de tempo (2 semanas) à dieta balanceada, com relação à insulina de jejum, também não evidenciou diferença estatística (63). Outro trabalho experimental com ratos Wistar, submetidos à dieta de cafeteria ou ração balanceada para a espécie por 12 semanas, não evidenciou diferenças na comparação dos valores médios de insulina entre os animais alimentados com as duas dietas (96). No entanto, um trabalho também com ratos Wistar alimentados com dieta de cafeteria ou ração balanceada demonstrou diferença estatística, com níveis médios de insulina superiores nos animais que receberam a dieta de cafeteria por um período de 7 semanas (64). Conforme descrito acima, além do tempo de dieta, é provável que variações na composição da dieta de cafeteria tenham influenciado os diferentes trabalhos que utilizaram este modelo.

6. A PIOGLITAZONA E A INSULINEMIA

Não foram detectadas diferenças nos níveis médios de insulina de jejum quando comparados os grupos que receberam ou não a intervenção com pioglitazona. Isto ficou evidente mesmo ao se comparar os grupos SGR e SGRC que não sofreram o impacto da dieta de cafeteria. Um estudo experimental com ratos Wistar, alimentados com dieta balanceada para a espécie, não encontrou diferença significativa nos níveis séricos de insulina ao comparar 2 grupos de

ratos que receberam ou não pioglitazona, mesmo com a administração da droga por períodos de até 12 semanas (84). No entanto, outro experimento, também com ratos Wistar machos tratados com ração, demonstrou diminuição dos níveis de insulina com apenas 2 semanas de administração de pioglitazona (97). Trabalhos realizados com seres humanos diabéticos demonstraram desde a ausência de diferença nos níveis séricos das médias de insulina de jejum, com a administração da pioglitazona por 4 semanas (78), até a diminuição da insulinemia, quando a droga foi administrada por períodos de 1 até 12 meses (77, 99). Assim, como no efeito da pioglitazona sobre o controle glicêmico, múltiplos fatores relacionados à amostra podem modular o achado de diferença ou não nos níveis de insulina, quando a droga é administrada. Entre esses fatores, podemos citar a gravidade do distúrbio do metabolismo glicêmico e a média de idade da amostra. Levando em consideração que a administração da droga por um período de 12 meses levou à diminuição das médias das insulinas de jejum em humanos, podemos supor que um dos fatores que pode influenciar o efeito da pioglitazona sobre os parâmetros metabólicos é o tempo de administração da droga. Parece que os efeitos das tiazolinedionas são dose e tempo dependentes, inicialmente afetando a sensibilidade hepática à insulina e depois agindo também sobre a sensibilidade periférica ao hormônio (74).

7. A DIETA DE CAFETERIA E O HOMA-IR

Não foram encontradas diferenças significativas nos valores de HOMA-IR quando se comparou este índice nos diferentes subgrupos. Em estudos sobre a fisiologia do metabolismo humano alguns parâmetros para a avaliação da resistência à insulina foram propostos. Entre eles um dos mais importantes é HOMA-IR. O HOMA-IR, como estimativa da resistência à insulina, fornece um resultado aceitável e confiável em ratos, camundongos e humanos (101). Os resultados disponíveis na literatura com relação ao impacto da dieta de cafeteria sobre o HOMA são variáveis. Em um trabalho experimental, que comparou ratos Wistar submetidos à dieta de cafeteria por 12 semanas a um grupo controle que recebeu dieta balanceada, não foram observadas diferenças nos valores de HOMA-IR entre os grupos (96). Em outro trabalho, também com ratos Wistar, a dieta de cafeteria por um período de 7 semanas foi suficiente para levar a um aumento do HOMA-IR significativo do ponto de vista estatístico (64). É possível que a ausência de homogeneidade na composição das dietas de cafeteria poderia levar a

uma discrepância entre os resultados encontrados nos diferentes trabalhos, mesmo quando a amostra é submetida ao mesmo tempo de dieta. Outra questão a ser considerada é a variação da idade e sexo dos ratos nos diferentes estudos, o que também poderia comprometer a comparação dos seus resultados. Conforme dados disponíveis na literatura tanto a idade (102-104) quanto o sexo (105-108) podem influenciar a sensibilidade à ação da insulina em animais e humanos.

8. A PIOGLITAZONA E O HOMA-IR

Com relação ao efeito da pioglitazona sobre o HOMA-IR, não foram notadas diferenças significativas do ponto de vista estatístico quando foram comparados os diferentes grupos. Confrontando o SGR com o SGRC, que receberam dieta balanceada para a espécie, com ou sem a administração de pioglitazona, respectivamente, também não foram evidenciadas diferenças. Em um trabalho com ratos Wistar em que se compararam animais sob uma dieta balanceada para a espécie, submetidos ou não a 12 semanas de pioglitazona, não foram demonstradas diferenças significativas entre os grupos (84). Um ensaio clínico realizado com 15 indivíduos diabéticos, que receberam pioglitazona por um período de 4 semanas, também não encontrou diferenças no HOMA-IR quando se comparou os valores anteriores aos posteriores ao tratamento (78). Outro estudo também com diabéticos tipo 2, onde 20 indivíduos foram avaliados e randomizados para receber pioglitazona ou placebo por 4 semanas, não encontrou diferenças no HOMA-IR quando foram comparados os parâmetros metabólicos anteriores e posteriores ao tratamento (77). Em um trabalho com 283 indivíduos com *diabetes mellitus* tipo 2 em que se utilizou a pioglitazona por período de 12 meses (99), demonstrou-se reduções significativas nos níveis de HOMA-IR, corroborando a hipótese de que um dos fatores relacionados a ausência de efeito desta droga sobre o HOMA-IR no presente estudo provavelmente foi o curto tempo de tratamento. Assim como na avaliação do impacto da pioglitazona sobre as médias das glicemias e insulinas de jejum, é provável que fatores relacionados à amostra, como a intensidade do distúrbio do metabolismo dos carboidratos e a idade, foram importantes fatores determinantes dos efeitos da droga sobre o HOMA-IR.

9. A DIETA DE CAFETERIA E A ADIPONECTINA SÉRICA

Quando comparamos o SGCC ao SGRC, que receberam, respectivamente, dieta de cafeteria e ração ou dieta específica para ratos, sem a influência da pioglitazona, não observamos qualquer diferença ($P=1$). Apesar da ausência de diferença estatística, devemos considerar que, se realmente houve uma expansão do tecido adiposo branco nos subgrupos cafeteria, os níveis de adiponectina estão desproporcionalmente mais baixos no SGCC comparado ao SGRC. Um experimento com ratos Wistar submetidos à dieta de cafeteria durante 15 dias demonstrou não haver diferenças nos níveis totais de adiponectina sérica, quando comparados ao grupo controle com dieta balanceada. Quando, porém, os títulos foram ajustados para a soma do tecido adiposo branco (níveis de adiponectina/soma do tecido adiposo branco), os níveis de adiponectina se mostraram inferiores no grupo submetido à dieta de cafeteria (109). No presente trabalho não foram mensurados os depósitos de tecido adiposo branco, o que torna impossível dizer com certeza absoluta que houve uma variação da adiponectina ajustada para o tecido em questão. Devemos, no entanto lembrar que já foi comprovado em um estudo anterior, com ratos Wistar machos, o aumento da adiposidade em animais submetidos à dieta de cafeteria por apenas 15 dias (63). Outro experimento com ratos Wistar machos também avaliou o impacto da dieta de cafeteria por 10 semanas sobre a adiponectina sérica ajustada para o tecido adiposo branco, e concluiu que o hormônio estava numericamente diminuído, porém sem qualquer significância estatística (110). Um trabalho com camundongos demonstrou que a adiponectina sérica encontrava-se diminuída em animais alimentados com dietas ricas em gorduras, por curtos ou longos períodos de tempo (111). Outros estudos revelaram um aumento da expressão do gene da adiponectina, quando ratos eram expostos a dietas hiperlipídicas por curtos períodos, e uma diminuição da expressão, quando as dietas eram mantidas por períodos mais longos (69, 112). Esta diferença poderia ser desencadeada por uma resposta inicial compensatória contra o excesso de aporte energético, que se perderia no caso de dietas hiperlipídicas e hipercalóricas prolongadas, levando a uma inibição da expressão do gene da adiponectina, sobrepondo-se a uma resistência inicial à obesidade e assim permitindo o estoque de lipídeos (69).

10. A PIOGLITAZONA E A ADIPONECTINA SÉRICA

Quando comparados quanto aos níveis séricos de adiponectina, o SGR, que recebeu pioglitazona por 14 dias, apresentou níveis significativamente mais elevados do hormônio do que o SGCC ($P=0,027$) e o SGRC ($P=0,014$), não tratados com pioglitazona. A média de adiponectina também foi numericamente maior no SGC, que recebeu pioglitazona, quando comparado ao SGCC, que recebeu salina, mas a diferença não foi estatisticamente significativa ($P=0,13$). Um dos motivos para a ausência de diferença estatística no SGC pode ter sido os altos níveis de grelina neste grupo. Já foi demonstrado na literatura que a administração de grelina pode diminuir a expressão do gene da adiponectina no tecido adiposo (113). Os demais achados encontram respaldo em outros estudos disponíveis na literatura, nos quais a administração de pioglitazona por curtos períodos de tempo em animais e humanos também promoveu um aumento significativo dos níveis de adiponectina (74-78). O promotor do gene da adiponectina possui múltiplos sítios de ligação de fatores transcricionais que modulam a sua atividade. A ativação do receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissomo (PPAR- γ) estimula a transcrição do gene da adiponectina (15). O PPAR- γ é o sítio de ação das drogas da classe das tiazolinedionas como a pioglitazona (15). Na literatura, um trabalho experimental com ratos evidenciou um aumento dos níveis séricos de adiponectina após a administração de pioglitazona por duas semanas (74). Outro trabalho experimental com células murinas e humanas isoladas demonstrou que a pioglitazona estimula a adiponectina de forma aguda após apenas 2 horas de contato com a droga (75). Em um ensaio clínico com indivíduos com tolerância normal à glicose a pioglitazona foi capaz de aumentar os níveis plasmáticos de adiponectina após 3 dias de tratamento. Esse aumento da adiponectina precedeu as mudanças no *status* do metabolismo da glicose e dos lipídeos, bem como do grau de inflamação (76). Outros ensaios clínicos com pacientes diabéticos concluíram que o tratamento com pioglitazona por 4 semanas foi capaz de aumentar significativamente os níveis de adiponectina (77-78).

11. A DIETA DE CAFETERIA, A GRELINA TOTAL E ACETILADA

Não foram encontradas diferenças quanto à grelina total, quando se relacionou o SGCC ao SGRC, que receberam dieta de cafeteria e ração ou apenas a dieta balanceada sem a intervenção de pioglitazona em ambos os casos. A grelina total, que constitui a soma das isoformas acetilada e não acetilada, parece ter uma relação razoável com a forma acetilada, já que os níveis de ambas são constantes sob várias condições que interferem na fisiologia do hormônio (114). A ausência de diferença estatística entre o SGCC e o SGRC pode também ser evidenciada com relação à grelina acetilada. A acetilação da grelina no resíduo 3 da serina é essencial para sua atividade, e sua ligação ao receptor secretagogo do hormônio do crescimento (GHS-R) libera GH *in vivo* e *in vitro* (29). Estes dois subgrupos (SGCC e SGRC) que não experimentaram qualquer diminuição numérica importante na curva de progressão do peso ao longo do estudo, provavelmente não sofreram privação expressiva da ingestão alimentar, o que já se demonstrou estar associado ao aumento dos níveis de grelina (43). Além disso, existem trabalhos disponíveis na literatura que associaram o aumento da resistência à insulina, e não o índice de massa corporal (IMC) *per se*, à diminuição dos níveis de grelina. Assim, no caso de aumento da resistência à insulina, os valores de grelina em jejum estariam mais baixos, quando os níveis de insulina estivessem mais altos (48-49). Extrapolando esta conclusão para os trabalhos que utilizaram a dieta de cafeteria, o resultado mais provável seria um aumento da resistência à insulina, com diminuição dos níveis de grelina. É importante salientar que, no trabalho em questão, não foram encontradas evidências significativas de aumento da resistência à insulina com a dieta de cafeteria durante trinta e cinco dias, o que pode ser observado pela ausência de diferença estatística quando foram avaliados os níveis séricos de glicemia, insulina e o HOMA-IR. Talvez esta ausência de diferença esteja relacionada, como já foi aventado, a fatores relacionados à amostra estudada, que incluiu animais jovens. Mesmo que tenha havido um incremento da resistência à insulina, o que pode ser inferido pela curva de variação de peso dos animais do SGCC submetido à dieta de cafeteria, talvez ela não tenha se manifestado de forma intensa, o que poderia ter impedido uma inibição expressiva dos níveis de grelina. É importante recordar que um trabalho com 15 dias de dieta de cafeteria evidenciou um aumento significativo na adiposidade em ratos Wistar, e esta adiposidade aumentada estava

mais relacionada à obesidade visceral do que aos depósitos subcutâneos de gordura (63).

O aumento do tecido adiposo visceral é o meio pelo qual a obesidade leva à resistência à insulina e à síndrome metabólica (115). Outro aspecto a ser enfatizado é que existem outros meios para avaliar a resistência à insulina. A quantificação da produção hepática de glicose, a mensuração do conteúdo hepático de triglicerídeos e os níveis circulantes de ácidos graxos livres são métodos importantes na determinação da presença e intensidade da resistência à insulina, que não foram utilizados no trabalho aqui discutido (116-117). A técnica do *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, que também não foi utilizada no trabalho em questão, fornece a mais pura e reprodutível informação sobre a ação tecidual da insulina, em que as duas variáveis (glicose e insulina) podem ser manipuladas independentemente (118-119). Esta técnica permite examinar as contribuições individuais do fígado e tecidos periféricos na metabolização da glicose induzida pela insulina. Além disso, pode ser combinados com outras técnicas, como calorimetria indireta, estudos com radioisótopos etc., para examinar uma infinidade de aspectos relacionados à homeostasia da glicose (118). Mesmo considerando o aumento de peso induzido pela dieta de cafeteria rica em lipídeos, existem outros aspectos que devem ser enfatizados. A interação da dieta com a concentração de grelina depende dos macronutrientes que a compõem, e já foi demonstrado que os lipídeos suprimem fracamente as concentrações pós-prandiais do hormônio (45). Um trabalho disponível na literatura demonstrou que a expressão do RNAm da grelina no estômago em jejum, no caso de ratos sob uma dieta com alto teor de lipídeos (45% do total calórico) por duas semanas, estaria aumentado quando comparada a uma dieta *standard* (71). Outro estudo experimental com ratos evidenciou que a enzima O-acetil transferase (GOAT), fundamental para a acetilação da grelina, é regulada pela disponibilidade de nutrientes. Este modelo propõe que o sistema GOAT-grelina funcionaria como um sensor de lipídeos, que na presença de ácidos graxos de cadeia média, sinalizaria ao cérebro que alimentos de alto valor calórico estariam disponíveis (39). Desta forma, é necessário considerar que, mesmo que tenha havido aumento do tecido adiposo visceral provocado pela dieta de cafeteria, e possivelmente um aumento da resistência à ação da insulina, deve-se dar uma atenção especial à composição deste modelo de dieta, que pode interferir nos resultados encontrados.

12. A PIOGLITAZONA, A GRELINA TOTAL E ACETILADA

Foram encontrados maiores níveis de grelina total no SGC, que recebeu dieta de cafeteria, ração e pioglitazona, quando comparado ao SGR, que recebeu dieta balanceada para a espécie e pioglitazona, sendo esta diferença significativa do ponto de vista estatístico ($p=0.006$). Aqui a grelina total, que inclui a forma acetilada e não acetilada, parece ter sofrido um aumento em razão dos níveis mais altos da primeira isoforma, reforçando assim os achados com relação à dosagem da grelina acetilada. Confrontando o SGC aos SGCC e SGR, se observou um aumento significativo ($P=0,047$ e $0,009$) nas médias de grelina acetilada de jejum no primeiro subgrupo que recebeu dieta de cafeteria, ração e pioglitazona. A presença de níveis mais altos de grelina acetilada no SGC, quando relacionado aos SGCC e SGR, poderia ser explicada pela estabilização do peso no primeiro grupo após uma curva ascendente de ganho ponderal, dado este não significativo do ponto de vista estatístico. Este comportamento do peso poderia estar relacionado a uma privação alimentar espontânea, associada às particularidades da dieta de cafeteria rica em lipídeos e ao aparecimento de diarreia após a intervenção com pioglitazona, fenômenos estes já descritos no tópico que aborda a interação da pioglitazona com o peso corporal. Como já descrito anteriormente, a dieta de cafeteria já foi associada à hipofagia por diversos mecanismos, como o retardo do esvaziamento gástrico (65), o aumento da oxidação de lipídeos (65-66) e o aumento da secreção de colecistocinina pelo pâncreas (111), e a pioglitazona está relacionada ao aparecimento de náuseas e diarreia como efeitos adversos (92). Conforme já demonstrado na literatura, a privação alimentar está relacionada ao aumento dos níveis plasmáticos de grelina (43). Esta estabilização das médias de peso, inclusive com diminuição numérica do peso em alguns animais, não aconteceu com o SGCC, que continuou em curva ascendente de ganho ponderal. Conforme já comentado, a comparação das médias de peso dos animais na semana 3 com relação a semana 5, demonstrou um ganho de peso com tendência à significância estatística ($P=0,073$) apenas no SGCC. Quanto ao SGR, a curva de variação de peso mostra um incremento ponderal mais harmônico, em que os valores não sofreram variações abruptas. Assim, o impacto maior, que levou ao aumento expressivo dos níveis de grelina total e acetilada no SGC, foi a mudança de comportamento na curva de peso, marcadamente ascendente no início, com uma tendência à estabilização após a administração de pioglitazona. Este fato não foi observado em nenhum dos outros grupos, e parece ter sobrepujado outros aspectos

relacionados à variação dos títulos séricos de grelina, como a composição da dieta de cafeteria e os efeitos terapêuticos da pioglitazona. De qualquer forma, não parece que a administração de pioglitazona por 14 dias tenha conseguido, através da diminuição da resistência à insulina, reduzir os valores plasmáticos da grelina acetilada em jejum. Quando comparamos o SGR ao SGRC, portanto, sem a interferência da dieta rica em gorduras e seus ácidos graxos de cadeia média, onde só o primeiro subgrupo recebeu pioglitazona, observamos níveis plasmáticos médios de grelina mais altos no segundo subgrupo que recebeu salina, porém sem qualquer significância estatística. Ensaio clínico disponível na literatura demonstraram que a administração de pioglitazona a pacientes diabéticos, por períodos curtos ou longos, não resultaram diretamente em variação dos níveis plasmáticos de grelina acetilada ou total (81, 120).

13. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

É de grande importância que algumas limitações do estudo sejam discutidas.

Conforme já aventado anteriormente, o período de exposição à dieta de cafeteria ou ração pode ter sido insuficiente para levar a achados laboratoriais associados à resistência insulínica. No entanto, o objetivo do presente estudo foi determinar o impacto da dieta de cafeteria administrada por um período curto de tempo. Os resultados relacionados à administração da dieta de cafeteria por períodos curtos ou longos são igualmente importantes para o entendimento da fisiopatologia da obesidade e das comorbidades a ela relacionadas.

Não se fez uma estimativa do volume dos alimentos ingeridos nos diferentes grupos. Este dado ajudaria a definir melhor o comportamento alimentar dos animais, e a influência das características da dieta e da intervenção no aporte calórico. Como todo alimento foi administrado *ad libitum*, podemos considerar que a magnitude do aporte alimentar foi determinada pela interação entre a fisiologia normal dos animais, a natureza da dieta e a intervenção realizada, o que de certa forma padroniza o experimento que utiliza animais de mesma idade e gênero.

A gordura corporal não foi mensurada, o que limitou a caracterização da expansão do tecido adiposo visceral e impossibilitou a avaliação da proporção entre a adiponectina e o tecido adiposo branco. Porém, outros trabalhos disponíveis na literatura já validaram a dieta de cafeteria como modelo indutor de expansão do tecido adiposo, em especial do tecido adiposo visceral (63-64).

Outros meios para a caracterização da resistência à insulina teriam sido úteis para reforçar a sua presença ou ausência nos grupos estudados. No trabalho aqui discutido foram utilizados vários parâmetros para mensurar a resistência à insulina, e a ausência de resultados que confirmem sua presença já é um indicativo de que sua intensidade foi modesta. Como descrito anteriormente, o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, que não foi utilizado no presente estudo, fornece a mais pura e reprodutível informação sobre a ação tecidual da insulina (118-119). Contudo, o HOMA-IR, aplicado no estudo em questão, é considerado atualmente um índice simples e confiável na mensuração do grau de resistência à insulina, fortemente relacionado ao *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, que nos ratos é de difícil execução em razão do pequeno calibre dos vasos e da baixa volemia (101).

VI. CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES

- A dieta de cafeteria por um período curto de tempo foi capaz de levar a uma média final de peso maior nos animais a ela submetidos, quando comparados àqueles que receberam somente alimentação balanceada (ração). A ausência de diferença no peso do subgrupo de animais submetido à dieta de cafeteria e pioglitazona parece ter ocorrido em razão de efeitos secundários a administração da droga, como a diarreia e possivelmente náuseas.
- A dieta de cafeteria por 35 dias não foi capaz de levar a alterações em parâmetros associados à resistência à insulina, como glicemia, níveis séricos de insulina e valores de HOMA-IR.
- A dieta de cafeteria não influenciou diretamente os níveis de grelina total e acetilada nos animais a ela submetidos. Isso ocorreu provavelmente porque a dieta de cafeteria, no presente estudo, não causou um aumento expressivo da resistência à insulina, fenômeno este já relacionado em outros estudos aos níveis de grelina. De forma semelhante, não foi observada influência da dieta de cafeteria nos níveis séricos de adiponectina. Apesar da ausência de diferença estatística, se for levada em consideração a provável expansão do tecido adiposo branco, ocorrida nos animais que receberam a dieta de cafeteria, é possível que os níveis de adiponectina estejam proporcionalmente mais baixos no grupo alimentado com a dieta hipercalórica.
- A pioglitazona foi capaz de levar a um aumento dos níveis séricos médios de adiponectina nos subgrupos de animais onde a droga foi administrada. Este efeito ocorreu tanto nos ratos alimentados com dieta balanceada quanto nos submetidos à dieta de cafeteria. O grupo que recebeu dieta de cafeteria e pioglitazona teve um aumento apenas numérico dos níveis de adiponectina. A causa proposta para explicar esse achado seriam os altos títulos de grelina detectados neste subgrupo, que poderiam levar à inibição da expressão do gene da adiponectina, conforme já demonstrado na literatura. Os ratos

tratados com pioglitazona e submetidos à dieta de cafeteria e ração apresentaram maiores médias de grelina total e acetilada. É mais provável que este achado esteja relacionado a eventos adversos associados à medicação do que a um efeito farmacológico direto. Após a introdução da droga, os ratos submetidos à dieta de cafeteria apresentaram diarreia e possivelmente náuseas, o que provavelmente causou uma privação alimentar espontânea, e consequentemente estabilização na curva de ganho ponderal. O aumento dos níveis de grelina, um hormônio sabidamente orexígeno, pode na verdade refletir a diminuição transitória no aporte nutricional dos animais tratados com a pioglitazona.

- O modelo da dieta de cafeteria, através do ganho de peso expressivo nos animais estudados, é válido no estudo indireto do efeito da dieta humana na obesidade e suas consequências. A administração da dieta de cafeteria por trinta e cinco dias caracteriza uma fotografia das fases iniciais de instalação da obesidade propriamente dita. A pioglitazona realmente demonstrou de forma rápida a capacidade de incrementar os níveis de adiponectina, hormônio cujos níveis reduzidos estão relacionados ao aumento da resistência à ação da insulina, e ao aparecimento do *diabetes mellitus* e das complicações cardiovasculares. Quanto aos detalhes da interação entre a grelina e adiponectina, outros estudos se fazem necessários para elucidar melhor a relação destes dois hormônios relacionados ao balanço energético celular.

VII. REFERÊNCIAS

1. Zimmet P, Thomas CR. Genotype, obesity and cardiovascular disease--has technical and social advancement outstripped evolution? *J Intern Med.* 2003 Aug;254(2):114-25.
2. WHO. Obesity and overweight. Geneva, centre WM;2011.
3. IDF. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome Brussels2006.
4. Rhodes CJ. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science.* 2005 Jan 21;307(5708):380-4.
5. Lindsley JE, Rutter J. Nutrient sensing and metabolic decisions. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2004 Dec;139(4):543-59.
6. Schutte AE, Huisman HW, Schutte R, van Rooyen JM, Malan L, Fourie CM, et al. Adipokines and cardiometabolic function: How are they interlinked? *Regul Pept.* 2010 Sep 24;164(2-3):133-8.
7. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care.* 2003 Aug;26(8):2442-50.
8. Cigolini M, Tonoli M, Borgato L, Frigotto L, Manzato F, Zeminian S, et al. Expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human adipose tissue: a role for TNF-alpha? *Atherosclerosis.* 1999 Mar;143(1):81-90.
9. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem.* 1995 Nov 10;270(45):26746-9.
10. Bluher M, Williams CJ, Kloting N, Hsi A, Ruschke K, Oberbach A, et al. Gene expression of adiponectin receptors in human visceral and subcutaneous adipose tissue is related to insulin resistance and metabolic parameters and is altered in response to physical training. *Diabetes Care.* 2007 Dec;30(12):3110-5.
11. Kondo H, Shimomura I, Matsukawa Y, Kumada M, Takahashi M, Matsuda M, et al. Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes: a candidate gene for the insulin resistance syndrome. *Diabetes.* 2002 Jul;51(7):2325-8.
12. Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC. Adipokines and insulin resistance. *Mol Med.* 2008 Nov-Dec;14(11-12):741-51.
13. Kos K, Wong SP, Huda MS, Cakir M, Jernas M, Carlsson L, et al. In humans the adiponectin receptor R2 is expressed predominantly in adipose tissue and linked to the adipose tissue expression of MMIF-1. *Diabetes Obes Metab.* 2010 Apr;12(4):360-3.

14. Wang Y, Lam KS, Yau MH, Xu A. Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem J*. 2008 Feb 1;409(3):623-33.
15. Phillips SA, Kung JT. Mechanisms of adiponectin regulation and use as a pharmacological target. *Curr Opin Pharmacol*. 2010 Dec;10(6):676-83.
16. Swarbrick MM, Havel PJ. Physiological, pharmacological, and nutritional regulation of circulating adiponectin concentrations in humans. *Metab Syndr Relat Disord*. 2008 Jun;6(2):87-102.
17. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):1784-92.
18. Santomauro Jún AC, Ugolini MR, Santomauro AT, Souto RPd. Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2008;52:120-5.
19. Hardie DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*. 2003 Dec;144(12):5179-83.
20. Mather KJ, Funahashi T, Matsuzawa Y, Edelstein S, Bray GA, Kahn SE, et al. Adiponectin, change in adiponectin, and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes*. 2008 Apr;57(4):980-6.
21. Li S, Shin HJ, Ding EL, van Dam RM. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2009 Jul 8;302(2):179-88.
22. Maahs DM, Ogden LG, Kinney GL, Wadwa P, Snell-Bergeon JK, Dabelea D, et al. Low plasma adiponectin levels predict progression of coronary artery calcification. *Circulation*. 2005 Feb 15;111(6):747-53.
23. Funahashi T, Nakamura T, Shimomura I, Maeda K, Kuriyama H, Takahashi M, et al. Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Intern Med*. 1999 Feb;38(2):202-6.
24. Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, et al. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab*. 2007 Jul;6(1):55-68.
25. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003 Jun 12;423(6941):762-9.

26. Targher G, Bertolini L, Rodella S, Zoppini G, Scala L, Zenari L, et al. Associations between plasma adiponectin concentrations and liver histology in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006 Jun;64(6):679-83.
27. Adachi M, Brenner DA. High molecular weight adiponectin inhibits proliferation of hepatic stellate cells via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Hepatology*. 2008 Feb;47(2):677-85.
28. Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology*. 2009 Sep;50(3):957-69.
29. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999 Dec 9;402(6762):656-60.
30. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Sukanuma T, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*. 2000 Nov;141(11):4255-61.
31. Dadan J, Hady HR, Zbucki RL, Iwacewicz P, Bossowski A, Kasacka I. The activity of gastric ghrelin positive cells in obese patients treated surgically. *Folia Histochem Cytobiol*. 2009;47(2):307-13.
32. Yabuki A, Taharaguchi S, Ichii O, Kojima M, Nishi Y, Mifune H, et al. Immunohistochemical localization of ghrelin in rodent kidneys. *Histochem Cell Biol*. 2006 Aug;126(2):231-8.
33. Cummings DE, Foster-Schubert KE, Overduin J. Ghrelin and energy balance: focus on current controversies. *Curr Drug Targets*. 2005 Mar;6(2):153-69.
34. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Oct;86(10):4753-8.
35. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jun;87(6):2988.
36. Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, et al. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Dec;85(12):4908-11.
37. Petersenn S. Growth hormone secretagogues and ghrelin: an update on physiology and clinical relevance. *Horm Res*. 2002;58 Suppl 3:56-61.

38. van der Lely AJ. Ghrelin and new metabolic frontiers. *Horm Res.* 2009 Jan;71 Suppl 1:129-33.
39. Kirchner H, Gutierrez JA, Solenberg PJ, Pfluger PT, Czyzyk TA, Willency JA, et al. GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nat Med.* 2009 Jul;15(7):741-5.
40. Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K. Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem.* 2003 Jan 3;278(1):64-70.
41. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev.* 2005 Apr;85(2):495-522.
42. Hiejima H, Nishi Y, Hosoda H, Yoh J, Mifune H, Satou M, et al. Regional distribution and the dynamics of n-decanoyl ghrelin, another acyl-form of ghrelin, upon fasting in rodents. *Regul Pept.* 2009 Aug 7;156(1-3):47-56.
43. Cordido F, Isidro ML, Nemina R, Sangiao-Alvarellos S. Ghrelin and growth hormone secretagogues, physiological and pharmacological aspect. *Curr Drug Discov Technol.* 2009 Mar;6(1):34-42.
44. Callahan HS, Cummings DE, Pepe MS, Breen PA, Matthys CC, Weigle DS. Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Mar;89(3):1319-24.
45. Foster-Schubert KE, Overduin J, Prudom CE, Liu J, Callahan HS, Gaylann BD, et al. Acyl and total ghrelin are suppressed strongly by ingested proteins, weakly by lipids, and biphasically by carbohydrates. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 May;93(5):1971-9.
46. Drazen DL, Vahl TP, D'Alessio DA, Seeley RJ, Woods SC. Effects of a fixed meal pattern on ghrelin secretion: evidence for a learned response independent of nutrient status. *Endocrinology.* 2006 Jan;147(1):23-30.
47. Mundinger TO, Cummings DE, Taborsky GJ, Jr. Direct stimulation of ghrelin secretion by sympathetic nerves. *Endocrinology.* 2006 Jun;147(6):2893-901.
48. McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Frayo RS, Cummings DE. Plasma ghrelin concentrations are decreased in insulin-resistant obese adults relative to equally obese insulin-sensitive controls. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Apr;89(4):1630-5.
49. Williams DL, Cummings DE. Regulation of ghrelin in physiologic and pathophysiologic states. *J Nutr.* 2005 May;135(5):1320-5.

50. Nishi Y, Hiejima H, Hosoda H, Kaiya H, Mori K, Fukue Y, et al. Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin. *Endocrinology*. 2005 May;146(5):2255-64.
51. Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, et al. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes*. 2002 Jan;51(1):124-9.
52. Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley GH, Jr. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology*. 2002 Jan;143(1):185-90.
53. Dezaki K, Kakei M, Yada T. Ghrelin uses Galphai2 and activates voltage-dependent K⁺ channels to attenuate glucose-induced Ca²⁺ signaling and insulin release in islet beta-cells: novel signal transduction of ghrelin. *Diabetes*. 2007 Sep;56(9):2319-27.
54. Dezaki K, Sone H, Koizumi M, Nakata M, Kakei M, Nagai H, et al. Blockade of pancreatic islet-derived ghrelin enhances insulin secretion to prevent high-fat diet-induced glucose intolerance. *Diabetes*. 2006 Dec;55(12):3486-93.
55. Tong J, Prigeon RL, Davis HW, Bidlingmaier M, Kahn SE, Cummings DE, et al. Ghrelin suppresses glucose-stimulated insulin secretion and deteriorates glucose tolerance in healthy humans. *Diabetes*. 2010 Sep;59(9):2145-51.
56. Majumdar ID, Weber HC. Gastrointestinal regulatory peptides and their effects on fat tissue. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2010 Feb;17(1):51-6.
57. Zhang W, Zhao L, Lin TR, Chai B, Fan Y, Gantz I, et al. Inhibition of adipogenesis by ghrelin. *Mol Biol Cell*. 2004 May;15(5):2484-91.
58. Zhang W, Chai B, Li JY, Wang H, Mulholland MW. Effect of des-acyl ghrelin on adiposity and glucose metabolism. *Endocrinology*. 2008 Sep;149(9):4710-6.
59. Kos K, Harte AL, O'Hare PJ, Kumar S, McTernan PG. Ghrelin and the differential regulation of des-acyl (DSG) and oct-anoyl ghrelin (OTG) in human adipose tissue (AT). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009 Mar;70(3):383-9.
60. Rodriguez A, Gomez-Ambrosi J, Catalan V, Gil MJ, Becerril S, Sainz N, et al. Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes. *Int J Obes (Lond)*. 2009 May;33(5):541-52.

61. Davies JS, Kotokorpi P, Eccles SR, Barnes SK, Tokarczuk PF, Allen SK, et al. Ghrelin induces abdominal obesity via GHS-R-dependent lipid retention. *Mol Endocrinol.* 2009 Jun;23(6):914-24.
62. Tsubone T, Masaki T, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H. Ghrelin regulates adiposity in white adipose tissue and UCP1 mRNA expression in brown adipose tissue in mice. *Regul Pept.* 2005 Aug 15;130(1-2):97-103.
63. Rodriguez E, Ribot J, Rodriguez AM, Palou A. PPAR-gamma2 expression in response to cafeteria diet: gender- and depot-specific effects. *Obes Res.* 2004 Sep;12(9):1455-63.
64. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, et al. Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. *Obesity (Silver Spring).* 2011 Feb 17.
65. Ebal E, Cavalie H, Michaux O, Lac G. Effect of a lipid-enriched diet on body composition and some regulatory hormones of food intake in growing rats. *Ann Endocrinol (Paris).* 2007 Oct;68(5):366-71.
66. Ramirez I. Hypophagia following dietary obesity. *Physiol Behav.* 1986;38(1):95-8.
67. Burton-Freeman B, Schneeman BO. Lipid infused into the duodenum of rats at varied rates influences food intake and body weight gain. *J Nutr.* 1996 Nov;126(11):2934-9.
68. Hajer GR, van Haefen TW, Visseren FLJ. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal.* 2008 December 1, 2008;29(24):2959-71.
69. Lopez IP, Milagro FI, Marti A, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA, De Miguel C. High-fat feeding period affects gene expression in rat white adipose tissue. *Mol Cell Biochem.* 2005 Jul;275(1-2):109-15.
70. Perez-Echarri N, Perez-Matute P, Martinez JA, Marti A, Moreno-Aliaga MJ. Serum and gene expression levels of leptin and adiponectin in rats susceptible or resistant to diet-induced obesity. *J Physiol Biochem.* 2005 Jun;61(2):333-42.
71. Asakawa A, Inui A, Kaga T, Katsuura G, Fujimiya M, Fujino MA, et al. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut.* 2003 Jul;52(7):947-52.
72. Beysen C, Murphy EJ, Nagaraja H, Decaris M, Riiff T, Fong A, et al. A pilot study of the effects of pioglitazone and rosiglitazone on de novo lipogenesis in type 2 diabetes. *J Lipid Res.* 2008 Dec;49(12):2657-63.

73. Harrison SA. Thiazolidinedione therapy for nonalcoholic steatohepatitis: go, stop, or proceed with caution? *Hepatology*. 2010 Feb;51(2):366-9.
74. Yang G, Li L, Tang Y, Boden G. Short-term pioglitazone treatment prevents free fatty acid-induced hepatic insulin resistance in normal rats: possible role of the resistin and adiponectin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jan 27;339(4):1190-6.
75. Pereira RI, Leitner JW, Erickson C, Draznin B. Pioglitazone acutely stimulates adiponectin secretion from mouse and human adipocytes via activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase. *Life Sci*. 2008 Nov 7;83(19-20):638-43.
76. Ikeda Y, Takata H, Inoue K, Shinahara M, Inada S, Maruyama H, et al. Pioglitazone rapidly increases serum adiponectin levels in men with normal glucose tolerance. *Diabetes Care*. 2007 Jun;30(6):e48.
77. Martens FM, Visseren FL, de Koning EJ, Rabelink TJ. Short-term pioglitazone treatment improves vascular function irrespective of metabolic changes in patients with type 2 diabetes. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005 Dec;46(6):773-8.
78. Maegawa H, Nishio Y, Nakao K, Ugi S, Maeda K, Uzu T, et al. Short-term low-dosage pioglitazone treatment improves vascular dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Endocr J*. 2007 Aug;54(4):613-8.
79. Martin CK, Gupta AK, Smith SR, Greenway FL, Han H, Bray GA. Effect of pioglitazone on energy intake and ghrelin in diabetic patients. *Diabetes Care*. 2010 Apr;33(4):742-4.
80. Kusaka I, Nagasaka S, Horie H, Ishibashi S. Metformin, but not pioglitazone, decreases postchallenge plasma ghrelin levels in type 2 diabetic patients: a possible role in weight stability? *Diabetes Obes Metab*. 2008 Nov;10(11):1039-46.
81. Kiyici S, Ersoy C, Oz Gul O, Sarandol E, Demirci M, Tuncel E, et al. Total and acylated ghrelin levels in type 2 diabetic patients: similar levels observed after treatment with metformin, pioglitazone or diet therapy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2009 Sep;117(8):386-90.
82. Paiva FP MV, Santos ACS. *Curso de Manipulação de Animais de Laboratório*. Salvador: Fiocruz2005.
83. Ikeda T, Fujiyama K. The effect of pioglitazone on glucose metabolism and insulin uptake in the perfused liver and hindquarter of high-fructose-fed rats. *Metabolism*. 1998 Sep;47(9):1152-5.
84. Liu X, Luo D, Zheng M, Hao Y, Hou L, Zhang S. Effect of pioglitazone on insulin resistance in fructose-drinking rats correlates

- with AGEs/RAGE inhibition and block of NADPH oxidase and NF kappa B activation. *Eur J Pharmacol.* 2010 Mar 10;629(1-3):153-8.
85. Taborda C MD, da Silva CA. *Manual de Normas Técnicas.* São Paulo: USP, Microbiologia Dd;2004.
86. Lazar MA. How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science.* 2005 Jan 21;307(5708):373-5.
87. Mauvais-Jarvis F, Andreelli F, Hanaire-BROUTIN H, Charbonnel B, Girard J. Therapeutic perspectives for type 2 diabetes mellitus: molecular and clinical insights. *Diabetes Metab.* 2001 Sep;27(4 Pt 1):415-23.
88. Lebovitz HE, Banerji MA. Insulin resistance and its treatment by thiazolidinediones. *Recent Prog Horm Res.* 2001;56:265-94.
89. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med.* 2004 Sep 9;351(11):1106-18.
90. Derosa G, Tinelli C, Maffioli P. Effects of pioglitazone and rosiglitazone combined with metformin on body weight in people with diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2009 Dec;11(12):1091-9.
91. Derosa G, D'Angelo A, Ragonesi PD, Ciccarelli L, Piccinini MN, Pricolo F, et al. Metformin-pioglitazone and metformin-rosiglitazone effects on non-conventional cardiovascular risk factors plasma level in type 2 diabetic patients with metabolic syndrome. *J Clin Pharm Ther.* 2006 Aug;31(4):375-83.
92. Kasliwal R, Wilton LV, Shakir SA. Monitoring the safety of pioglitazone : results of a prescription-event monitoring study of 12,772 patients in England. *Drug Saf.* 2008;31(10):839-50.
93. [Consumption of fruit juices and beverages by Spanish children and teenagers: health implications of their poor use and abuse]. *An Pediatr (Barc).* 2003 Jun;58(6):584-93.
94. Hyams JS, Etienne NL, Leichtner AM, Theuer RC. Carbohydrate malabsorption following fruit juice ingestion in young children. *Pediatrics.* 1988 Jul;82(1):64-8.
95. Zoran D. Nutritional management of gastrointestinal disease. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2003 Nov;18(4):211-7.
96. Naderali EK, Pickavance LC, Wilding JP, Williams G. Diet-induced endothelial dysfunction in the rat is independent of the degree of increase in total body weight. *Clin Sci (Lond).* 2001 Jun;100(6):635-41.
97. Ye JM, Frangioudakis G, Iglesias MA, Furler SM, Ellis B, Dzamko N, et al. Prior thiazolidinedione treatment preserves insulin sensitivity in normal rats during acute fatty acid elevation: role of the liver. *Endocrinology.* 2002 Dec;143(12):4527-35.

98. Aronoff S, Rosenblatt S, Braithwaite S, Egan JW, Mathisen AL, Schneider RL. Pioglitazone hydrochloride monotherapy improves glycemic control in the treatment of patients with type 2 diabetes: a 6-month randomized placebo-controlled dose-response study. The Pioglitazone 001 Study Group. *Diabetes Care*. 2000 Nov;23(11):1605-11.
99. Perriello G, Pampanelli S, Di Pietro C, Brunetti P. Comparison of glycaemic control over 1 year with pioglitazone or gliclazide in patients with Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2006 Mar;23(3):246-52.
100. Szocs Z, Brunmair B, Stadlbauer K, Nowotny P, Bauer L, Luger A, et al. Age-dependent development of metabolic derangement and effects of intervention with pioglitazone in Zucker diabetic fatty rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008 Jul;326(1):323-9.
101. Mather K. Surrogate measures of insulin resistance: of rats, mice, and men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Feb;296(2):E398-9.
102. Rowe JW, Minaker KL, Pallotta JA, Flier JS. Characterization of the insulin resistance of aging. *J Clin Invest*. 1983 Jun;71(6):1581-7.
103. Chang AM, Halter JB. Aging and insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 Jan;284(1):E7-12.
104. Escriva F, Gavete ML, Fermin Y, Perez C, Gallardo N, Alvarez C, et al. Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity. *J Endocrinol*. 2007 Jul;194(1):131-41.
105. Yki-Jarvinen H. Sex and insulin sensitivity. *Metabolism*. 1984 Nov;33(11):1011-5.
106. Galipeau DM, Yao L, McNeill JH. Relationship among hyperinsulinemia, insulin resistance, and hypertension is dependent on sex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Aug;283(2):H562-7.
107. Hevener A, Reichart D, Janez A, Olefsky J. Female rats do not exhibit free fatty acid-induced insulin resistance. *Diabetes*. 2002 Jun;51(6):1907-12.
108. Macotela Y, Boucher J, Tran TT, Kahn CR. Sex and depot differences in adipocyte insulin sensitivity and glucose metabolism. *Diabetes*. 2009 Apr;58(4):803-12.
109. Ribot J, Rodriguez AM, Rodriguez E, Palou A. Adiponectin and resistin response in the onset of obesity in male and female rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Apr;16(4):723-30.
110. Perez-Matute P, Perez-Echarri N, Martinez JA, Marti A, Moreno-Aliaga MJ. Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis,

adiponectin and tumour necrosis factor-alpha. *Br J Nutr.* 2007 Feb;97(2):389-98.

111. Bueno AA, Oyama LM, de Oliveira C, Pisani LP, Ribeiro EB, Silveira VL, et al. Effects of different fatty acids and dietary lipids on adiponectin gene expression in 3T3-L1 cells and C57BL/6J mice adipose tissue. *Pflugers Arch.* 2008 Jan;455(4):701-9.

112. Lopez IP, Milagro FI, Marti A, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA, De Miguel C. Gene expression changes in rat white adipose tissue after a high-fat diet determined by differential display. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 May 21;318(1):234-9.

113. Ott V, Fasshauer M, Dalski A, Meier B, Perwitz N, Klein HH, et al. Direct peripheral effects of ghrelin include suppression of adiponectin expression. *Horm Metab Res.* 2002 Nov-Dec;34(11-12):640-5.

114. Murakami N, Hayashida T, Kuroiwa T, Nakahara K, Ida T, Mondal MS, et al. Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats. *J Endocrinol.* 2002 Aug;174(2):283-8.

115. Lebovitz HE, Banerji MA. Point: visceral adiposity is causally related to insulin resistance. *Diabetes Care.* 2005 Sep;28(9):2322-5.

116. Buettner R, Ottinger I, Scholmerich J, Bollheimer LC. Preserved direct hepatic insulin action in rats with diet-induced hepatic steatosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004 May;286(5):E828-33.

117. Hwang JH, Stein DT, Barzilai N, Cui MH, Tonelli J, Kishore P, et al. Increased intrahepatic triglyceride is associated with peripheral insulin resistance: in vivo MR imaging and spectroscopy studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 Dec;293(6):E1663-9.

118. Geloneze B, Tambascia MA. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* 2006;50:208-15.

119. Hughey CC, Hittel DS, Johnsen VL, Shearer J. Hyperinsulinemic-euglycemic clamp in the conscious rat. *J Vis Exp.* 2011(48).

120. Otto C, Otto B, Goke B, Pfeiffer AF, Lehrke M, Vogeser M, et al. Increase in adiponectin levels during pioglitazone therapy in relation to glucose control, insulin resistance as well as ghrelin and resistin levels. *J Endocrinol Invest.* 2006 Mar;29(3):231-6.

ANEXO A – Protocolo aprovado pela CEUA/UFSC**Resultado de Solicitação de Protocolo****Protocolo**

PP00552

Título

ESTUDO DO IMPACTO DA RESISTÊNCIA À INSULINA SOBRE OS NÍVEIS CIRCULANTES DE GLICOSE, INSULINA, GRELINA E ADIPONECTINA EM RATOS

Data de Entrada

28/10/2010

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

03/12/2010

Considerações

Ofício nº 249/CEUA/PRPE/2010

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Armando José D'Acampora, Departamento de Clínica Cirúrgica – CCs

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois ano(s), para a utilização de vinte e quatro ratos (*Rattus Norvegicus*).

- Procedência do animal: Biotério Central da UFSC.

- Processo cadastrado sob o número: 23080.040933/2010-72


Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 10/03/2013

Data 10/12/2010

Parecer(es):

**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE**

