

CARLA NAPPO TOBARUELA

**Estudo fenotípico preliminar de camundongos fêmeas Swiss
espontaneamente obesas**

São Paulo

2015

CARLA NAPPO TOBARUELA

**Estudo fenotípico preliminar de camundongos fêmeas Swiss
espontaneamente obesas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Departamento de Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Luciano Freitas Felício

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3198
FMVZ

Tobaruela, Carla Nappo
Estudo fenotípico preliminar de camundongos fêmeas Swiss espontaneamente obesas / Carla Nappo Tobaruela. -- 2015.
64 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Freitas Felício.

1. Obesidade. 2. Tecido adiposo. 3. Síndrome metabólica. 4. Leptinemia. I. Título.

Figura 1 - Modelo de Certificado da Comissão de Ética



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que a aluna Carla Nappo Tobaruela entregou, nesta data, o projeto de pesquisa intitulado: “Caracterização fenotípica de camundongos fêmeas da linhagem Swiss portadores de obesidade espontânea”, sob responsabilidade do Prof. Dr. Luciano Freitas Felicio, o qual foi protocolado sob o nº 2925/2013.

São Paulo, 6 de fevereiro de 2013.



Roseli da Costa Gomes
Chefe do Serviço de Apoio Acadêmico
e secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: TOBARUELA, Carla Nappo

Título: **Estudo fenotípico preliminar de camundongos fêmeas Swiss espontaneamente obesas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta Dissertação de Mestrado a toda a minha família, meus pais, minha irmã e meu noivo, foram estas pessoas tão queridas que me deram todo respaldo e apoio para que esta obra se concretizasse!!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho pudesse existir.

Agradeço aos meus pais, Sandra e Nilson, por me amarem incondicionalmente e sempre me apoiarem em todas as decisões e escolhas da minha vida!

Agradeço a minha irmã, Nathalia, pelo apoio e pela paciência de ter que dormir de luz acesa devido ao meu estudo!

Agradeço ao amor da minha vida, futuro muito próximo esposo, Michel, por me amar, apoiar, fortalecer e sempre estar ao meu lado!

Agradeço ao meu orientador, professor Luciano, por ser sempre esta pessoa tão paciente e bondosa, por sempre me dar conforto e apoio com suas palavras!

Agradeço a toda a equipe do laboratório de Neurociências do Departamento de Patologia da USP, Magali, Julieta, Larissa, Jullie, pelos momentos de descontração e por todas as palavras de força e incentivo!

Agradeço a uma amiga mais do que especial, pois sem todo seu apoio, força, dedicação, empenho, carinho.....nada disso teria acontecido, muito obrigada Marianne!

Agradeço aos meus colegas de profissão e amigos de coração, Mara, Marcos e Koga, por terem tanta paciência comigo, pelo carinho, palavras amigas, força e por sempre apoiarem meu crescimento profissional!

Agradeço aos meus amigos queridos, Adriana e Tadashi, por sempre serem tão amigos e torcerem por mim!

Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Patologia, Idalina, Aline, Luciana, Mauro, Nelson, Luciano Buga, Marguithi, Milena, Adriana e também a professora Claudia Mori, por terem sido sempre tão atenciosos comigo e tão prestativos em me ajudar!

Agradeço as queridas alunas do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, Evelyn e Fernanda, pela ajuda nos experimentos, pelo carinho e atenção com que me receberam!

Agradeço as funcionárias da biblioteca, Elza, Neuza, Camila, Stela, por serem tão atenciosas e preocupadas com nós alunos!

Agradeço aos funcionários da pós graduação da FMVZ-USP, Henrique, Daura, Thaís, por serem sempre tão educados e prontos a nos ajudar!

Agradeço a fundação CAPES, pelo auxílio que me foi concedido!

RESUMO

TOBARUELA, C. N. **Estudo fenotípico preliminar de camundongos fêmeas Swiss espontaneamente obesas.** [Preliminary phenotypic study in spontaneously obese Swiss females mice]. 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A obesidade é um sério problema de saúde pública. Este estudo teve como objetivo avaliar o crescimento de camundongos fêmeas Swiss, oriundas do biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, que se tornam espontaneamente obesas, tentando identificar em que período se iniciam estas características de obesidade. Para isso, foram realizados dois experimentos: Exp. 1 - as fêmeas foram acompanhadas do dia pós-natal 303 (DPN 303) até o DPN 491; Exp. 2 - as fêmeas foram acompanhadas do DPN 1 até o DPN 240. No Exp. 1, os animais foram divididos em dois grupos: obesas (OB) e não obesas (NOB), todas receberam dieta padrão. No Exp. 2, ao completarem 21 dias de vida, as fêmeas foram divididas em 4 grupos: dieta padrão (DP), grupos DP-OB e DP-NOB e dieta hiperlipídica (DHF), grupos DHF-OB e DHF-NOB; receberam DHF somente durante a peripuberdade (DPN 21-DPN 60). Em ambos os experimentos foram realizados acompanhamento de peso corporal, acompanhamento de ingestão alimentar, medição de comprimento corporal e medição de circunferência abdominal. No DPN 470, foi realizado o teste de tolerância à insulina (TTI) e no DPN 472 o teste de tolerância oral à glicose (TTOG) nas fêmeas do Exp. 1 e da mesma forma nos DPN 230 e 232 nas fêmeas do Exp. 2. Foi realizado teste de suspensão pela cauda (TSC) nos animais do Exp. 2. Ao final dos experimentos foram realizadas dosagens séricas de triglicérides, colesterol total, AST, leptina e insulina, além das pesagens dos órgãos: gorduras gonadal e retroperitoneal, fígado, rim com adrenal e útero com ovários. Os resultados obtidos em cada experimento foram avaliados por meio de ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni e t Student, $p < 0,05$. Em ambos os experimentos os animais obesos apresentaram maior comprimento corporal e circunferência abdominal, além de pesagem elevada dos órgãos fígado, rim e gorduras. As dosagens de leptina foram significantes para todos os animais obesos e as dosagens de triglicérides foram significantes nos grupos OB e DP-OB. No Exp. 1, houve diferença significativa na resposta à insulina entre os grupos OB e NOB (TTI) e as fêmeas OB tiveram maior pico de glicemia aos 20 minutos de teste e

permaneceram por mais tempo com os níveis glicêmicos elevados (TTOG); os animais do grupo OB tiveram aumento significativo do ganho de peso corporal ao longo do tempo, atingindo 70g; as dosagens de AST foram significantes nos animais OB. No Exp. 2, os animais do grupo DP-OB tiveram aumento significativo do ganho de peso corporal ao longo do tempo, mostrando ganho de peso elevado após o DPN 81; as dosagens de insulina foram significantes no grupo DP-OB em relação ao grupo DP-NOB; TSC não apresentou resultados significantes. Portanto, as alterações de ganho de peso elevado, maior crescimento corporal e maior circunferência abdominal podem ser observadas nas fêmeas DP-OB já no início da vida adulta. Entretanto, as alterações metabólicas aparecem somente em idade avançada (Exp. 1). Assim, mais estudos são necessários a fim de que se possa elucidar a origem das alterações fenotípicas encontradas.

Palavras-chave: Obesidade. Tecido adiposo. Síndrome metabólica. Leptinemia.

ABSTRACT

TOBARUELA, C. N. **Preliminary phenotypic study in spontaneously obese Swiss females mice.** [Estudo fenotípico preliminar de camundongos fêmeas Swiss espontaneamente obesas]. 2015.64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Obesity is a serious public health problem. This study aimed to evaluate Swiss female mice growth that were born in the Department of Pathology (FMVZ-USP) and became obese spontaneously, trying to identify in which period these obesity signs start. Therefore, two experiments were conducted: Exp. 1 – females were observed from post-natal day 303 (PND 303) to PND 491; Exp. 2 – females were observed from PND 1 to PND 240. In the Exp. 1, animals were assigned to either one of two groups: obese (OB) and non-obese (NOB), where both groups received standard chow. In the Exp. 2, when females were 21 days old, they were assigned to either: standard chow (DP), DP-OB or DP-NOB groups, and high fat diet (DHF), DHF-OB and DHF-NOB groups; these animals received DHF only in the peripuberty period (PND 21- PND 60). Body weight gain, food intake, body length and abdominal circumference were measured in both experiments. In PND 470, insulin tolerance test (ITT) and PND 472 the oral glucose tolerance test (OGTT) were performed in the females from Exp. 1, and in PND 230 and PND 232, respectively, in the animals from Exp. 2. The tail suspension test (TST) was performed in the animals from Exp. 2. In the end of experiments, blood levels of triglycerides, total cholesterol, AST, leptin and insulin were evaluated and the following organs were weighted: gonadal fat pad, retroperitoneal fat pad, liver, kidney including adrenals and uterus with ovaries. Results were analysed by two-way ANOVA with Bonferroni post-test and t Student test, $p < 0.05$. Obese animals in both experiments showed bigger body length and abdominal circumference, including heavier organs such as liver, kidney and fat pads. Leptin levels were significant higher in all obese animals and triglycerides levels were significant in OB and DP-OB groups. In the Exp. 1, there was a significant difference in the response to insulin injection in between groups OB and NOB (ITT) and OB females reached higher glycaemic levels 20 min after the glucose administration, keeping these levels high longer (OGTT); OB females showed a significant increase in the body weight gain over time, reaching 70g; AST levels were significant in OB animals. In the Exp. 2, animals from DP-OB group had significant higher body weight

significant in the DP-OB group comparing to DP-NOB; there was no significant results in the TST. Therefore, heavier body weights, bigger body length and bigger abdominal circumference were observed in DP-OB females in the beginning of adult life. However, metabolic alterations can be detected only in late adult life (Exp. 1). Thus, more studies need to be done aiming to clarify the origin of the phenotypic alterations found here.

Keywords: Obesity. Adipose tissue. Metabolic syndrome. Leptinemia.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	TECIDO ADIPOSEO.....	16
2.1.1	Tecido adiposo - órgão endócrino	17
2.1.1.1	Leptina.....	18
2.2	SÍNDROME METABÓLICA	20
2.2.1	Insulina	21
2.3	OBESIDADE INDUZIDA PELA DIETA	22
2.4	DEPRESSÃO	23
2.4.1	Teste de suspensão pela cauda	24
3	OBJETIVOS	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	EXPERIMENTO 1	26
4.1.1	Animais	26
4.1.1.1	Composição da ração.....	27
4.1.2	Acompanhamento físico	27
4.1.2.1	Acompanhamento do ganho de peso.....	27
4.1.2.2	Acompanhamento da ingestão alimentar.....	28
4.1.2.3	Medição da circunferência abdominal.....	29
4.1.2.4	Medição do comprimento corporal.....	30
4.1.3	Acompanhamento metabólico	31
4.1.3.1	Teste de Tolerância à insulina (TTI).....	31
4.1.3.2	Teste de Tolerância à glicose (TTOG).....	32
4.1.3.3	Testes bioquímicos.....	32
4.1.3.4	Testes hormonais.....	33
4.1.4	Pesagem de órgãos	33
4.2	EXPERIMENTO 2	33
4.2.1	Animais	33
4.2.1.1	Composição da ração.....	35
4.2.2	Acompanhamento físico	35
4.2.2.1	Acompanhamento do ganho de peso.....	36

4.2.2.2	Acompanhamento da ingestão alimentar.....	36
4.2.2.3	Medição da circunferência abdominal.....	37
4.2.2.4	Medição do comprimento corporal.....	37
4.2.3	Acompanhamento metabólico	37
4.2.3.1	Teste de Tolerância à insulina (TTI).....	38
4.2.3.2	Teste de Tolerância à glicose (TTOG).....	38
4.2.3.3	Testes bioquímicos.....	38
4.2.3.4	Testes hormonais.....	39
4.2.4	Pesagem de órgãos	39
4.2.5	Teste de suspensão pela cauda	40
4.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
5	RESULTADOS	41
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença definida como acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal que apresenta um risco para a saúde (SIKARIS, 2004; OMS, 2012). Trata-se de um problema de saúde pública de proporções gigantescas tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHETA JR., 2003; LIMA, 2008), onde esta doença vem crescendo cada vez mais. Alguns levantamentos apontam que mais de 50% da população está acima do peso, ou seja, na faixa de sobrepeso e obesidade; entre as crianças está em torno de 15% (ABESO, 2015).

Em 2008, mais de 1,4 bilhões de adultos estavam acima do peso ideal, em 2010, mais de 40 milhões de crianças menores de cinco anos estavam com sobrepeso e atualmente, se sabe que 65% da população mundial vive em países onde o sobrepeso e a obesidade matam mais pessoas do que a subnutrição (OMS 2, 2012).

A projeção para 2025 é de que cerca de 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso, e mais de 700 milhões, obesos; já o número de crianças com sobrepeso e obesidade no mundo pode chegar a 75 milhões, caso nada seja feito (ABESO, 2015).

O aumento do risco da morbidade e mortalidade anteriormente era considerado problema apenas em países de alta renda, agora estão dramaticamente em ascensão em países de baixa e média renda, principalmente em áreas urbanas (OMS, 2012).

Hoje em dia a obesidade também tem sido observada de forma crescente nos animais de companhia (GERMAN, 2006). A maioria dos investigadores concorda que tal incidência nos animais domésticos tende a aumentar (DEVITO et al., 2015) e esta incidência nos animais parece refletir o aumento da incidência da obesidade nos humanos (GERMAN, 2006).

A obesidade é caracterizada como uma síndrome metabólica complexa onde há alteração do equilíbrio dinâmico de energia, o qual envolve não apenas o cérebro, mas também as reações bioquímicas básicas no fígado, gordura e tecido muscular (STICE et al., 2013).

Sua definição não pode ser simplesmente feita em termos de peso corporal,

pois assim se deveria esperar que uma pessoa pequena fosse mais leve que uma pessoa alta. A simples expressão para isto é o índice de massa corpórea (IMC), calculado com o peso (kg) dividido pela altura ao quadrado (m^2) (SIKARIS, 2004).

O ideal IMC é o nível máximo de expectativa de vida, e quando se apresenta maior que 28 é considerado representativo para obesidade (FRIEDMAN; HALAAS, 1998).

É muito difícil estabelecer uma relação de causa e efeito entre o IMC e o grau de atividade física, mas sabe-se que a redução na atividade física diária afeta direta e indiretamente o gasto energético diário do indivíduo (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHA JR., 2003).

A etiologia da obesidade não é de fácil identificação, uma vez que a mesma é caracterizada como uma doença multifatorial, ou seja, é resultado de uma complexa interação entre fatores comportamentais, culturais, genéticos, fisiológicos e psicológicos. Pode, dessa forma, ser classificada em dois contextos: por determinação genética ou fatores endócrinos e metabólicos, ou então, influenciada por fatores externos, sejam eles de origem dietética, comportamental ou ambiental (ROMERO; ZANESCO, 2006), sendo este último o maior determinante da prevalência da doença (SIKARIS, 2004).

Nos dias de hoje, a disponibilidade de alimentos palatáveis que são ricos em açúcar, gordura e calorias transformou o ambiente moderno num cenário onde há comida em abundância (LERARIO et al., 2002; STICE et al., 2013). Acredita-se que as mudanças de comportamento alimentar e os hábitos de vida sedentários atuando sobre genes de susceptibilidade sejam o principal determinante do crescimento da obesidade no mundo (OBICI et al., 2002; PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHA JR., 2003; SIKARIS, 2004; COUTINHO, 2007).

O aumento da obesidade tem se tornado um problema de saúde pública, uma vez que as consequências da obesidade para a saúde são muitas, e variam do risco aumentado de morte prematura à graves doenças não letais, mas debilitantes e que afetam diretamente a qualidade de vida destes indivíduos (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHA JR., 2003). Dentre estas doenças encontram-se diabetes mellitus tipo 2, hipercolesterolemia, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, apnéia do sono, problemas psico-sociais, doenças ortopédicas e diversos tipos de câncer (COUTINHO, 2007).

Nos últimos 20 anos, aumentou muito o conhecimento sobre diversos fatores que contribuem para o desenvolvimento da obesidade, e as consequências endócrinas e metabólicas desta doença. Muito deste conhecimento foi derivado de estudos em modelos de obesidade animal. Atualmente, mais de 30 modelos genéticos de obesidade animal estão descritos na literatura (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHÁ JR., 2003).

O estudo da obesidade em humanos, provavelmente, responderia muitas dúvidas correntes neste tópico. No entanto, pesquisas com humanos têm óbvias limitações éticas e financeiras, já os estudos em animais permitem grande quantidade de pesquisas e resultados (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHÁ JR., 2003). Além disso, animais de laboratório podem ser mantidos em condições rigidamente controladas, consumindo dieta controlada e mantidos livres de patógenos, sob controle de diversas variáveis, tais como genéticas e ambientais (COLEMAN; EICHER, 1990).

Mesmo que estes modelos animais não possam ser considerados exatamente os modelos de obesidade em humanos, eles ainda são de grande valor no estudo das condições bioquímicas, fisiológicas e patológicas necessárias para o acúmulo excessivo de gordura (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHÁ JR., 2003), são pré requisitos fundamentais na busca por possíveis tratamentos da doença, sendo que, devido a facilidade de manipulação genética, os camundongos são o sistema mais acessível dos mamíferos, tendo sua anatomia, fisiologia e genética similares aos humanos (MCKERLIE, 2006).

O fato de animais de laboratório também se tornarem obesos espontaneamente, se alimentando de ração comercial, ou através de outras manipulações, abriu novas áreas para a pesquisa na área de obesidade (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHÁ JR., 2003).

Como a obesidade é um problema tão importante na atualidade, se tornou indispensável investigações mais aprofundadas no assunto, e isso fez com que se desse mais atenção aos animais pertencentes à nossa colônia, a fim de conhecer melhor os parâmetros que demonstram esta obesidade espontânea.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A partir da descoberta das consequências da obesidade para a saúde, muitos estudos passaram a ser realizados com o objetivo de identificar os principais fatores que contribuem para o seu desenvolvimento (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHETA JR., 2003).

Por isso, o combate contra esta enfermidade requer não só a intervenção de políticas públicas de controle de agentes obesogênicos e uma importante atuação na área de educação alimentar, mas há a necessidade de se compreender o tecido adiposo e sua relação com o sistema nervoso central (SNC) no controle do comportamento alimentar (LIMA, 2008).

2.1 TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo, comumente chamado de gordura, é um tipo especial de tecido conjuntivo onde predomina o adipócito (célula que armazena gordura), esta célula é cercada por uma matriz de fibras colágenas, vasos sanguíneos, fibroblastos e células imune (AHIMA; FLIER, 2000). A proximidade anatômica e a íntima interação entre os adipócitos e os capilares sugerem que a microcirculação seja crucial para a modulação das funções dos adipócitos sob condições fisiológicas e patológicas (HONEK et al., 2014).

O número de células adiposas é determinado antes do animal alcançar a maturidade sexual (aproximadamente com 60 dias no camundongo). O adipócito do animal adulto é marcado pelo alargamento destas células nos depósitos subcutâneo, gonadal e retroperitoneal (JOHNSON; HIRSCH, 1972), regiões onde o tecido adiposo é organizado dentro de largas estruturas lobulares (AHIMA; FLIER, 2000). O número de células adiposas e o tamanho destas células contribuem para o tamanho do depósito de tecido adiposo (JOHNSON; HIRSCH, 1972).

O acúmulo excessivo de tecido adiposo, levando ao sobrepeso e a obesidade, representa uma quebra do equilíbrio metabólico que mantém o peso de um indivíduo normal estável (DAMIANI; DAMIANI, 2006).

O tecido adiposo é provavelmente o tecido mais original do corpo, sofrendo constantemente expansão e contração. Esta plasticidade é inevitável para alterar os componentes celulares e moleculares no microambiente do tecido adiposo. Os componentes das células endoteliais, perivasculares, inflamatórias e mesenquimais também mudam constantemente seu número e função para lidar com a demanda metabólica dos adipócitos (CAO, 2007; HONEK et al., 2014).

Atualmente, sabe-se que há grande quantidade de hormônios produzidos pelo tecido adiposo, bem como a expressão de muitos receptores hormonais, sendo um importante órgão endócrino para a manutenção do equilíbrio dinâmico (DAMIANI; DAMIANI, 2006).

2.1.1 Tecido adiposo - órgão endócrino

Durante muito tempo, pensou-se que o tecido adiposo era uma estrutura secundária cuja característica mais marcante era possuir notável capacidade de armazenar grandes quantidades de gordura na forma de triacilglicerol (combinação de glicerol com ácidos, especialmente ácidos graxos), mas pouco se atentou para sua participação no controle do peso corporal e da ingestão alimentar (LIMA, 2008).

O tecido adiposo além de secretar hormônios sintetiza, através dos adipócitos, outras substâncias que fazem parte do sistema endócrino, como adiponectina, glicocorticoides, fator de necrose tumoral (TNF α), hormônios sexuais e interleucina-6 (IL-6), que atuam no metabolismo e controle de diversos sistemas (AHIMA; FLIER, 2000; SIKARIS, 2004; ZECCHIN; CARVALHEIRA; SAAD, 2004). Neste contexto a obesidade pode ser considerada como um estado inflamatório de baixa intensidade, já que o tecido adiposo em excesso produz adipocinas e citocinas que causam esta inflamação (DEVITO et al., 2015).

Uma das adipocinas secretadas pelo tecido adiposo humano em resposta à insulinemia pós-prandial é a leptina, e o aumento da sua produção ocorre à medida que os adipócitos aumentam de tamanho (DEVITO et al., 2015). O tecido adiposo e as concentrações de leptina no plasma vão depender da quantidade de energia estocada como gordura, bem como o status de balanço energético (AHIMA; FLIER, 2000) e este balanço energético positivo ocorre quando o valor calórico ingerido é

superior ao gasto, contribuindo para o desenvolvimento da obesidade e promovendo aumento nos estoques de energia corporal (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHETA JR., 2003).

A função endócrina do tecido adiposo é melhor caracterizada pela leptina (FRIEDMAN; HALAAS, 1998).

2.1.1.1 Leptina

A leptina é um hormônio que apresenta massa relativa de 16 kDa, estrutura helicoidal similar as citocinas e é altamente conservado entre os mamíferos (AHIMA; FLIER, 2000). Seu nome deriva do grego leptós que quer dizer magro (HALAAS et al., 1995).

A leptina é secretada principalmente pelo tecido adiposo, sendo melhor sintetizada no tecido adiposo subcutâneo do que no visceral (AHIMA; FLIER, 2000), embora baixos níveis também sejam encontrados na placenta, músculo esquelético, epitélios gástrico e mamário e no cérebro (FRIEDMAN; HALAAS, 1998). A secreção é realizada pelos adipócitos dentro da circulação atravessando a barreira hematoencefálica (SIKARIS, 2004).

Num primeiro plano, a leptina é um componente integral do complexo sistema fisiológico que regula o armazenamento, o equilíbrio e o uso de energia pelo organismo (NEGRÃO; LICINIO, 2000). Sinaliza e modula o estado nutricional do organismo para outros sistemas fisiológicos (FRIEDMAN; HALAAS, 1998; NEGRÃO; LICINIO, 2000), regula a função neuroendócrina e o metabolismo da glicose e de gorduras, atuando a partir da ativação de receptores específicos presentes nos órgãos alvos (ROMERO; ZANESCO, 2006).

A leptina é responsável pelo controle da ingestão alimentar, atuando em células neuronais no centro hipotalâmico da saciedade no SNC (NEGRÃO; LICINIO, 2000; ROMERO; ZANESCO, 2006), além disso atua de forma ativa na elevação da termogênese, agindo como controladora do peso dos animais (DEVITO et al., 2015).

Portanto, uma das funções mais claras da leptina é ser uma aferência para o SNC dentro de uma alça de retroalimentação negativa que regula a massa de tecido

adiposo, ou seja, a leptina informa o cérebro que os estoques de energia em forma de gordura estão adequados (NEGRÃO; LICINIO, 2000).

Durante a fome, os níveis de leptina caem ativando as respostas comportamentais, hormonais e metabólicas, que são adaptativas quando a comida não está disponível (FRIEDMAN; HALAAS, 1998).

Em indivíduos obesos, os níveis de leptina são maiores e aumentam com superalimentação, nos indivíduos magros há baixos níveis de leptina e quando o indivíduo está em jejum ocorre redução da leptina circulante (AHIMA; FLIER, 2000).

Ainda não se sabe se o mesmo ou diferentes neurônios respondem pelo aumento e diminuição dos níveis de leptina (FRIEDMAN; HALAAS, 1998).

Nos humanos, o pico de leptina é maior à noite e atinge o ponto mais baixo pela manhã (AHIMA; FLIER, 2000).

Esta hiperleptinemia, encontrada em pessoas obesas, é atribuída a alterações no receptor de leptina ou a uma deficiência em seu sistema de transporte na barreira hemato-encefálica, fenômeno denominado resistência à leptina (ROMERO; ZANESCO, 2006).

A leptina apresenta ação multisistêmica, por isso sua ação ou até mesmo sua resistência podem mediar complicações metabólicas, endócrinas e cardiovasculares associadas com a obesidade (AHIMA; FLIER, 2000). Ela pode ser também a chave entre o estado nutricional e o sistema imune (FRIEDMAN; HALAAS, 1998).

Sua função na patogênese da obesidade pode ser inferida pela mensuração da leptina plasmática, ou seja, o aumento da leptina plasmática sugere que a obesidade seja resultado da resistência à leptina e a baixa ou a normal concentração plasmática de leptina, sugerem diminuição na sua produção (FRIEDMAN; HALAAS, 1998), visto que oscilações do peso corporal acarretam em mudanças nas concentrações plasmáticas de leptina (NEGRÃO; LICINIO, 2000; ROMERO; ZANESCO, 2006).

Fatores que modulam diretamente o gasto energético ou ativam a adipogênese e a lipogênese podem também resultar na aparente resistência à leptina (FRIEDMAN; HALAAS, 1998).

As consequências da deficiência de leptina ou sua insensibilidade, causam hiperfagia, obesidade mórbida, diabetes, variação nas anormalidades neuroendócrinas e autonômicas e disfunção imune, conforme visto em estudos com

camundongos mutantes que apresentaram esta deficiência (COLEMAN; EICHER, 1990; FRIEDMAN; HALAAS, 1998).

O tratamento de animais deficientes em leptina com aplicação de leptina exógena, restabelece a homeostase da glicose independente da perda de peso, sugerindo que a leptina atua diretamente nas células β pancreáticas afetando sua função (NISWENDER; MAGNUSON, 2007), além disso, injeções periféricas ou intracerebroventricular (mais potentes) de leptina, reduzem o peso corporal e a massa gorda, através da inibição da ingestão alimentar e da diminuição do gasto energético em roedores (FRIEDMAN; HALAAS, 1998).

2.2 SÍNDROME METABÓLICA

A Síndrome Metabólica (SM) é um transtorno complexo representado por um conjunto de fatores de risco cardiovasculares usualmente relacionados a deposição central de gordura e a resistência à insulina (BRANDÃO et al., 2005), é um conjunto de alterações que comprometem a qualidade de vida e a longevidade de um indivíduo (DAMIANI; DAMIANI, 2006).

A demonstração de resistência insulínica não é um requisito necessário para o diagnóstico da SM, mas está presente na maioria dos indivíduos, principalmente quando há predominância de gordura abdominal (BRANDÃO et al., 2005).

Não existe um único critério aceito universalmente para definir a SM, por isso, o Brasil dispõe do seu Consenso Brasileiro sobre Síndrome Metabólica, documento referendado por diversas entidades médicas. O diagnóstico da Síndrome Metabólica é dado quando três ou mais fatores de risco estiverem presentes numa mesma pessoa: grande quantidade de gordura abdominal, baixo colesterol HDL, triglicérides elevado (nível de gordura no sangue), pressão sanguínea alta e glicose elevada (SBEM 2, 2015).

Existe uma associação entre a obesidade e os fatores de risco para síndrome metabólica, esta associação depende de produtos liberados pelo tecido adiposo, dentre eles estão, ácidos graxos livres, citocinas inflamatórias, adiponectina, leptina, glicocorticoides, hormônios sexuais, TNF- α (DAMIANI; DAMIANI, 2006).

A SM deve ser diagnosticada precocemente e vigorosamente tratada através

de medidas não-medicamentosas e medicamentosas (BRANDÃO et al., 2005).

2.2.1 Insulina

A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico com efeitos metabólicos potentes (ZECCHIN; CARVALHEIRA; SAAD, 2004). É produzida pelas células β do pâncreas, cuja síntese é ativada pelo aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições (AHIMA; FLIER, 2000).

A insulina é o hormônio responsável por retirar a glicose do sangue e levá-la às células do organismo. A ação da insulina é fundamental para a vida (SBEM 2, 2015).

Embora a glicose seja o principal motivo da secreção de insulina, outras substâncias como os aminoácidos, ácidos graxos, o hormônio leptina e neurotransmissores também interferem na quantidade de insulina que é secretada (NISWENDER; MAGNUSON, 2007).

Os receptores de insulina são expressos em muitos tecidos do corpo, incluindo os tecidos clássicos sensíveis à insulina (fígado, músculo e gordura) e os tecidos não sensíveis a ela, tais como os glóbulos vermelhos do sangue e o tecido neuronal no SNC (BRUNING et al., 2000).

Seus efeitos metabólicos imediatos incluem: aumento da captação de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo; aumento da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio; bloqueio da produção hepática de glicose (via diminuição da neoglicogênese e glicogenólise), da lipólise e da proteólise. Outras funções da insulina incluem a prevenção da apoptose ou morte celular e a promoção da sobrevivência celular (ZECCHIN; CARVALHEIRA; SAAD, 2004).

Na década de 80, um pesquisador chamado Reaven, observou que doenças frequentes como hipertensão, alterações na glicose e no colesterol estavam, muitas vezes, associadas à obesidade. E mais que isso, essas condições estavam unidas por um elo de ligação comum, chamado resistência insulínica (SBEM 2, 2015).

Esta resistência significa que mais insulina do que a quantidade normal está sendo necessária para manter o organismo funcionando e a glicose em níveis

normais (SBEM, 2015). Resistência insulínica corresponde então a uma dificuldade desse hormônio em exercer suas ações (SBEM 2, 2015).

Uma das explicações para o desenvolvimento da resistência periférica à ação da insulina, nos indivíduos obesos, estaria relacionada à maior ingestão de lipídios, comum na dieta de pessoas obesas, que não seria acompanhada por um aumento imediato de sua oxidação, com isso, o excesso de ácidos graxos livres seria estocado em diferentes tecidos, além das células adiposas (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHI JR., 2003). Outros fatores também contribuem para o aparecimento desta resistência, fatores genéticos, excesso de peso (principalmente na região abdominal) e a ausência de atividade física (SBEM, 2015).

A resistência insulínica é amplamente reconhecida como a falha fundamental nos casos de obesidade e diabetes tipo 2 (SIKARIS, 2004).

Há um estudo que comprovou que a insulina é produzida de maneira proporcional a leptina, portanto o indivíduo obeso produz mais insulina e a insulina regula a ingestão alimentar (WOODS et al., 1979). A regulação nutricional da leptina é mediada pelo menos em parte pela insulina, a leptina diminui em resposta aos baixos níveis de insulina e aumenta com a alimentação ou em resposta a insulina (AHIMA; FLIER, 2000).

Tem ficado claro que a homeostase energética considera simultaneamente os efeitos da glicose, insulina e leptina nos múltiplos tecidos (NISWENDER; MAGNUSON, 2007).

A compreensão das etapas moleculares da sinalização da insulina pode proporcionar novas abordagens terapêuticas para estados de resistência à insulina, incluindo obesidade, diabetes mellitus do tipo 2, hipertensão arterial e intolerância à glicose associada a diversas endocrinopatias (ZECCHIN; CARVALHEIRA; SAAD, 2004).

2.3 OBESIDADE INDUZIDA PELA DIETA

A etiologia multifatorial da obesidade fornece várias opções para o desenvolvimento de modelos experimentais induzidos à obesidade. Isto é necessário para escolher o modelo melhor adaptado às características a serem

pesquisadas, se sofreram alterações ambientais ou genéticas (VON DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006).

A dieta é a forma mais simples de se induzir um modelo animal à obesidade e possivelmente uma das formas que mais se assemelham com a realidade da obesidade em humanos. Existem vários tipos de dieta que induzem a obesidade que já provaram efetividade. Algumas dietas alcançam valores hipercalóricos com a adição de carboidratos e outras pela adição de gorduras, muitas variam entre 3,7 Kcal/g e 5,4 Kcal/g (VON DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006). A gordura é o nutriente da dieta com a maior densidade energética visto que proporciona 9 kcal/g enquanto o carboidrato e a proteína proporcionam apenas 4 kcal/g (PICCHI et al., 2011).

Estudos em animais tem indicado que as dietas hiperlipídicas são um importante componente para a etiologia da obesidade (PICCHI et al., 2011). Todas elas tem alta palatabilidade e induzem a obesidade (VON DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006).

A investigação das causas e efeitos da obesidade induzida em modelos experimentais pode fornecer um melhor entendimento da fisiopatogenia da obesidade, o qual pode mostrar novas opções de prevenção e tratamento (VON DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006).

2.4 DEPRESSÃO

Uma das consequências da obesidade é a desaprovação pública desta patologia podendo afetar na educação, no emprego, na renda, no estado civil e no cuidado com a saúde dos indivíduos obesos. Estes são efeitos prejudiciais na qualidade de vida e estão associados com o aumento da incidência de depressão (SIKARIS, 2004).

Ocorre também que os sintomas de depressão podem predispor alguns indivíduos a se engajarem na alimentação como um método de aliviarem o estresse, e isto confere um alto risco de obesidade. A alimentação compulsiva em resposta à sentimentos negativos juntamente com o ganho de peso, podem piorar a existência dos sintomas de depressão (GOLDSCHMIDT et al., 2014).

Hoje tem-se estudado o “transtorno de compulsão alimentar”, que está associado com o aumento fisiopatológico da depressão e dos transtornos de personalidade. O transtorno de compulsão alimentar não é só restrito a indivíduos obesos, porém é mais comum neste grupo e estes indivíduos são os que mais buscam por tratamento, onde os antidepressivos são muito efetivos na redução do transtorno (DE ZWAAN, 2001).

2.4.1 Teste de suspensão pela cauda

Ao ser criado o teste de suspensão pela cauda (TSC) pensou-se na seguinte hipótese: um animal normal submetido a uma situação sem solução (sem saída), irá apresentar uma reação aversiva à esta situação, fazendo com que alterne entre dois tipos de comportamento, agitação e imobilidade. Assim, caracterizou-se por “comportamento de procura” a intensa atividade motora e o gasto de energia e o “comportamento de espera” a imobilidade e a polpação de energia. Então observou-se que o uso de antidepressivos modificava o balanço entre as diferentes formas de comportamento, favorecendo a procura por uma saída e reduzindo o tempo de imobilidade (STERU et al., 1985).

Em outro estudo, camundongos obesos mutantes gastaram mais tempo imóveis no TSC do que o grupo controle, mostrando comportamento semelhante à depressão, sendo esta resposta normalizada com o uso de antidepressivos, onde os animais ficaram menos tempo imóveis (RODRIGUIZ et al., 2013).

3 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo avaliar o crescimento de camundongos fêmeas da linhagem Swiss que se tornam espontaneamente obesas em idade avançada, oriundas do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo; tendo em vista identificar em que período se iniciam estas características de obesidade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para melhor avaliação deste fenômeno natural (obesidade espontânea), este estudo foi dividido em dois experimentos.

4.1 EXPERIMENTO 1

4.1.1 Animais

Foram utilizados 20 camundongos fêmeas da linhagem Swiss, acompanhados desde os 10 meses de idade (dias pós-natal 303 [DPN 303]) até os 16 meses de idade (DPN 491), oriundas do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno medindo 30x20x13cm, armazenadas no interior de estantes ventiladas, com controle de temperatura (26 ± 2 °C) e ciclo de luz de 12h claro - 12h escuro. Água e comida foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento. Este estudo esteve de acordo com os padrões internacionais de experimentação animal (*Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources - National Research Council/USA*) e da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Estas fêmeas foram agrupadas conforme pesos semelhantes, e mantidas assim até o término do experimento.

Estes animais foram divididos em dois grupos, um grupo de animais considerados obesos (OB, n=10) e o outro grupo de animais considerados não obesos (NOB, n=10). Esta divisão de grupos foi realizada ao término dos experimentos baseando-se nos parâmetros peso corporal (onde foi realizada uma média dos últimos três pesos de cada animal) e peso da gordura gonadal. Os animais que se encontraram dentro do erro padrão da média foram eliminados.

4.1.1.1 Composição da ração

Durante todo o experimento estes animais receberam a dieta padrão do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Nuvilab CR1).

Esta ração padrão utilizada possui 2980 kcal/Kg de energia metabolizável sendo constituída por 22 a 22,5% de proteína bruta, 4 a 5% de extrato etéreo (gordura) e 53 a 55% de carboidratos em quantidade. Sua composição básica contém milho integral moído, farelo e soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, monóxido de manganês, óxido de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina e BHT como aditivo, de acordo com informações do fabricante.

4.1.2 Acompanhamento físico

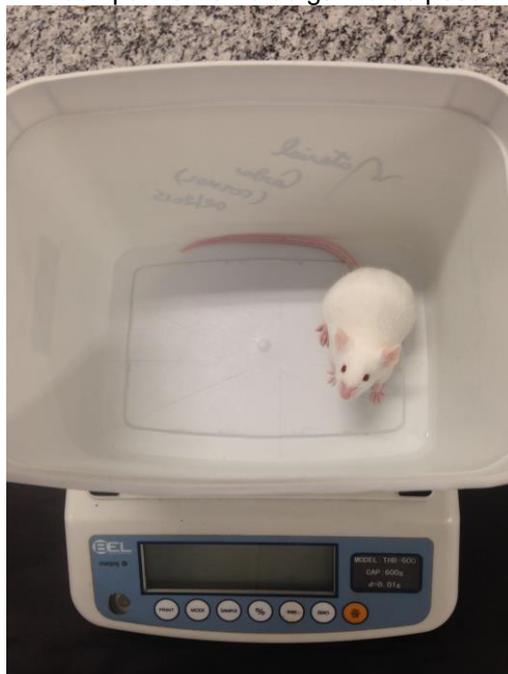
Para o acompanhamento do desenvolvimento físico destes animais com maior faixa etária foram realizados acompanhamento do ganho de peso, acompanhamento da ingestão alimentar, medição da circunferência abdominal e medição do comprimento corporal.

4.1.2.1 Acompanhamento do ganho de peso

Estes animais foram colocados um a um em um recipiente de plástico para contenção e o mesmo foi posto em uma balança digital (o peso do recipiente foi descontado na balança antes da colocação do animal em seu interior), obtendo-se assim o peso do animal (Figura 2).

As pesagens foram realizadas semanalmente, do DPN 303 até o DPN 429, totalizando 19 semanas de acompanhamento do ganho de peso.

Figura 2 - Acompanhamento do ganho de peso individual

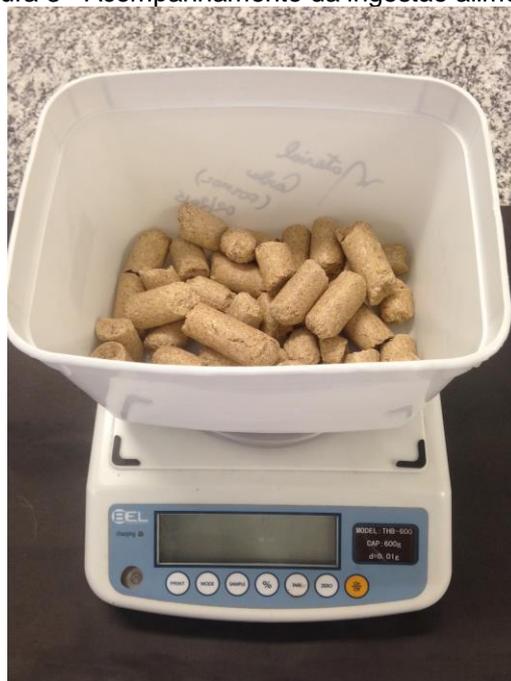


Fonte: (TOBARUELA, C.N., 2015)

4.1.2.2 Acompanhamento da ingestão alimentar

Para o acompanhamento da ingestão alimentar foi realizada pesagem da ração semanalmente, a ração foi colocada em um recipiente de plástico e o mesmo foi posto em uma balança digital (o peso do recipiente foi descontado na balança antes da colocação da ração, conforme pesagem dos animais) (Figura 3). O resultado final da ingestão de cada animal diariamente foi obtido a partir da subtração do peso da ração colocada em uma semana menos o peso da ração encontrada na semana seguinte, este valor foi dividido pelo número de animais presente naquela gaiola e este agora dividido por 7 (número de dias em uma semana). O acompanhamento da ingestão alimentar foi realizado durante 17 semanas que compreenderam do DPN 317 ao DPN 429.

Figura 3 - Acompanhamento da ingestão alimentar



Fonte: (TOBARUELA, C.N., 2015)

4.1.2.3 Medição da circunferência abdominal

Foi realizada a medição da circunferência abdominal, com fita métrica, onde o animal foi contido pela pele do dorso e posicionado verticalmente, sem o apoio dos membros posteriores, logo depois foi passada a fita métrica ao redor da região abdominal, obtendo-se a circunferência abdominal em centímetros (Figura 4). Foram realizadas medições quinzenalmente do DPN 373 ao DPN 418.

Figura 4 - Medição da circunferência abdominal

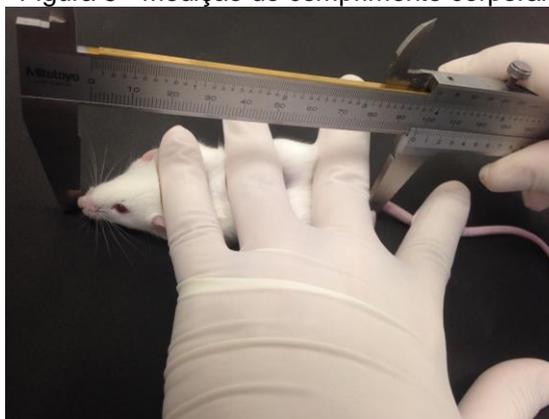


Fonte: (TOBARUELA, C.N., 2015)

4.1.2.4 Medição do comprimento corporal

Nos mesmos dias em que foram feitas as medições da circunferência abdominal (DPN 373 - DPN 418) foram realizadas as medições do comprimento corporal destes animais, através de um instrumento chamado paquímetro. Foi mensurada a distância naso - anal de cada animal, sendo este contido através de leve pressão sobre seu corpo contra a mesa de apoio (Figura 5).

Figura 5 - Medição do comprimento corporal



Fonte: (TOBARUELA, C.N., 2015)

4.1.3 Acompanhamento metabólico

Para a pesquisa de alterações metabólicas, os animais passaram por testes de tolerância à insulina e de tolerância oral à glicose. No DPN 491 foi realizada a eutanásia destes animais, neste procedimento eles foram submetidos a anestesia inalatória com Isoflurano e posterior punção cardíaca (coleta de sangue que cessa os parâmetros vitais do animal) seguida de deslocamento cervical. Este material coletado na punção cardíaca foi processado para obtenção do soro o qual foi posteriormente utilizado para análises laboratoriais onde realizou-se testes bioquímicos e testes hormonais.

4.1.3.1 Teste de Tolerância à insulina (TTI)

Este teste foi realizado no DPN 470 para a obtenção da curva glicêmica de cada animal.

Os animais foram submetidos a jejum de 6 horas, após este período foram pesados e receberam uma injeção intraperitoneal de solução de insulina (100U/ml) na dose de 1,5 U/kg (DE SOUZA et al., 2010).

Amostras de sangue foram obtidas dos vasos da cauda, através de um pequeno corte na extremidade da mesma (aproximadamente um milímetro), para a

determinação da glicemia (Glucômetro One Touch Ultra, Johnson & Johnson®) nos tempos 0, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos.

4.1.3.2 Teste de Tolerância Oral à Glicose (TTOG)

Este teste foi realizado no DPN 472 para a obtenção da curva glicêmica de cada animal.

Os animais foram submetidos a jejum de 6 horas, após este período foram pesados e receberam uma solução de glicose (200 g/l) por via intragástrica (gavagem) na dose de 2 mg/g (BEZERRA et al., 2012).

Amostras de sangue foram obtidas dos vasos da cauda, através de um pequeno corte na extremidade da mesma (aproximadamente um milímetro), para a determinação da glicemia (Glucômetro One Touch Ultra, Johnson & Johnson®) nos tempos 0, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos.

4.1.3.3 Testes bioquímicos

Os testes bioquímicos escolhidos para avaliação de possíveis alterações metabólicas foram Colesterol total, Triglicérides e Aspartato Amino Transferase (AST).

Para determinação de AST nas amostras foram realizadas análises através da metodologia cinética, seguindo-se todas as orientações do fabricante na elaboração (Labtest®).

Para mensuração do colesterol total e do triglicérides nas amostras foram realizadas análises através do sistema enzimático colorimétrico, seguindo-se todas as orientações do fabricante na elaboração (Labtest®).

4.1.3.4 Testes hormonais

Foram feitos testes hormonais para dosagens de leptina e insulina através de teste Elisa. A leitura das amostras foi realizada por um equipamento (BioTek®) leitor de Elisa que envia imediatamente os resultados da leitura para um software chamado Gen5, os dados obtidos depois foram transmitidos para um outro software (SoftMax® Pro) que realiza cálculos para se obter o valor final em ng/mL. As dosagens de leptina foram feitas com o teste *Mouse Leptin ELISA Kit - Crystal Chem Inc.®* e as dosagens de insulina foram feitas com o teste *Ultra Sensitive Mouse Insulin Elisa Kit - Crystal Chem Inc.®*, respeitando-se as orientações do fabricante na elaboração dos testes.

4.1.4 Pesagem de órgãos

No DPN 491, data em que foi realizada a eutanásia dos animais, foi feita a remoção de alguns órgãos para verificação do peso dos mesmos. Os órgãos selecionados foram fígado, gordura retroperitoneal, gordura gonadal, rim direito e útero juntamente com os ovários.

4.2 EXPERIMENTO 2

4.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Swiss, acompanhados desde dia pós-natal 01 (DPN 01) até o DPN 240 (8 meses de idade), oriundas do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno medindo 30x20x13cm, armazenadas no interior de estantes ventiladas, com controle de temperatura (26 ± 2 °C) e ciclo de luz de 12h claro - 12h escuro. Água e comida foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento. Este estudo esteve de acordo com os padrões internacionais de experimentação animal (*Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources - National Research Council/USA*) e da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Primeiramente os animais foram acasalados na proporção de um macho para duas fêmeas para a obtenção de 10 ninhadas, estas ninhadas foram padronizadas, quando possível, em 4 machos e 4 fêmeas. Ao completarem 21 dias de vida foi realizado o desmame dos animais, e a partir de então as fêmeas foram divididas em dois grupos, um grupo de fêmeas que receberiam a dieta padrão do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Nuvilab CR1) e o outro grupo de fêmeas que receberiam uma dieta hiperlipídica apenas no período de peri-puberdade, que compreendeu do DPN 21 ao DPN 60, após este período estas fêmeas passaram a receber a dieta padrão.

Estas fêmeas foram agrupadas conforme pesos semelhantes, e mantidas assim até as últimas análises.

Ao término dos experimentos, baseando-se nos parâmetros peso corporal (onde foi realizada uma média dos últimos três pesos de cada animal) e peso da gordura gonadal, foi realizada a divisão destas fêmeas em 4 grupos, um grupo de fêmeas consideradas obesas e que comeram a *dieta padrão* (DP) ao longo de toda a vida (DP-OB, n=9); outro grupo de fêmeas consideradas não obesas e que comeram a dieta padrão ao longo de toda a vida (DP-NOB, n=7); outro grupo de fêmeas consideradas obesas e que comeram *dieta hiperlipídica* (DHF) apenas na peri-puberdade (DHF-OB, n=7); e um último grupo de fêmeas consideradas não obesas e que comeram ração hiperlipídica apenas na peri-puberdade (DHF-NOB, n=7). Os animais que se encontraram dentro do erro padrão da média foram eliminados.

4.2.1.1 Composição da ração

Esta ração padrão utilizada possui 2980 kcal/Kg de energia metabolizável sendo constituída por 22 a 22,5% de proteína bruta, 4 a 5% de extrato etéreo (gordura) e 53 a 55% de carboidratos em quantidade. Sua composição básica contém milho integral moído, farelo e soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, monóxido de manganês, óxido de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina e BHT como aditivo, de acordo com informações do fabricante.

A ração hiperlipídica 45% utilizada neste estudo possui composição básica semelhante à ração padrão, sendo 4590 kcal/Kg de energia metabolizável. Em quantidade, possui 8% de matéria mineral, 22% de proteína bruta, 23% de extrato etéreo (gordura – o que equivale a 45,1% em quilocalorias), 6% de fibra bruta e 41% de carboidratos. As fontes de gordura são 16,8% de banha (gordura saturada) e o restante em sua maioria óleo de soja e uma fração mínima de óleo de milho (gordura insaturada).

4.2.2 Acompanhamento físico

Para o acompanhamento do desenvolvimento físico destes animais com menor faixa etária foram realizados acompanhamento do ganho de peso, acompanhamento da ingestão alimentar, medição da circunferência abdominal e medição do comprimento corporal.

4.2.2.1 Acompanhamento do ganho de peso

Estes animais foram colocados um a um em um recipiente de plástico para contenção e o mesmo foi posto em uma balança digital (o peso do recipiente foi descontado na balança antes da colocação do animal em seu interior), obtendo-se assim o peso do animal (Figura 2).

As pesagens compreenderam do DPN 01 até o DPN 240, totalizando 34 pesagens para o acompanhamento do ganho de peso. Estas pesagens foram realizadas a cada 3 dias do DPN 01 até o DPN 60, semanalmente do DPN 67 ao DPN 88, quinzenalmente do DPN 103 ao DPN 200 e novamente semanalmente do DPN 207 ao DPN 240.

4.2.2.2 Acompanhamento da ingestão alimentar

Para o acompanhamento da ingestão alimentar foi realizada pesagem da ração em um recipiente de plástico e o mesmo foi posto em uma balança digital (o peso do recipiente foi descontado na balança antes da colocação da ração, conforme pesagem dos animais) (Figura 3). O resultado final da ingestão de cada animal foi obtido a partir da subtração do peso da ração colocada em uma semana menos o peso da ração encontrada na semana seguinte, este valor foi dividido pelo número de animais presente naquela gaiola e este agora dividido por 7 (número de dias em uma semana).

As pesagens foram realizadas do DPN 24 até o DPN 240, totalizando 31 pesagens para o acompanhamento da ingestão alimentar. Estas pesagens foram realizadas a cada 3 dias do DPN 24 até o DPN 60, semanalmente do DPN 67 ao DPN 88, quinzenalmente do DPN 103 ao DPN 200 e novamente semanalmente do DPN 207 ao DPN 240, acompanhando sempre a pesagem dos animais.

4.2.2.3 Medição da circunferência abdominal

Foi realizada a medição da circunferência abdominal, com fita métrica, onde o animal foi contido pela pele do dorso e posicionado verticalmente, sem o apoio dos membros posteriores, logo depois foi passada a fita métrica ao redor da região abdominal, obtendo-se a circunferência abdominal em centímetros (Figura 4). Este acompanhamento foi feito nos DPN 21, 40, 60, 180 e 240, para verificar o desenvolvimento dos animais.

4.2.2.4 Medição do comprimento corporal

Foi realizada a medição do comprimento corporal destes animais, através de um instrumento chamado paquímetro, mensurando a distância naso - anal de cada animal, sendo este contido através de leve pressão sobre seu corpo contra a mesa de apoio (Figura 5). As medições foram realizadas nos DPN 01, 10, 21, 40, 60, 180 e 240.

4.2.3 Acompanhamento metabólico

Para a pesquisa de alterações metabólicas, os animais passaram por testes de tolerância à insulina e de tolerância oral à glicose. Foram realizadas coletas de sangue nos DPN 90 e 180. Utilizou-se para coleta os vasos da região da face, no ponto onde ocorre a junção dos vasos oriundos da região retro orbital. No DPN 240 foi realizada a eutanásia destes animais, neste procedimento eles foram submetidos a anestesia inalatória com Isoflurano e posterior punção cardíaca (coleta de sangue que cessa os parâmetros vitais do animal) seguida de deslocamento cervical. Este material coletado na punção cardíaca foi processado para obtenção do soro o qual foi posteriormente utilizado para análises laboratoriais onde realizou-se testes bioquímicos e testes hormonais.

4.2.3.1 Teste de Tolerância à insulina (TTI)

Este teste foi realizado no DPN 230 para a obtenção da curva glicêmica de cada animal.

Os animais foram submetidos a jejum de 6 horas, após este período foram pesados e receberam uma injeção intraperitoneal de solução de insulina (100U/ml) na dose de 1,5 U/kg (citação dose TTI).

Amostras de sangue foram obtidas dos vasos da cauda, através de um pequeno corte na extremidade da mesma (aproximadamente um milímetro), para a determinação da glicemia (Glucômetro One Touch Ultra, Johnson & Johnson®) nos tempos 0, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos.

4.2.3.2 Teste de Tolerância Oral à Glicose (TTOG)

Este teste foi realizado no DPN 232 para a obtenção da curva glicêmica de cada animal.

Os animais foram submetidos a jejum de 6 horas, após este período foram pesados e receberam uma solução de glicose (200 g/l) por via intragástrica (gavagem) na dose de 2 mg/g (citação dose TTOG).

Amostras de sangue foram obtidas dos vasos da cauda, através de um pequeno corte na extremidade da mesma (aproximadamente um milímetro), para a determinação da glicemia (Glucômetro One Touch Ultra, Johnson & Johnson®) nos tempos 0, 20, 40, 60, 90 e 120 minutos.

4.2.3.3 Testes bioquímicos

Os testes bioquímicos escolhidos para avaliação de possíveis alterações metabólicas foram Colesterol total, Triglicérides e Aspartato Amino Transferase (AST).

Para determinação de AST nas amostras foram realizadas análises através da metodologia cinética, seguindo-se todas as orientações do fabricante na elaboração (Labtest®).

Para mensuração do colesterol total e do triglicérides nas amostras foram realizadas análises através do sistema enzimático colorimétrico, seguindo-se todas as orientações do fabricante na elaboração (Labtest®).

4.2.3.4 Testes hormonais

Foram feitos testes hormonais para dosagens de leptina e insulina através de teste Elisa. A leitura das amostras foi realizada por um equipamento (BioTek®) leitor de Elisa que envia imediatamente os resultados da leitura para um software chamado Gen5, os dados obtidos depois foram transmitidos para um outro software (SoftMax® Pro) que realiza cálculos para se obter o valor final em ng/mL. As dosagens de leptina foram feitas com o teste *Mouse Leptin ELISA Kit - Crystal Chem Inc.®* e as dosagens de insulina foram feitas com o teste *Ultra Sensitive Mouse Insulin Elisa Kit - Crystal Chem Inc.®*, respeitando-se as orientações do fabricante na elaboração dos testes.

4.2.4 Pesagem de órgãos

No DPN 240, data em que foi realizada a eutanásia dos animais, foi feita a remoção de alguns órgãos para a verificação do peso dos mesmos. Os órgãos selecionados foram fígado, gordura retroperitoneal, gordura gonadal, rim direito e útero juntamente com os ovários.

4.2.5 Teste de suspensão pela cauda

No DPN 200 foi realizado teste de suspensão pela cauda nos animais. Cada um deles foi posicionado pela cauda em uma estrutura semiaberta com um gancho na superfície superior. Os animais permaneceram nesta posição por 6 minutos e foram filmados durante este período para posterior avaliação. O parâmetro observado durante este período foi o tempo total de imobilidade dos animais. Este teste seguiu os métodos descritos (CASTAGNÉ et al., 2011).

4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

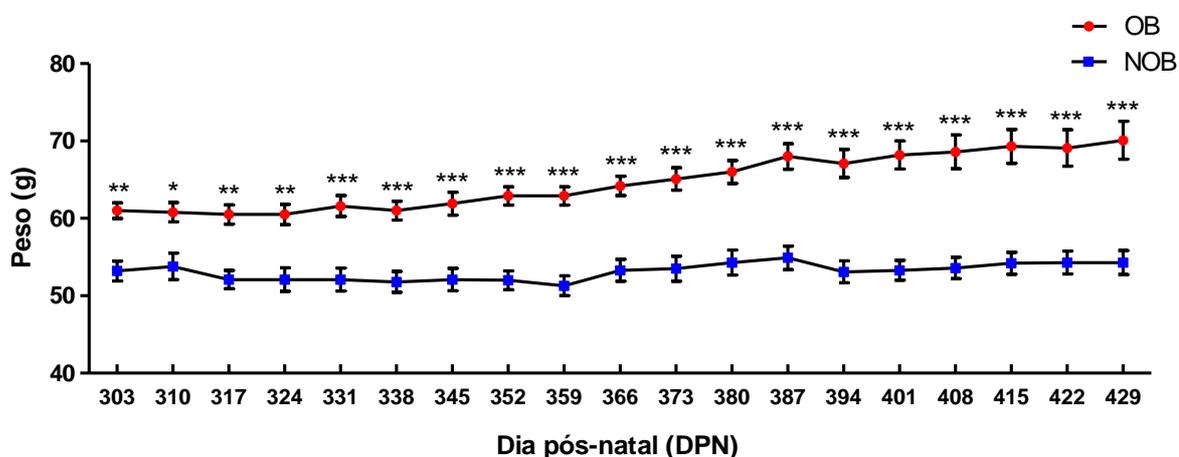
Para todos os dados foi estabelecido limite mínimo de significância de 95% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPrism. ANOVA de uma via foi utilizada para avaliar o efeito das alterações espontâneas e do tratamento (dieta hiperlipídica) sobre a área sob a curva do TTOG e dos níveis plasmáticos de insulina. ANOVA de duas vias foi utilizada para avaliar o efeito do tempo e do tratamento no acompanhamento do ganho de peso, delta do ganho de peso, acompanhamento da ingestão alimentar, medição da circunferência abdominal, medição do comprimento corporal e curvas glicêmicas do TTI e TTOG. Para as outras análises como o peso dos órgãos (absoluto e relativo), teste de suspensão pela cauda, medição do comprimento corporal nos animais com maior faixa etária e dosagens bioquímicas e hormonais, foi utilizado teste t.

5 RESULTADOS

Experimento 1

Os animais do grupo OB tiveram aumento significativo do ganho de peso corporal (Gráfico 1) ao longo do tempo em relação ao grupo NOB, atingindo cerca de 70g.

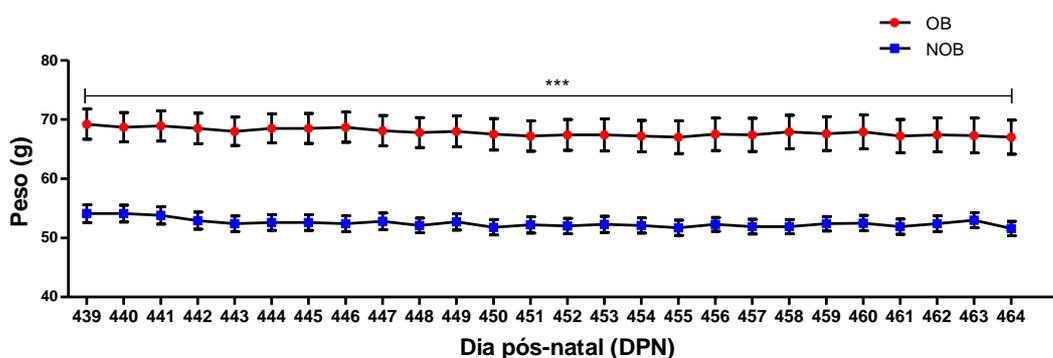
Gráfico 1 – Acompanhamento do ganho de peso corporal semanal



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
 ANOVA de duas vias. Efeito de grupo e tempo significativo, $p < 0,0001$.
 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$, Bonferroni.
 OB: grupo obesas, NOB: grupo não obesas.

Os mesmos resultados foram encontrados no acompanhamento do ganho de peso corporal diário (Gráfico 2), realizado para um acompanhamento mais próximo, verificando os demais resultados.

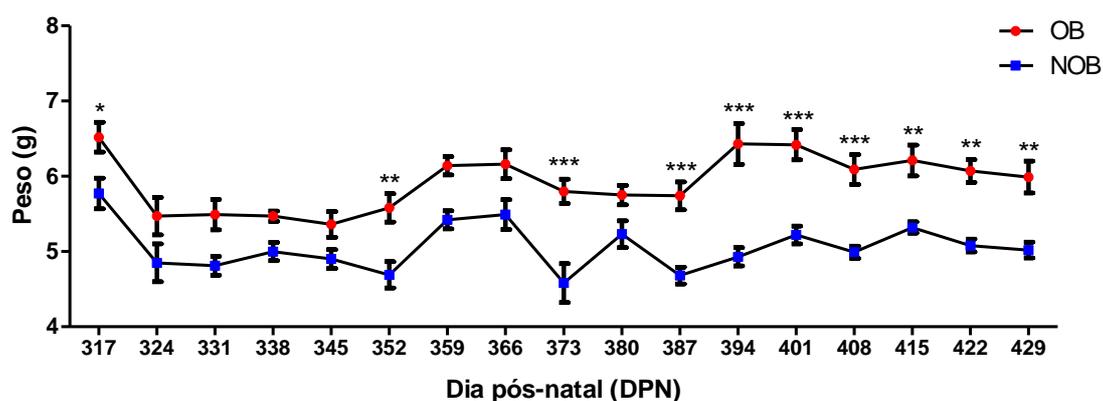
Gráfico 2 – Acompanhamento do ganho de peso corporal diário



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
ANOVA de duas vias. Efeito de grupo e tempo significativo, $p < 0,0001$.
* $p < 0,05$, Bonferroni.
OB: grupo obesas, NOB: grupo não obesas.

Foi observada uma maior ingestão no grupo OB em relação ao outro grupo, ao longo do tempo (Gráfico 3).

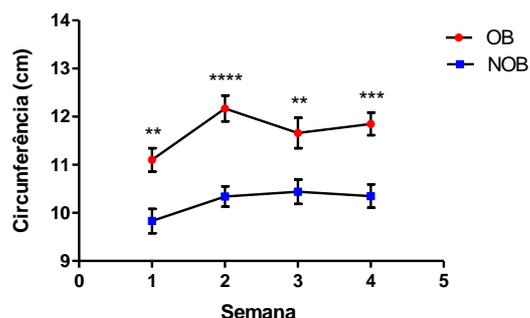
Gráfico 3 – Controle de ingestão semanal



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
ANOVA de duas vias. Efeito de grupo e tempo significativo, $p < 0,0001$.
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$, Bonferroni.
OB: grupo obesas, NOB: grupo não obesas.

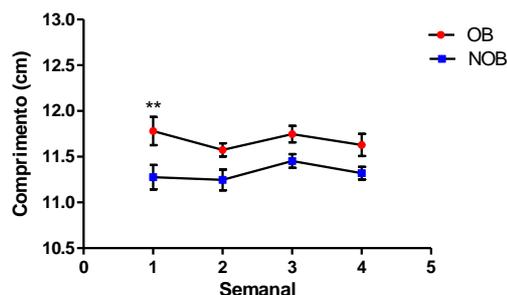
As fêmeas do grupo OB apresentaram circunferência abdominal (Gráfico 4) e comprimento corporal (Gráfico 5) maiores comparadas ao grupo NOB.

Gráfico 4 – Circunferência abdominal



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
ANOVA de duas vias. Efeito de grupo e tempo significativo, $p < 0,0001$.
** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, Bonferroni.
OB: grupo obesas
NOB: grupo não obesas.

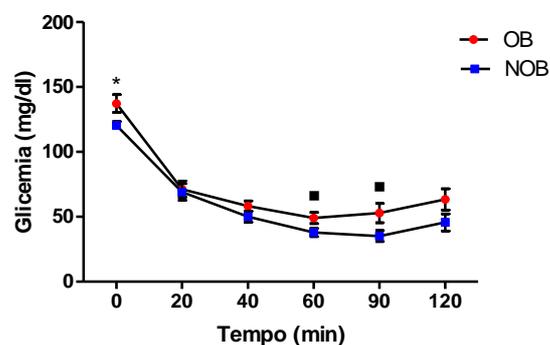
Gráfico 5 – Comprimento corporal



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
ANOVA de duas vias. Efeito de grupo significativo, $p < 0,05$.
** $p < 0,01$, Bonferroni.
OB: grupo obesas
NOB: grupo não obesas.

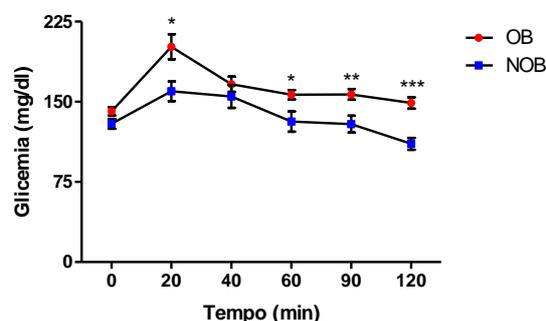
No TTI (Gráfico 6) houve diferença significativa na resposta à insulina entre os grupos OB e NOB; e no TTOG (Gráfico 7) as fêmeas OB tiveram maior pico de glicemia aos 20 minutos de teste e permaneceram por mais tempo com os níveis glicêmicos elevados.

Gráfico 6 – Teste de tolerância à insulina



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
ANOVA de duas vias. Efeito de grupo e tempo significativo, $p < 0,05$.
* $p < 0,05$, Bonferroni. ■ $0,05 > p < 0,06$, t Student
OB: grupo obesas
NOB: grupo não obesas.

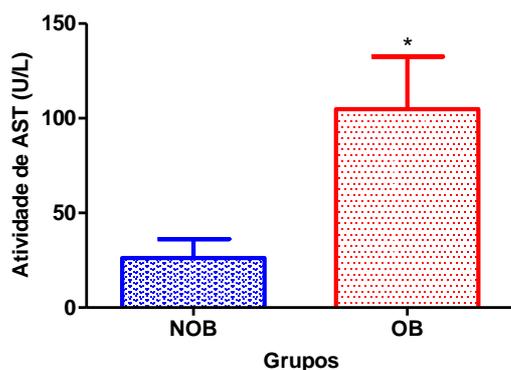
Gráfico 7 – Teste de tolerância oral à glicose



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
ANOVA de duas vias. Efeito de grupo e tempo significativo, $p < 0,05$.
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Bonferroni.
OB: grupo obesas
NOB: grupo não obesas.

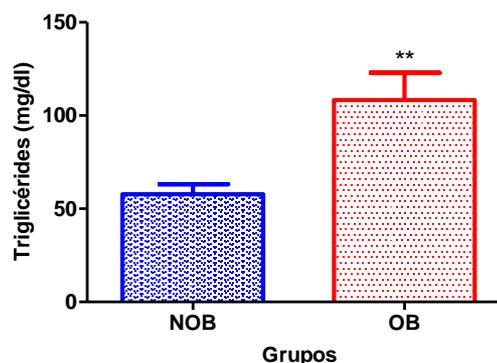
Nos testes bioquímicos foram encontrados resultados significantes no grupo OB nas dosagens de AST (Gráfico 8) e triglicérides (Gráfico 9). Para as dosagens de colesterol total (Gráfico 10) não houve resultados estatisticamente significantes.

Gráfico 8 – Dosagens de Aspartato Amino Transferase



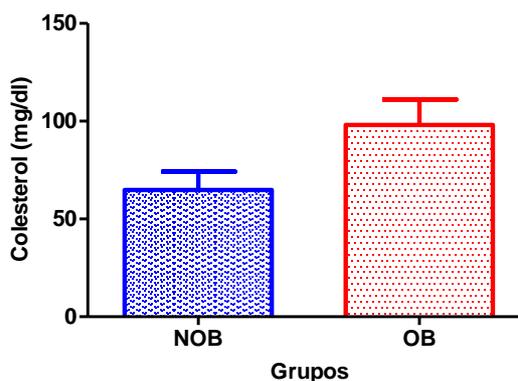
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
* $p < 0,05$, t Student.
OB: grupo obesas
NOB: grupo não obesas.

Gráfico 9 – Dosagens de Triglicérides



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
** $p < 0,01$, t Student.
OB: grupo obesas
NOB: grupo não obesas.

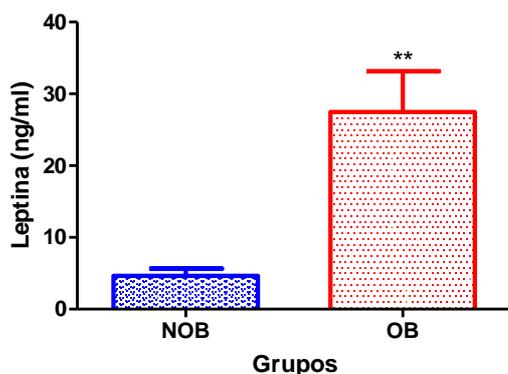
Gráfico 10 – Dosagens de Colesterol total



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
OB: grupo obesas
NOB: grupo não obesas.

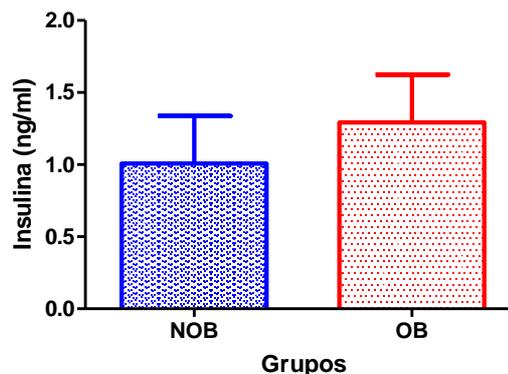
Nos testes hormonais foram encontrados resultados significantes nas dosagens de leptina (Gráfico 11), porém o mesmo não ocorreu nas dosagens de insulina (Gráfico 12).

Gráfico 11 – Dosagens de Leptina



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
 ** $p < 0,01$, t Student.
 OB: grupo obesas
 NOB: grupo não obesas.

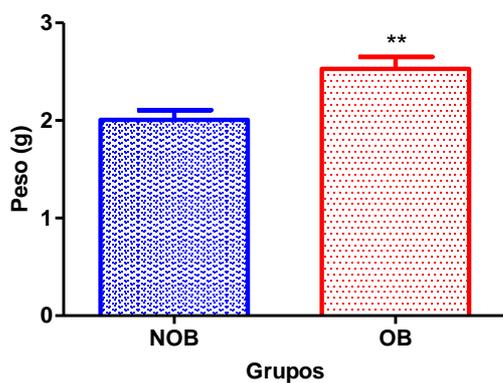
Gráfico 12 – Dosagens de Insulina



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
 OB: grupo obesas
 NOB: grupo não obesas.

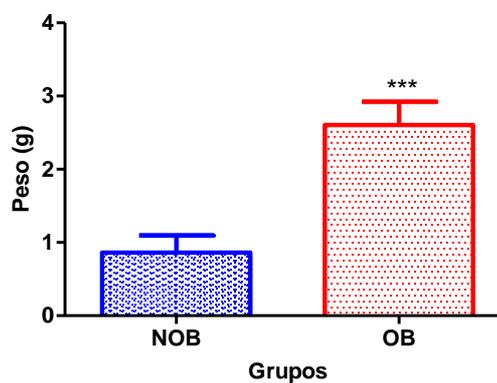
Nas pesagens dos órgãos coletados, os resultados foram significantes para o grupos das fêmeas obesas em quase todos os órgãos, fígado (Gráfico 13), gordura retroperitoneal (Gráfico 14), gordura gonadal (Gráfico 15) e rim direito com adrenal (Gráfico 16), não mostrando diferença significativa apenas no peso do útero com ovários (Gráfico 17).

Gráfico 13 – Peso do fígado



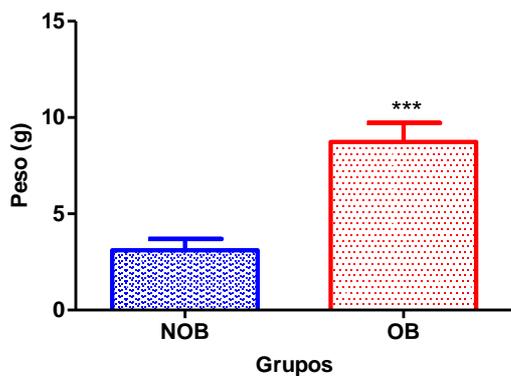
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
 ** $p < 0,01$, t Student.
 OB: grupo obesas
 NOB: grupo não obesas.

Gráfico 14 – Peso da gordura retroperitoneal



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
 ** $p < 0,001$, t Student.
 OB: grupo obesas
 NOB: grupo não obesas.

Gráfico 15 – Peso da gordura gonadal



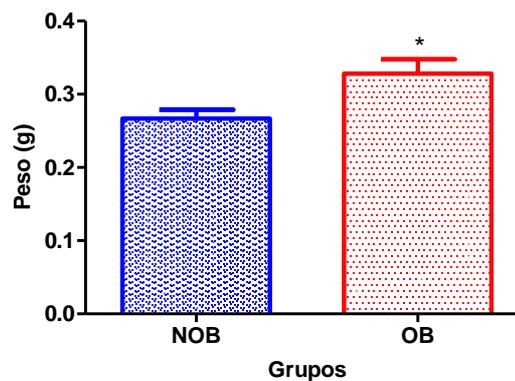
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.

** $p < 0,001$, t Student.

OB: grupo obesas

NOB: grupo não obesas.

Gráfico 16 – Peso do rim com adrenal



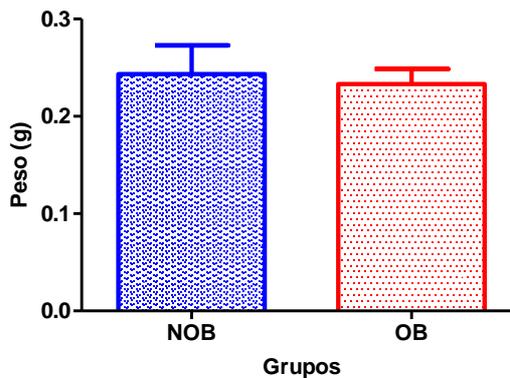
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.

* $p < 0,05$, t Student.

OB: grupo obesas

NOB: grupo não obesas.

Gráfico 17 – Peso do útero com os ovários



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.

OB: grupo obesas

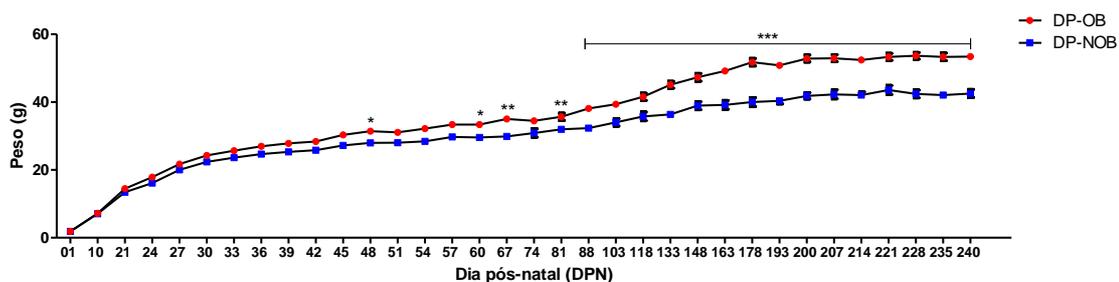
NOB: grupo não obesas.

Experimento 2

Os animais do grupo DP-OB tiveram aumento significativo do ganho de peso corporal (Gráfico18) ao longo do tempo, mostrando o ganho de peso elevado após o DPN 81. Também ocorreu efeito da interação grupo e tempo significativo, indicando que os grupos responderam de forma diferente ao longo do tempo.

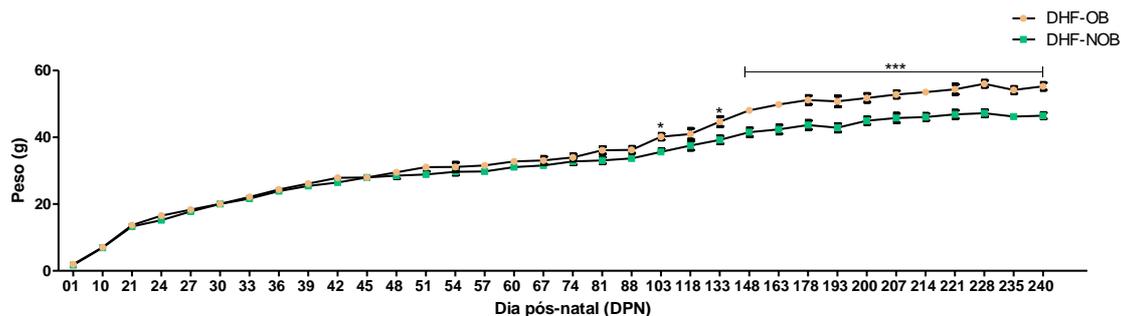
Com os animais do grupo DHF-OB também ocorreu aumento significativo do ganho de peso corporal (Gráfico 19) ao longo do tempo, porém o ganho de peso elevado apareceu após o DPN 133.

Gráfico 18 – Acompanhamento do ganho de peso corporal, fêmeas com dieta padrão



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
ANOVA de duas vias. Efeito de grupo e tempo significativo, $p < 0,0001$.
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$, Bonferroni.
DP-OB: dieta padrão - grupo obesas
DP-NOB: dieta padrão - grupo não obesas.

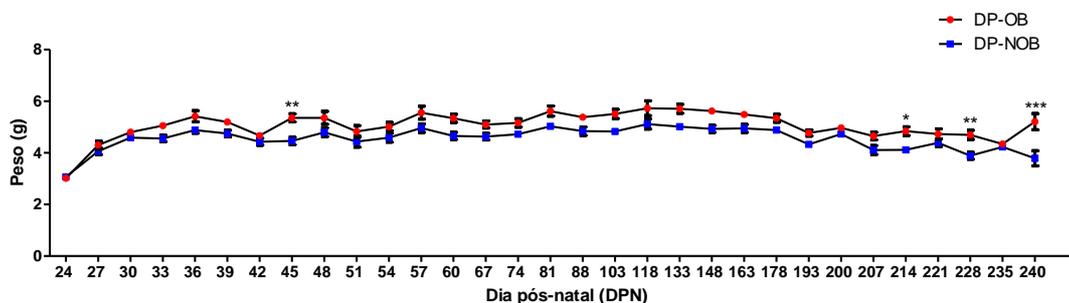
Gráfico 19 – Acompanhamento do ganho de peso corporal, fêmeas com dieta hiperlipídica



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
ANOVA de duas vias. Efeito de grupo e tempo significativo, $p < 0,0001$.
* $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$, Bonferroni.
DHF-OB: dieta hiperlipídica - grupo obesas
DHF-NOB: dieta hiperlipídica - grupo não obesas.

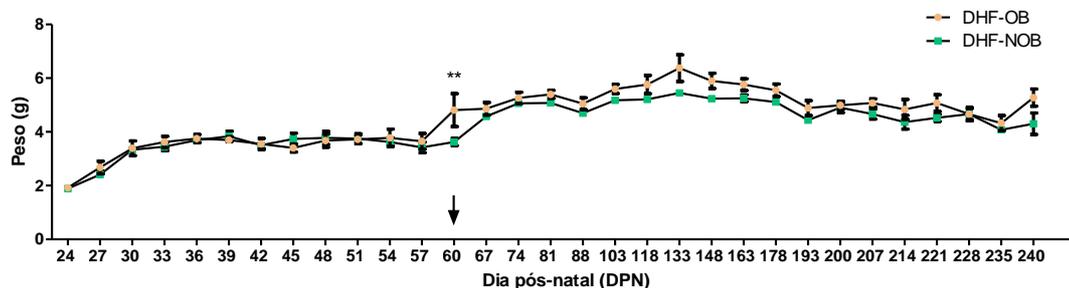
O controle de ingesta do grupo DP-OB (Gráfico 20) apresentou alterações significantes de grupo e tempo em alguns dias após o nascimento (DPN 45, 214, 228 e 240), já o grupo DHF-OB (Gráfico 21) mostrou diferença significativa na ingesta ao longo do tempo, destacando o DPN 60, dia pós-natal onde passaram a receber a ração padrão.

Gráfico 20 – Controle de ingesta, fêmeas com dieta padrão



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
ANOVA de duas vias. Efeito de grupo e tempo significativo, $p < 0,05$.
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$, Bonferroni.
DP-OB: dieta padrão - grupo obesas
DP-NOB: dieta padrão - grupo não obesas.

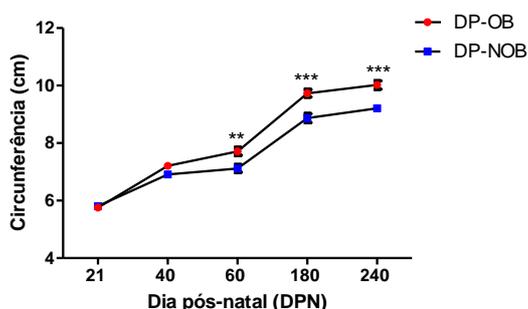
Gráfico 21 – Controle de ingesta, fêmeas com dieta hiperlipídica



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
ANOVA de duas vias. Efeito de tempo significativo, $p < 0,05$.
** $p < 0,01$, Bonferroni.
↓ início da dieta padrão
DHF-OB: dieta hiperlipídica - grupo obesas
DHF-NOB: dieta hiperlipídica - grupo não obesas.

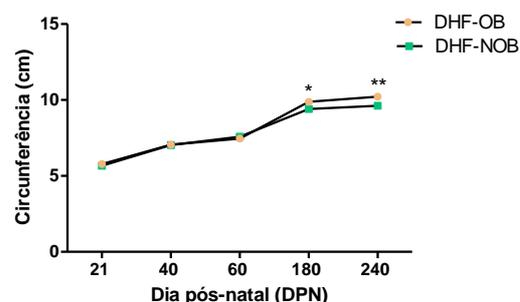
Os grupos DP-OB (Gráfico 22) e DHF-OB (Gráfico 23) mostraram efeito da interação grupo e tempo significativo no acompanhamento da circunferência abdominal, porém apenas o grupo DP-OB (Gráfico 24) mostrou este mesmo efeito no acompanhamento do comprimento corporal; o grupo DHF-OB (Gráfico 25) mostrou apenas aumento do comprimento ao longo do tempo comparado ao grupo DHF-NOB.

Gráfico 22 – Circunferência abdominal, fêmeas com dieta padrão



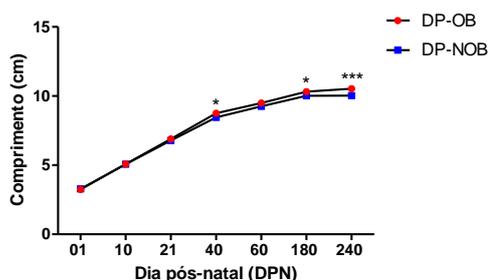
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
ANOVA de duas vias. Efeito de grupo e tempo significativo, $p < 0,05$.
** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$, Bonferroni.
DP-OB: dieta padrão - grupo obesas
DP-NOB: dieta padrão - grupo não obesas.

Gráfico 23 – Circunferência abdominal, fêmeas com dieta



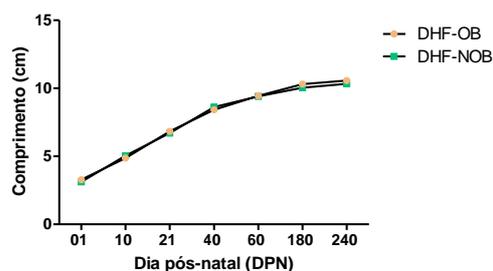
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
ANOVA de duas vias. Efeito de grupo e tempo significativo, $p < 0,05$.
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Bonferroni.
DHF-OB: dieta hiperlipídica - grupo obesas
DHF-NOB: dieta hiperlipídica - grupo não obesas.

Gráfico 24 – Comprimento corporal, fêmeas com dieta padrão



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
ANOVA de duas vias. Efeito de grupo e tempo significativo, $p < 0,05$.
* $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$, Bonferroni.
DP-OB: dieta padrão - grupo obesas
DP-NOB: dieta padrão - grupo não obesas.

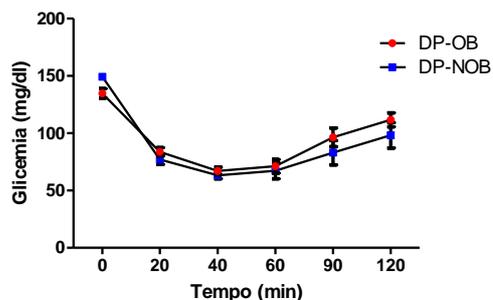
Gráfico 25 – Comprimento corporal, fêmeas com dieta hiperlipídica



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
ANOVA de duas vias.
Não houve diferença significativa entre os grupos.
DHF-OB: dieta hiperlipídica - grupo obesas
DHF-NOB: dieta hiperlipídica - grupo não obesas.

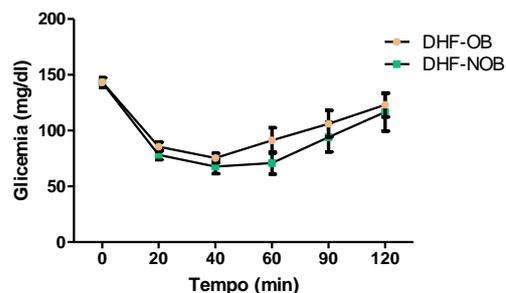
Os animais dos grupos de dieta padrão (Gráficos 26 e 28) e de dieta hiperlipídica (Gráficos 27 e 29) responderam conforme o esperado tanto para o TTI como para o TTOG.

Gráfico 26 – Teste de tolerância à insulina, fêmeas com dieta padrão



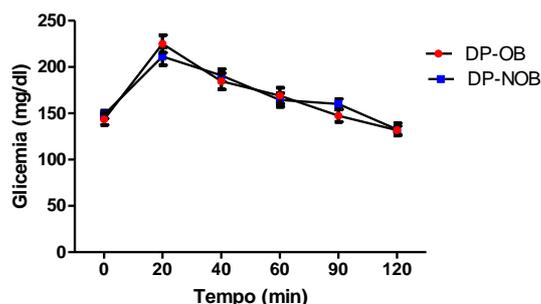
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
ANOVA de duas vias.
Não houve diferença significativa entre os grupos.
DP-OB: dieta padrão - grupo obesas
DP-NOB: dieta padrão - grupo não obesas.

Gráfico 27 – Teste de tolerância à insulina, fêmeas com dieta hiperlipídica



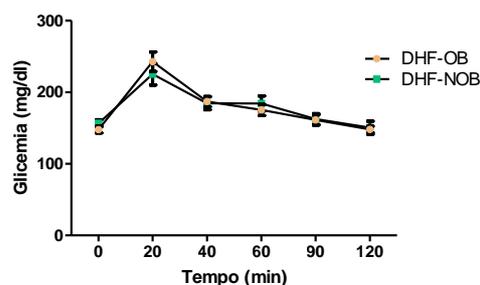
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
ANOVA de duas vias.
Não houve diferença significativa entre os grupos.
DHF-OB: dieta hiperlipídica - grupo obesas
DHF-NOB: dieta hiperlipídica - grupo não obesas.

Gráfico 28 – Teste de tolerância oral à glicose, fêmeas com dieta



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
ANOVA de duas vias.
Não houve diferença significativa entre os grupos.
DP-OB: dieta padrão - grupo obesas
DP-NOB: dieta padrão - grupo não obesas.

Gráfico 29 – Teste de tolerância oral à glicose, fêmeas com dieta

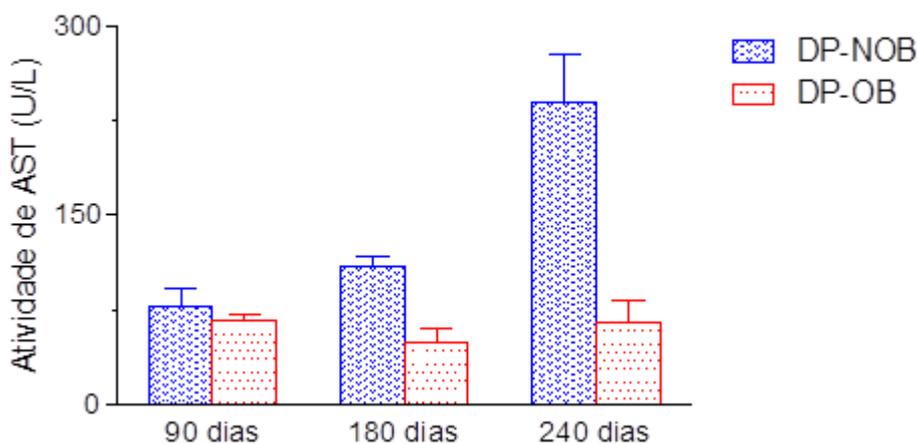


Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
ANOVA de duas vias.
Não houve diferença significativa entre os grupos.
DHF-OB: dieta hiperlipídica - grupo obesas
DHF-NOB: dieta hiperlipídica - grupo não obesas.

Quanto as dosagens bioquímicas, realizadas nos DPN 90, 180 e 240, não foram encontrados resultados significantes nos grupos DP-OB (Gráfico 30) e DHF-OB (Gráfico 31) para as dosagens de AST, assim como para as dosagens de colesterol, no grupo de dieta padrão (Gráfico 32) e no grupo de dieta hiperlipídica

(Gráfico 33). Nas dosagens de triglicérides, houve resposta significativa no DPN 180 para o grupo DP-OB (Gráfico 34) o que não ocorreu no grupo DHF-OB (Gráfico 35).

Gráfico 30 – Dosagens de Aspartato Amino Transferase (AST), fêmeas com dieta padrão



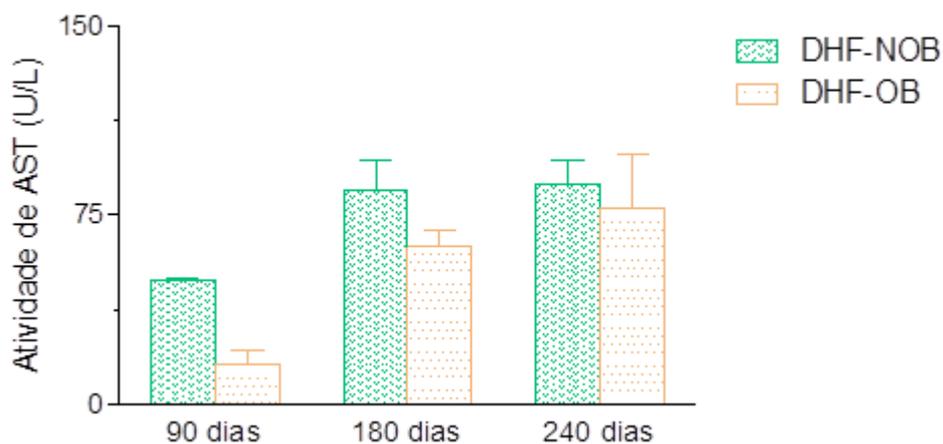
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.

/ $p < 0,05$, t Student.

DP-OB: dieta padrão - grupo obesas

DP-NOB: dieta padrão - grupo não obesas.

Gráfico 31 – Dosagens de Aspartato Amino Transferase (AST), fêmeas com dieta hiperlipídica



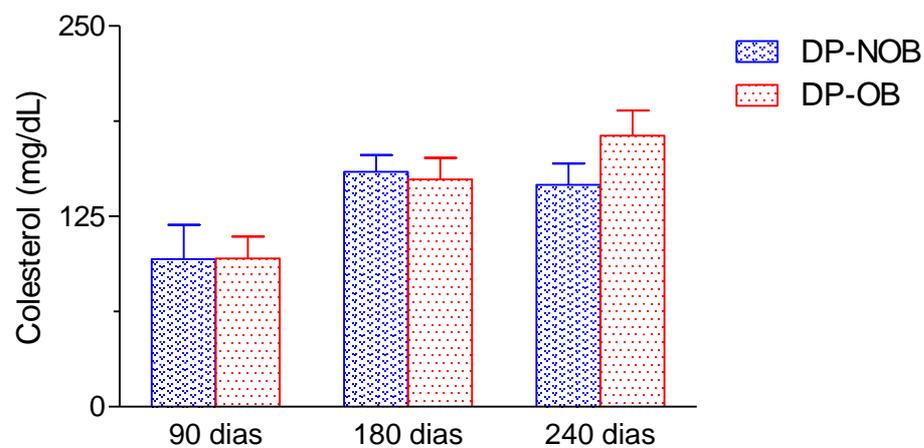
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.

* $p < 0,05$, t Student.

DHF-OB: dieta hiperlipídica - grupo obesas

DHF-NOB: dieta hiperlipídica - grupo não obesas.

Gráfico 32 – Dosagens de colesterol total, fêmeas com dieta padrão



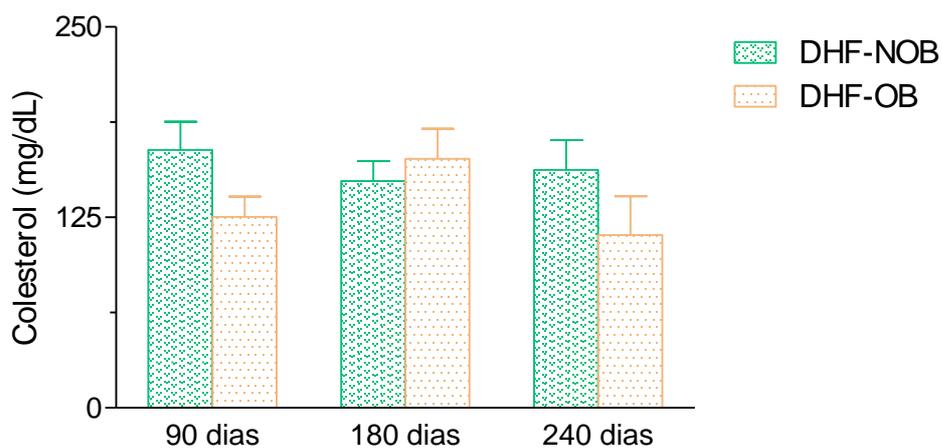
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
t Student.

Não houve diferença significativa entre os grupos.

DP-OB: dieta padrão - grupo obesas

DP-NOB: dieta padrão - grupo não obesas.

Gráfico 33 – Dosagens de colesterol total, fêmeas com dieta hiperlipídica



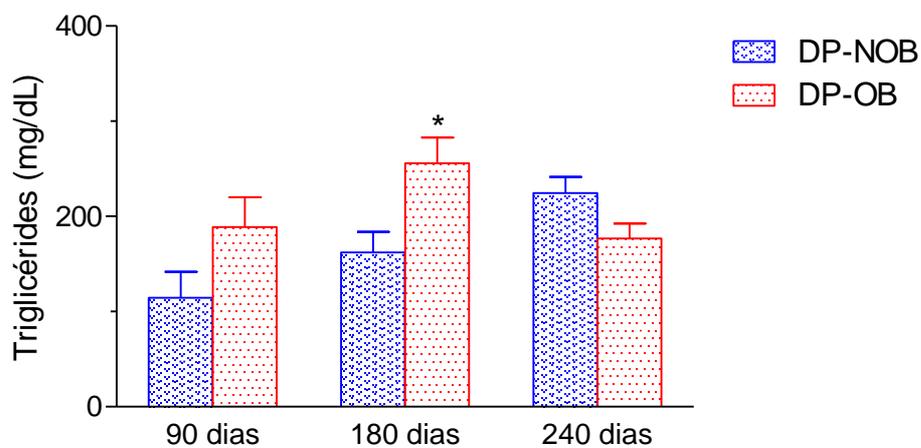
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
t Student.

Não houve diferença significativa entre os grupos.

DHF-OB: dieta hiperlipídica - grupo obesas

DHF-NOB: dieta hiperlipídica - grupo não obesas.

Gráfico 34 – Dosagens de triglicérides, fêmeas com dieta padrão



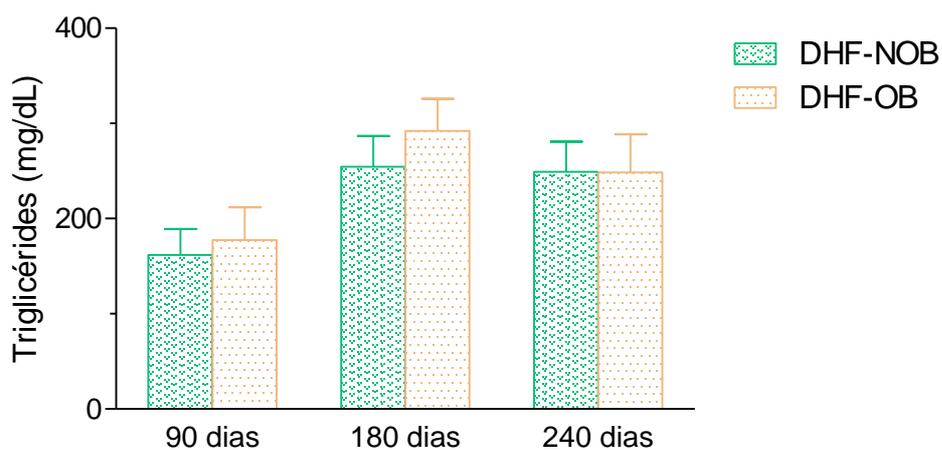
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.

* $p < 0,05$, t Student.

DP-OB: dieta padrão - grupo obesas

DP-NOB: dieta padrão - grupo não obesas.

Gráfico 35 – Dosagens de triglicérides, fêmeas com dieta hiperlipídica



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.

t Student.

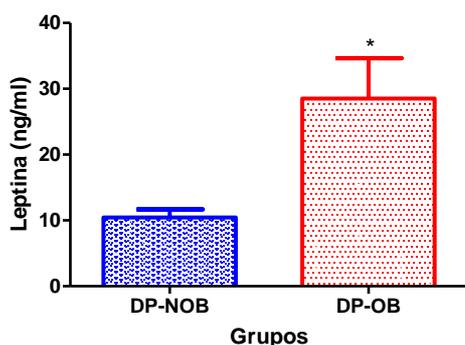
Não houve diferença significativa entre os grupos.

DHF-OB: dieta hiperlipídica - grupo obesas

DHF-NOB: dieta hiperlipídica - grupo não obesas.

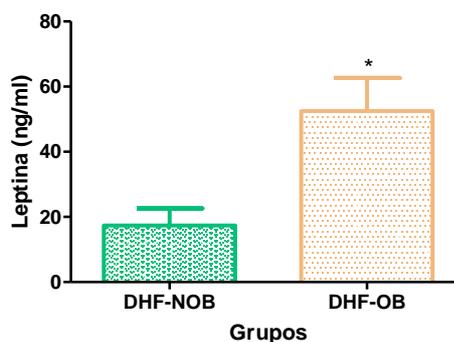
As dosagens hormonais de leptina foram significantes nos grupos DP-OB (Gráfico 36) e DHF-OB (Gráfico 37) e as dosagens de insulina foram significantes apenas no grupo DP-OB (Gráfico 38), não havendo diferença estatística entre os grupos de dieta hiperlipídica (Gráfico 39).

Gráfico 36 – Dosagens de leptina, fêmeas com dieta padrão



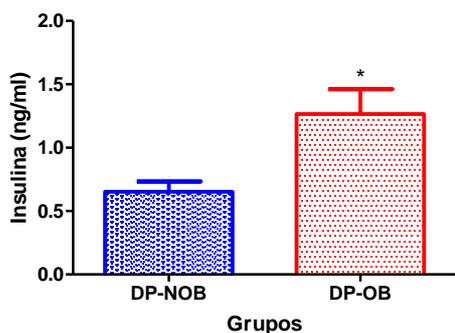
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
* $p < 0,05$, t Student.
DP-OB: dieta padrão - grupo obesas
DP-NOB: dieta padrão - grupo não obesas.

Gráfico 37 – Dosagens de leptina, fêmeas com dieta hiperlipídica



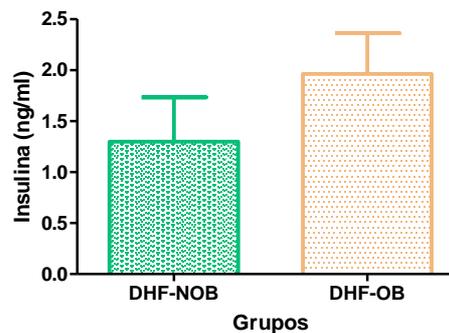
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
* $p < 0,05$, t Student.
DHF-OB: dieta hiperlipídica - grupo obesas
DHF-NOB: dieta hiperlipídica - grupo não obesas.

Gráfico 38 – Dosagens de insulina, fêmeas com dieta padrão



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
* $p < 0,05$, t Student.
DP-OB: dieta padrão - grupo obesas
DP-NOB: dieta padrão - grupo não obesas.

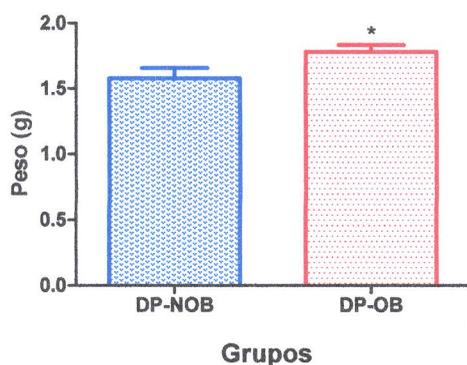
Gráfico 39 – Dosagens de insulina, fêmeas com dieta hiperlipídica



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
t Student.
Não houve diferença significativa entre os grupos.
DHF-OB: dieta hiperlipídica - grupo obesas
DHF-NOB: dieta hiperlipídica - grupo não obesas.

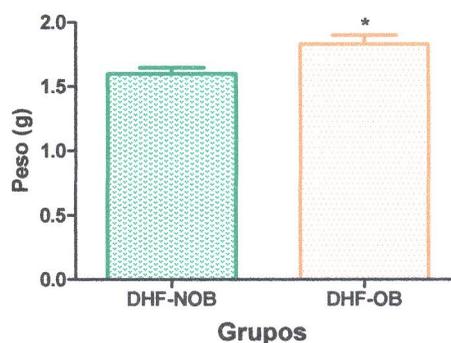
Nas pesagens dos órgãos coletados, foram encontrados resultados significantes para a maioria dos órgãos, fígado (Gráfico 40 e 41), gordura retroperitoneal (Gráfico 42 e 43), gordura gonadal (Gráfico 44 e 45) e rim direito com adrenal (Gráfico 46 e 47). Apenas o útero com os ovários (Gráfico 48 e 49) não apresentaram diferenças significantes, isto ocorreu com os animais de ambas dietas.

Gráfico 40 – Peso do fígado, fêmeas com dieta padrão



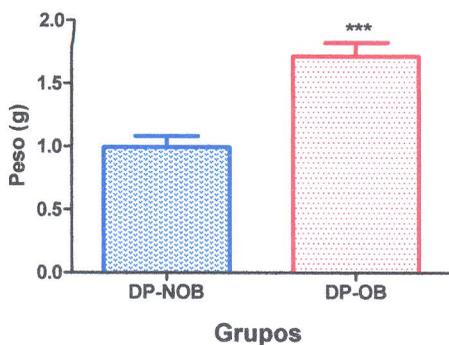
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
* $p < 0,05$, t Student.
DP-OB: dieta padrão - grupo obesas
DP-NOB: dieta padrão - grupo não obesas.

Gráfico 41 – Peso do fígado, fêmeas com dieta hiperlipídica



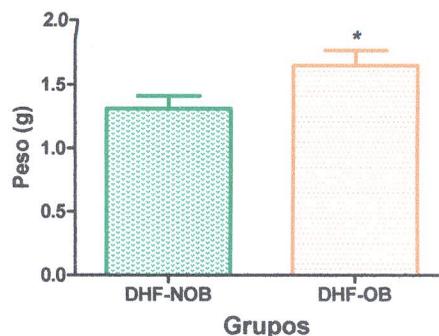
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
* $p < 0,05$, t Student.
DHF-OB: dieta hiperlipídica - grupo obesas
DHF-NOB: dieta hiperlipídica - grupo não obesas.

Gráfico 42 – Peso da gordura retroperitoneal, fêmeas com dieta padrão



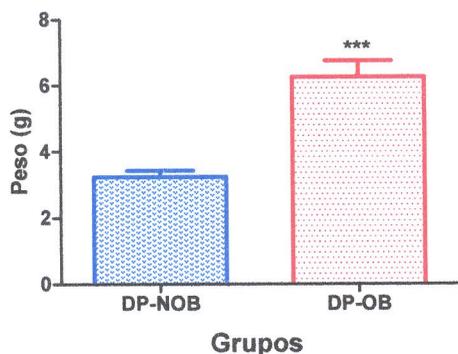
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
*** $p < 0,05$, t Student.
DP-OB: dieta padrão - grupo obesas
DP-NOB: dieta padrão - grupo não obesas.

Gráfico 43 – Peso da gordura retroperitoneal, fêmeas com dieta hiperlipídica



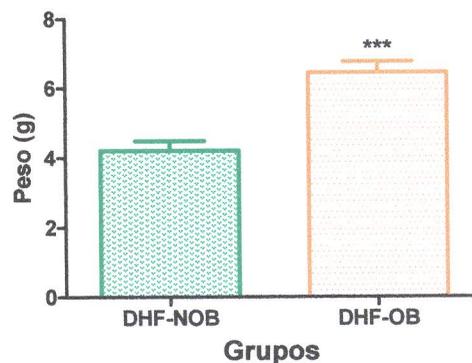
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
* $p < 0,05$, t Student.
DHF-OB: dieta hiperlipídica - grupo obesas
DHF-NOB: dieta hiperlipídica - grupo não obesas.

Gráfico 44 – Peso da gordura gonadal, fêmeas com dieta padrão



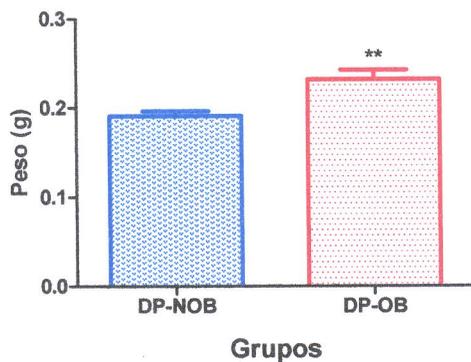
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
 *** $p < 0,05$, t Student.
 DP-OB: dieta padrão - grupo obesas
 DP-NOB: dieta padrão - grupo não obesas.

Gráfico 45 – Peso da gordura gonadal, fêmeas com dieta hiperlipídica



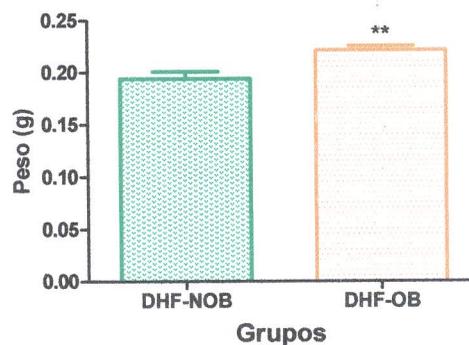
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
 *** $p < 0,05$, t Student.
 DHF-OB: dieta hiperlipídica - grupo obesas
 DHF-NOB: dieta hiperlipídica - grupo não obesas.

Gráfico 46 – Peso do rim direito com adrenal, fêmeas com



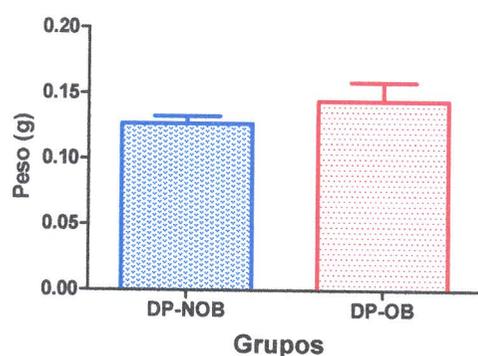
Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
 ** $p < 0,05$, t Student.
 DP-OB: dieta padrão - grupo obesas
 DP-NOB: dieta padrão - grupo não obesas.

Gráfico 47 – Peso do rim direito com adrenal, fêmeas com dieta hiperlipídica



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.
 ** $p < 0,05$, t Student.
 DHF-OB: dieta hiperlipídica - grupo obesas
 DHF-NOB: dieta hiperlipídica - grupo não obesas.

Gráfico 48 – Peso do útero com ovários, fêmeas com dieta padrão



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.

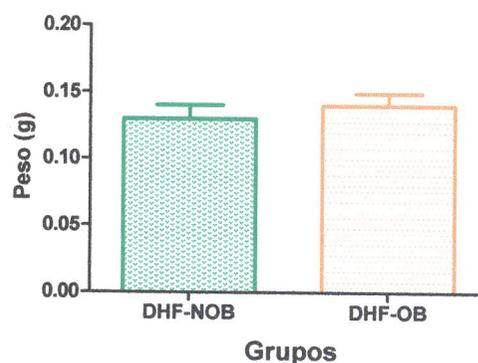
t Student.

Não houve diferença significativa entre os grupos.

DP-OB: dieta padrão - grupo obesas

DP-NOB: dieta padrão - grupo não obesas.

Gráfico 49 – Peso do útero com ovários, fêmeas com dieta hiperlipídica



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.

t Student.

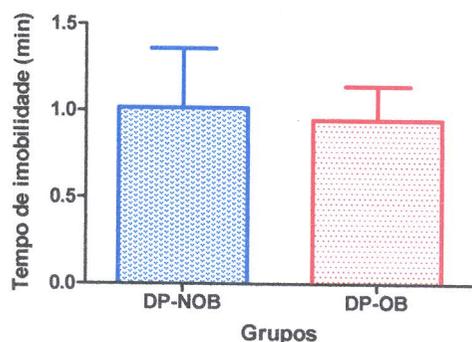
Não houve diferença significativa entre os grupos.

DHF-OB: dieta hiperlipídica - grupo obesas

DHF-NOB: dieta hiperlipídica - grupo não obesas.

No teste de suspensão pela cauda não foi encontrado diferença entre os grupos DP-OB e DP-NOB (Gráfico 50), nem nos grupos DFH-OB e DHF-NOB (Gráfico 51).

Gráfico 50 – Teste de suspensão pela cauda, fêmeas com dieta



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.

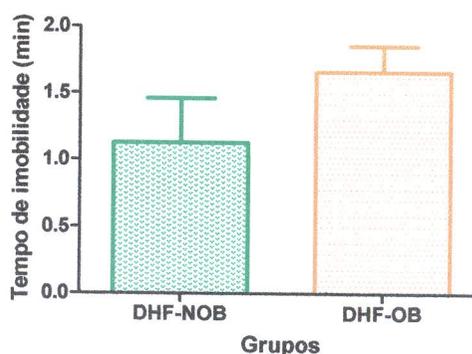
t Student.

Não houve diferença significativa entre os grupos.

DP-OB: dieta padrão - grupo obesas

DP-NOB: dieta padrão - grupo não obesas.

Gráfico 51 – Teste de suspensão pela cauda, fêmeas com dieta



Legenda: Valores expressos em média \pm erro padrão da média.

t Student.

Não houve diferença significativa entre os grupos.

DHF-OB: dieta hiperlipídica - grupo obesas

DHF-NOB: dieta hiperlipídica - grupo não obesas.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi possível verificar o aumento do ganho de peso corporal e o aumento da ingestão alimentar nos animais obesos, em ambos os experimentos. O ganho de peso significativo entre os grupos ocorreu independente da dieta. Esse fato sugere a ocorrência de obesidade espontânea e não induzida.

A partir da descoberta da leptina, hormônio ligado à saciedade, derivado do adipócito, o tecido adiposo tem sido cada vez mais reconhecido como um órgão endócrino (GIMENO; KLAMAN, 2005). O papel da leptina na prevenção do ganho de excesso de peso tem se mostrado fisiologicamente significativo (FRIEDMAN; HALAAS, 1998). A concentração plasmática de leptina está parcialmente relacionada ao tamanho da massa de tecido adiposo presente no corpo (ROMERO; ZANESCO, 2006), portanto, a função da leptina na patogênese da obesidade pode ser inferida pela mensuração da leptina plasmática e quando há aumento da leptina plasmática sugere-se que a obesidade é resultado da resistência à leptina (FRIEDMAN; HALAAS, 1998). Visto a relação direta da leptina com a obesidade, decidiu-se mensurá-la no presente estudo. A leptina apresentou-se em maior quantidade nos animais obesos em relação aos não obesos. Esse dado pode ser sugestivo da presença de resistência à leptina nesses animais.

Injeções periféricas ou intracerebroventriculares de leptina, reduzem o peso corporal e a massa gorda, por meio da inibição da ingestão alimentar e da diminuição do gasto energético em roedores (FRIEDMAN; HALAAS, 1998). Isso comprova que a ação da leptina está diretamente relacionada à ingestão alimentar e portanto à obesidade. Além disso, esses resultados sugerem que os animais deste estudo podem de fato ser considerados obesos.

Para se avaliar o grau de obesidade, costuma-se utilizar a expressão, índice de massa corpórea (IMC) igual ao peso (kg) do indivíduo dividido pela sua altura ao quadrado (m^2) (SIKARIS, 2004). Seria possível e mais preciso, realizar o IMC dos animais obesos a partir do seu comprimento e seu peso, mas não há valores de referência para isto.

Alguns trabalhos estudaram a influência da obesidade nos casos de depressão, como nos indivíduos obesos que sofrem preconceito da sociedade (SIKARIS, 2004). Há também estudos sobre a influência da depressão na

obesidade, como nos casos de pessoas com transtorno de compulsão alimentar (DE ZWAAN, 2001). Assim, a obesidade pode estar ligada a esta enfermidade. Por este motivo houve o interesse de se testar se havia algum comportamento semelhante à depressão, nos animais obesos. Para tal foi utilizado o TSC. Porém não houve diferença significativa entre os grupos neste estudo. Esse resultado não evidencia a influência de depressão no modelo aqui estudado.

Um crescente número de fatores derivados dos adipócitos tem sido descrito. Esses fatores contribuem para a patofisiologia da síndrome metabólica, a qual é caracterizada pela adiposidade, resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão e inflamação crônica (GIMENO; KLAMAN, 2005). Sabe-se que o consumo de dieta hiperlipídica, ou de alimentação em excesso, tanto em humanos quanto em roedores, causa alterações metabólicas que aumentam o risco de desenvolver outras doenças (NISWENDER; MAGNUSON, 2007). A ocorrência da síndrome metabólica aumenta com o envelhecimento (SBEM, 2015). No presente estudo viu-se que os animais, de um modo geral, apresentaram maior ingestão alimentar e maior ganho de peso, mas as alterações metabólicas só foram encontradas nos animais obesos mais velhos.

O diagnóstico da Síndrome Metabólica é dado quando três ou mais fatores de risco estiverem presentes: grande quantidade de gordura abdominal, baixo colesterol HDL, triglicérides elevado (nível de gordura no sangue), pressão sanguínea alta e glicose elevada (SBEM, 2015). Dentre as alterações que caracterizam a síndrome metabólica, algumas delas foram encontradas neste estudo, onde obteve-se resultados significantes nas dosagens de triglicérides (nos grupos de DP, em ambas as idades), TTOG sugerindo intolerância à glicose (no grupo de DP, nos animais mais velhos) e grande quantidade de gordura abdominal (em todos os grupos).

Em um estudo com animais obesos por indução de dieta hiperlipídica, foi encontrado TTOG significativo em relação ao grupo controle (BEZERRA et al., 2012). Isto ressalta a importância do presente estudo, pois esta mesma alteração foi encontrada, mas em animais espontaneamente obesos, sem a necessidade da indução desta enfermidade, o que sugere que estes animais realmente apresentam alterações típicas da síndrome metabólica. Seriam necessários estudos mais aprofundados a fim de averiguar os aspectos causais dos dados descritos neste trabalho.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi possível verificar aumento de peso e de ingesta nos animais obesos, em ambas as dietas. Os animais obesos apresentaram maior comprimento corporal e maior circunferência abdominal. Nos animais mais velhos, observou-se alterações quanto a intolerância à glicose, o que não foi visto nos animais mais jovens. Os animais obesos apresentaram órgãos com maior peso e taxas de triglicérides e leptina aumentadas. Nos mais jovens, este aumento também ocorreu nas taxas de insulina. Além disso, os animais que receberam dieta hiperlipídica como um desafio durante a peripuberdade, de modo geral, não mostraram evidências de obesidade precoce, conforme o esperado.

Portanto, os animais que apresentaram obesidade espontânea tiveram alterações metabólicas cujo padrão varia de acordo com a idade, o que faz pensar na possibilidade de ter ocorrido alguma alteração genética levando ao aparecimento desta sublinhagem.

Este estudo representa um ponto de partida para o desenvolvimento de futuras linhagens de uso potencial como modelos para obesidade e outras doenças metabólicas. Futuros estudos serão necessários para avaliar e caracterizar a ocorrência desse fenótipo observada nessa colônia.

REFERÊNCIAS

- ABESO - Associação Brasileira para o estudo da obesidade e da síndrome metabólica . **Mapa da obesidade**. Disponível em: <http://www.abeso.org.br/atitude-saudavel/mapa-obesidade>. Acesso em: 01 de Julho de 2015.
- AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 11, n. 8, p. 327–332, 2000.
- BEZERRA, R. M. N.; VEIGA, L. F.; CAETANO, A. C.; ROSALEN, P. L.; AMARAL, M. E. C.; PALANCH, A. C.; DE ALENCAR, S. M. Caffeic acid phenethyl ester reduces the activation of the nuclear factor kb pathway by high-fat diet-induced obesity in mice. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 61, n. 11, p. 1606–1614, 2012.
- BRANDÃO, A. P.; BRANDÃO, A. A.; NOGUEIRA, A. R.; SUPLICY, H.; GUIMARÃES, J. I.; OLIVEIRA, J. E. P. I Diretriz brasileira de diagnóstico e tratamento da síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, p. 3–28, 2005.
- BRUNING, J. C.; GAUTAM, D.; BURKS, D. J.; GILLETTE, J.; SCHUBERT, M.; ORBAN, P. C.; KLEIN, R.; KRONE, W.; MULLER-WIELAND, D.; KAHN, C. R. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. **Science**, v. 289, n. 5487, p. 2122–2125, 2000.
- CAO, Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 9, p. 2362–2368, 2007.
- CASTAGNÉ, V.; MOSER, P.; ROUX, S.; PORSOLT, R. D. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. **Current Protocols in Neuroscience**, n. 55, p. 1–14, 2011.
- COLEMAN, D. L.; EICHER, E. M. Fat (fat) and tubby (tub): two autosomal recessive mutations causing obesity syndromes in the mouse. **Journal of Heredity**, v. 81, n. 6, p. 424–427, 1990.
- COUTINHO, W. Etiologia da obesidade. **Abeso**, v. 7, n. 30, p. 1–14, 2007.
- DAMIANI, D.; DAMIANI, D. Tecido adiposo : depósito de gordura ou um complexo órgão endócrino ? **Pediatria Moderna**, v. 42, n. 2, p. 56–66, 2006.
- DE SOUZA, C. T.; FREDERICO, M. J. S.; DA LUZ, G.; CINTRA, D. E.; ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; VELLOSO, L. a. Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/HNF-4alpha pathway in insulin resistant mice. **The Journal of physiology**, v. 588, n. Pt 12, p. 2239–2253, 2010.
- DE ZWAAN, M. Binge eating disorder and obesity. **International Journal of Obesity**, v. 25, n. 1, p. S51–S55, 2001.

DEVITO, F. C.; PATRICIO, G. C. F.; RIZZO, M. F. C. I.; PACHECO, P. F.; FLÔR, P. B.; BRUNETTO, M. A.; CORTOPASSI, S. R. G. Anestesia e obesidade canina - revisão de literatura. **Clínica Veterinária**, v. 20, n. 117, p. 42–52, 2015.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, n. 6704, p. 763–770, 1998.

GERMAN, A. J. The growing problem of obesity in dogs and cats. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 7, p. 1940s–1946s, 2006.

GIMENO, R. E.; KLAMAN, L. D. Adipose tissue as an active endocrine organ: recent advances. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, n. 2, p. 122–128, 2005.

GOLDSCHMIDT, A. B.; CROSBY, R. D.; ENGEL, S. G.; CROW, S. J.; CAO, L.; PETERSON, C. B.; DURKIN, N. Affect and eating behavior in obese adults with and without elevated depression symptoms. **International Journal of Eating Disorders**, v. 47, n. 3, p. 281–286, 2014.

HALAAS, J. L.; GAJIWALA, K. S.; MAFFEI, M.; COHEN, S. L.; CHAIT, B. T.; RABINOWITZ, D.; LALLONE, R. L.; BURLEY, S. K.; FRIEDMAN, J. M. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. **Science (New York, N.Y.)**, v. 269, n. 5223, p. 543–546, 1995.

HONEK, J.; SEKI, T.; IWAMOTO, H.; FISCHER, C.; LI, J.; LIM, S.; SAMANI, N. J.; ZANG, J.; CAO, Y. Modulation of age-related insulin sensitivity by VEGF-dependent vascular plasticity in adipose tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 41, p. 14906–14911, 2014.

JOHNSON, P. R.; HIRSCH, J. Cellularity of adipose depots in six strains of genetically obese mice. **Journal of lipid research**, v. 13, n. 1, p. 2–11, 1972.

LERARIO, D. D. G.; GIMENO, S. G.; FRANCO, L. J.; IUNES, M.; FERREIRA, S. R. G. Excesso de peso e gordura abdominal para a síndrome metabólica em nipo-brasileiros. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 1, p. 4–11, 2002.

LIMA, F. B. Tecido adiposo: uma breve perspectiva histórica e o momento atual. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 927–928, 2008.

MCKERLIE, C. Cause and effect considerations in diagnostic pathology and pathology phenotyping of genetically engineered mice (GEM). **ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources**, v. 47, n. 2, p. 156–162, 2006.

NEGRÃO, A. B.; LICINIO, J. Leptina: o diálogo entre adipócitos e neurônios. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, n. 3, 2000.

NISWENDER, K. D.; MAGNUSON, M. A. Obesity and the β cell: lessons from leptin. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 10, p. 2753–2756, 2007.

OBICI, S.; CHOWDUEY, J.; CHOWDURY, R.; FENG, Z.; SIDDHANTA, U.; MORGAN, K.; ROSSETTI, L. Identification of a biochemical link between energy intake and energy expenditure. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 12, p. 1599–1605, 2002.

OMS - Organização Mundial de Saúde. **Temas de saúde - obesidade**. Disponível em: <http://www.who.int/topics/obesity/en/>. Acesso em: 18 de Dezembro de 2012.

OMS 2 - Organização Mundial de Saúde. **Obesidade e sobrepeso**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>

PEREIRA, L. O.; FRANCISCHI, R. P. De; LANCHETA JR., A. H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 2, p. 111–127, 2003.

PICCHI, M. G.; DE MATTOS, A. M.; BARBOSA, M. R.; DUARTE, C. P.; GANDINI, M. A.; PORTARI, G. V.; JORDAO, A. A. A high-fat diet as a model of fatty liver disease in rats. **Acta cirurgica brasileira**, v. 26, n. 2, p. 25–30, 2011.

RODRIGUIZ, R. M.; WILKINS, J. J.; CRESON, T. K.; BISWAS, R.; BEREZNIUK, I.; FRICKER, A. D.; FRICKER, L. D.; WETSEL, W. C. Emergence of anxiety-like behaviours in depressive-like Cpe(fat/fat) mice. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 7, p. 1623–34, 2013.

ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 85–91, 2006.

SBEM - Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. **A síndrome metabólica**. Disponível em: <http://www.endocrino.org.br/a-sindrome-metabolica/>. Acesso em: 01 de Julho de 2015.

SBEM 2 - Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. **Síndrome metabólica? O que é isso?** Disponível em: <http://www.endocrino.org.br/sindrome-metabolica/>. Acesso em: 01 de Julho de 2015.

SIKARIS, K. A. The clinical biochemistry of obesity. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 25, n. 3, p. 165–181, 2004.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367–370, 1985.

STICE, E.; FIGLEWICZ, D. P.; GOSNELL, B. A.; LEVINE, A. S.; PRATT, W. E. The contribution of brain reward circuits to the obesity epidemic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 9, p. 2047–2058, 2013.

VON DIEMEN, V.; TRINDADE, E. N.; TRINDADE, M. R. M. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta cirurgica brasileira**, v. 21, n. 6, p. 425–429, 2006.

WOODS, S. C.; LOTTER, E. C.; MCKAY, L. D.; PORTE, D. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. **Nature**, v. 282, n. 5738, p. 503–505, 1979.

ZECCHIN, H. .; CARVALHEIRA, J. B. .; SAAD, M. J. . Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 14, n. 4, p. 574–589, 2004.