UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Efeitos da variação do peso corporal e da suplementação
com L-leucina e L-fenilalanina na composição corporal e
em parâmetros metabólicos em ratos

José Donato Júnior

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo

2005

José Donato Júnior

Efeitos da variação do peso corporal e da suplementação com L-leucina e L-fenilalanina na composição corporal e em parâmetros metabólicos em ratos

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo
orientador/presidente

Prof. Dr. Antonio Herbert Lancha Junior
1º. examinador

Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno
2º. examinador

São Paulo, 28 de junho de 2005.

Dedico este trabalho à minha mãe,
Mafalda

Agradecimentos

Este trabalho é o resultado do esforço e colaboração de muitas pessoas.

Inicialmente gostaria de agradecer aos que de modo indireto ajudaram para a realização desse trabalho: Mônica, Tânia, Jorge, Elaine e Majô da secretária do departamento e da pós-graduação. À Lurdinha e à Joana. Ao pessoal do biotério: Silvânia, Flávia, as duas Renatas, Wagner, Eurídice, entre outros.

Aos gentis funcionários do B16 que permitiram a preparação das rações e do IPEN que nos ajudaram nas dosagens de radioimunoensaio. Agradeço também o apoio do técnico Robertinho, que foi extremamente útil no início da aprendizagem dos procedimentos cirúrgicos com os animais, e do Mauro da empresa Ajinomoto pela doação dos aminoácidos purificados.

Aos colegas de outros laboratórios, como companheiros dessa jornada.

Aos professores das disciplinas e aos professores que participaram da banca de qualificação e de defesa e também áqueles que gentilmente me ajudaram quando foi preciso. Um agradecimento especial à extraordinária professora Inar, sempre pronta para colaborar quando solicitada.

Às estagiárias Cláudia e Lia que me ajudaram em alguns momentos da parte experimental.

Devo muito a todos os amigos do nosso laboratório que foram verdadeiras fontes de conhecimento, ajuda e companheirismo, como Érica, Nelson, Maysa, Letícia, Michele, Vinicius, Renata, Luciana, Leandro, Mariana, Soraya e Aline. Não há como negar que devo um agradecimento especial a alguns companheiros do laboratório, entre eles o sempre enrolado Jonas (ou Madurão); à grande amiga Sandra, que além de tudo realizou a determinação da concentração de leptina sérica; ao Marcelo com toda sua gentileza, boa-

vontade, capacidade e conhecimento que o torna um verdadeiro modelo a ser seguido; e, especialmente, ao grande companheiro de discussões e trabalhos, Rogério. Espero que o destino permita que possamos trabalhar mais vezes em conjunto.

Sou muito grato ao André que ao compartilhar seu apartamento foi muito importante no período do meu mestrado.

O professor Julio tem meu profundo agradecimento pela grande oportunidade que me foi concedida e por todo o trabalho que conseguimos realizar até o momento e também aos que viermos a fazer no futuro.

A Ivanir não merece apenas um agradecimento; seria mais justo tê-la como co-autora do trabalho, pois essa foi sua importância e sem ela, obviamente, o resultado final seria aquém ao apresentado.

Finalmente, gostaria de agradecer a meus parentes e especialmente à minha mãe que, de modo indireto, foram muito importantes para a conclusão desse trabalho.

Embora esta lista seja extensa, peço-lhes desculpas aos que colaboraram, mas, por falha da minha memória, não foram aqui citados.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA.....	3
3. OBJETIVOS.....	4
3.1 Geral.....	4
3.2 Específicos	4
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
4.1 Variação do peso corporal (efeito sanfona)	5
4.1.1 Incidência e riscos à saúde	5
4.1.2 Estudos intervencionais em seres humanos	9
4.1.3 Estudos em animais	12
4.2 Implicações fisiológicas da rotina alimentar meal-feeding	20
4.3 Leucina e sua ação na regulação do processo de síntese protéica ...	23
4.4 Efeito dos aminoácidos na secreção de insulina	28
4.5 Papel da insulina na regulação do balanço energético	31
5. MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1 EXPERIMENTO I	37
5.1.1 Animais.....	37
5.1.2 Ração	38
5.1.3 Grupos experimentais	40
5.1.4 Desenho experimental.....	40
5.1.5 Manipulação dos animais e determinação do peso corporal e do consumo de ração	42
5.1.6 Sacrifício dos animais e coleta de sangue e tecidos	42
5.2 EXPERIMENTO II.....	44
5.2.1 Animais.....	45
5.2.2 Ração	45
5.2.3 Grupos experimentais	46
5.2.4 Desenho experimental.....	47
5.2.5 Manipulação e sacrifício dos animais	48

5.3	EXPERIMENTO III.....	49
5.3.1	Animais e ração.....	50
5.3.2	Grupos Experimentais.....	50
5.3.3	Procedimento de canulação.....	51
5.3.4	Determinação dos valores nos pontos da curva de secreção de insulina e da área sob a curva.....	58
5.4	Determinação da composição corporal.....	59
5.4.1	Umidade.....	59
5.4.2	Lipídeo.....	59
5.4.3	Proteína e massa magra.....	60
5.4.4	Cinzas.....	62
5.5	Parâmetros plasmáticos e séricos.....	62
5.5.1	Glicose.....	63
5.5.2	Triacilglicerol.....	63
5.5.3	Albumina.....	64
5.5.4	Proteína total sérica.....	64
5.5.5	Triiodotironina total.....	64
5.5.6	Tiroxina livre.....	65
5.5.7	Insulina.....	66
5.5.8	Leptina.....	66
5.6	Parâmetros teciduais.....	67
5.6.1	Glicogênio.....	67
5.6.2	Proteína tecidual.....	67
5.6.3	RNA total.....	68
5.6.4	DNA total.....	68
5.7	Índice de resistência à insulina (HOMA).....	68
5.8	Análise estatística.....	69
6.	RESULTADOS.....	70
6.1	EXPERIMENTO I.....	70
6.1.1	Conteúdo de proteína nas rações.....	70
6.1.2	Consumo de ração.....	70
6.1.3	Peso corporal e ganho de peso.....	72
6.1.4	Variação do peso corporal durante os ciclos.....	76
6.1.5	Coeficiente de eficiência metabólica.....	77

6.1.6	Composição corporal.....	79
6.1.7	Peso de tecidos e órgãos	84
6.1.8	Glicogênio	85
6.1.9	Proteína muscular (gastrocnêmio).....	88
6.1.10	Proteína hepática	89
6.1.11	Parâmetros plasmáticos e séricos.....	90
6.1.12	Triiodotironina total	91
6.1.13	Tiroxina livre	92
6.1.14	Insulina	93
6.1.15	Índice de resistência à insulina (HOMA).....	94
6.2	EXPERIMENTO II.....	95
6.2.1	Conteúdo de proteína nas rações	95
6.2.2	Peso corporal	95
6.2.3	Peso de tecidos e órgãos	97
6.2.4	Composição corporal.....	97
6.2.5	Concentração de albumina e proteína total no soro	100
6.2.6	Concentração de leptina sérica	101
6.2.7	Concentração de proteína, RNA e DNA tecidual.....	102
6.3	EXPERIMENTO III.....	102
6.3.1	Peso corporal, duração do jejum e horário da aplicação do anestésico.....	102
6.3.2	Intercorrências durante os procedimentos de canulação e de coleta das amostras de sangue	105
6.3.3	Cinética da concentração de insulina após administração intragástrica de ração	105
6.3.4	Área sob a curva da concentração de insulina	107
7.	DISCUSSÃO.....	109
8.	CONCLUSÕES.....	132
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
10.	ANEXOS	153

Lista de abreviações

Abreviação	Nome por extenso
4EBP1	proteína ligadora do fator de inicialização eucariótico 4E-1
AgRP	peptídeo relacionado a agouti
BCAA	aminoácidos de cadeia ramificada
BCKD	desidrogenase de alfa-ceto ácido de cadeia ramificada
eIF4E	fator de inicialização eucariótico 4E-1
EM	eficiência metabólica
LEU	L-leucina
mTOR	alvo de rapamicina de mamíferos
NPY	neuropeptídeo Y
PHE	L-fenilalanina
PM	programa multidisciplinar
POMC	pró-opiomelanocortina
S6K1	proteína ribossomal S6 quinase-1 de 70 Kda
SNC	sistema nervoso central
VPC	variação do peso corporal

1. INTRODUÇÃO

“Efeito sanfona” ou “efeito iô-iô” são termos coloquialmente empregados para caracterizar a situação, pela qual muitos indivíduos são acometidos, quando engordam e emagrecem, diversas vezes. O “efeito sanfona” se caracteriza por um estado metabólico que predispõe o indivíduo a engordar e torna mais difíceis tentativas voluntárias de emagrecimento. Além disso, sugere-se que a rotina de variação do peso corporal (VPC) é capaz de alterar a composição corporal, favorecendo o acúmulo de gordura, além de representar um fator de risco à saúde. As adaptações decorrentes do efeito sanfona são consequência, principalmente, do aumento da eficiência metabólica (EM), ou seja, dado uma mesma ingestão calórica, o organismo armazena mais energia (gordura). Entretanto, ainda não há consenso na literatura científica sobre os efeitos da VPC na saúde e na EM.

A propensão a engordar, após um período de emagrecimento, é o resultado de adaptações que ocorrem no organismo quando o mesmo “percebe” que a ingestão calórica é insuficiente para suprir a demanda energética (LEIBEL, ROSENBAUM & HIRSCH, 1995; DONATO, PEDROSA & TIRAPGUI, 2004). Como resposta, por exemplo, a uma dieta de restrição alimentar, o organismo reduz o gasto de energia pela diminuição da taxa metabólica basal, da atividade física voluntária e pela inibição de funções do organismo que demandam energia, como o sistema imunológico, o anabolismo protéico, o sistema reprodutivo e determinados eixos endócrinos (CHAN *et al.*, 2003). Todas essas adaptações reduzem as chances de sucesso de uma restrição alimentar voluntária, tanto para emagrecer quanto para manter o peso corporal reduzido. Nesse sentido, a rotina de VPC, teoricamente, induz um ciclo vicioso em que, ao se tentar emagrecer, o organismo, em resposta, aumenta a EM, por meio da diminuição de funções que demandam energia, predispondo o indivíduo a recuperar o peso perdido; depois de recuperar o peso, esse indivíduo, que já está com o organismo “mais eficiente”, tenta novamente emagrecer e assim por diante. Depois de diversos períodos de emagrece e engorda, o organismo pode estar “altamente eficiente”, tornando

tentativas futuras de perder peso difíceis de serem conseguidas e com grande propensão para engordar.

No contexto dos tratamentos para a obesidade, determinadas vias bioquímicas e hormonais, chamadas de sensores nutricionais, são essenciais, pois informam às células ou a todo o organismo, respectivamente, a respeito do estado nutricional, mais especificamente sobre o balanço energético do indivíduo e, dessa maneira, desencadeiam as adaptações observadas em períodos de restrição de energia.

A leucina (LEU) é proposta como um sensor nutricional, pois sua disponibilidade estimula a síntese protéica, principalmente ao ativar o processo de tradução (YOSHIZAWA, 2004). Além disso, a LEU aumenta a quantidade de proteínas ribossomais e fatores de alongação, resultando em maior capacidade de síntese protéica celular (ANTHONY *et al.*, 2001). Já a insulina, cuja função principal é a regulação do metabolismo dos carboidratos, tem sua liberação controlada pela presença de certos nutrientes. A LEU e a fenilalanina (PHE) são secretagogos de insulina que, em conjunto com glicose, atuam de maneira sinérgica amplificando a secreção desse hormônio (VAN LOON *et al.*, 2000a; ZAWALICH *et al.*, 2004). Alguns trabalhos recentes ressaltam o papel da insulina, em conjunto com a leptina, na regulação do peso corporal e no metabolismo energético, ao transmitir, dos tecidos periféricos ao sistema nervoso central (SNC), informações referentes ao estado nutricional e balanço energético do organismo (NISWENDER, BASKIN & SCHWARTZ, 2004; STOCKHORST *et al.*, 2004). Além disso, diversos experimentos demonstram uma ação permissiva ou complementar do aumento na concentração de insulina nos efeitos anabólicos provocados pela administração aguda de LEU (PATTI *et al.*, 1998; O'CONNOR *et al.*, 2003).

Diante disso, o presente trabalho testou a hipótese de que a suplementação com LEU / PHE, ao agir em algumas vias metabólicas e hormonais tidas como sensores nutricionais do organismo, poderia amenizar os efeitos negativos observados na composição corporal e na EM, desencadeados por situações envolvidas com restrição alimentar, especialmente a rotina de VPC, que foi utilizada como um modelo que supostamente provoca profundas mudanças nas variáveis analisadas.

2. JUSTIFICATIVA

Dado o seguinte contexto: 1) a obesidade ou o excesso de peso é uma epidemia global (WHO, 2000); 2) muitas pessoas desejam emagrecer e de fato o tentam, seja por questões de bem-estar e saúde ou de estética (SERDULA *et al.*, 1999; NAVIA *et al.*, 2003); 3) os tratamentos mais usualmente empregados, como intervenções dietéticas, apresentam baixa taxa de adesão e, conseqüentemente, de sucesso a longo prazo (AYYAD & ANDERSEN, 2000). Nesse sentido, é de se esperar que os indivíduos que já tentaram emagrecer (que são muitos) e não conseguiram ou não foram capazes de manter o peso corporal estável após o emagrecimento (a grande maioria) venham a tentar perder peso novamente. Estudos epidemiológicos que buscaram estimar a proporção de pessoas que tentam emagrecer constantemente verificaram que essa situação é corriqueira e muitos sujeitos acabam se tornando adeptos rotineiros dos ciclos de emagrece e engorda (BENDIXEN *et al.*, 2002; FIELD *et al.*, 2003; FIELD *et al.*, 2004b). Dessa maneira, a rotina de VPC é prática comum, ressaltando sua importância clínica. Além disso, suas conseqüências no metabolismo e na saúde ainda não foram totalmente esclarecidas (JEFFERY, 1996; WILLIAMSON, 1996). Assim, é fundamental o estudo das conseqüências, no metabolismo e na composição corporal, desencadeadas por situações de balanço energético negativo, nesse caso, a rotina de VPC.

Apesar da grande importância atribuída aos efeitos da rotina de VPC, poucos foram os estudos que investigaram possíveis estratégias nutricionais que atenuem suas adaptações. Diante de evidências demonstrando que alguns aminoácidos são capazes de regular o metabolismo corporal, influenciando direta e indiretamente o ganho de peso e a composição corporal, o presente estudo examinou o efeito da suplementação com LEU e PHE em situações envolvidas com restrição alimentar, especialmente a VPC.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar os efeitos da suplementação crônica com LEU / PHE na EM, na composição corporal e em alguns parâmetros metabólicos em ratos durante duas condições que afetam de forma distinta a homeostase do peso corporal: a rotina de VPC e a restrição alimentar crônica.

3.2 Específicos

Experimento I:

Desenvolver um desenho experimental, baseado na rotina de VPC (períodos intercalados de perda e ganho de peso), para o estudo da EM em ratos. Avaliar os efeitos da suplementação crônica com LEU e PHE em alguns parâmetros metabólicos, na composição corporal e na EM de ratos sujeitos a 3 ciclos de VPC.

Experimento II:

Avaliar o efeito da suplementação crônica com LEU na composição corporal e no estado nutricional protéico em ratos submetidos à restrição alimentar de 50% durante 6 semanas.

Experimento III:

Avaliar a capacidade dos aminoácidos LEU e PHE, adicionados à dieta, de aumentar agudamente a secreção de insulina, em resposta à administração intragástrica de ração, em ratos anestesiados submetidos a diferentes períodos de jejum (4 ou 18 horas).

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Variação do peso corporal (efeito sanfona)

4.1.1 Incidência e riscos à saúde

Uma das principais justificativas para o estudo dos efeitos da constante VPC é a enorme prevalência de indivíduos tentando perder peso ou preocupados em mantê-lo estável. Com o aumento da incidência de obesidade em praticamente todo o mundo (STEIN & COLDITZ, 2004), espera-se que mais pessoas tentem perder peso e que essa prática se repita diversas vezes para o mesmo indivíduo, pois as chances de sucesso a longo prazo de tentativas de emagrecimento são estimadas em apenas 15%, quando emprega-se intervenções dietéticas, a estratégia mais comumente utilizada (AYYAD & ANDERSEN, 2000).

SERDULA *et al.* (1999) em uma amostra de 107.804 adultos norte-americanos verificaram que 28,8% e 35,1% dos homens e 43,6% e 34,4% das mulheres estavam tentando emagrecer ou preocupados em manter o peso estável, respectivamente, quando foram entrevistados. Em um estudo prospectivo com duração mínima de 2 anos em pré-adolescentes e adolescentes, FIELD *et al.* (2003) observaram que 25% das meninas e 13,8% dos meninos fizeram algum tipo de dieta para emagrecer. Já 4,5% das meninas e 2,2% dos meninos foram classificados como adeptos freqüentes de dietas. A partir dos dados do estudo chamado *Nurses' Health Study II*, cuja amostragem consistiu de 46.634 mulheres jovens e de meia-idade, foi observado que 1,6% podiam ser classificadas como indivíduos que variavam de peso constantemente (variar mais de 9 kg do peso corporal, pelo menos 3 vezes no período entre 1989 e 1993) e outras 20% variavam de peso com menos freqüência (variar menos de 4,5 kg do peso corporal, pelo menos 3 vezes entre 1989 e 1993) (FIELD *et al.*, 2004b), indicando alta incidência de mulheres que se submetem a seguidos períodos de emagrecimento e recuperação do peso

corporal. BENDIXEN *et al.* (2002) conduziram entrevistas entre 1992 e 1998 em uma população de 1.200 indivíduos na Dinamarca. Nesse período, 61% das mulheres e 32% dos homens tentaram, ao menos uma vez, perder peso.

Os dados apresentados não deixam dúvida quanto à alta incidência de pessoas tentando perder peso. Nesse sentido, muitos autores (PRENTICE *et al.*, 1992; HILL, 2004; LOWE & TIMKO, 2004) levantaram a seguinte questão: será que o fato de tentar emagrecer não predispõe o organismo a engordar? Dessa forma, ao passar por períodos de restrição calórica, um indivíduo estaria sujeito a diversas adaptações em seu organismo, tornando-o metabolicamente mais eficiente, e, assim, gerando tendência para engordar (PRENTICE *et al.*, 1992).

Essa questão, inicialmente proposta em 1983 por CANNON & EINZIG, é extremamente relevante no aspecto clínico do tratamento da obesidade, pois abre o questionamento se a prática indiscriminada de estratégias que visam a redução ponderal deve ser incentivada. Obviamente, o excesso de gordura corporal é reconhecidamente prejudicial à saúde (KOPELMAN, 2000) e a redução ponderal reduz os problemas à saúde e os fatores de risco associados a essa condição (VAN GAAL, WAUTERS & DE LEEUW, 1997). Entretanto, pode ser questionado se a população em geral deve se engajar em toda e qualquer tentativa de emagrecimento, mesmo sabendo que a grande maioria delas resultará em fracasso. Em nenhum momento pretende-se deixar de incentivar qualquer pessoa que esteja acima do peso de tentar emagrecer, mas para que o faça de maneira responsável, dedicando especial atenção na fase de manutenção do peso após o emagrecimento, para evitar recuperação do mesmo. Isso deve ser levado em conta, pois, como será exposto a seguir, diversos estudos demonstram uma relação entre a prática constante de emagrecimento e diversos problemas e riscos à saúde, além de uma predisposição a possuir mais peso e gordura corporal, e, finalmente, a uma propensão a engordar.

No intuito de verificar se o histórico de diversos episódios de VPC aumenta as chances de engordar, KROKE *et al.* (2002) estudaram 18.001 adultos durante 2 anos. Os pesquisadores verificaram que o histórico de VPC foi significativamente associado ao ganho de peso nos 2 anos subseqüentes de acompanhamento, tanto para homens quanto para mulheres (4,8 e 3,0 vezes

mais risco de ganho de peso, respectivamente, para homens e mulheres). Além disso, as mulheres que haviam perdido peso recentemente tinham 4,8 vezes mais probabilidade de engordar. RÖSSNER (1992) estudou a associação entre a incidência de ciclos de VPC intencional ou o número de gestações e o ganho de peso em mulheres obesas. Foi observado que o ganho de peso em cada gestação (episódios naturais de VPC) contribuiu substancialmente no ganho de peso para a condição de obesidade.

Em contrapartida a esses estudos, HEITMANN & GARBY (2002), verificaram em um estudo longitudinal que períodos de perda de peso ou VPC não aumenta o percentual de gordura corporal, nem é capaz de reduzir a massa magra. Os autores observaram que o tecido (gordura ou massa magra) que era perdido durante um episódio de emagrecimento, era readquirido na mesma proporção, quando ocorria a recuperação de peso. Esse fato não se alterava, mesmo após diversos episódios de VPC. Entretanto, RODIN *et al.* (1990) observaram que indivíduos que variavam de peso regularmente apresentavam aumento significativo na relação entre a circunferência da cintura e do quadril, indicando maior distribuição de gordura abdominal e, conseqüentemente, maior risco de doenças cardiovasculares. A quantidade de gestações também foi independente e significativamente associada à maior relação entre a circunferência da cintura e do quadril. Esses resultados foram confirmados por WALLNER *et al.* (2004) que encontraram maior acúmulo de gordura visceral (padrão andróide de distribuição da gordura corporal) em mulheres engajadas regularmente em ciclos de VPC. BENINI *et al.* (2001) também verificaram que obesos que variam de peso regularmente apresentam uma maior porcentagem de gordura corporal.

A partir das evidências apresentadas por alguns artigos, que associam a VPC ao maior peso e/ou gordura corporal e, possivelmente, à distribuição de gordura predominantemente central (visceral), não é surpresa que diversos estudos epidemiológicos (HAMM, SHEKELLE & STAMLER, 1989; LISSNER *et al.*, 1991; BLAIR *et al.*, 1993; IRIBARREN *et al.*, 1995; FOLSOM *et al.*, 1996), mas nem todos (LISSNER *et al.*, 1990; STEVEN & LISSNER, 1990; JEFFERY, WING & FRENCH, 1992; NATIONAL TASK FORCE ON THE PREVENTION AND TREATMENT OF OBESITY, 1994; WING, JEFFERY & HELLERSTEDT,

1995; HANSON *et al.*, 1995; PETERSMARCK *et al.*, 1999), associem a VPC a um maior risco de doenças cardiovasculares e mortalidade.

GRACI *et al.* (2004) examinaram em 459 obesos a relação entre VPC e fatores de risco cardiovascular. Os autores concluíram que a VPC não é um fator independente de risco, mas pode aumentar a incidência de doenças cardiovasculares ao atuar indiretamente, uma vez que a VPC foi associada ao acúmulo de gordura ao longo dos anos. Em outro estudo, não foi observada correlação entre a VPC e determinados fatores de risco para doenças cardiovasculares, como colesterol total, lipoproteínas de alta densidade (HDL), a razão entre colesterol total e HDL e pressão arterial diastólica (PETERSMARCK *et al.*, 1999). Segundo os pesquisadores, o aumento da mortalidade em indivíduos que variam de peso regularmente provavelmente não é atribuído aos fatores de risco para doenças cardiovasculares. REBUFFÉ-SCRIBE *et al.* (1994) também não encontraram associação entre fatores de risco de doenças crônicas não transmissíveis em indivíduos que variavam de peso constantemente. Contudo, observou-se relação entre a VPC e o aumento da deposição de gordura no tecido subcutâneo abdominal.

Dois estudos procuraram estudar a relação entre VPC e intolerância a glicose e risco de desenvolvimento do diabetes *mellitus* do tipo 2. PODAR *et al.* (1996) não encontraram evidências de que indivíduos engajados regularmente em ciclos de VPC apresentam maior risco de intolerância a glicose. Esses resultados foram reforçados por FIELD *et al.* (2004a) que, ao analisar 46.634 mulheres participantes do *Nurses' Health Study II*, não encontraram relação independente entre VPC e risco para o desenvolvimento de diabetes do tipo 2. Entretanto, a constante VPC foi fortemente associada ao Índice de Massa Corporal (IMC), esse, por sua vez, teve uma grande correlação com a progressão do diabetes. Nesse sentido, a VPC pode favorecer à obesidade e, indiretamente, aumentar a incidência de fatores de risco para as doenças cardiovasculares.

Já GUAGNANO *et al.* (2000) encontraram correlação diretamente proporcional entre VPC e risco de hipertensão arterial, quando o padrão de obesidade visceral está presente. SHADE *et al.* (2004) observaram relação entre VPC e redução da função do sistema imunológico. Os autores testaram a hipótese de que indivíduos que variavam constante e intencionalmente de peso

apresentavam menor atividade das células NK (*natural killer*). Essa hipótese se confirmou, indicando que a VPC pode ter consequências negativas a longo prazo na eficiência do sistema imunológico (SHADE *et al.*, 2004; NEBELING *et al.*, 2004).

Assim, como um resumo geral a respeito das evidências que associam a rotina de VPC com o risco de diversos tipos de doenças crônicas não transmissíveis, muitos estudos, controlados ou observacionais, apontam para a constante VPC como um possível fator de risco para a saúde, aumentando inclusive a mortalidade (MULS *et al.*, 1995; JEFFERY, 1996). Entretanto, diversos experimentos epidemiológicos que encontraram essa associação não diferenciaram entre a redução ponderal intencional e a não-intencional (WILLIAMSON, 1996). A última pode estar relacionada a doenças que fazem com que o indivíduo emagreça e, indiretamente, aumentem a mortalidade. Essa variável pode induzir a conclusões equivocadas que relacionam a constante VPC a fatores de risco à saúde (JEFFERY, WING & FRENCH, 1992). Dada a controvérsia, praticamente nenhum trabalho recomenda que indivíduos obesos deixem de tentar emagrecer, mesmo após tentativas passadas de emagrecimento que não foram bem sucedidas (NATIONAL TASK FORCE ON THE PREVENTION AND TREATMENT OF OBESITY, 1994).

4.1.2 Estudos intervencionais em seres humanos

Poucos estudos verificaram diretamente em seres humanos o efeito da rotina de VPC no metabolismo e na composição corporal. Além disso, todos esses trabalhos apresentam pontos fracos, como a falta de grupo controle ou de rigor com que os indivíduos foram submetidos durante os períodos de restrição alimentar.

BLACKBURN *et al.* (1989), a partir de uma amostragem com mais de 1.000 obesos que foram recrutados para um programa multidisciplinar (PM) de redução ponderal entre 1973 e 1982, selecionaram indivíduos que se submeteram ao menos duas vezes no mesmo PM. Os pacientes escolhidos foram classificados em aqueles que participaram de um PM de acompanhamento (n = 43) ou em um PM que mantinha o indivíduo internado (n

= 14), para garantir maior controle. No período entre as duas participações nos PM, os indivíduos recuperaram 120 e 115% do peso corporal perdido no primeiro PM, para os grupos de acompanhamento e de internação, respectivamente. Os pesquisadores avaliaram se a taxa de redução de peso foi diferente entre um PM e outro. Os dados foram devidamente padronizados e os tratamentos entre as duas participações foram iguais. Para os participantes do PM de acompanhamento, os autores verificaram que houve redução significativa na taxa de perda de peso entre o primeiro e o segundo ciclo (0,19 e 0,15 kg/dia de redução ponderal, respectivamente, para o 1° e 2° ciclos). O mesmo ocorreu para os participantes do PM de internação, sendo que no 1° ciclo os indivíduos perderam 0,47 kg/dia, contra 0,37 kg/dia no 2° ciclo ($P < 0,05$). Os autores concluíram que a VPC pode aumentar a EM, tornando tentativas futuras de emagrecimento mais difíceis.

JEBB *et al.* (1991) estudaram o efeito de 3 ciclos de VPC, cada um com duração de 2 semanas de perda de peso (ingestão de ~ 450 kcal/dia), intercalados por 4 semanas de consumo *ad libitum*, em 11 mulheres obesas. A redução ponderal nos 3 ciclos foi de 4,44, 3,29 e 2,98 kg e a redução na taxa metabólica basal foi de 130, 68 e 68 kcal, respectivamente, para cada ciclo. A massa magra foi reduzida apenas no 1° ciclo e voltou ao normal depois da fase de recuperação de peso. O mesmo ocorreu com a taxa metabólica basal, que terminou inalterada ao final do último ciclo. Os autores concluíram que não encontraram evidências de que a rotina de VPC promove alterações negativas na taxa metabólica basal ou na composição corporal. Entretanto, os próprios autores argumentam que a adesão à dieta foi reduzida no decorrer dos ciclos.

VAN DALE & SARIS (1989) estudaram um grupo de obesas que vinham de seguidos episódios de VPC e um outro grupo de obesas, cujo peso corporal estava há muito tempo inalterado. Durante um tratamento com restrição alimentar (840 kcal/dia) e exercício físico aeróbico, ambos os grupos apresentaram a mesma redução de peso, de gordura corporal e da taxa metabólica de repouso. MELBY, SCHMIDT & CORRIGAN (1990), ao estudar jovens lutadores de luta livre, que costumam sofrer grandes variações no peso corporal anualmente, não observaram evidências que essa rotina reduz a taxa metabólica basal desses indivíduos. Esses resultados foram confirmados pelos mesmos pesquisadores em outro estudo (SCHMIDT, CORRIGAN & MELBY,

1993), não encontrando relação entre a VPC e o aumento da EM. Nesses 3 experimentos, a população estudada praticava exercício físico e existem evidências que essa estratégia pode minimizar os efeitos da rotina de VPC na composição corporal e na EM (SARIS, 1989; WAINWRIGHT *et al.*, 1991; GERARDO-GETTENS *et al.*, 1991; LIM *et al.*, 1996).

KAJIOKA *et al.* (2002) estudaram o efeito de dois períodos de restrição alimentar, com duração de 30 dias cada, intercalados por um período de reganho de peso entre os ciclos (duração de 14 dias), e, finalmente, de um período de acompanhamento posterior, em 5 mulheres jovens, saudáveis e com IMC médio igual a 20,5 kg/m². Durante as fases de restrição alimentar, os indivíduos perderam mais de 4 kg. No período entre as perdas de peso, as mulheres recuperaram todo o peso perdido no 1º ciclo. O mesmo aconteceu no período posterior de acompanhamento. Os autores, comparando o início do experimento (*baseline*) com o final do período de acompanhamento (180 dias do *baseline*), observaram redução significativa na massa magra, na concentração sérica de triiodotironina e tiroxina total e de redução na taxa metabólica de repouso. Além disso, os indivíduos apresentaram aumento significativo da pressão arterial sistólica e diastólica, bem como da concentração de triacilglicerol na circulação. Os autores concluíram que a VPC pode ter implicações negativas na saúde e no metabolismo, em mulheres magras e jovens.

Concluindo, há indícios clínicos e epidemiológicos, que relacionam a rotina de VPC com o aumento da mortalidade e de fatores de risco para diversas doenças crônicas não transmissíveis. Além disso, alguns estudos, porém nem todos, observaram associação entre VPC e aumento do peso ou da gordura corporal, além de apontar a VPC como um fator que predispõe os indivíduos a engordar ou a recuperar o peso perdido, após períodos de redução ponderal. No entanto, como ainda há muita controvérsia entre os estudos, não é possível fazer afirmações seguras a respeito dos efeitos da VPC em seres humanos.

4.1.3 Estudos em animais

A rotina de VPC vem sendo continuamente estudada em animais de experimentação, pois o emprego de ratos e camundongos é considerado um bom modelo experimental na área de metabolismo energético (THIBAUT, WOODS & WESTERTERP-PLANTENGA, 2004), uma vez que a realização desse tipo de experimento em humanos, com o rigor necessário, é muitas vezes inviável e antiético. No entanto, devem-se considerar algumas diferenças importantes na regulação do peso corporal entre roedores e seres humanos, tais como, roedores ganham peso de forma contínua ao longo da vida, ao passo que seres humanos tendem a estabilizar o peso corporal na fase adulta; ratos e camundongos possuem mecanismos de ajuste do peso corporal mais sensíveis e eficazes, pois, em geral, são mais resistentes ao ganho de peso, induzido por dietas hipercalóricas e reagem de forma mais intensa a períodos de balanço energético negativo, comparados aos seres humanos (THIBAUT, WOODS & WESTERTERP-PLANTENGA, 2004).

Um dos primeiros estudos sobre VPC foi realizado por SZEPESI & EPSTEIN (1977), nos quais os autores estudaram o efeito de repetidos ciclos de perda e recuperação de peso no ritmo de crescimento e no peso de ratos Wistar. Os autores observaram que a rotina de VPC aumentou o percentual de gordura corporal dos animais, mas esse efeito diminuiu com o avanço da idade. Além disso, os efeitos da VPC são decorrentes, segundo os pesquisadores, de um processo de compensação, que ocorre quando os animais recebem dieta *ad libitum*, implicando em um período de grande consumo de ração e, conseqüentemente, em ganho de peso corporal acelerado.

Posteriormente, muitos outros autores também se interessaram em estudar o possível efeito da rotina de VPC no peso, na composição corporal, na EM e na atividade de enzimas relacionadas com o metabolismo de lipídeos. Um aspecto bastante interessante ao analisar esses trabalhos é a enorme variedade de desenhos experimentais, linhagens de animais e determinações empregadas. Em relação ao desenho experimental, o parâmetro mais heterogêneo entre os estudos, houve aqueles que empregaram de 1 a 21 ciclos de VPC; a duração de cada ciclo variou de 1 dia até alguns meses; o tipo

de ração empregada foi, em alguns casos, de alta densidade energética (para gerar obesidade induzida pela dieta ou *diet-induced obesity* – DIO), com ou sem reposição de micronutrientes e proteínas, implicando, respectivamente, em condições de restrição calórica ou restrição alimentar; o grau de severidade da restrição oscilou entre o jejum até situações de consumo *ad libitum*, mas com rações de diferentes composições; o emprego de animais naturalmente obesos, por exemplo, ratos Zucker, ou linhagens mais convencionais, como Wistar ou Sprague-Dawley, além do fato de alguns trabalhos terem utilizado animais machos e outros fêmeas; a idade e o peso com que os animais iniciavam e terminavam o experimento; e, finalmente, a maneira com que o estudo foi controlado, pois para haver grupo controle adequado algumas variáveis, mas nem todas, poderiam ser simultaneamente padronizadas, tais como, consumo total de ração, duração dos ciclos e o peso com que o animal deveria estar em cada etapa.

Fica claro que fazer comparações entre os estudos acaba se tornando um processo difícil e que pode implicar em interpretações equivocadas, fato esse que faz com que tecer afirmações conclusivas a respeito dos efeitos da rotina de VPC é no mínimo imprudente.

Entretanto, a partir dos resultados, das conclusões e das hipóteses levantadas pelos autores é possível observar que, na maioria dos casos, a rotina de VPC aumenta a EM dos animais (PRENTICE *et al.*, 1992). Os experimentos que não encontraram esse efeito, em geral, empregaram modelos experimentais que implicavam em restrição calórica ou alimentar excessivamente severa, ou então, em períodos de recuperação do peso corporal que não permitiam o pleno reganho de peso. Além disso, muitos trabalhos foram incapazes ou negligenciaram a importância de fazer com que os grupos controle mantivessem um consumo de ração médio ou total equivalente aos animais que passaram por ciclos de VPC, levando diversos estudos a concluir que a rotina de VPC não altera a composição corporal, mas, provavelmente, esses resultados foram consequência da menor ingestão calórica. Nos próximos parágrafos diversas pesquisas serão comentadas a respeito da metodologia empregada, dos resultados e conclusões.

CLEARY (1986) examinou o efeito de 4 ciclos, cada um consistindo de 3 semanas com restrição alimentar de 50%, seguidas por 3 semanas de

consumo *ad libitum*, em ratos Zucker magros ou geneticamente obesos. Os ratos magros que foram submetidos à rotina de VPC apresentaram o mesmo peso e composição corporal que os animais do grupo controle, a despeito de uma ingestão de carboidrato 25% menor, indicando aumento da EM. Já os ratos obesos que variaram de peso também apresentaram características semelhantes aos animais obesos controles, ingerindo menos ração, porém apresentaram menos gordura no depósito retroperitoneal.

HILL e colaboradores (1987) submeteram ratos Wistar a 4 ou 8 períodos de VPC. Em cada período, os animais ficaram 3 dias de jejum e tiveram acesso à ração nos 7 dias seguintes, de acordo com o consumo de grupos controle que não variaram de peso, mas cuja alimentação foi controlada a fim de gerar uma restrição calórica de 40 ou 60%, além de um grupo com consumo *ad libitum*. Dessa maneira, os animais que variaram de peso consumiram o equivalente ao seu respectivo grupo controle. Não foi encontrada diferença entre os grupos que variaram de peso e seus respectivos controle no ganho de peso, na composição corporal e na EM, quando o consumo de ração foi equivalente a 40 ou 60% do consumo *ad libitum*. Contudo, o grupo que variou de peso e na fase de realimentação teve acesso à quantidade de ração equivalente ao grupo *ad libitum* não conseguiu consumir toda a ração disponível, levando esses animais a apresentarem menor peso e gordura corporal. Embora o estudo anterior não tenha encontrado qualquer efeito da rotina de VPC, a mesma equipe de pesquisadores, em um experimento muito semelhante ao anterior (HILL *et al.*, 1988) observou que ratos submetidos a ciclos de VPC aumentaram a EM, especialmente nos períodos de recuperação do peso.

DESAUTELS & DULOS (1988) submeteram camundongos a 14 dias de jejum, sendo que cada dia foi intercalado por outro de livre acesso à ração, num total de 28 dias. O consumo de ração, o ganho de peso final e o consumo de oxigênio foram equivalentes entre os animais que variaram e os que não variaram de peso. Contudo, os animais que variaram de peso apresentaram menor responsividade a uma injeção de norepinefrina. Dessa forma, segundo os autores, esse achado ofereceu evidências a respeito de um tecido adiposo marrom menos ativo nos animais submetidos à VPC. Além desse fato, comparando-se animais que foram submetidos aos 14 ciclos de VPC contra

aqueles que variaram uma única vez, foi verificado que ambos ganham peso na mesma magnitude, porém os primeiros tendem a acumular mais gordura. Esses resultados apontam para um potencial da rotina de VPC em aumentar a conservação ou aproveitamento da energia consumida, armazenando-a na carcaça, depois de seguidos episódios de redução e aumento de peso.

ARCHAMBAULT *et al.* (1989) e WAINWRIGHT *et al.* (1991) engordaram ratos e camundongos, respectivamente, por meio de uma dieta com alta densidade calórica e submeteram os animais à restrição alimentar. Posteriormente, forneceram ração *ad libitum*, para verificar se, nessa segunda etapa de ganho ponderal, os animais ganhariam peso mais rapidamente. A hipótese dos autores se confirmou, pois foi observado um ganho de peso mais rápido, associado ao aumento da EM, provocado pelo período de redução de peso.

WHEELER *et al.* (1990) verificaram o efeito da VPC e também da distribuição do consumo de ração durante o dia, aumentando ou diminuindo o número de refeições dos animais. Os grupos chamados *gorgers* apresentavam 1 ou 2 refeições e os chamados *nibblers* apresentavam 5 ou 9 refeições, respectivamente, nas fases de restrição alimentar e recuperação do peso corporal. Os ratos foram submetidos a 8 dias de restrição alimentar de 50%, seguidos por um período de consumo *ad libitum*. Tanto os *gorgers* quanto os *nibblers* apresentaram um consumo total inferior ao grupo controle que não variava de peso (consumo *ad libitum*). Mesmo assim, os *gorgers* apresentaram um ganho de peso e de gordura corporal equivalente ao controle, indicando aumento de EM. Já o grupo *nibbler*, cujo consumo de ração foi o menor em relação a todos os grupos, apresentou o menor acúmulo de gordura e ganho de peso. Nos dois grupos que variaram de peso observou-se aumento da atividade da enzima lipase lipoproteína do depósito de gordura retroperitoneal. Esses resultados demonstram um papel da baixa quantidade de refeições (*gorge*) como um fator de aumento da EM, além da própria VPC, cujo efeito não pôde ser plenamente mensurado devido ao menor consumo de ração.

Por outro lado, BROWNLOW *et al.* (1993), utilizando um desenho experimental de restrição calórica (50% ou 70% das calorias ingeridas por animais *ad libitum*), fornecidas em 1 ou 2 refeições por dia, não encontraram diferença entre os grupos no ganho de peso, quando os mesmos tiveram livre

acesso à ração. Entretanto, o grupo que na fase de restrição consumiu 50% das calorias em 2 refeições apresentou o maior percentual de gordura corporal, após a fase de recuperação do peso.

Um estudo que exemplifica as dificuldades na elaboração de um desenho experimental bem controlado que investiga a rotina de VPC é o ensaio de GRAHAM e colaboradores (1990). Nesse experimento, os autores submeteram fêmeas Wistar a 3 ciclos, consistindo cada um de 3 dias de jejum, seguidos por um número variável de dias em que os animais recebiam livre acesso a uma ração rica em gordura. O período de reganho de peso terminava no momento em que os ratos atingissem o peso equivalente ao grupo controle e, assim, iniciava-se outro ciclo. Com esse desenho experimental os autores tentaram verificar se a rotina de VPC tornava a perda de peso menor ou implicava em períodos de recuperação de peso mais curtos, em ambos os casos, consequência do aumento da EM devido os ciclos de VPC. Entretanto, o grupo VPC consumiu menos ração que o grupo *ad libitum*, tornando qualquer comparação entre os dois grupos complicada, pois passa a haver duas variáveis interferindo no experimento: a rotina de VPC e o consumo de ração. Dessa forma, não foi possível atribuir os resultados encontrados a uma ou outra variável. Fato semelhante ocorreu no estudo de Reed *et al.* (1993). Em ambos os casos, não foi possível determinar claramente o efeito da VPC no ganho de peso, na composição corporal e na EM.

Já ROZEN, BRIGANT & APFELBAUM (1994) submeteram ratos machos Wistar a uma dieta palatável rica em gordura (*cafeteria diet*) para promover obesidade induzida pela dieta. Esses mesmos animais passaram por 3 ciclos de VPC, cuja fase inicial de cada ciclo consistia de um período de restrição alimentar de 35% até que o peso atingisse o valor equivalente ao grupo controle (ração normal *ad libitum*). Posteriormente, o grupo VPC recebeu ração *ad libitum* rica em gordura para voltar a engordar. Apesar dos ratos do grupo que variou de peso terem consumido menos energia que um segundo grupo controle (*cafeteria diet ad libitum*), o grupo VPC ganhou a mesma quantidade de peso e gordura corporal, indicando aumento da EM. Parte do aumento da EM foi consequência da redução no consumo de oxigênio observado no grupo VPC.

Em outro estudo com obesidade induzida pela dieta, JEN *et al.* (1995) estudaram a rotina de VPC e o efeito da idade na resposta dos animais a essa situação. Os autores concluíram que a rotina de VPC favorece o maior acúmulo de gordura corporal, fazendo com que a taxa de redução ponderal seja diminuída mediante a restrição calórica e que o ganho de peso esteja aumentado, após o livre acesso à ração. Aumento da idade reduziu a quantidade de peso perdido na fase de restrição, mas não alterou o reganho de peso. Dessa forma, os ciclos de VPC promoveram redistribuição da composição corporal, favorecendo o acúmulo de gordura e a redução da massa magra.

LIM *et al.* (1996), utilizando ratos Sprague-Dawley de peso normal, conseguiram criar um grupo controle adequado para o grupo VPC, que foi submetido a 4 ciclos de 7 dias com consumo restrito a 40%, seguidos por 7 dias de consumo equivalente a 100% da ingestão do grupo *ad libitum* (não foi permitido o período de hiperfagia, usualmente observado após episódios de restrição calórica). Como grupos controle, houve um com consumo *ad libitum* e outro cujo consumo foi restrito a 70%, porém mantido constante ao longo do experimento (grupo *pair-fed*). Os animais submetidos à rotina de VPC apresentaram maior peso, gordura e proteína corporais, comparados aos ratos do grupo *pair-fed*, indicando aumento de EM, confirmado pela redução no consumo de oxigênio. Além disso, a VPC promoveu aumento da concentração plasmática de insulina, da atividade da enzima lipase lipoproteína e redução da taxa metabólica de repouso e do efeito térmico do alimento. Um detalhe interessante foi o fato dos autores terem estudado o efeito do exercício físico, em conjunto com a VPC. Foi observado que o exercício físico melhorou todas as consequências provocadas pela rotina de VPC, apontando essa estratégia como possível alternativa contra as adaptações no metabolismo e na composição corporal, desencadeadas pela VPC.

PELLIZZON, BUISSON & JEN (2000) estudaram o efeito da VPC por meio de outro modelo experimental. Havia um grupo de ratos que foi induzido à obesidade (20% mais pesado que animais controle) por meio de uma alimentação rica em gordura. Posteriormente, esses animais foram submetidos à restrição alimentar de 50% até atingirem o peso corporal do grupo controle e novamente foram induzidos à obesidade (+20%), durante 5 ciclos no total.

Outro grupo foi mantido em um peso 20% inferior ao do grupo controle e passou por 4 ciclos de engorda (até o peso do controle) e emagrece (-20% do peso do grupo controle). Os autores observaram aumento da EM nos grupos VPC, pois consumiram menos ração e apresentaram peso e gordura corporais equivalentes aos do grupo controle. Deve ser observado que o peso corporal dos grupos experimentais foi controlado, fato que explica a ausência de diferença nessa variável e na composição corporal, entre os grupos. Entretanto, como a rotina de VPC fez com que os animais ganhassem peso mais rapidamente e tornou a taxa de redução ponderal menor, nas respectivas fases, os autores concluíram que a constante VPC pode promover obesidade nos ratos. Esse estudo exemplifica o emprego do peso corporal como variável de controle, avaliando, dessa forma, o consumo calórico e o tempo necessário para ocorrer a variação do peso corporal. Outros experimentos preferiram parear os grupos controle para o consumo de ração, mantendo flexível a variação do peso e da composição corporal.

Em relação a aspectos relacionados ao risco de doenças crônicas não transmissíveis associadas à rotina de VPC, ERNSBERGER *et al.* (1996) estudaram ratos geneticamente obesos e hipertensos e observaram que a VPC exacerba a obesidade e a hipertensão desses animais, além de aumentar a EM, a atividade simpática e o acúmulo de gordura abdominal. TAGLIAFERRO *et al.* (1997) concluíram que a rotina de VPC pode aumentar o risco de desenvolvimento do câncer de mama em ratos Sprague-Dawley pré-tratados com *N*-metil-*N*-nitrosouréia ($P = 0,03$ e $P = 0,06$, respectivamente, para aumento na proliferação de células mamárias nas regiões lobuloalveolar e ductal, comparado ao grupo controle). Segundo os autores, esse efeito pode ter sido mediado pelo estímulo para proliferação de células mamárias induzida pela insulina, já que a concentração desse hormônio foi a única variável independente a apresentar correlação significativa com a proliferação das células mamárias ($P < 0,01$).

SEA *et al.* (2000) observaram que animais submetidos a ciclos de VPC reduzem a proporção entre ácidos graxos poliinsaturados e ácidos graxos saturados, na carcaça. Segundo os pesquisadores, a mudança no perfil dos ácidos graxos corporais, além das variações abruptas nas concentrações sangüíneas de colesterol, triacilglicerol, insulina, glicose e glucagon, induzidas

pelos ciclos de VPC, são possíveis explicações para o aumento do risco de doenças cardiovasculares, observados em estudos epidemiológicos que demonstram uma correlação positiva entre a VPC e problemas cardiovasculares.

KIM & SCARPACE (2003) não observaram efeito da rotina de VPC na EM, no ganho de peso e na composição corporal em ratos submetidos a 21 ciclos intermitentes de 1 dia de jejum e de 1 dia de consumo *ad libitum*. Provavelmente, esses autores encontraram esse resultado devido ao desenho experimental, nos quais os animais não foram capazes de recuperar o peso corporal em apenas 1 dia, após o mesmo período de jejum, ou seja, não houve tempo suficiente para que as esperadas adaptações promovidas pela VPC fizessem com que os animais ganhassem peso, sequer de alcançarem o grupo controle. Esse experimento determinou a concentração plasmática de leptina, bem como o conteúdo de RNA mensageiro de leptina e da enzima lipase lipoproteína no tecido adiposo branco retroperitoneal, e também do RNA mensageiro do neuropeptídeo pro-opiomelanocortina no hipotálamo. Foi observado aumento de todas essas variáveis no grupo VPC. O aumento da concentração de leptina, segundo os autores, explica em parte porque os animais do grupo VPC não aumentaram de peso. Contudo, as observações dos autores podem ser questionadas, pois é possível que esses resultados tenham sido consequência de falha metodológica, cujas coletas de sangue e tecidos ocorreram após um período excessivamente prolongado de jejum, subestimando a concentração e expressão de leptina nos grupos controle. Uma evidência nesse sentido é o fato da concentração e expressão de leptina estarem reduzidas nos grupos controle, a despeito do peso e da gordura corporal estarem mais elevados, em relação ao grupo VPC.

Assim, a partir de uma ampla revisão bibliográfica dos efeitos da VPC em ratos e camundongos, pode-se sugerir que existem evidências consistentes de que a rotina de VPC aumenta a EM dos animais, seja por promover um ganho de peso e de gordura corporal equivalente ao do grupo controle, a partir de um menor consumo de ração; aumento do ganho de peso e de gordura na carcaça quando os animais consomem ração na mesma quantidade que o grupo controle; ou então, aumento na velocidade de ganho de peso e/ou menor redução ponderal, quando os animais são submetidos à recuperação ou à

perda de peso, respectivamente, no decorrer dos ciclos de VPC (Figura 1). Provavelmente, o principal motivo de alguns estudos não encontrarem efeitos da VPC, principalmente na composição corporal (PRENTICE *et al.*, 1992), é o menor consumo de ração que os grupos VPC apresentaram, em relação ao grupo controle. Isso geralmente ocorre porque os animais que variam de peso têm sua alimentação restrita durante um certo período e não conseguem compensar esse déficit na etapa de recuperação do peso corporal, apesar de um período inicial de hiperfagia, mas cujo consumo tende a retornar para os valores semelhantes à média do grupo *ad libitum*, depois de algum tempo.

Figura 1. Esquema que ilustra simplificadamente as etapas envolvidas com as mudanças no organismo que aumentam a eficiência metabólica e predispõe o indivíduo a engordar, após vários episódios de redução do peso corporal, caracterizando o ciclo vicioso conhecido popularmente como “efeito sanfona”

4.2 Implicações fisiológicas da rotina alimentar *meal-feeding*

Sujeitar ratos de experimentação à restrição alimentar, em geral, faz com que ocorram adaptações fisiológicas que vão além das impostas pela simples redução da disponibilidade de ração. O principal motivo dessas

adaptações, independentes da restrição calórica, é a mudança do padrão alimentar, cujos animais são submetidos.

Ratos se alimentam em diversas refeições ao longo do dia (para esse padrão alimentar existe o termo em inglês *nibble*), sendo que a maior parte ocorre durante o ciclo escuro do dia. A partir do momento em que os animais estão sujeitos a uma quantidade controlada de ração, disponibilizada em um único momento do dia, os animais passam a ter um padrão alimentar de hiperfagia ao receberem o alimento. Isso faz com que, em um curto período de tempo, os animais ingiram grande quantidade da ração, podendo, em menos de 2 horas, consumir o equivalente a 50% da ração que um animal com livre acesso ao alimento ingeriria durante todo o dia (CURI *et al.*, 1984). Como consequência à rápida ingestão de toda ração disponível, o animal em restrição alimentar passa a maior parte do dia em jejum. Tanto o curto período diário de hiperfagia, quanto o jejum prolongado, fazem com que os animais sofram adaptações metabólicas e fisiológicas. Essas adaptações são características de animais submetidos a um esquema alimentar conhecido como *meal-feeding*, cuja variante mais usual é submeter os animais ao livre acesso à ração durante apenas 2 horas no dia e, no restante do tempo, manter os animais em jejum (BAZOTTE, BATISTA & CURI, 2000). Assim, como o presente estudo submeteu os animais a uma condição semelhante ao esquema *meal-feeding* é imprescindível o conhecimento das adaptações que esse padrão alimentar promove no organismo.

Entre as principais adaptações que os animais sofrem durante o esquema *meal-feeding* (incluí-se a restrição alimentar como uma variante do esquema *meal-feeding*) estão: o aumento da eficiência alimentar (LEVEILLE, 1972), a redução da atividade física espontânea (LEVEILLE, 1972), o aumento da lipogênese (LEVEILLE, 1966), o aumento da tolerância à glicose (SANTOS Jr, CARPINELLI & CURI, 1989), a redução da resposta insulinêmica a um estímulo (MALAISSE, MALAISSE & WRIGHT, 1967; SANTOS Jr, CARPINELLI & CURI, 1989), o aumento do armazenamento de glicogênio e a redução de sua degradação (CURI *et al.*, 1984), o aumento da capacidade gástrica de armazenamento de comida, com concomitante hipertrofia do estômago, além de redução do esvaziamento gástrico (BAZOTTE, BATISTA & CURI, 2000). Grande parte dessas adaptações é dependente dos hormônios da glândula

adrenal, mais especificamente dos glicocorticóides, pois animais adrenalectomizados não sobrevivem a esse regime alimentar (BERDANIER, WURDEMAN & TOBIN, 1976).

Dentre todas as adaptações desencadeadas pelo esquema *meal-feeding*, talvez a mais importante para o presente trabalho seja a provocada na secreção de insulina, uma vez que um dos objetivos da suplementação com LEU / PHE foi de promover aumento da resposta insulinêmica em cada refeição. Além disso, no EXPERIMENTO III foi verificada a influência do tempo de jejum na resposta insulinêmica, após administração intragástrica de ração, tentando simular o tempo de jejum durante as fases semelhantes ao esquema *meal-feeding* (aproximadamente 18 horas) ou durante um jejum fisiológico (4 horas ou menos), mais parecido com situações de consumo *ad libitum*. MALAISSE, MALAISSE & WRIGHT (1967), há quase 40 anos, constataram que ratos em jejum prolongado sofrem redução da secreção de insulina, a partir de um estímulo. Essa resposta fisiológica foi confirmada em animais submetidos a 4 semanas de esquema *meal-feeding* (2 horas com consumo *ad libitum*; 22 horas de jejum). Nesse estudo (SANTOS Jr, CARPINELLI & CURI, 1989), foi administrada, via injeção intraperitoneal, solução de glicose (1 g/kg.peso corporal) e a resposta glicêmica e insulinêmica dos animais foi acompanhada. Os ratos que vinham de consumo *ad libitum* apresentaram a maior resposta insulinêmica e a menor resposta glicêmica. Já animais que não foram treinados no esquema *meal-feeding*, mas estavam em jejum de 22 horas, apresentaram resposta insulinêmica intermediária (entre os animais *ad libitum* e os *meal-feeding*). Finalmente, os animais que vinham do esquema *meal-feeding* praticamente não apresentaram um pico bem-definido de secreção de insulina. Dessa forma, animais submetidos a períodos de jejum prolongado apresentam secreção de insulina reduzida em resposta a um estímulo, e, segundo os dados de SANTOS Jr, CARPINELLI & CURI (1989), essa resposta tende a estar ainda mais reduzida no esquema *meal-feeding*, provavelmente, devido ao aumento da sensibilidade à insulina (CURI *et al.*, 1984).

No estudo de CURI *et al.* (1989), foi observado que a idade também exerce papel relevante, pois animais mais velhos, quando submetidos ao esquema *meal-feeding* por 3 semanas, perderam mais peso que animais

jovens. LIMA *et al.* (1982) verificaram que independentemente dos animais serem alimentados durante o período claro do dia, as adaptações decorrentes do esquema *meal-feeding* continuam a ocorrer. Finalmente, BLOCK, AFTRING & BUSE (1990) estudaram a influência do esquema *meal-feeding* (6 horas com consumo *ad libitum*; 18 horas de jejum) na atividade da enzima hepática desidrogenase de alfa-ceto ácido de cadeia ramificada (BCKD). Os autores verificaram que esse esquema alimentar reduz drasticamente a porcentagem da enzima na forma ativa, comparado a condições de consumo *ad libitum* ($29 \pm 6\%$ contra $93 \pm 6\%$, respectivamente), em ratos Wistar machos, consumindo ração com conteúdo protéico adequado (25% de caseína). Os autores concluíram que a menor atividade dessa enzima, que é a etapa limitante do processo de degradação dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), é um mecanismo adaptativo que aumenta o aproveitamento dos BCAA para a síntese de proteínas.

4.3 Leucina e sua ação na regulação do processo de síntese protéica

A principal função dos aminoácidos é de servir como substratos para a síntese de proteínas. No entanto, diversos aminoácidos possuem funções regulatórias, independentes de sua função primária *proteogênica* (MEIJER, 2003).

Alguns aminoácidos, incluindo a PHE e, sobretudo a LEU, são capazes de estimular o processo de síntese protéica (ANTHONY *et al.*, 2001; LYNCH *et al.*, 2002a), reduzir a proteólise (HAMEL *et al.*, 2003; KADOWAKI & KANAZAWA, 2003), favorecendo um balanço nitrogenado positivo (Figura 2) (MEIJER, 2003).

Segundo KADOWAKI & KANAZAWA (2003), a disponibilidade de certos aminoácidos pode modular a proteólise, ao reduzir, principalmente, o processo de autofagia lisossomal, que age na degradação não seletiva de proteínas endógenas no meio intracelular. Todavia, HAMEL *et al.* (2003) verificaram que os aminoácidos isoleucina, LEU, tirosina, PHE, triptofano, lisina e arginina

também são capazes de inibir determinados tipos de proteasomos. Os proteasomos fazem parte de outro mecanismo de proteólise, porém nesse caso, seletivo, cujas proteínas que serão degradadas são previamente conjugadas com ubiquitina, funcionando como um marcador.

Figura 2. Esquema ilustrativo da ação dos aminoácidos leucina e fenilalanina no estímulo para a síntese protéica e redução da proteólise

mTOR, alvo de rapamicina de mamíferos; S6K1, proteína ribossomal S6 quinase-1 de 70 kDa; S6, proteína ribossomal S6; 4EBP1, proteína ligadora do fator de inicialização eucariótico 4E 1; eIF4E, eIF4G, eIF4A e eIF4F, fator de inicialização eucariótico 4E, 4G, 4A e 4F

A inibição da proteólise pela suplementação de alguns aminoácidos poderia, teoricamente, reduzir o *turnover* protéico. Esse processo levaria à economia de energia e ao aumento da EM, contudo haveria a possibilidade de surgir alguns problemas associados a essa condição: 1) redução da disponibilidade de aminoácidos, oriundos da proteólise endógena, para suprir a síntese de proteínas essenciais durante períodos de restrição alimentar; 2) acúmulo de organelas e macromoléculas com danos estruturais que deveriam

ser removidas, porém, com meia-vida aumentada, as mesmas poderiam se acumular, acarretando mau funcionamento celular (KADOWAKI & KANAZAWA, 2003).

Em relação ao outro extremo do balanço protéico, o hormônio insulina e alguns aminoácidos são capazes de estimular a taxa de síntese protéica, atuando no processo posterior à transcrição gênica, a tradução protéica (Figura 2). Ainda não se sabe exatamente de que forma, mas a LEU estimula a atividade da proteína quinase conhecida como Alvo de Rapamicina de Mamíferos (*mammalian target of rapamycin* ou mTOR). A mTOR fosforila a proteína ribossomal S6 quinase-1 de 70 kDa (S6K1), ativando-a. A S6K1, quando ativa, fosforila e ativa a proteína ribossomal S6, que por sua vez, modula a síntese de proteínas ribossomais e fatores de alongação. Em última análise, a LEU consegue estimular a síntese de complexos que são responsáveis pelo processo de tradução (ribossomos e fatores de alongação). Além disso, a enzima mTOR também fosforila a proteína ligadora do fator de inicialização eucariótico 4E 1 (4EBP1), cuja forma fosforilada reduz sua ligação com o fator de inicialização eucariótico 4E (eIF4E). Assim, o eIF4E livre pode se ligar a outros fatores de inicialização (eIF4G e 4A), gerando o complexo eIF4F que, finalmente, atua na inicialização do processo de tradução protéica (ANTHONY *et al.*, 2001; MEIJER, 2003).

Dessa forma, tanto a insulina quanto determinados aminoácidos são capazes de atuar nos dois processos do balanço protéico, na síntese e na degradação, regulando-os, conforme a disponibilidade desses compostos (MEIJER, 2003). Essa regulação ocorre de maneira semelhante, mas com peculiaridades próprias, em diversos tecidos do organismo, como o tecido adiposo, o músculo esquelético e o fígado (LYNCH, 2001).

LYNCH *et al.* (2003), na tentativa de entender como a LEU age sobre a enzima mTOR, testaram a hipótese de que a ativação da mTOR poderia estar relacionada com a atividade da enzima que catalisa a etapa limitante do processo de oxidação dos BCAA, a BCKD. A BCKD é regulada pela enzima BCKD quinase, que a fosforila, inibindo-a. Uma vez que a LEU regula a BCKD quinase, talvez essa etapa esteja relacionada com a ativação da enzima mTOR. Contudo, os pesquisadores não encontraram evidências que o

processo de regulação da BCKD e da BCKD quinase modifiquem a atividade da mTOR.

Tanto a insulina, quanto certos aminoácidos e mesmo a contração muscular são capazes de estimular as mesmas vias celulares, no que se refere à regulação da síntese protéica (BOLSTER, JEFFERSON & KIMBALL, 2004). Nesse sentido, PATTI *et al.* (1998) verificaram *in vitro* que aminoácidos modulam a ação celular da insulina de modo bidirecional. Ao mesmo tempo em que aminoácidos, como a LEU, estimulam as vias de síntese protéica de modo semelhante à insulina, os aminoácidos também são capazes de reduzir a sinalização da insulina em processos relacionados ao transporte de glicose e gliconeogênese. A inibição destes últimos processos pode estar relacionada com a elevação do fluxo na via das hexosaminas, cujo produto final é *N*-acetilglicosamina (TRAXINGER & MARSHALL, 1989). O aumento da concentração de glicosamina provoca resistência periférica à insulina *in vitro* e *in vivo* (ROSSETTI *et al.*, 1995). Assim, os aminoácidos aparentemente exercem um papel “contraditório” ao estimular a secreção de insulina e ao ativar, em conjunto com a insulina, vias que aumentam a síntese protéica, porém, também podem causar resistência à insulina, ao menos em determinadas vias celulares ativadas pela insulina. Entretanto, SURYAWAN *et al.* (2004) não encontraram interferência de aminoácidos em algumas vias de sinalização celular da insulina, em porcos recém-nascidos.

Além disso, alguns pesquisadores sugerem que dietas com alto conteúdo de proteína (~1,5 g/kg.dia) podem ajudar no controle glicêmico e na redução ponderal (LAYMAN & BAUM, 2004). Entre os mecanismos propostos, LAYMAN (2003) propõe que a LEU é essencial para os efeitos benéficos de dietas com conteúdo protéico acima das recomendações, seja por estimular a síntese protéica ou por melhorar o controle glicêmico, em parte pelo processo de gliconeogênese gerado pela degradação muscular de LEU.

Poucos foram os trabalhos científicos que procuraram investigar o efeito da suplementação crônica com LEU ou com os três BCAA (LEU, valina e isoleucina) na capacidade de promoção de mudanças positivas na composição corporal, seja reduzindo a gordura corporal ou aumentando a massa magra. LYNCH *et al.* (2002b) estudaram o efeito de 12 dias de suplementação na água com LEU ou norleucina, um composto análogo à LEU, mas que não estimula a

secreção de insulina e não é incorporado à estrutura das proteínas, na síntese protéica em ratos. Observou-se que a LEU e a norleucina aumentaram a taxa de síntese protéica no tecido adiposo, no músculo gastrocnêmio e no fígado, mas não no coração e nos rins. Além disso, os pesquisadores não encontraram mudanças significativas na concentração das proteínas mTOR, 4EBP1 e S6K1 nos cinco tecidos estudados. Os autores concluíram que a suplementação crônica com LEU ou norleucina estimula a síntese protéica do tecido adiposo, do músculo esquelético e do fígado, sem alteração significativa nas enzimas que atuam nessas vias metabólicas. Também foi observada retenção de nitrogênio na carcaça de ratos suplementados cronicamente com LEU, durante a fase de recuperação nutricional, após um período de desnutrição protéica (VENTRUCCI *et al.*, 2004). STEIN *et al.* (2003) suplementaram BCAA durante 2 semanas em indivíduos que estavam acamados (*bed rest*), simulando condições de demanda muscular mínima. Os autores verificaram aumento significativo na retenção de nitrogênio; sem, contudo, alterar a cinética protéica durante a fase de recuperação.

MOURIER *et al.* (1997a) suplementaram atletas que estavam em restrição alimentar (28 kcal/kg.dia) com BCAA, durante 19 dias. Os autores verificaram que o grupo suplementado com BCAA reduziu significativamente a gordura corporal (-4 kg ou -17,3%) e visceral (-34,4%), mesmo quando comparado aos demais grupos com dietas isoenergéticas e com conteúdo de proteína normal ou elevado. A massa muscular e parâmetros relacionados com aptidão física não diferiram entre os grupos.

Baseado no estudo anterior, parte da mesma equipe de pesquisadores estudou o efeito da suplementação com BCAA na mobilização de tecido adiposo visceral e na sensibilidade à insulina, em um programa de atividade física em diabéticos do tipo 2 (MOURIER *et al.*, 1997b). Nesse estudo, não foi encontrado qualquer benefício adicional com a suplementação de BCAA na redução dos depósitos de gordura visceral, na melhora da sensibilidade à insulina, na aptidão física e em outros parâmetros estudados.

Finalmente, no que se refere à segurança dos suplementos com BCAA, SHIMOMURA *et al.* (2004) resumem diversos aspectos da suplementação com esses aminoácidos e traz evidências de que, mesmo em doses elevadas, a suplementação é segura. No entanto, alguns autores sugerem que a

suplementação apenas com LEU poderia prejudicar a disponibilidade de valina e isoleucina, uma vez que a atividade do complexo enzimático BCKD é estimulada na presença de LEU ou de seu ceto ácido, alfa-cetoisocaproato (PAXTON & HARRIS, 1984; HARRIS, JOSHI & JEOUNG, 2004; SHIMOMURA *et al.*, 2004). Dessa maneira, sugere-se que o aumento da oferta de LEU estimularia a degradação dos três BCAA e, caso valina e isoleucina não sejam suplementados, poderia haver comprometimento na disponibilidade desses aminoácidos, essenciais como substratos para o processo de síntese protéica (BLOCK & HARPER, 1991). Alguns estudos com suplementação crônica apenas de LEU não encontraram evidências indicando comprometimento do processo de síntese protéica (LYNCH *et al.*, 2002b; VENTRUCCI *et al.*, 2004). Em um experimento com trutas, a alta ingestão de LEU não reduziu as concentrações plasmáticas de valina e isoleucina (CHOO *et al.*, 1991). Além disso, a suplementação com LEU por 12 dias não alterou a concentração das enzimas envolvidas no metabolismo dos BCAA, como a aminotransferase de cadeia ramificada mitocondrial, a BCKD e a BCKD quinase, no rim, fígado, coração, tecido adiposo e músculo gastrocnêmio em ratos, indicando que a suplementação unicamente com LEU, em doses próximas ao consumo habitual, não afeta o metabolismo dos BCAA (LYNCH *et al.*, 2002b).

4.4 Efeito dos aminoácidos na secreção de insulina

É fato conhecido o efeito de determinados aminoácidos ou compostos protéicos no estímulo à secreção de insulina *in vitro* (FLOYD *et al.*, 1966), com ou sem a presença de glicose (RABINOWITZ *et al.*, 1966).

Os aminoácidos são capazes de estimular a secreção de insulina nas células beta do pâncreas ao proverem compostos para produção de energia, como acetil-CoA, ou de intermediários do ciclo de Krebs – processo conhecido como anaplerose – como alfa-cetoglutarato (GUNAWARDANA *et al.*, 2004; MEIJER & DUBBELHUIS, 2004). Em ambos os casos, há aumento da síntese de ATP pelas células beta, permitindo a elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} , passo necessário para a secreção de insulina (GUNAWARDANA *et al.*, 2004; MEIJER & DUBBELHUIS, 2004).

VAN LOON *et al.* (2000a) estudaram o efeito de diversas misturas contendo aminoácidos purificados, proteínas hidrolisadas e carboidratos, na secreção de insulina em 8 homens não-obesos e saudáveis. O intuito dos pesquisadores foi determinar qual mistura conseguiria potencializar a secreção de insulina. Os autores concluíram que os aminoácidos LEU, PHE e tirosina apresentaram a melhor correlação com a resposta insulinêmica. Assim, segundo os autores, esses aminoácidos poderiam ser adicionados a suplementos para promover secreções acentuadas de insulina. A alta resposta insulinêmica produzida por esses aminoácidos, administrados a um suplemento contendo carboidrato, foi confirmada em outro estudo desenvolvido por VAN LOON *et al.* (2000b). O efeito insulinêmico do aminoácido LEU também foi confirmado em ratos Wistar (ANELLO *et al.*, 2001) e Sprague-Dawley (ZAWALICH *et al.*, 2004), utilizando-se ilhotas pancreáticas isoladas.

Poucos estudos investigaram a resposta insulinêmica da administração aguda de LEU ou PHE *in vivo* em ratos. CROZIER *et al.* (2005) administraram em ratos Sprague-Dawley machos, via gavagem, doses de LEU equivalentes à 5, 10, 25, 50 e 100% da ingestão diária desse aminoácido. Observou-se que apenas as doses equivalentes a 50 e 100% conseguiram desencadear aumento significativo de insulina, após 30 minutos. BAUM *et al.* (2005) administraram em ratos Sprague-Dawley machos 2,63 g de carboidrato (50% de glicose e 50% de sacarose), 0,27 g de LEU (equivalente à ingestão diária desse aminoácido) ou carboidrato + LEU e verificaram a resposta insulinêmica durante 90 minutos. Conforme pode ser observado na Figura 3, o tratamento apenas com LEU promoveu aumento modesto na concentração plasmática de insulina, no tempo 10 minutos.

A adição de LEU ao carboidrato promoveu aumento sinérgico na insulinemia, resultando em diferença significativa no tempo 90 minutos, comparado ao grupo apenas com carboidrato. É interessante notar que tanto o grupo carboidrato como o grupo carboidrato + LEU apresentaram um padrão de curva insulinêmica bifásica, cujos picos ocorreram nos minutos 10 e 60 (BAUM *et al.*, 2005). Entretanto, não há estudos que investigaram a ação combinada de LEU + PHE na resposta insulinêmica, em ratos *in vivo*. Segundo VAN LOON *et al.* (2000a), essa combinação de aminoácidos, acrescida de carboidrato, é capaz de promover a maior resposta no estímulo à secreção de

insulina, ao menos em seres humanos, mesmo quando comparada a diversas outras misturas de macronutrientes. Além disso, nenhum estudo verificou o efeito insulinêmico da adição de LEU + PHE a misturas alimentares complexas (contendo todos os macro e micronutrientes), como a ração em pó AIN93-M (REEVES *et al.*, 1997), nem o efeito da duração do jejum nessa resposta, em ratos *in vivo*.

Figura 3. Concentração plasmática de insulina, após administração intragástrica de 2,63 g de carboidrato (50% glicose e 50% sacarose; CHO), leucina (0,27 g; leu) e CHO + leu, em ratos adultos

Os valores representam a média $\pm$ erro padrão; $n = 4$ animais por grupo em cada ponto. * $P < 0,05$, diferença significativa em relação ao tratamento apenas com CHO.

Modificado de BAUM *et al.* (2005)

ANELLO *et al.* (2001) demonstraram, em incubação de ilhotas pancreáticas de ratos, que a exposição prolongada (24 horas) a uma alta concentração de LEU (20 mM) pode reduzir a liberação de insulina induzida por glicose (16,7 e 22,2 mM), por meio da diminuição da razão entre ATP e ADP.

Porém, ainda não se sabe se esse efeito representa um comportamento fisiológico *in vivo* significativo e se a suplementação crônica com LEU / PHE poderia produzir esse estado.

4.5 Papel da insulina na regulação do balanço energético

A insulina é um hormônio secretado pelas células beta do pâncreas e sua imprescindível função no metabolismo dos macronutrientes, em especial dos carboidratos, é bem documentada. A insulina se liga a seu receptor e desencadeia uma série de sinalizações celulares que podem aumentar a captação de glicose pelas células, estimular a síntese de glicogênio, aumentar a oxidação de glicose, suprimir a lipólise e a oxidação de gordura, estimular a síntese protéica, reduzir a proteólise, a gliconeogênese e a liberação de glicose hepática, estimular a lipogênese, aumentar a atividade de enzima lipase lipoproteína (Figura 4), entre outras ações (GUYTON, 1986).

Analisando as funções descritas conclui-se que a insulina desempenha um papel estritamente anabólico. Por outro lado, há muito tempo já se sabe que a administração de insulina no SNC leva a um estado catabólico do organismo, pois causa diminuição da ingestão alimentar, aumento do gasto energético e redução do peso corporal (Figura 4) (WOODS *et al.*, 1979; BRIEF & DAVIS, 1984).

Uma vez que a secreção de insulina é estimulada pela ingestão de alimentos e a concentração sangüínea desse hormônio apresenta correlação diretamente proporcional com a quantidade de gordura corporal, a insulina é considerada um hormônio que também atua como um sinalizador do estado nutricional do organismo que informa ao SNC, especialmente o hipotálamo, a respeito da quantidade das reservas de energia e do balanço energético do organismo (OBICI & ROSSETTI, 2003; NISWENDER, BASKIN & SCHWARTZ, 2004; ALQUIER & KAHN, 2004; HELLSTRÖM *et al.*, 2004). Dessa forma, a insulina compartilha com a leptina, um hormônio secretado pelos adipócitos, a função de veículo de comunicação ao transmitir, dos tecidos periféricos para o SNC, informações a respeito do estado nutricional do organismo, a fim de que determinadas ações fisiológicas sejam desencadeadas, como aumento ou

diminuição do estímulo para ingestão alimentar e modulação dos diferentes componentes do gasto energético, conforme a situação (Figura 5). Como uma evidência a esse respeito, o hipotálamo, especialmente o núcleo arqueado, apresenta grande concentração de receptores de insulina (STOCKHORST *et al.*, 2004). A insulina também consegue modular os principais neuropeptídeos envolvidos com a regulação do peso corporal e com o metabolismo energético, como o neuropeptídeo Y (NPY), o peptídeo relacionado a agouti (AgRP) e a pró-opiomelanocortina (POMC) (MIZUNO *et al.*, 1999). Além disso, a ablação ou inibição dos receptores de insulina no cérebro promove aumento da ingestão de alimentos, obesidade e hipogonadismo hipogonadotrófico (BRUNING *et al.*, 2000; OKAMOTO & ACCILI, 2003).

O aspecto mais intrigante da ação da insulina é o dualismo entre sua ação periférica e central (Figura 4). Na primeira, a insulina age como um hormônio anabólico, conforme pode ser comprovado a partir do efeito colateral de aumento do peso e gordura corporal na terapia com insulina em pacientes com intolerância à glicose e diabetes (THE DCCT RESEARCH GROUP, 1988; CARLSON & CAMPBELL, 1993; UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP, 1998; FRITSCHKE & HÄRING, 2004). Além disso, o tratamento com alguns fármacos que aumentam a sensibilidade à insulina, como a metformina, ao invés da administração de insulina, não traz a desvantagem de promover aumento ponderal (PURNELL *et al.*, 1998). Entretanto, outras classes de agentes hipoinsulinêmicos podem produzir aumento do peso corporal.

VELASQUEZ-MIEYER *et al.* (2003) verificaram que a supressão da secreção de insulina reduz o peso corporal. LUSTIG *et al.* (2004) apontaram para a associação entre hiperinsulinemia e ganho de peso, por meio do aumento da resistência à leptina, e que a redução da insulinemia pode ajudar na redução ponderal, ao aumentar a sensibilidade do organismo à ação da leptina. Ainda há pesquisadores que atribuem a uma “nutrição insulinogênica”, ou seja, rica em carboidratos com alto índice glicêmico e que, conseqüentemente, provocam elevada secreção de insulina, um papel na etiologia de fatores que aumentam o risco de obesidade, diabetes e síndrome metabólica (KOPP, 2003). Todos os estudos citados de certa forma foram voltados para indivíduos obesos ou que apresentavam intolerância à glicose ou

diabetes, sendo que essas condições são caracterizadas pela diminuição da sensibilidade à insulina, ou seja, em falhas na sinalização adequada da informação que esse hormônio está transmitindo.

Figura 4. Esquema que mostra as ações do hormônio insulina em diversos tecidos do organismo

Por outro lado, a sinalização da insulina no SNC promove um estado de catabolismo no organismo, uma vez que resulta em balanço energético negativo, por meio da inibição da ingestão alimentar e do aumento do gasto energético (NISWENDER, BASKIN & SCHWARTZ, 2004; HELLSTRÖM *et al.*, 2004). Recentemente, alguns estudos começaram a empregar a insulina como alternativa de manipular a composição corporal e o metabolismo energético em humanos. Isso foi possível por meio da aplicação de insulina via spray intranasal (HALLSCHMID *et al.*, 2004a). Essa via de aplicação permite que peptídeos atinjam diretamente o SNC, através de sua absorção pela mucosa

nasal (STOCKHORST *et al.*, 2004). Além disso, a quantidade de peptídeo que atinge a circulação sistêmica é mínima (STOCKHORST *et al.*, 2004). Esse aspecto é bastante relevante, pois caso a concentração sistêmica de insulina aumente, sem a concomitante elevação da glicemia, pode haver episódios de hipoglicemia e, aparentemente, os efeitos anorexígenos da insulina no SNC somente são acionados em condições de euglicemia, provavelmente devido a mecanismos próprios do SNC de controle do estado nutricional / glicemia (STOCKHORST *et al.*, 2004; HALLSCHMID *et al.*, 2004a). Nesse sentido, MIZUNO *et al.* (1999) investigaram o efeito do jejum na ação dos hormônios insulina e leptina na regulação dos neuropeptídeos hipotalâmicos que regulam o balanço energético (NPY, AgRP e POMC), em camundongos normais e diabéticos. Os pesquisadores concluíram que embora a insulina e a leptina regulem a expressão gênica dos neuropeptídeos hipotalâmicos, a glicemia ou outros fatores podem exercer efeitos independentes à ação dos hormônios, sugerindo a existência de mecanismos regulatórios (sensores nutricionais) próprios do SNC.

HALLSCHMID *et al.* (2004b) investigaram o efeito da aplicação intranasal de insulina em homens e mulheres durante 8 semanas. Os pesquisadores verificaram que os homens reduziram significativamente o peso (-1,28 kg), a gordura corporal (-1,38 kg) e a medida da circunferência da cintura (-1,63 cm). Essas mudanças foram acompanhadas pela redução na sensação de fome e também pela diminuição de 27% na concentração plasmática de leptina, sem alteração na concentração sanguínea de insulina ou da glicemia. Por outro lado, as mulheres sofreram acréscimo de 1,04 kg no peso corporal, devido ao aumento do armazenamento de água extracelular, sem alteração em outros parâmetros. Quatro meses após o término do tratamento, todas as variáveis retornaram aos valores iniciais. Os autores confirmaram os resultados de estudos em animais, no qual o gênero é importante na sensibilidade à ação da insulina no SNC, sendo que machos são mais sensíveis à ação anoréxica da insulina, ao passo que fêmeas são mais sensíveis aos efeitos da leptina, no SNC (CLEGG *et al.*, 2003; HALLSCHMID *et al.*, 2004b). Uma explicação sugerida pelos autores, de certa forma teleológica, é que homens seriam mais sensíveis à sinalização da insulina, pois possuem maior quantidade de gordura visceral, e esta, por sua vez, apresenta correlação positiva com a concentração

plasmática de insulina. Já mulheres possuem maior reserva de gordura subcutânea e esses depósitos sintetizam mais leptina que os adipócitos viscerais (FRÜHBECK *et al.*, 2001), e, dessa forma, tenderiam a ser mais sensíveis à ação da leptina. Além disso, os estrógenos exercem papel relevante não apenas ao aumentar a concentração de leptina, mas permitindo maior sensibilidade à sinalização desse hormônio no SNC (HALLSCHMID *et al.*, 2004b).

FIGLEWICZ (2003) ainda aponta para um efeito mais abrangente da insulina e da leptina no SNC, sendo que esses hormônios agiriam estimulando centros de “recompensa” ou “compensação” à ingestão alimentar. Ademais, a síntese de leptina é estimulada pela presença de insulina (CAMMISOTTO & BUKOWIECHI, 2002) e de LEU (ROH *et al.*, 2003).

Assim, a insulina pode ser entendida não só como um hormônio que regula o metabolismo dos macronutrientes, mas também possui ação semelhante a de um sensor que informa ao SNC o estado nutricional e o balanço energético do organismo, exercendo ação conjunta e semelhante à leptina (Figura 5). Além disso, a redução na sinalização da insulina no SNC desencadeia alterações metabólicas que favorecem o anabolismo, ao acarretar hiperfagia e obesidade (BRUNING *et al.*, 2000), de forma análoga aos modelos de obesidade animal provocados por ausência de leptina. Assim, considerando que a redução na concentração da insulina sinaliza ao SNC um estado de balanço energético negativo, cuja resposta é o aumento do consumo de alimentos e a redução do gasto energético, é instigante a hipótese de que alternativas que mantenham a insulinemia ou que estimulem respostas pós-prandiais mais acentuadas na secreção de insulina, em condições de sensibilidade normal à insulina, possam provocar repercussões fisiológicas semelhantes à reposição da leptina (Figura 5), que ameniza consideravelmente as repercussões no metabolismo de condições de balanço energético negativo (CHAN *et al.*, 2003).

Figura 5. Esquema que relaciona a hipótese do presente trabalho com a ação da insulina no sistema nervoso central

A. A restrição alimentar promove redução da gordura corporal (reservas de energia do organismo), além de diminuir a concentração de leucina, insulina e leptina; a redução na concentração desses compostos, ao sinalizar para o organismo um estado de balanço energético negativo, desencadeiam alterações metabólicas no organismo, como aumento da eficiência metabólica, que, em última análise, reduz a perda de peso e de gordura corporal

B. O presente trabalho pretende estudar as consequências de se manter a concentração de leucina, por meio da suplementação na ração, durante períodos de restrição alimentar. ↔, não sofre alteração; ?, efeito desconhecido

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 EXPERIMENTO I

O EXPERIMENTO I consistiu no estudo do efeito da variação forçada do peso corporal, por meio de períodos de restrição alimentar, intercalados por períodos de recuperação do peso. Os parâmetros de controle foram o acesso à ração e a duração dos períodos de perda e recuperação de peso. O peso corporal não foi controlado, pois essa seria justamente a variável investigada. O grupo controle teve seu consumo de ração mantido constante. Além disso, o consumo de ração do grupo controle foi regulado para que, no final do experimento, sua ingestão fosse equivalente à ingestão média dos grupos que variaram de peso (por isso a definição do grupo controle como *pair-fed*, ou grupo pareado pelo consumo). Dessa maneira, a variável “variação de peso” foi isolada, sem interferência de diferenças no total de ração ingerida.

Além disso, houve dois grupos no EXPERIMENTO I que foram suplementados com L-leucina (LEU) e L-fenilalanina (PHE), em duas diferentes dosagens. Objetivou-se, com esses grupos, verificar se os aminoácidos LEU e PHE poderiam interferir nos supostos efeitos da rotina de VPC. Essa interferência seria uma hipotética amenização do aumento da EM, promovendo um melhor perfil da composição corporal e de determinados parâmetros metabólicos e hormonais.

5.1.1 Animais

O presente estudo foi realizado com 30 ratos Wistar machos e adultos, com peso inicial de 268 ± 14 g, distribuídos em 5 grupos (6 animais por grupo). Os animais foram fornecidos pelo Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente climatizado a 22 ± 2 °C, umidade relativa do ar $55 \pm$

10%, com 15 a 20 trocas de ar por hora e com ciclo biológico invertido (12h claro/12h escuro - luz acesa às 20:00 horas), durante período de 11 semanas. Com a adoção do ciclo invertido foi possível tratar os ratos durante a fase escura do dia, que é o momento de maior atividade biológica dessa espécie, visando minimizar o possível estresse causado pela manipulação dos animais. Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da FCF-USP, segundo os princípios adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), em 19/11/2004 (Protocolo nº 50).

5.1.2 Ração

As dietas foram preparadas em nosso laboratório de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN-93M) (REEVES, 1997), formuladas para a manutenção de roedores. As rações, na forma de pó, foram fornecidas em coxos individuais.

Foram preparadas três diferentes rações:

- **Ração controle:** formulação adaptada do AIN-93M, na qual uma pequena porção de amido (aproximadamente 8 gramas por kg de ração) foi trocada por caseína, a fim de padronizar a quantidade de nitrogênio fornecida em cada ração.
- **Ração suplementada com 50% de LEU e PHE:** formulação adaptada do AIN-93M, com adição dos aminoácidos purificados LEU e PHE, a fim de aumentar a disponibilidade desses aminoácidos na ração em 50%. Para cada quilograma de ração preparada, foram substituídos 5,45 g e 3,10 g de amido por LEU e PHE, respectivamente.
- **Ração suplementada com 100% de LEU e PHE:** formulação adaptada do AIN-93M, mas com adição dos aminoácidos purificados LEU e PHE, a fim de aumentar a disponibilidade desses aminoácidos na ração em 100%. Para cada quilograma de ração preparada, foram substituídos 10,9 g e 6,2 g de amido por LEU e PHE, respectivamente.

Os aminoácidos LEU e PHE, ambos fornecidos pela empresa Ajinomoto, apresentaram, respectivamente, grau de pureza de 100,4% (98,5% a 101,0%) e 99,5% (98,5% a 101,0%), segundo certificado de análise do lote, oferecido ao nosso laboratório, realizado pela própria Ajinomoto. As dietas oferecidas apresentaram, em relação a sua composição, cerca de 12% de proteína (caseína + L-cistina), 72% de carboidratos (amido + sacarose) e 4% de lipídios (óleo de soja) (REEVES, 1997) (Tabela 1). Em relação ao valor calórico total, apresentaram aproximadamente 3,72 kcal por cada grama de ração, sendo que destes 13,3% foi a partir de proteína, 77,1% a partir de carboidratos e 9,54% a partir de lipídios (REEVES, 1997). As quantidades de minerais e vitaminas atendiam às recomendações para roedores. O conteúdo de proteína e a verificação da homogeneidade da ração foram determinados a partir da análise do conteúdo total de nitrogênio pelo método de Kjeldahl (CECCHI, 1999).

Tabela 1. Composição das rações utilizadas no EXPERIMENTO I (AIN-93M modificada) (REEVES, 1997)

Ingredientes	Ração Controle	Suplementada	Suplementada
		+ 50% de LEU	+ 100% de LEU
		e PHE	e PHE
gramas por cada kg de ração			
Amido	612,142	612,142	603,592
Sacarose	100	100	100
Caseína	148,55	140	140
Óleo de Soja	40	40	40
Celulose	50	50	50
Mistura Salina	35	35	35
Mistura Vitamínica	10	10	10
L-Cistina	1,8	1,8	1,8
Bitartarato de Colina	2,5	2,5	2,5
Tetrabutylhidroquinona	0,008	0,008	0,008
L-Leucina		5,45	10,90
L-Fenilalanina		3,10	6,20

LEU, L-leucina; PHE, L-fenilalanina

5.1.3 Grupos experimentais

- **AL:** ingestão *ad libitum*. Animais com livre acesso à ração durante todo o experimento. Grupo de referência (n = 6).
- **PF:** ingestão controlada (*pair-fed*). Animais com acesso constante à ração, porém limitado, de acordo com a média do consumo dos grupos que variaram de peso (VP0, VP50, VP100). Grupo controle para a determinação do efeito da rotina alimentar de variação de peso (n = 6).
- **VP0:** *variação de peso e ração sem suplementação*. Animais foram submetidos à rotina de variação do peso corporal. Grupo controle para a determinação do efeito da suplementação com LEU+PHE, durante a rotina alimentar de variação de peso (n = 6).
- **VP50:** *variação de peso e suplementação de 50% com LEU + PHE*. Animais submetidos à rotina de variação do peso corporal e suplementados (+ 50%) com L-leucina e L-fenilalanina (n = 6).
- **VP100:** *variação de peso e suplementação de 100% com LEU + PHE*. Animais submetidos à rotina de variação do peso corporal e suplementados (+ 100%) com L-leucina e L-fenilalanina (n = 6).

5.1.4 Desenho experimental

Os grupos foram compostos, objetivando a homogeneidade na idade (nascimento e desmame) e no peso corporal inicial. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento. No período de adaptação (duração de 2 semanas), os animais tiveram livre acesso à ração, visando à adaptação dos mesmos à ração, às condições da sala e à manipulação. Desde a fase de adaptação, cada grupo recebeu sua respectiva ração.

Depois do período de adaptação, os animais dos grupos VP0, VP50 e VP100 foram submetidos à rotina de variação do peso corporal que consistia em 3 ciclos de perda e recuperação do peso corporal. Cada ciclo teve duração de 3 semanas e consistiu de 1 semana com restrição alimentar de 50%

(metade do consumo de ração que animais com livre acesso à comida costumam ingerir), seguida por 2 semanas de livre acesso à ração. No primeiro ciclo, a fase de recuperação de peso teve duração de 12 dias, ao passo que nos outros dois ciclos foi de 2 semanas. Dessa forma, a rotina de variação do peso corporal teve duração aproximada de 9 semanas (61 dias exatamente). O desenho experimental pode ser observado na Figura 6.

A quantidade de ração oferecida aos grupos VP0, VP50 e VP100, nas fases de perda de peso, foi determinada durante o período de adaptação e ajustada no decorrer do experimento conforme o consumo do grupo AL.

Figura 6. Desenho experimental do EXPERIMENTO I

A quantidade de ração oferecida aos animais do grupo PF foi determinada ao longo do experimento e sofria pequenos ajustes conforme a necessidade. O objetivo foi de fornecer ao grupo PF a mesma quantidade de ração que os grupos VP0, VP50 e VP100 ingeriram, mantendo, contudo, sua ingestão constante durante o andamento do experimento. Todos animais tiveram livre acesso à água durante o experimento.

5.1.5 Manipulação dos animais e determinação do peso corporal e do consumo de ração

Toda manipulação dos animais foi realizada em horário fixo, com início entre 12:00 e 13:00. Esse horário representou, aproximadamente, o meio da fase escura dos animais (ciclo invertido, luz acesa entre 20:00 e 8:00).

Os animais foram pesados 3 vezes por semana em uma balança com precisão de 0,1 g (Marte AL 5000). Nesses mesmos dias, a ração era providenciada e o consumo do período determinado. Para a avaliação do consumo de ração foi calculada a diferença entre a quantidade de ração colocada anteriormente e a restante, considerando-se o montante desperdiçado. Toda ração desperdiçada foi minuciosamente separada e pesada para cada animal, utilizando-se uma balança com precisão de 0,01 g.

Nos dias referentes ao período de restrição alimentar (primeira semana de cada ciclo de variação de peso dos grupos VP0, VP50 e VP100) e durante as 9 semanas de experimento para o grupo PF, a ração foi fornecida diariamente, em um único momento, caracterizando períodos semelhantes ao do modelo experimental conhecido como *meal-feeding* (BAZOTTE, BATISTA & CURI, 2000). A água dos bebedouros foi trocada 2 vezes por semana.

5.1.6 Sacrifício dos animais e coleta de sangue e tecidos

Em média, os animais foram mantidos em jejum de 14 horas, variando conforme o horário em que o animal foi sacrificado. A ração foi removida por volta das 24:00 e o sacrifício ocorreu pela manhã do dia seguinte.

Para minimizar possíveis interferências do tempo de jejum e do horário de sacrifício, a ordem dos animais sacrificados foi rotativa em relação aos grupos, ou seja, um animal de cada grupo era sacrificado até que se repetisse o mesmo grupo. Com isso, os grupos apresentaram, na média, o mesmo tempo de jejum.

Os animais foram sacrificados por decapitação, utilizando-se uma guilhotina apropriada. Não foi utilizado qualquer tipo de anestesia antes ou durante o sacrifício. Esse procedimento foi realizado de forma muito rápida,

visando minimizar qualquer forma de sofrimento ou estresse, por parte dos animais.

Após a decapitação, o sangue do tronco foi coletado em dois tubos distintos, um deles sem anticoagulante para obtenção da porção sérica do sangue, e o outro com 50 UI de heparina sódica (Roche) por mL de sangue, para obtenção da porção plasmática. A cada três animais sacrificados, as amostras eram centrifugadas (Jouan BR4i) a 3000 rotações/minuto, por 15 minutos, a 4 °C. Entre um animal e outro, os tubos para obtenção do soro eram mantidos a temperatura ambiente e os de plasma, em geladeira, até a centrifugação. Depois de centrifugados, os tubos eram mantidos em geladeira até o final do sacrifício, quando eram, então, separadas as respectivas porções séricas e plasmáticas de cada tubo. As amostras de soro e plasma foram devidamente armazenadas em microtubos do tipo eppendorf. Tomou-se o cuidado de se colocar em cada microtubo a quantidade necessária apenas para uma única análise, para evitar que a amostra tivesse que ser descongelada e congelada repetidas vezes.

Logo após a coleta de sangue, os músculos gastrocnêmio e sóleo de ambas as patas, além do fígado, foram rápida e cuidadosamente dissecados e coletados. Depois, uma porção padronizada do gastrocnêmio e do fígado foi cortada para a determinação do conteúdo de glicogênio nesses tecidos. Essa parte e o restante dos três tecidos citados foram pesados em balança analítica com precisão de 0,0001g (Ohaus), colocados individualmente em saquinhos plásticos, já devidamente identificados, e congelados em nitrogênio líquido. Desde a decapitação até o congelamento dos tecidos transcorria no máximo 5 minutos.

A região no músculo gastrocnêmio e no fígado (lobo direito), que foi cortada logo após a coleta, foi previamente definida a fim de se evitar erros a partir das diferenças regionais no conteúdo de glicogênio. Além disso, a amostra para a determinação do glicogênio foi cortada logo após o tecido ter sido dissecado para se evitar a dificuldade de padronização da região a ser utilizada na análise, quando este já se encontra congelado.

No intuito de preparar a carcaça para a composição corporal, todo o trato gastrointestinal foi limpo e lavado em solução salina, antes de ser devolvido

à carcaça. Nesse momento, a carcaça foi pesada em balança analítica com precisão de 0,01 g (Marte AL 5000).

As amostras de soro, plasma e tecidos dos animais foram armazenadas em freezer a -80 °C. A carcaça foi armazenada em freezer a -20 °C até a determinação da composição corporal.

5.2 EXPERIMENTO II

O EXPERIMENTO II teve como objetivo avaliar os efeitos, na composição corporal e em alguns parâmetros do estado nutricional protéico, da suplementação crônica na dieta com o aminoácido LEU, durante 6 semanas de 50% de restrição alimentar (metade do consumo *ad libitum*). Diferentemente do EXPERIMENTO I que também utilizou PHE, no EXPERIMENTO II buscou-se determinar o efeito isolado apenas da suplementação com LEU, uma vez que existem muitas pesquisas sobre LEU e praticamente nenhuma sobre LEU e PHE, em conjunto, permitindo, dessa forma, uma melhor comparação com os resultados do presente trabalho com os dados da literatura científica.

A hipótese do EXPERIMENTO II baseia-se no fato de que em situações predominantemente catabólicas, como, por exemplo, a restrição alimentar, ocorre inibição da síntese e do *turnover* protéico, o que em última instância pode afetar negativamente o estado nutricional protéico e reduzir o gasto energético. Esse último aspecto é considerado uma das adaptações que aumentam a EM, porém às custas do comprometimento de funções biológicas vitais, como o anabolismo protéico. Além disso, o organismo que gasta menos energia gera um déficit energético menor, levando à diminuição do ritmo de degradação dos estoques endógenos de gordura. Assim, como a LEU estimula a taxa de síntese protéica, foi determinado se a suplementação com LEU, durante a restrição alimentar de 50%, pode alterar favoravelmente a composição corporal e alguns parâmetros do estado nutricional protéico.

5.2.1 Animais

O EXPERIMENTO II foi realizado com 28 ratos Wistar machos e adultos, cujo peso, depois do período de adaptação, foi de 310 ± 11 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério de Produção e Experimentação da FCF e do IQ da USP. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente climatizado a 22 ± 2 °C, umidade relativa do ar $55 \pm 10\%$, com 15 a 20 trocas de ar por hora, com ciclo biológico de 12h claro/12h escuro e luz acesa às 07:00 horas, durante período de 9 semanas. Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da FCF-USP, segundo os princípios adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), em 07/03/2005 (Protocolo nº 61).

5.2.2 Ração

As dietas foram preparadas em nosso laboratório de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN-93M) (REEVES, 1997), formuladas para a manutenção de roedores. As rações, na forma de pó, foram fornecidas em coxos individuais.

Foram preparadas duas rações:

- **Ração controle:** formulação adaptada do AIN-93M.
- **Ração suplementada com 50% de LEU:** formulação adaptada do AIN-93M, com adição do aminoácido purificado LEU, a fim de aumentar a disponibilidade desse aminoácido na ração em 50%. Para cada quilograma de ração preparada, foram substituídos 5,91 g de amido por LEU.

O valor para suplementação com LEU no EXPERIMENTO II foi determinado a partir do aminograma realizado na caseína utilizada na preparação das rações (ANEXOS, Tabela 26). O aminograma foi realizado pela Ajinomoto do Brasil, a pedido de nosso laboratório. A composição e o valor calórico das rações foram semelhantes ao do EXPERIMENTO I. A Tabela 2 detalha a composição dessas rações.

O conteúdo protéico e a verificação da homogeneidade da ração foram determinados a partir da análise do conteúdo total de nitrogênio pelo método de Kjeldahl (CECCHI, 1999).

Tabela 2. Composição das rações utilizadas no EXPERIMENTO II (AIN-93M modificada) (REEVES, 1997)

Ingredientes	Ração	Suplementada
	Controle	com 50% de LEU
	Gramas por cada kg de ração	
Amido	620,692	614,782
Sacarose	100	100
Caseína	140	140
Óleo de Soja	40	40
Celulose	50	50
Mistura Salina	35	35
Mistura Vitamínica	10	10
L-Cistina	1,8	1,8
Bitartarato de Colina	2,5	2,5
Tetrabutylhidroquinona	0,008	0,008
L-Leucina (LEU)		5,91

5.2.3 Grupos experimentais

- **R-CON:** *grupo controle.* Ração AIN93-M. Animais submetidos à restrição alimentar de 50% (metade da ração ingerida por ratos com consumo *ad libitum*, oferecida de uma só vez no dia) (n = 15).
- **R-LEU:** *grupo suplementado com LEU.* Ração suplementada com 50% de LEU (acrécimo de 5,91 g de L-leucina/kg de ração). Animais submetidos à restrição alimentar de 50% (metade da ração ingerida por ratos com consumo *ad libitum*, oferecida de uma só vez no dia) (n = 13).

5.2.4 Desenho experimental

Durante período de 3 semanas, os animais foram mantidos em gaiolas individuais com acesso livre à ração controle. Esse período teve como objetivo a adaptação dos animais à ração na forma de pó, às condições da sala e à manipulação.

Após esse período, os animais foram distribuídos em dois grupos, conforme o peso corporal no final do período de adaptação. A partir desse ponto, cada grupo recebeu sua respectiva ração e a ingestão foi restrita a fim de gerar uma restrição alimentar de 50%, ou seja, restringir a ingestão à metade do que um animal de livre acesso à ração espontaneamente consumiria. O período de restrição alimentar teve duração de 6 semanas (Figura 7).

Figura 7. Desenho experimental do EXPERIMENTO II

A quantidade de ração oferecida aos animais foi determinada a partir da ingestão média de ratos com consumo *ad libitum*, de experimentos anteriores realizados pelo nosso laboratório e confirmada pela determinação do consumo na terceira semana de adaptação, quando os animais já apresentam um ganho de peso e consumo regulares. Os animais receberam exatamente 11,3 gramas de ração por dia, fornecido em um único momento, caracterizando um modelo experimental semelhante ao esquema *meal-feeding* (BAZOTTE, BATISTA & CURI, 2000). Vale ressaltar que o montante de ração fornecido já considerava a quantidade de ração que os animais desperdiçavam durante períodos de

restrição alimentar, mesmo que essa quantidade fosse muito pequena. Caso essa correção não fosse efetuada, a restrição alimentar a que os animais foram submetidos seria, na realidade, um pouco maior que 50%. Todos animais tiveram livre acesso à água durante o experimento.

5.2.5 Manipulação e sacrifício dos animais

Ao contrário do EXPERIMENTO I, a manipulação desses animais ocorreu no meio do período claro, porém também em um horário fixo, com início entre as 12:30 e 13:30 (luz acesa, 7:00-19:00). Os animais foram pesados semanalmente em balança com precisão de 0,1 g (Marte AL 5000). O consumo de ração foi determinado apenas na terceira semana de adaptação. Entretanto, a quantidade de ração desperdiçada durante o período de restrição alimentar, por observação empírica, foi mínima e equivalente entre os grupos. A água dos bebedouros foi trocada 2 vezes por semana.

Para o sacrifício, os animais receberam ração no dia anterior, como de habitual. Não foi necessária remoção dos coxos de ração, pois os animais ingeriam toda a ração diária disponível em no máximo 6 horas. Dessa forma, o tempo de jejum em que os animais foram submetidos equivale ao período entre o fornecimento de ração de um dia para o outro. Como um resumo, os animais receberam ração por volta das 13:00 e foram sacrificados entre 8:00 e 12:00 do dia seguinte, utilizando o mesmo procedimento de rotação de grupos, descrito no EXPERIMENTO I. O procedimento de sacrifício, coleta de sangue, obtenção e armazenagem de soro transcorreu conforme descrito no EXPERIMENTO I.

Foram coletados o fígado e os dois músculos gastrocnêmio. Depois de dissecados, esses tecidos foram pesados em balança com precisão de 0,0001 g (Ohaus), colocados individualmente em saquinhos plásticos, já devidamente identificados, e congelados em nitrogênio líquido. No intuito de preparar a carcaça para a composição corporal, todo o trato gastrointestinal foi limpo e lavado em solução salina. Além disso, coração, estômago, intestino, baço e rins foram pesados e, posteriormente, devolvidos à carcaça. Nesse momento, a carcaça foi pesada em balança com precisão de 0,01 g (Ohaus).

As amostras de soro e plasma foram armazenadas em freezer a -80 °C. Os tecidos dos animais foram armazenados em freezer a -20 °C. A carcaça foi separada, no mesmo dia, para o início da determinação da composição corporal.

5.3 EXPERIMENTO III

O objetivo do EXPERIMENTO III foi verificar se a adição na ração de LEU e PHE aumenta agudamente a secreção de insulina, em resposta à sua ingestão. Como já foi comentado na revisão da literatura, diversos estudos já verificaram que a PHE e, principalmente, a LEU aumentam a secreção de insulina e, em conjunto com glicose, promovem aumento sinérgico na liberação desse hormônio pelas células beta do pâncreas. Entretanto, o uso conjunto de LEU e PHE ainda não foi testado em ratos *in vivo*, nem a suplementação desses aminoácidos em compostos que contêm diversos nutrientes, como é o caso da ração. Portanto, o EXPERIMENTO III é original no sentido de estudar a resposta insulinêmica da adição conjunta de LEU e PHE na ração, em ratos *in vivo*.

Além disso, também se avaliou o efeito do tempo de jejum na cinética da secreção de insulina. Os dois tempos de jejum (4 ou 18 horas) foram escolhidos com o intuito de simular os períodos de jejum de animais em restrição alimentar (jejum prolongado) ou de animais com consumo *ad libitum*, que se alimentam freqüentemente (jejum curto).

Assim, resumidamente, o EXPERIMENTO III visou verificar se parte dos resultados obtidos nos EXPERIMENTO I e II pode ser atribuída a uma diferente dinâmica na secreção de insulina, induzida pela presença de LEU e PHE na ração.

5.3.1 Animais e ração

Para esse experimento agudo foram utilizados ratos Wistar machos e adultos com peso corporal próximo ao peso dos animais no EXPERIMENTO I (330 g na média), fornecidos pelo Biotério de Produção e Experimentação da FCF/IQ da USP. Esses animais permaneceram em sala climatizada nas mesmas condições que no EXPERIMENTO I, porém, sem sofrer qualquer intervenção com exceção de pesagem semanal. Os ratos foram mantidos em caixas com maravalha, contendo de 3 a 6 animais por caixa. Esses animais consumiram ração peletizada comercial (Nuvital) irradiada e água *ad libitum*. Esse período de adaptação teve duração de 2 a 5 semanas, até que os animais atingissem o peso necessário para o procedimento de canulação. A composição das rações foi igual às utilizadas no EXPERIMENTO I. Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da FCF-USP, segundo os princípios adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), em 19/11/2004 (Protocolo nº 49).

5.3.2 Grupos Experimentais

1) Grupos de jejum prolongado, simulando o tempo de jejum que normalmente ocorre durante períodos de restrição alimentar ou *meal-feeding*. O horário da coleta de sangue nesses grupos foi variável, pois, em geral, mais de um teste era realizado por dia. No entanto, houve revezamento entre os grupos quanto ao horário de início do procedimento para reduzir potenciais interferências em relação ao momento do dia em que sofreriam o teste e em relação ao tempo de jejum, pois, a ração era retirada sempre no dia anterior, no mesmo horário para todos os ratos que seriam testados no dia seguinte. Os grupos de jejum prolongado foram:

- **CONTROLE:** ração controle e tempo de jejum de 18 horas (n = 6).
- **LEU+PHE-50%:** Ração suplementada com 50% de LEU e PHE, igual à utilizada no EXPERIMENTO I e tempo de jejum de aproximadamente 18 horas (n = 6).

- **LEU+PHE-100%:** Ração suplementada com 100% de LEU e PHE, igual à utilizada no EXPERIMENTO I e tempo de jejum de aproximadamente 18 horas (n = 6).
- **SALINA:** Infusão intragástrica apenas de solução salina (NaCl 0,9%) e tempo de jejum de aproximadamente 18 horas (n = 5). Esse é um grupo de referência em relação à variação da concentração de insulina plasmática em resposta ao estresse da anestesia, do procedimento de canulação e das coletas de sangue, independentemente do tratamento (administração intragástrica de ração).

2) Grupos de jejum curto, simulando a condição de animais com consumo de ração *ad libitum*, que se alimentam em breves espaços de tempo. Os grupos de jejum curto foram:

- **CONTROLE-SJ:** ração controle e tempo de jejum de aproximadamente 4 horas. A sigla SJ significa grupo sem jejum prolongado (n = 4).
- **LEU+PHE-50%-SJ:** Ração suplementada com 50% de LEU e PHE, igual à utilizada no EXPERIMENTO I e tempo de jejum de aproximadamente 4 horas. A sigla SJ significa grupo sem jejum prolongado (n = 4).

5.3.3 Procedimento de canulação

5.3.3.1 Material

- Balança analítica para pesagem do animal e da quantidade de ração a ser administrada.
- Solução de anestesia contendo Hidrato de Cloral (Deg) a 50%, diluído em água deionizada.
- 1 seringa de 1 mL com agulha 0,45 X 13 mm para aplicação de anestesia intraperitoneal. Os procedimentos e material para a

anestesia estão de acordo com os recomendados pela literatura científica (SHIBUTANI, 2000).

- Solução salina (água deionizada com NaCl 0,9%) para diluição da ração.
- Ração a ser administrada.
- 1 seringa de 5 mL com agulha 1,60 X 40 mm para aplicação da ração diluída.
- Pipeta automática de 200 a 1000 μ L e sua respectiva ponteira.
- Solução salina acrescida de 10 UI de heparina sódica (Roche) por mL de solução, para limpeza e conservação da cânula entre as coletas.
- 1 tesoura cirúrgica convencional com ponta curva.
- 1 pinça cirúrgica convencional com ponta curva.
- 1 kelly curva pequena.
- 1 pinça de precisão (pinça de relojoeiro).
- 1 tesoura de precisão (oftalmológica). Essa tesoura é reconhecida por ter a ponta de uma tesoura pequena e o formato de pinça, para garantir precisão durante os cortes.
- Linha de costura convencional.
- Algodão.
- Solução salina para limpeza do local de canulação.
- Cânula de silicone 0,75 X 1,65 mm (RC Lab). O comprimento da cânula é de 13 cm, havendo duas marcas no lado esquerdo, indicando os comprimentos de 2,5 e 3 cm para orientação da extensão da introdução da cânula dentro da veia. Além disso, nesse mesmo lado, existe uma ponta na cânula, a fim de facilitar sua introdução, através do corte.
- Sonda plástica, tamanho P240, para administração intragástrica da ração diluída em solução salina.
- Luminária para garantir melhor visibilidade durante o procedimento.
- 4 seringas de 1 mL com agulha 0,80 X 25 mm, devidamente identificadas. Uma seringa serve para a coleta do sangue não sistêmico (descarte), uma para a coleta do sangue sistêmico

(utilizado nas determinações) e duas para infusão de solução salina para limpeza da cânula, além do vedamento da mesma (para não ocorrer sangramentos pela cânula).

- Suporte para apoio do rato anestesiado e rampa de aproximadamente 30° sob o suporte. A rampa foi confeccionada a partir de isopor e era colocada sob o suporte em que o animal estava preso, antes da administração da ração. O animal permanecia o restante do experimento na inclinação de 30°, pois isso evitava problemas de refluxo da ração. Como o rato estava sob efeito da anestesia, o refluxo poderia causar a morte do animal por afogamento, pois o mesmo perdia o reflexo de glutição. Além disso, essa inclinação não comprometia a pressão arterial, problema observado em inclinações mais acentuadas.
- Aquecedor para manter a temperatura ambiente, próxima ao animal, entre 30 a 33 °C. O aquecedor era importante, pois, com o animal sob efeito da anestesia, poderia haver comprometimento da manutenção de sua temperatura corporal, fato esse agravado pelas seguidas coletas de sangue. Tudo isso, poderia culminar em um quadro de hipotermia, comprometendo não só a qualidade das análises, mas também a sobrevivência do animal no decorrer do experimento.
- Banho para aquecer a solução salina com anticoagulante a 37 °C.
- Microtubos do tipo eppendorf, devidamente identificados, para armazenamento das amostras de sangue, em cada tempo. Uma vez que se desejava extrair a porção plasmática, era pipetado, previamente, 0,5 µL de heparina sódica (Roche) no fundo do tubo, representando aproximadamente 2,5 UI por microtubo ou 10 UI por mL de sangue coletado (coletas de ~250 µL de sangue).
- Isopor com gelo e estante para armazenar os microtubos durante as coletas.
- Cronômetro.
- Beckers para solução salina, água deionizada e solução de descarte, utilizados na limpeza das seringas e agulhas entre cada coleta.

5.3.3.2 Procedimento

Após o período de jejum referente a cada grupo experimental, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (Deg), na dosagem de 400 mg para cada kg de peso do rato (ou 800 mL de solução/kg.peso corporal), via injeção intraperitoneal. Essa dosagem está de acordo com a empregada na literatura científica (AROLA *et al.*, 1981; HINDLYCKE & JANSSON, 1992; FIELD *et al.*, 1993; SHIBUTANI, 2000).

Em poucos minutos o animal se encontrava anestesiado, condição confirmada por meio de testes de pressão na cauda e patas traseiras. Caso o animal reagisse, esperava-se entre 5 a 10 minutos até que a anestesia fizesse efeito, não sendo necessário, salvo 3 exceções (2 do grupo CONTROLE e 1 do grupo LEU+PHE-50%), reaplicação do anestésico. Nesses 3 casos, foi reaplicada uma dose equivalente a um terço da dose inicialmente administrada.

Posteriormente, o animal era preso, por meio de fita adesiva nas patas dianteiras, em uma estrutura de isopor para início da implantação da cânula. O procedimento para a canulação consistia de:

- 1) Remoção dos pêlos e da pele localizada acima da veia jugular direita.
- 2) Remoção de tecido adiposo e limpeza da região, onde a veia jugular está localizada.
- 3) Descolamento da face posterior da veia jugular, por meio de movimentos de *vulcionar* (abertura), com o lado sem corte da lâmina de uma tesoura cirúrgica, sem, no entanto, danificar a veia.
- 4) Passagem de duas linhas por baixo da veia jugular descolada. Com uma linha, fazia-se um nó na extremidade cranial, a fim de interromper o retorno sangüíneo da cabeça até o coração, pela veia do lado direito. Com a outra linha, apenas preparava-se um nó na extremidade caudal (o fluxo de sangue ainda não era interrompido).
- 5) Uma kelly curva pequena era utilizada para prender e esticar a veia jugular por meio da sobra de linha do nó na extremidade cranial.

- 6) Com o uso de pinça e de tesoura de precisão, era realizado um pequeno corte na veia jugular direita. Esse corte não podia ser grande, pois provocaria grave hemorragia, nem pequeno a ponto de não ser possível a introdução da cânula. Pode-se dizer que esse é o momento mais crítico do procedimento de canulação.
- 7) Após o corte, a cânula contendo solução salina e heparina sódica (Roche) (10 UI por mL de solução) no seu interior, era rapidamente introduzida pelo corte e o nó previamente preparado era, enfim, apertado para prender a cânula e evitar sangramento. Deve-se evitar apertar em demasia o nó, pois o fluxo sangüíneo, através da cânula, poderia ficar comprometido. A cânula era introduzida, com o lado contendo ponta, aproximadamente 2,5 cm. Caso a cânula excedesse essa distância havia risco de parada cardíaca. Por outro lado, se a cânula não fosse suficientemente inserida poderia haver comprometimento nas coletas de sangue.
- 8) O local da aplicação da cânula era limpo e um algodão, embebido em solução salina, era utilizado para tampar a região.

Uma vez que o rato estivesse canulado, a próxima etapa consistia da administração intragástrica de ração, porém, antes, era coletada a primeira amostra de sangue, referente à condição *baseline* ou tempo zero (T0).

Cada rato recebeu a ração respectiva a seu grupo na quantidade de 2 gramas de ração para cada kg de peso corporal. A ração foi diluída em solução salina (NaCl 0,9%), em um volume de 4 mL para cada kg de peso corporal. O grupo SALINA recebeu apenas solução salina no volume de 4 mL para cada kg de peso corporal. A ração, depois de pesada, era colocada dentro da seringa, seguida da adição da solução salina. Esse procedimento foi adotado, ao invés de misturar a ração previamente, para evitar problemas na qualidade da diluição. Dessa forma, ao se injetar todo o conteúdo da seringa, garantia-se que as dosagens desejadas eram de fato administradas. Além disso, as quantidades de ração e da solução salina foram corrigidas, acrescentado-se, respectivamente, 140 µg e 280 µL, calculados a partir do “volume-morto” representado pela sonda intragástrica.

Pouco antes da administração da ração, a seringa era vigorosamente agitada, o volume de ar dentro da seringa era descartado e a sonda, previamente umedecida para facilitar a passagem até o estômago, era introduzida através da boca do animal até que fosse percebido que a mesma atravessasse a entrada do estômago (óstio cárdico). Era importante que a ração fosse injetada dentro do estômago para evitar refluxo. Uma vez posicionada a sonda, a agulha da seringa contendo ração era rapidamente introduzida na sonda e o conteúdo injetado no estômago. A sonda era retirada e a partir desse momento, iniciava-se a contagem de tempo para as coletas de sangue. Vale ressaltar que a administração da ração deveria ser realizada o mais rápido possível, pois, pelo diâmetro da sonda, o animal não conseguia respirar, enquanto ele estivesse intubado.

Os tempos das coletas de sangue para a determinação da cinética da concentração de insulina plasmática, em resposta à administração intragástrica de ração, foram: 2,5, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos, além do tempo zero. Ou seja, no total, onze coletas de sangue.

O procedimento durante cada coleta de sangue consistia de:

- 1) Pouco antes do tempo da próxima coleta, a seringa que vedava a saída da cânula era removida.
- 2) Introdução da seringa (A) para a coleta do sangue não sistêmico, que era descartado. Na média, era coletado e descartado em torno de 200-250 μL de sangue.
- 3) Coleta de aproximadamente 250 μL de sangue com a seringa limpa (B). Esse sangue era utilizado para a dosagem de insulina.
- 4) Infusão na cânula de aproximadamente 200 μL de solução salina com anticoagulante. Essa etapa não ocorreu depois das coletas nos tempos T_{2,5} (não havia tempo suficiente) e T₁₂₀ (o animal seria sacrificado). Essa solução estava aquecida em banho a 41 °C. Até o momento da infusão, esperava-se que a solução atingisse aproximadamente 37 °C. A seringa (C) não era removida da cânula, até a próxima coleta, garantindo vedamento.
- 5) A agulha da seringa B era removida e o conteúdo de sangue era cuidadosamente colocado dentro de um microtubo do tipo eppendorf,

previamente identificado. O microtubo era fechado, levemente agitado, manualmente, e colocado em uma estante com gelo, até o momento da centrifugação.

- 6) A seringa B e sua agulha eram cuidadosamente limpas com água deionizada. A última lavagem era realizada com solução salina. Depois, eliminava-se todo o conteúdo residual de líquido dentro da seringa, para evitar a mínima diluição do sangue coletado. Utilizava-se uma agulha por rato e a seringa era trocada a cada 2-4 animais.
- 7) Limpava-se a seringa A (essa seringa era utilizada apenas para a coleta de descarte).
- 8) Cerca de 1 minuto antes da próxima coleta de sangue, coletava-se a solução salina com anticoagulante, que estava no banho a 41 °C, com a segunda seringa C. Nota-se que haviam duas seringas C, para que houvesse revezamento entre a seringa que vedava a cânula e aquela que continha solução salina para limpar a cânula entre as coletas.

Após a coleta T120, o animal era sacrificado por decapitação, ainda sob efeito de anestesia. Depois da coleta T20, as amostras eram centrifugadas nas mesmas condições descritas no EXPERIMENTO I. Isso também ocorria depois da coleta T60 (centrifugando-se as amostras T30, T45 e T60) e T120 (centrifugando-se as amostras T90, e T120). Com isso, transcorria no máximo 30-40 minutos da coleta até a centrifugação, embora as amostras estivessem constantemente no gelo. Depois de centrifugadas, coletava-se o plasma que era armazenado individualmente em microtubos. Esses ficavam em freezer a -8 °C até que todas as coletas do dia fossem realizadas e posteriormente eram guardadas em freezer a -80 °C, até a determinação da insulina plasmática. A determinação de cada ponto foi feita em uniplicata.

A Figura 8 resume o desenho experimental empregado no EXPERIMENTO III, representando a coleta de apenas um animal. Ressalta-se que os animais não vinham de qualquer tratamento prévio.

Figura 8. Esquema que ilustra os procedimentos empregados em cada rato no EXPERIMENTO III, para a determinação do efeito de diferentes rações e períodos de jejum na cinética da concentração de insulina plasmática

*, indica o momento em que a contagem de tempo era iniciada. ↑, indica os momentos das coletas de sangue

5.3.4 Determinação dos valores nos pontos da curva de secreção de insulina e da área sob a curva

Após a determinação da concentração de insulina plasmática, foi realizada, por grupo, o cálculo da média dos valores em cada tempo. Esses valores foram utilizados para fazer a curva da cinética da secreção de insulina.

Para o cálculo da área sob a curva, os 11 valores de cada rato foram computados (T0 a T120). A área sob a curva foi calculada separadamente para cada animal, com o auxílio do *software* GraphPad Prism versão 3.0 (GraphPad Software, Inc). Posteriormente, foi determinada a média dos valores da área sob a curva em cada grupo.

5.4 Determinação da composição corporal

A composição corporal dos animais foi determinada a partir da análise química da carcaça, a qual avaliou a quantidade absoluta e o percentual de umidade, proteína, lipídeo e cinzas, presentes na carcaça.

A carcaça consistiu de todo o corpo do animal, incluindo a cabeça, com exceção da amostra de sangue (aproximadamente 5 mL), do fígado e dos músculos gastrocnêmio e sóleo (ambas as patas), removidos para análises teciduais. Como já mencionado, o conteúdo gastrintestinal foi limpo e lavado em solução salina, antes de ser incluído à carcaça.

5.4.1 Umidade

A umidade foi determinada a partir da secagem de toda a carcaça em estufa ventilada (aproximadamente 70 °C) durante 7 dias. Para tanto, as carcaças foram colocadas individualmente em embalagens de papel alumínio. O tórax e o abdômen dos animais foram abertos ao máximo, para permitir uma secagem eficiente. As carcaças foram pesadas antes de serem colocadas na estufa e depois de terem sido dessecadas. A diferença entre os pesos é o valor absoluto de umidade (g). O percentual de umidade corporal foi calculada a partir do valor absoluto de umidade (g) dividido pelo peso corporal final (g).

$$\% \text{ umidade corporal} = \text{umidade absoluta (g)} \div \text{peso corporal final (g)}$$

5.4.2 Lipídeo

Toda a carcaça seca foi então picada, embrulhada em gaze e envolvida por papel filtro (Whatman). Por meio da técnica de extração, com éter etílico (Synth) como solvente, foi removido todo o lipídeo da carcaça, utilizando-se o aparelho de Soxhlet. Essa técnica consiste em colocar a amostra em um tubo extrator, adicionar éter etílico em um balão coletor que está agregado ao extrator e aquecer o balão com a finalidade de fazer o éter evaporar. O éter

atinge a amostra e condensa, pois o tubo extrator é resfriado externamente com água corrente. Ao condensar, o éter lava a amostra, extraindo lipídeo que se acumula no balão coletor.

Depois de 2 dias, o solvente foi eliminado por evaporação e o balão pesado. A diferença entre o peso do balão limpo, previamente determinado, e o balão com lipídeo forneceu o valor absoluto de gordura presente em toda a carcaça do animal. O percentual de gordura corporal foi calculada dividindo-se a quantidade de gordura na carcaça (g) pelo peso corporal final (g).

$$\% \text{ gordura corporal} = \text{gordura absoluta (g)} \div \text{peso corporal final (g)}$$

5.4.3 Proteína e massa magra

O restante da carcaça, sem umidade nem lipídeo, foi totalmente moído (moinho Ika Labortechnik M20). A amostra moída foi peneirada, apenas para remoção dos pêlos que poderiam reduzir sua homogeneidade. Esse processo resultou em um pó bastante uniforme, representando o conteúdo protéico de toda a carcaça.

A proteína na carcaça foi analisada por meio do método de Kjeldahl (CECCHI, 1999), que determina o teor de nitrogênio de origem orgânica de uma amostra. Essa técnica também foi utilizada para a determinação do conteúdo protéico e como teste da homogeneidade das rações. Em ambos os casos, as análises foram realizadas em quadruplicata.

Este método baseia-se na digestão da amostra com ácido sulfúrico, na presença do catalisador sulfato de cobre e de sulfato de potássio. Durante esse processo, o nitrogênio da proteína é reduzido em sulfato de amônia. Posteriormente, adiciona-se NaOH concentrado na amostra. O sulfato de amônia é destilado, ocorrendo liberação da amônia dentro de um volume conhecido de solução de ácido bórico (na presença de solução indicadora), formando borato de amônia. O borato de amônia formado é titulado com solução de ácido clorídrico (HCL). A normalidade do ácido foi de 0,1 N para a análise da carcaça e 0,02 N para a determinação do conteúdo de nitrogênio das rações.

Tanto para a ração (caseína como fonte de proteína) quanto para a carcaça, o percentual de nitrogênio encontrado foi multiplicado pelo fator arbitrário 6,25, para obtenção do percentual de proteína nas amostras, uma vez que o teor de nitrogênio, em ambos os casos, aproxima-se de 16% do conteúdo protéico total.

$$\% N = [(\text{mL HCL amostra} - \text{mL HCL branco}) \times N \times \text{FC} \times 14,007] \div \text{mg amostra}$$

- % N = percentual de nitrogênio da amostra
- mL HCL = volume gasto de ácido clorídrico
- N = normalidade do HCl. Ração – 0,02 N; carcaça – 0,1 N
- FC = fator de correção do ácido
- 14,007 = peso equivalente do nitrogênio
- mg amostra = massa da amostra analisada

$$\% \text{ Proteína} = \% N \times 6,25$$

- % Proteína = percentual de proteína da amostra
- % N = percentual de nitrogênio da amostra
- 6,25 = fator arbitrário indicativo do conteúdo de nitrogênio da amostra protéica (aproximadamente 16% do total)

O conteúdo absoluto de proteína na carcaça foi calculado de acordo com a seguinte formula:

$$\text{Proteína absoluta (g)} = [\text{carcaça seca (g)} - \text{lipídeo total (g)}] \times \% \text{ Proteína}$$

Deve-se notar que a % Proteína não indica o percentual de proteína corporal, mas sim o percentual de proteína na amostra da carcaça moída (base seca). O percentual de proteína corporal foi calculado a partir da massa de proteína absoluta (g) dividida pelo peso corporal final (g).

$$\% \text{ proteína corporal} = \text{proteína absoluta (g)} \div \text{peso corporal final (g)}$$

O valor absoluto da massa magra foi calculado a partir da diferença entre o peso corporal final (g) e o valor absoluto de lipídeo (g). O percentual de massa magra é a divisão entre seu valor absoluto pelo peso corporal final (g).

$$\text{Massa magra} = \text{peso corporal final (g)} - \text{gordura total (g)}$$

$$\% \text{ massa magra} = \text{massa magra (g)} \div \text{peso corporal final (g)}$$

5.4.4 Cinzas

O mesmo pó utilizado na determinação de proteína, proveniente da moagem da carcaça seca e sem gordura, foi utilizado para a obtenção da amostra de cinzas. Para tanto, aproximadamente 2 g do pó foram pesados em um cadinho, que foi colocado dentro de uma mufla à 550 °C, durante 12 horas. Posteriormente, o cadinho foi colocado dentro de um dessecador até atingir a temperatura ambiente, quando então o peso da amostra de cinzas foi determinado, a partir da diferença do peso da amostra antes de ter sido colocada na mufla. A determinação de cinzas foi realizada em duplicata. O percentual de cinzas foi calculado a partir da massa de cinzas absoluta (g) dividida pelo peso corporal final (g).

$$\% \text{ cinzas} = \text{massa de cinzas (g)} \div \text{peso corporal final (g)}$$

5.5 Parâmetros plasmáticos e séricos

Todos os parâmetros plasmáticos e séricos foram analisados em duplicata. A média da duplicata representa o valor de cada animal.

5.5.1 Glicose

A concentração de glicose plasmática foi determinada pelo método de BERGMEYER (1974) que consiste nas seguintes reações:

A antipirilquinonimina formada possui coloração vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra. Foi utilizado um kit comercial (LabTest – Glicose PAD) para aquisição dos reagentes usados nas reações. As amostras foram lidas em comprimento de onda de 505 nm (espectrofotômetro UV – Shimadzu mini 1240).

5.5.2 Triacilglicerol

A concentração de triacilglicerol sérico foi determinada por meio de kit comercial (LabTest – Triglicérides GPO-ANA). Esse método consiste nas seguintes reações:

A quinoneimina possui coloração violeta, cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de triacilglicerol. As amostras foram lidas em comprimento de onda 540 nm (espectrofotômetro UV – Shimadzu mini 1240).

5.5.3 Albumina

A concentração de albumina sérica foi determinada pelo método colorimétrico de verde de bromocresol (DOUMAS, WATSON & BIGGS, 1971). O procedimento consistiu em adicionar 25 µL do soro em 5 mL do reagente de cor, contendo solução de verde de bromocresol 0,60 mM (Merck), tampão de succinato 0,1 M (Merck) e surfactante não iônico 35%, em pH 4,0. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro UV (Shimadzu mini 1240) a 628 nm e as concentrações determinadas contra curva linear de calibração de albumina (Sigma), nas concentrações de 2, 3, 4, 5 e 6 g/dL.

5.5.4 Proteína total sérica

A concentração da proteína total no soro foi medida pelo método do reagente de biureto (sulfato de cobre a 10%) (HENRY, 1974). O princípio do método consiste na reação das ligações peptídicas das proteínas com o Cu^{2+} em meio alcalino, dando origem a um complexo de cor violeta, cuja intensidade de coloração é proporcional à concentração de proteína da amostra. As absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro UV (Shimadzu mini 1240) a 545 nm e as concentrações foram obtidas contra curva de calibração, realizada com um padrão de proteínas totais (LabTest).

5.5.5 Triiodotironina total

Para a determinação da concentração de triiodotironina (T_3 , 3,5,3'-triiodotironina) sérica total foi utilizado um kit comercial (DSL) para

radioimunoensaio com tubos revestidos para triiodotironina ACTIVE® para humanos, porém validado para ratos. O T3 foi marcado com ^{125}I .

O princípio do método de radioimunoensaio se baseia na competição entre um antígeno radioativo (quantidade conhecida) e um não radioativo (concentração que se deseja determinar) por um número fixo de sítios de ligação (anticorpo). A quantidade de antígeno radioativo ligado ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração de antígeno não marcado presente. A separação do antígeno livre e do ligado é feita por decantação ou aspiração dos tubos, nesse caso, revestidos com anticorpo.

O cálculo é realizado a partir da leitura de emissão de raios gama dos tubos. Esses valores são plotados em uma curva log-linear, obtida a partir da contagem de amostras-padrão, cujo intervalo de concentração deve ser suficiente para abranger todo o espectro de concentrações possíveis das amostras que se deseja determinar. Dessa forma, quanto maior for a emissão de raios gama, menor será a concentração da amostra desconhecida. Nesse sentido, a amostra da curva-padrão de maior contagem é aquela em que não é adicionado qualquer antígeno e a de menor contagem é o padrão que possui a maior concentração de antígeno, em ambos os casos, competindo contra uma mesma concentração de antígenos radioativos.

O limite de sensibilidade do kit é de 4,3 ng/dL. A leitura das amostras foi feita em um contador de cintilação gama (Beckman L600), durante 1 minuto.

5.5.6 Tiroxina livre

Para a determinação da concentração de tiroxina (T4, 3,5,3',5'-tetraiodotironina) sérica livre foi utilizado um kit comercial para radioimunoensaio (^{125}I) de fase sólida, com tubos revestidos para ligação do T4 não ligado à proteína (DPC). O kit é para dosagem de T4 livre em humanos, porém, pode ser adaptado ao uso veterinário. O princípio desse método e os cálculos foram iguais aos utilizados para determinação de T3 total.

O limite de sensibilidade do kit é de 0,01 ng/dL. As amostras foram lidas em contador de cintilação gama (Beckman L600), durante 1 minuto.

5.5.7 Insulina

No EXPERIMENTO I, a concentração de insulina foi determinada em duplicata, a partir de amostras de 100 μ L de soro. No EXPERIMENTO III, a concentração de insulina foi determinada no plasma, a partir de uma amostra de 50 μ L, em uniplicata. O volume de 50 μ L, segundo testes do fabricante, apresenta resultados praticamente idênticos aos de 100 μ L, ressaltando a confiabilidade do uso desse volume. Foi adicionada 50 μ L de solução tampão, fornecida pelo kit, para completar o volume para 100 μ L.

Foi utilizado um kit de radioimunoensaio específico para determinação da concentração de insulina em ratos (Linco), baseado na técnica de duplo anticorpo/PEG. O primeiro anticorpo foi obtido de porquinhos-da-índia, a partir de insulina de ratos altamente purificada, cuja sensibilidade é de pelo menos 0,1 ng/mL em amostras de 100 μ L. O segundo anticorpo foi obtido a partir do soro de cabras. A insulina foi marcada com 125 I. O princípio desse método e os cálculos para obtenção dos resultados foram os mesmos dos empregados na determinação de T3 total e T4 livre. No entanto, diferentemente dos kits anteriores, cujos tubos já vieram revestidos com anticorpo, no kit de insulina a determinação foi realizada em dois dias. No primeiro, ocorreu a competição entre a insulina marcada e a presente nas amostras, pela ligação com o anticorpo anti-insulina. No segundo dia, foi adicionada uma solução contendo anticorpo anti-IgG anti-insulina e PEG 3% para a precipitação da insulina. A leitura foi realizada em contador de cintilação gama (Beckman L600) durante 1 minuto.

5.5.8 Leptina

A concentração de leptina no soro foi determinada a partir de um kit comercial de radioimunoensaio específico para ratos (Linco), usando leptina de rato como padrão (0,5 – 50 ng/mL). O princípio do método e os procedimentos, tanto para a determinação, quanto para os cálculos foram semelhantes aos utilizados na determinação da concentração de insulina. As amostras foram

determinadas em uniplicata, após 1 minuto de leitura em contador de cintilação gama.

5.6 Parâmetros teciduais

Cada amostra foi analisada em duplicata. A média da duplicata representa o valor de cada animal.

5.6.1 Glicogênio

A determinação da concentração de glicogênio hepático e dos músculos gastrocnêmio e sóleo foi baseada no método descrito por HASSID & ABRAHAMS (1957). O princípio desta metodologia consiste em: 1) digestão das amostras de fígado e do músculo gastrocnêmio (~ 250 mg) em 1 mL de KOH 30%, e do músculo sóleo (~ 150 mg) em 0,75 mL de KOH 30%, em tubos de ensaio selados por bolas de vidro, durante 60 minutos em banho fervente; 2) precipitação do glicogênio com etanol 70%, em banho fervente; 3) hidrólise do glicogênio à glicose, com solução de antrona em ácido sulfúrico 1 M; 4) determinação colorimétrica da glicose a partir da reação com antrona que promove coloração esverdeada. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 540 nm (espectrofotômetro UV – Shimadzu mini 1240).

5.6.2 Proteína tecidual

A concentração da proteína hepática e do músculo gastrocnêmio foi determinada segundo o método colorimétrico descrito por LOWRY *et al.* (1951). O princípio consiste na hidrólise alcalina das proteínas da amostra e na formação de um complexo de cor azul, a partir da reação com o reagente de *Folin-Ciocalteu*. Assim, a intensidade da coloração desse complexo é proporcional à concentração de proteína da amostra. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 660 nm em espectrofotômetro UV (Shimadzu mini

1240). A quantidade de proteína da amostra foi calculada a partir de curva-padrão de albumina de soro bovino (Sigma).

5.6.3 RNA total

As concentrações de RNA total no fígado e no músculo gastrocnêmio foram determinadas pelo método descrito por MUNRO & FLECK (1966), a partir do sobrenadante, após o processo de extração de proteína da amostra. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 260 nm em espectrofotômetro UV (Shimadzu mini 1240). A concentração de RNA da amostra foi calculada a partir da concentração de proteína (μg de RNA/mg de proteína).

5.6.4 DNA total

As concentrações de DNA total no fígado e no músculo gastrocnêmio foram determinadas pelo método descrito por GENDIMENICO, BOUQUIN & TRAMPOSCH (1988). De modo sucinto, 500 μL da amostra, após a extração de proteína e RNA, foram adicionados a 1 mL do reagente difenilamina e incubados durante 3 horas à 50 °C. Posteriormente, a leitura da amostra foi realizada em comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro UV (Shimadzu mini 1240). A concentração de DNA da amostra foi calculada a partir de uma curva-padrão (0,625 – 60 μg de DNA) e padronizada pela concentração de proteína (μg de DNA/mg de proteína).

5.7 Índice de resistência à insulina (HOMA)

Para a determinação da resistência à insulina foi utilizado o índice conhecido como HOMA (*homeostasis model assessment*), que utiliza como parâmetros a glicemia e a insulinemia de jejum (MATTHEWS *et al.*, 1985). Para o cálculo, multiplica-se a concentração de glicose (mmol/L) com a concentração de insulina (ng/mL), e divide-se o valor resultante por 22,5. Quanto maior for o valor do índice, mais resistência à insulina o indivíduo ou o

animal apresenta. A validade e a utilidade desse modelo vêm sendo continuamente confirmadas (WALLACE, LEVY & MATTHEWS, 2004).

5.8 Análise estatística

Os dados experimentais foram primeiramente submetidos a um teste de normalidade e a homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Bartlett. Quando os dados de 3 ou mais grupos foram comparados, utilizou-se o teste de Análise de Variância – ANOVA *one-way*, sendo os contrastes identificados pelo teste de Tukey. Na comparação entre apenas 2 grupos, utilizou-se o teste de T-Student (*T-test*) não pareado e *two-tailed*. Os testes de Kruskal-Wallis e Dunns foram aplicados nos casos significativos para o teste de Bartlett. As correlações parciais entre os dados foram obtidas por meio de regressão linear (Pearson). Em todas as análises foi considerado um valor de alfa de 0,05. A análise estatística foi realizada no *software* GraphPad Prism versão 3.0 (GraphPad Software, Inc). Todos os resultados estão expressos como a média $\pm$ desvio-padrão. Os valores nas figuras e tabelas que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística.

6. RESULTADOS

6.1 EXPERIMENTO I

6.1.1 Conteúdo de proteína nas rações

Conforme pode ser observado na Tabela 3, as rações apresentaram conteúdo equivalente de proteína ($P = 0,8463$). Dessa forma, assumiu-se que as rações utilizadas no EXPERIMENTO I eram isoenergéticas e isonitrogenadas, ou seja, forneciam a mesma quantidade de calorias e nitrogênio.

Tabela 3. Conteúdo de proteína nas rações utilizadas no EXPERIMENTO I

	Conteúdo de Proteína (%)		
	CONTROLE	50%	100%
Média	12,36	12,17	12,31
DP	0,50	0,41	1,03

CONTROLE, ração AIN-93M modificada; 50%, ração com adição de 50% de L-leucina e L-fenilalanina; 100%, ração com adição de 100% de L-leucina e L-fenilalanina. DP, desvio-padrão (ANOVA, $P = 0,8463$)

6.1.2 Consumo de ração

A Figura 9 e a Tabela 4 apresentam o consumo de ração dos grupos experimentais, durante o estudo. Pode-se observar que os grupos VP0, VP50 e VP100 tiveram 3 momentos de restrição alimentar, seguidos por períodos em que o consumo de ração excedeu ao do grupo AL. Por outro lado, pode-se observar constância no consumo de ração do grupo PF.

Figura 9. Consumo de ração dos grupos durante todo o experimento

AL, consumo de ração controle *ad libitum*; PF, grupo *pair-fed* com ração controle; VP0, grupo que variou de peso e ração controle; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

Pode-se observar na Tabela 4 que o consumo de ração do grupo AL foi significativamente maior do que o consumo dos demais grupos, ao final do experimento (na média, 11,42% maior). Dessa forma, justifica-se a necessidade de adição do grupo PF, como um controle mais adequado, ao invés do grupo AL, para isolar apenas a variável “variação de peso”. A partir dos próximos dados, o grupo AL não foi considerado na análise estatística, mas utilizado apenas como um grupo de referência. Não houve diferença no consumo de ração entre os grupos PF, VP0, VP50 e VP100.

Tabela 4. Consumo de ração durante o experimento

	AL	PF	VP0	VP50	VP100	P
T1 (g/dia)	24,17 ^a ± 2,00	19,84 ^b ± 0,38	21,31 ^b ± 1,71	21,79 ^{ab} ± 1,96	20,40 ^b ± 1,57	0,0075
T2 (g/dia)	21,62 ± 1,75	19,38 ± 0,30	18,88 ± 0,97	19,74 ± 1,94	19,83 ± 1,41	0,1138
T3 (g/dia)	22,61 ^a ± 1,55	19,58 ^b ± 0,44	20,56 ^{ab} ± 1,32	20,46 ^{ab} ± 2,46	20,41 ^{ab} ± 1,79	0,0383
Período total (g/dia)	22,76 ^a ± 0,91	19,59 ^b ± 0,34	20,22 ^b ± 1,03	20,62 ^b ± 1,15	20,21 ^b ± 1,21	0,0001
Consumo acumulado durante todo período (g)	1388,2 ^a ± 55,6	1195,1 ^b ± 20,6	1233,1 ^b ± 63,0	1258,1 ^b ± 70,1	1232,6 ^b ± 73,5	0,0001

T1, T2 e T3 representam, respectivamente, o consumo médio no ciclo 1, ciclo 2 e ciclo 3. Dados expressos como média ± desvio-padrão. Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. AL, consumo de ração controle *ad libitum*; PF, grupo *pair-fed* com ração controle; VP0, grupo que variou de peso e ração controle; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

6.1.3 Peso corporal e ganho de peso

A Figura 10 apresenta a variação do peso corporal dos grupos durante todo o período experimental. Pode-se notar que os grupos AL e PF aumentam de peso de forma constante, ao passo que os grupos VP0, VP50 e VP100 passam pelos três ciclos de variação de peso, como pode ser observado pelas 3 quedas no peso corporal a partir dos dias 0, 19 e 40 (T0, T1 e T3, respectivamente).

Figura 10. Variação do peso corporal durante o experimento

AL, consumo de ração controle *ad libitum*; PF, grupo *pair-fed* com ração controle; VP0, grupo que variou de peso e ração controle; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

A Tabela 5 e a Figura 11 apresentam os valores do peso corporal e do ganho de peso médio diário dos grupos experimentais. O peso corporal e o ganho de peso apresentaram as mesmas tendências.

Figura 11. Média do ganho de peso diário dos grupos experimentais

Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. PF, grupo controle *pair-fed* com ração AIN93-M; VP0, grupo que variou de peso e ração AIN93-M; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

Observou-se que, ao final do experimento, o peso corporal e o ganho de peso do grupo VP50 foram significativamente maiores, quando comparados ao grupo PF. Não houve diferença estatística entre os demais grupos. Contudo, pode ser observado que todos os grupos que variaram de peso tenderam a apresentar um ganho de peso maior que o grupo PF. Os grupos VP0, VP50 e VP100 apresentaram, respectivamente, aumento no ganho de peso de 12,52%, 35,70% e 21,55% em relação ao grupo PF. O peso corporal dos grupos VP0, VP50 e VP100 foram, respectivamente, 5,93%, 13,13% e 7,58% maior do que o grupo PF.

Tabela 5. Peso corporal e média do ganho de peso diário dos grupos experimentais, durante todas as etapas do experimento

Peso Corporal (g)	PF	VP0	VP50	VP100	P
Início do período de adaptação	265 ± 20	269 ± 7	275 ± 22	265 ± 11	0,6953
T0 (dia 0), após adaptação	315 ± 13	327 ± 17	333 ± 25	324 ± 21	0,4636
T1 (dia 19)	350 ^a ± 16	366 ^{ab} ± 20	393 ^b ± 21	364 ^{ab} ± 29	0,0224
T2 (dia 40)	394 ± 16	401 ± 24	437 ± 30	417 ± 33	0,0506
T3 (dia 61)	418 ^a ± 16	442 ^{ab} ± 26	472 ^b ± 35	449 ^{ab} ± 37	0,0366
Média do Ganho de Peso Diário (g/dia)					
T1 (dia 19)	1,86 ^a ± 0,54	2,10 ^{ab} ± 0,44	3,19 ^b ± 0,92	2,11 ^{ab} ± 0,79	0,0162
T2 (dia 40)	2,08 ± 0,47	1,65 ± 0,90	2,06 ± 0,83	2,53 ± 0,19	0,2215
T3 (dia 61)	1,14 ± 0,26	1,97 ± 1,18	1,70 ± 0,77	1,52 ± 0,23	0,1434
Período total	1,69 ^a ± 0,31	1,90 ^{ab} ± 0,20	2,29 ^b ± 0,31	2,05 ^{ab} ± 0,32	0,0129
Ganho de peso acumulado (g)	102,9 ^a ± 18,6	115,8 ^{ab} ± 12,0	139,7 ^b ± 19,1	125,1 ^{ab} ± 19,7	0,0129

T0, T1, T2 e T3 representam, respectivamente, os períodos referentes ao início do experimento, ao ciclo 1, ao ciclo 2 e ao ciclo 3. Dados expressos como média ± desvio-padrão. Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. PF, grupo controle *pair-fed* com ração AIN93-M; VP0, grupo que variou de peso e ração AIN93-M; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

6.1.4 Variação do peso corporal durante os ciclos

A Tabela 6 apresenta as mudanças no peso corporal nos grupos VP0, VP50 e VP100, em cada momento dos 3 ciclos de variação de peso.

Tabela 6. Variação do peso corporal (g) durante os ciclos – períodos de perda de peso e períodos de recuperação do peso corporal

PERÍODOS DE PERDA DE PESO	VP0	VP50	VP100	P
1° Ciclo	-29,4 ± 3,7	-25,3 ± 11,3	-29,5 ± 7,0	0,5847
2° Ciclo	-26,5 ± 7,5	-31,4 ± 4,7	-24,4 ± 3,7	0,1116
3° Ciclo	-23,9 ± 15,1	-27,1 ± 8,9	-28,9 ± 5,3	0,7149
Somatória dos Ciclos	-79,8 ± 17,4	-83,8 ± 15,2	-82,8 ± 11,9	0,8924
PERÍODOS DE RECUPERAÇÃO DO PESO				
1° Ciclo	69,20 ^a ± 8,90	85,87 ^b ± 8,98	69,50 ^a ± 11,65	0,0158
2° Ciclo	61,15 ± 19,93	74,72 ± 18,70	77,50 ± 9,77	0,2279
3° Ciclo	65,23 ± 13,63	62,85 ± 17,93	60,88 ± 7,55	0,8608
Somatória dos Ciclos	195,58 ± 19,88	223,43 ± 31,95	207,88 ± 23,22	0,2003

Dados expressos como média ± desvio-padrão. Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. VP0, grupo que variou de peso e ração AIN93-M; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

Cada período de perda de peso causou redução significativa de aproximadamente 10% do peso corporal. Nas 2 semanas seguintes, que correspondiam ao período de recuperação de peso, os animais dos grupos variação de peso aumentaram acentuadamente de peso.

Pode-se observar que a suplementação com LEU e PHE, nas duas dosagens, não alterou a quantidade de peso reduzido durante as fases de perda de peso. A suplementação, especialmente na dosagem de 50%, aumentou a quantidade de peso ganho, durante os períodos de recuperação de peso. Contudo, como pode ser verificado na Tabela 6, houve diferença significativa apenas na recuperação de peso no primeiro ciclo. Dessa forma, pode-se dizer que a suplementação com LEU+PHE aumentou o ganho de peso dos animais durante o experimento, somente ao aumentar o ganho de peso na recuperação e não ao diminuir a quantidade de peso perdido nas fases de restrição alimentar.

6.1.5 Coeficiente de eficiência metabólica

O coeficiente de EM é a divisão entre o consumo médio diário e a média do ganho de peso diário dos animais. Esse coeficiente indica quantos gramas de ração ingeridos foram necessários para cada grama de peso aumentado. Dessa forma, quanto menor for o coeficiente de eficiência, menos comida o animal precisou comer para ganhar um peso equivalente, indicando aumento da EM.

Como pode ser observado na Tabela 7, o grupo VP50 apresentou o coeficiente de eficiência significativamente menor do que o grupo PF, indicando aumento em sua EM. Os outros grupos também apresentaram menor coeficiente de eficiência, porém os valores não foram estatisticamente significativos (Figura 12). A partir do coeficiente de EM, observou-se que os grupos VP0, VP50 e VP100 necessitaram, respectivamente, 10,30%, 23,76% e 16,08% menos ração para ganhar a mesma quantidade de peso corporal, comparado ao grupo PF. Uma vez que os animais apresentaram consumo de ração equivalente, o aumento da EM explica o maior ganho ponderal dos animais que variaram de peso.

Tabela 7. Valores do coeficiente de eficiência metabólica dos grupos experimentais

	PF	VP0	VP50	VP100	P
T1 (dia 19)	11,48 ± 3,44	10,50 ± 2,16	7,43 ± 2,68	10,54 ± 2,74	0,0979
T2 (dia 40)	9,73 ± 2,20	13,04 ± 8,38	11,02 ± 4,70	7,98 ± 0,96	0,1257
T3 (dia 61)	18,08 ± 4,96	12,44 ± 4,21	13,65 ± 4,63	13,57 ± 1,77	0,1162
Período total	11,94 ^a ± 2,20	10,71 ^{ab} ± 0,74	9,10 ^b ± 0,88	10,02 ^{ab} ± 1,35	0,0171

O coeficiente de eficiência é a divisão entre o consumo médio e a média do ganho de peso. Dados expressos como média ± desvio-padrão. Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. PF, grupo controle *pair-fed* com ração AIN93-M; VP0, grupo que variou de peso e ração AIN93-M; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

Figura 12. Valores referentes ao coeficiente de eficiência metabólica dos grupos experimentais

Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. PF, grupo controle *pair-fed* com ração AIN93-M; VP0, grupo que variou de peso e ração AIN93-M; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

6.1.6 Composição corporal

Os valores da composição corporal são apresentados na Tabela 8 de forma absoluta e em relação ao peso corporal no final do experimento.

Tabela 8. Valores da composição dos animais dos grupos experimentais

	PF	VP0	VP50	VP100	P
% Gordura	15,8 ± 3,1%	19,8 ± 5,7%	16,3 ± 2,1%	16,4 ± 1,4%	0,7803
% Massa magra	84,2 ± 3,1%	80,2 ± 5,7%	83,7 ± 2,1%	83,6 ± 1,4%	0,7803
% Proteína	18,6 ± 1,0%	17,8 ± 1,4%	19,6 ± 1,2%	20,3 ± 3,3%	0,1613
% Umidade	58,1 ± 3,3%	52,7 ± 6,3%	52,1 ± 5,7%	54,1 ± 6,0%	0,2501
Gordura (g)	64,9 ± 12,7	88,4 ± 29,4	77,2 ± 11,8	71,2 ± 7,6	0,2986
Massa magra (g)	345,7 ^a ± 25,6	354,1 ^{ab} ± 17,8	395,3 ^b ± 30,4	365,0 ^{ab} ± 39,4	0,0426
Proteína (g)	76,3 ^a ± 6,6	78,4 ^a ± 3,4	92,3 ^b ± 7,4	88,7 ^{ab} ± 19,1	0,0089
Umidade (g)	238,7 ± 18,8	232,6 ± 24,7	246,4 ± 34,5	236,5 ± 37,5	0,8768

Os valores estão expressos em termos absolutos (g) e em termos relativos (percentual do peso corporal). Dados expressos como média ± desvio-padrão. Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. PF, grupo controle *pair-fed* com ração AIN93-M; VP0, grupo que variou de peso e ração AIN93-M; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

6.1.6.1 Gordura

Observa-se na Tabela 8 que o percentual de gordura corporal não diferiu significativamente entre os grupos. Todavia, o percentual de gordura do grupo VP0 foi 24,75% maior em relação ao grupo PF, enquanto nos grupos VP50 e VP100 esse valor foi de +3,16% e +3,28%, respectivamente. Ou seja, houve

tendência da suplementação com LEU e PHE minimizar o aumento no percentual de gordura corporal, provocado pela rotina de variação de peso.

A quantidade absoluta de gordura é apresentada na Tabela 8 e na Figura 13, mostrando que os grupos VP0, VP50 e VP100 terminaram o experimento com a quantidade de gordura 36,09%, 18,95% e 9,64% maior do que o grupo PF. Não houve diferença significativa entre os grupos na quantidade de gordura total, porém nota-se tendência da rotina de variação de peso de aumentar a gordura na carcaça e tendência da suplementação com LEU+PHE de minimizar a deposição de gordura, induzida por essa rotina alimentar.

Figura 13. Quantidade de gordura total (g) na carcaça

PF, grupo controle *pair-fed* com ração AIN93-M; VP0, grupo que variou de peso e ração AIN93-M; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

6.1.6.2 Massa magra

A Tabela 8 apresenta o percentual de massa magra na carcaça dos animais. Não houve diferença estatística entre os grupos. O percentual de massa magra foi 4,66%, 0,59% e 0,62% menor nos grupos VP0, VP50 e VP100, respectivamente, comparados ao grupo PF.

A Tabela 8 e a Figura 14 apresentam os valores referentes à quantidade de massa magra presente na carcaça ao final do experimento. A massa magra do grupo VP50 foi significativamente maior, comparado ao grupo PF, não havendo diferença entre os demais grupos. A massa magra foi 2,43%, 14,35% e 5,58% maior nos grupos VP0, VP50 e VP100, respectivamente, em relação ao grupo PF.

Figura 14. Valor absoluto de massa magra na carcaça dos animais nos grupos experimentais

Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. PF, grupo controle *pair-fed* com ração AIN93-M; VP0, grupo que variou de peso e ração AIN93-M; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

6.1.6.3 Proteína

Observa-se na Tabela 8 que o percentual de proteína na carcaça do grupo VP0 apresentou redução de 4,25%, enquanto os grupos VP50 e VP100 apresentaram, respectivamente, aumento de 5,33% e 9,37% nessa variável, quando comparados ao grupo PF. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos.

A Tabela 8 e a Figura 15 apresentam os valores absolutos da quantidade de proteína presente na carcaça. Observou-se aumento na quantidade de proteína de 2,85%, 21,06% e 16,35%, respectivamente, para os grupos VP0, VP50 e VP100, comparados ao grupo PF. Porém, apenas o grupo VP50 apresentou aumento significativo, em relação aos grupos PF e VP0.

Figura 15. Quantidade de proteína na carcaça dos animais

Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. PF, grupo controle *pair-fed* com ração AIN93-M; VP0, grupo que variou de peso e ração AIN93-M; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

Comparando-se os grupos VP50 e VP100, ambos suplementados com LEU+PHE, observou-se aumento no percentual de proteína corporal na ordem de 10,01% e 14,23%, respectivamente, quando comparados ao grupo VP0 (ração controle AIN93-M). Em termos absolutos, os grupos VP50 e VP100 aumentaram a quantidade de proteína na carcaça, respectivamente, em 17,71% e 13,13%, quando comparados ao grupo VP0. Esses resultados indicam um possível efeito dos aminoácidos no aumento da quantidade e no percentual de proteína corporal.

6.1.6.4 Umidade

Pode-se observar na Tabela 8 que o percentual de umidade corporal e a quantidade absoluta de umidade na carcaça não apresentaram diferença significativa entre os grupos. O percentual de umidade foi 9,29%, 10,41% e 6,88% menor nos grupos VP0, VP50 e VP100, respectivamente, em relação ao grupo PF. A quantidade absoluta de umidade foi 3,23% maior no grupo VP50, comparado ao grupo PF, ao passo que esse valor foi 2,56% e 0,92% menor nos grupos VP0 e VP100, respectivamente, em relação ao grupo PF.

6.1.7 Peso de tecidos e órgãos

Não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao peso do fígado e dos músculos sóleo e gastrocnêmio, tanto em termos absolutos, quanto em termos relativos ao peso corporal (Tabela 9).

De uma forma geral, pode-se notar que há uma tendência do peso dos músculos gastrocnêmio e sóleo e, especialmente do fígado, em termos relativos ao percentual do peso corporal, de estarem reduzidos nos grupos que variaram de peso, comparados ao grupo PF.

Tabela 9. Peso e valores relativos ao peso corporal do fígado e dos músculos gastrocnêmio e sóleo

	PF	VP0	VP50	VP100	P
Fígado (% do peso corporal)	3,09 ± 0,15%	2,43 ± 0,41%	2,56 ± 0,51%	2,48 ± 0,57%	0,0635
Músculo Sóleo* (% do peso corporal)	0,080 ± 0,006%	0,076 ± 0,006%	0,075 ± 0,007%	0,076 ± 0,003%	0,3897
M. Gastrocnêmio* (% do peso corporal)	1,34 ± 0,03%	1,20 ± 0,12%	1,21 ± 0,13%	1,18 ± 0,13%	0,1169
Fígado (g)	11,890 ± 0,895	10,350 ± 1,270	11,660 ± 2,321	10,640 ± 1,647	0,3025
Músculo Sóleo* (g)	0,314 ± 0,027	0,326 ± 0,042	0,344 ± 0,055	0,330 ± 0,026	0,6237
Músculo Gastrocnêmio* (g)	5,270 ± 0,232	5,109 ± 0,131	5,508 ± 0,432	5,108 ± 0,563	0,1628

*, representam a soma dos músculos de ambas as pernas. Dados expressos como média ± desvio-padrão. PF, grupo controle *pair-fed* com ração AIN93-M; VP0, grupo que variou de peso e ração AIN93-M; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

6.1.8 Glicogênio

A Tabela 10 apresenta os valores referentes à concentração de glicogênio hepático e nos músculos gastrocnêmio e sóleo.

Tabela 10. Concentração de glicogênio hepático e nos músculos gastrocnêmio e sóleo

	PF	VP0	VP50	VP100	P
Glicogênio Gastro. (mg/100 mg de tecido)	0,096 ± 0,034	0,098 ± 0,063	0,116 ± 0,061	0,066 ± 0,027	0,3897
Glicogênio Sóleo (mg/100 mg de tecido)	0,076 ^a ± 0,006	0,149 ^{ab} ± 0,064	0,166 ^b ± 0,073	0,139 ^{ab} ± 0,048	0,0396
Glicogênio Hepático (mg/100 mg de tecido)	2,103 ^a ± 1,412	0,334 ^{ab} ± 0,239	0,286 ^b ± 0,167	0,251 ^b ± 0,214	0,0087

Dados expressos como média ± desvio-padrão. Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. PF, grupo controle *pair-fed* com ração AIN93-M; VP0, grupo que variou de peso e ração AIN93-M; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

6.1.8.1 Glicogênio do músculo gastrocnêmio

Não houve diferença significativa em relação ao conteúdo de glicogênio no músculo gastrocnêmio, conforme pode ser observado na Tabela 10. Os grupos VP0 e VP50 apresentaram, respectivamente, aumento de 2,08% e 20,83% nesse parâmetro, em relação ao grupo PF. Já o grupo VP100 apresentou redução de 31,25% no conteúdo de glicogênio no gastrocnêmio, comparado ao grupo PF. Ao comparar o efeito da suplementação com LEU+PHE nessa variável, observou-se que o grupo VP50 aumentou o glicogênio em 18,37% e o grupo VP100 reduziu em 32,65%, comparados ao grupo VP0.

6.1.8.2 Glicogênio do músculo sóleo

Observou-se aumento na concentração de glicogênio no músculo sóleo nos grupos que variaram de peso, comparados ao grupo PF (Tabela 10 e Figura 16). Contudo, esse aumento foi significativo apenas entre os grupos VP50 e PF. De uma forma geral, houve aumento no conteúdo de glicogênio no sóleo de 96,05%, 118,42% e 82,89%, respectivamente, para os grupos VP0, VP50 e VP100, em relação ao grupo PF.

Figura 16. Concentração de glicogênio no músculo sóleo

Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. PF, grupo controle *pair-fed* com ração AIN93-M; VP0, grupo que variou de peso e ração AIN93-M; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

6.1.8.3 Glicogênio hepático

A Tabela 10 e a Figura 17 apresentam os valores referentes ao conteúdo de glicogênio hepático. Ao se considerar o valor do grupo de referência AL ($0,287 \pm 0,222$; média $\pm$ desvio-padrão), pode-se observar que o glicogênio hepático no grupo PF estava elevado (grupo AL versus PF, $P = 0,01$). Os grupos que variaram de peso não apresentaram diferença

significativa em relação ao grupo de referência AL (grupos VP0, VP50 e VP100 versus grupo AL, $P > 0,05$). Dessa maneira, o conteúdo de glicogênio hepático apresentou alteração apenas no grupo PF, ao passo que os grupos que variaram de peso mantiveram esse parâmetro na faixa de normalidade (ratos de consumo *ad libitum*).

Houve diferença significativa apenas entre o grupo PF e os grupos VP50 e VP100. A diferença entre o grupo PF e os demais é bastante elevada, chegando a ser 6,3, 7,4 e 8,4 vezes maior que nos grupos VP0, VP50 e VP100, respectivamente.

Figura 17. Concentração de glicogênio no fígado

Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. PF, grupo controle *pair-fed* com ração AIN93-M; VP0, grupo que variou de peso e ração AIN93-M; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

6.1.9 Proteína muscular (gastrocnêmio)

A Figura 18 apresenta os valores da concentração de proteína muscular, analisada no gastrocnêmio. Observou-se que os grupos que variaram de peso apresentaram maior concentração de proteína muscular, porém houve

diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos VP100 e PF. Assim, os grupos VP0, VP50 e VP100 apresentaram, respectivamente, aumento de 4,78%, 1,62% e 6,88% na concentração de proteína no músculo gastrocnêmio, quando comparados ao grupo PF.

Figura 18. Concentração de proteína no músculo gastrocnêmio

Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. PF, grupo controle *pair-fed* com ração AIN93-M; VP0, grupo que variou de peso e ração AIN93-M; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

6.1.10 Proteína hepática

Da mesma forma que a concentração de proteína muscular, a Figura 19 mostra que a rotina de variação do peso corporal aumentou a concentração de proteína no fígado, porém não ocorreu diferença estatisticamente significativa.

Os grupos VP0, VP50 e VP100 aumentaram a concentração protéica no fígado em 17,24, 4,45 e 11,62%, respectivamente, comparados ao grupo PF.

Figura 19. Concentração de proteína no fígado

PF, grupo controle *pair-fed* com ração AIN93-M; VP0, grupo que variou de peso e ração AIN93-M; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

6.1.11 Parâmetros plasmáticos e séricos

Observou-se que a concentração de glicose plasmática não diferiu significativamente entre os grupos. A concentração de triacilglicerol no soro não apresentou diferença estatística entre os grupos, oscilando dentro da faixa de normalidade, observada durante o jejum. Não houve diferença em relação à concentração de albumina sérica. O mesmo aconteceu com a concentração de proteína total no soro (Tabela 11).

Tabela 11. Concentração de glicose plasmática e de triacilglicerol, albumina e proteína total no soro

Parâmetros Plasmáticos	PF	VP0	VP50	VP100	P
Glicose (mg/dL)	122,3 ± 10,2	121,4 ± 12,5	127,4 ± 9,6	121,9 ± 5,4	0,6965
Parâmetros Séricos					
Triacilglicerol (mg/dL)	102,3 ± 28,7	80,9 ± 9,1	110,1 ± 44,7	80,5 ± 20,1	0,3865
Albumina (g/dL)	4,48 ± 0,08	4,45 ± 0,17	4,46 ± 0,16	4,49 ± 0,12	0,9578
Proteína Total (g/dL)	7,44 ± 0,45	6,92 ± 0,62	7,27 ± 0,93	6,78 ± 0,60	0,3262

Dados expressos como média ± desvio-padrão. PF, grupo controle *pair-fed* com ração AIN93-M; VP0, grupo que variou de peso e ração AIN93-M; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

6.1.12 Triiodotironina total

A Figura 20 apresenta os valores da concentração de triiodotironina (T3) total no soro. Observou-se que a concentração de T3 total foi significativamente menor nos grupos VP0, VP50 e VP100, comparados ao grupo PF. Isso representa uma concentração de T3 23,94%, 15,93% e 24,53% menor, respectivamente, nos grupos VP0, VP50 e VP100, em relação ao grupo PF. Não houve diferença estatística entre os grupos que variaram de peso.

Ao se considerar o valor do grupo de referência AL ($187,2 \pm 17,4$; média ± desvio-padrão), pode-se observar que a concentração de T3 total no soro do grupo PF estava elevada (grupo AL versus PF, $P < 0,05$). Os grupos que variaram de peso não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo de AL (grupos VP0, VP50 e VP100 versus grupo AL, $P > 0,05$). Assim, enquanto que a concentração de T3 total no soro dos grupos que variaram de

peso se mantiveram próximas aos valores de ratos com consumo *ad libitum* de ração, o grupo PF apresentou aumento significativo nesse parâmetro.

Figura 20. Concentração de triiodotironina (T3) total no soro

Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. PF, grupo controle *pair-fed* com ração AIN93-M; VP0, grupo que variou de peso e ração AIN93-M; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

6.1.13 Tiroxina livre

A Tabela 12 apresenta a concentração de tiroxina (T4) livre no soro. Não houve diferença significativa nesse parâmetro entre os grupos experimentais. Ao se considerar o valor do grupo de referência AL ($2,28 \pm 0,30$; média $\pm$ desvio-padrão), pode-se observar que a concentração de T4 livre no soro não apresentou variação significativa entre os grupos experimentais (grupos PF, VP0, VP50 e VP100 versus grupo AL, $P > 0,05$), permanecendo na faixa dos valores encontrados em animais com consumo *ad libitum* de ração.

Tabela 12. Concentração de tiroxina (T4) livre no soro

	PF	VP0	VP50	VP100	P
Tiroxina Livre no Soro (ng/dL)	2,30 ± 0,37	2,55 ± 0,38	2,65 ± 0,82	2,57 ± 0,37	0,6848

Dados expressos como média ± desvio-padrão. PF, grupo controle *pair-fed* com ração AIN93-M; VP0, grupo que variou de peso e ração AIN93-M; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

6.1.14 Insulina

Não houve diferença significativa entre os grupos em relação a concentração de insulina sérica (Tabela 13). Os valores observados estão dentro da faixa de normalidade para ratos em jejum com consumo de ração *ad libitum* (grupo de referência AL, $1,20 \pm 0,14$; média ± desvio-padrão; grupos PF, VP0, VP50 e VP100 versus grupo AL, $P > 0,05$).

Após o cálculo da correlação parcial, foi observado que a concentração de insulina sérica apresentou valor diretamente proporcional à quantidade de gordura na carcaça dos animais ($r = 0,5523$, $P = 0,0063$).

Tabela 13. Concentração de insulina sérica

	PF	VP0	VP50	VP100	P
Insulina Sérica (ng/mL)	1,26 ± 0,33	1,83 ± 0,50	1,90 ± 0,35	1,30 ± 0,11	0,4850

Dados expressos como média ± desvio-padrão. PF, grupo controle *pair-fed* com ração AIN93-M; VP0, grupo que variou de peso e ração AIN93-M; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

6.1.15 Índice de resistência à insulina (HOMA)

Pode-se observar na Tabela 14 que o índice HOMA não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais. Os grupos VP0, VP50 e VP100 apresentaram, respectivamente, valores 102%, 60% e 4% maiores que o grupo PF. Os resultados do índice HOMA estão dentro da faixa de normalidade para ratos em jejum com consumo de ração *ad libitum* (grupo de referência AL, $0,361 \pm 0,129$; média $\pm$ desvio-padrão; grupos PF, VP0, VP50 e VP100 versus grupo AL, $P > 0,05$).

Observou-se correlação significativa entre o índice HOMA e a quantidade ($r = 0,4773$, $P = 0,0213$) e o percentual de gordura corporal ($r = 0,4978$, $P = 0,0156$). Além disso, o valor do índice HOMA foi diretamente proporcional à concentração de glicogênio no músculo gastrocnêmio ($r = 0,4877$, $P = 0,0073$) e no músculo sóleo ($r = 0,3472$, $P = 0,0649$). Não houve correlação entre o índice HOMA e a concentração de glicogênio hepático ($r = -0,2134$, $P = 0,2663$).

Tabela 14. Índice de resistência à insulina por meio da determinação do HOMA (*homeostasis model assessment*)

	PF	VP0	VP50	VP100	P
Índice HOMA	0,387 $\pm$ 0,240	0,781 $\pm$ 0,530	0,619 $\pm$ 0,311	0,402 $\pm$ 0,093	0,2847

O valor do HOMA apresenta correlação positiva com a resistência à insulina. Utiliza-se a glicemia e a insulinemia de jejum para seu cálculo. Dados expressos como média $\pm$ desvio-padrão. PF, grupo controle *pair-fed* com ração AIN93-M; VP0, grupo que variou de peso e ração AIN93-M; VP50, grupo que variou de peso e ração suplementada com 50% de leucina e fenilalanina; VP100, grupo que variou de peso e ração suplementada com 100% de leucina e fenilalanina (n = 6 ratos/grupo)

6.2 EXPERIMENTO II

6.2.1 Conteúdo de proteína nas rações

Diferentemente do que ocorreu no EXPERIMENTO I, a ração suplementada com aminoácido no EXPERIMENTO II apresentou maior conteúdo protéico, comparada à ração CONTROLE ($P = 0,0024$), conforme pode ser observado na Tabela 15. Uma vez que não foi corrigido o conteúdo protéico da ração CONTROLE, era esperado aumento na concentração de proteína na ração suplementada com LEU.

Tabela 15. Conteúdo protéico das rações utilizadas no EXPERIMENTO II

Conteúdo de Proteína (%)		
	CONTROLE	50% LEU
Média	12,35	12,82*
Desvio-Padrão	0,35	0,29

*, diferença significativa em relação à ração CONTROLE ($P = 0,0024$). CONTROLE, ração AIN93-M; 50% LEU, ração AIN93-M adaptada, suplementada com 50% de L-leucina

6.2.2 Peso corporal

Pode-se observar na Tabela 16 e na Figura 21 que os grupos iniciaram o experimento com o mesmo valor do peso corporal ($P = 0,6134$). Ao final das 6 semanas de restrição alimentar de 50%, os grupos não apresentaram diferença significativa em relação ao peso corporal final ($P = 0,1453$) e no total de peso perdido ($P = 0,1191$). Além disso, não houve diferença significativa no peso e na redução ponderal entre os grupos em qualquer etapa do EXPERIMENTO II (Figura 21).

Tabela 16. Valores referentes ao peso corporal no início e final do experimento, além do peso corporal perdido durante as 6 semanas de restrição alimentar

	R-CON	R-LEU	P
Peso Corporal Inicial (g)	309,4 ± 11,3	311,5 ± 11,3	0,6134
Peso Corporal Final (g)	277,4 ± 11,3	269,6 ± 16,1	0,1453
Redução Ponderal (g)	-32,0 ± 16,5	-42,0 ± 16,2	0,1191

Dados expressos como média ± desvio-padrão. R-CON, grupo com ração controle (n = 15); R-LEU, grupo suplementado com 50% de L-leucina (n = 13)

Figura 21. Peso corporal no decorrer do EXPERIMENTO II

R-CON, grupo com ração controle (n = 15); R-LEU, grupo suplementado com 50% de L-leucina (n = 13)

6.2.3 Peso de tecidos e órgãos

Os dados referentes ao peso de tecidos e órgãos, bem como o percentual que esses valores representam do peso corporal final são apresentados na Tabela 17. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação a nenhuma dessas variáveis, com exceção do valor do peso dos músculos sóleo, no qual o grupo R-LEU apresentou valor significantemente maior que o grupo R-CON (valor absoluto, +12,8%, $P = 0,0017$; valor relativo, +9,5%, $P = 0,0107$).

6.2.4 Composição corporal

Os valores da composição corporal estão apresentados na Tabela 18 em termos absolutos (g) ou como percentual da massa da carcaça.

Não houve diferença significativa entre os grupos nos valores de umidade e proteína total. O grupo R-LEU apresentou aumento significativo no percentual de cinzas, porém o valor absoluto não diferiu significantemente entre os grupos.

A Figura 22 mostra a quantidade absoluta de gordura presente na carcaça dos animais. Foi observada redução significativa na quantidade (-24,5%) e no percentual (-22,6%) de gordura corporal no grupo R-LEU, comparado ao R-CON.

De forma concomitante à redução significativa no percentual de gordura corporal, houve aumento no percentual de massa magra no grupo suplementado com LEU (Tabela 18). No entanto, o valor absoluto de massa magra não foi diferente entre os grupos experimentais (Tabela 18).

Tabela 17. Peso de tecidos e órgãos e o percentual que esses valores representam do peso corporal final

	R-CON	R-LEU	P
Fígado (% do peso corporal)	2,673 ± 0,237%	2,611 ± 0,229%	0,4918
Coração (% do peso corporal)	0,264 ± 0,025%	0,280 ± 0,025%	0,1076
Estômago (% do peso corporal)	0,622 ± 0,052%	0,630 ± 0,073%	0,7237
Intestino (% do peso corporal)	2,082 ± 0,464%	2,058 ± 0,394%	0,8834
Baço (% do peso corporal)	0,173 ± 0,019%	0,182 ± 0,018%	0,2100
Rins* (% do peso corporal)	0,657 ± 0,035%	0,657 ± 0,054%	0,9840
Músculo Sóleo* (% do peso corporal)	0,087 ± 0,007%	0,098 ± 0,009%	♦ 0,0017
Músculo Gastrocnêmio* (% do peso corporal)	1,362 ± 0,050%	1,384 ± 0,095%	0,8178
Fígado (g)	7,428 ± 0,878	7,066 ± 1,000	0,3171
Coração (g)	0,732 ± 0,066	0,752 ± 0,055	0,3946
Estômago (g)	1,726 ± 0,178	1,701 ± 0,239	0,7544
Intestino (g)	5,807 ± 1,465	5,592 ± 1,368	0,6927
Baço (g)	0,479 ± 0,059	0,491 ± 0,073	0,6336
Rins* (g)	1,820 ± 0,095	1,769 ± 0,145	0,2727
Músculo Sóleo* (g)	0,240 ± 0,021	0,263 ± 0,022	♦ 0,0107
Músculo Gastrocnêmio* (g)	3,776 ± 0,193	3,724 ± 0,251	0,5467

*, representam a soma dos músculos de ambas as pernas ou a somatória dos rins. Dados expressos como média ± desvio-padrão. ♦, diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo R-CON. R-CON, grupo com ração controle (n = 15); R-LEU, grupo suplementado com 50% de L-leucina (n = 13)

Tabela 18. Valores referentes à composição corporal nos grupos experimentais, ao final do estudo

	R-CON	R-LEU		P
Carcaça (g)	256,4 ± 13,2	248,5 ± 14,3		0,1435
% Gordura	9,9 ± 2,5%	7,7 ± 2,9%	♦	0,0397
% Massa magra	90,1 ± 2,5%	92,3 ± 2,9%	♦	0,0397
% Proteína	19,3 ± 1,0%	19,8 ± 0,8%		0,1720
% Umidade	63,1 ± 1,8%	64,4 ± 2,4%		0,1140
% Cinzas	4,4 ± 0,3%	4,7 ± 0,4%	♦	0,0402
Gordura (g)	25,5 ± 6,9	19,3 ± 8,1	♦	0,0361
Massa magra (g)	230,9 ± 11,3	229,3 ± 11,0		0,7081
Proteína (g)	49,4 ± 1,8	49,2 ± 2,8		0,7863
Umidade (g)	161,8 ± 9,0	160,0 ± 8,8		0,5952
Cinzas (g)	11,1 ± 0,8	11,5 ± 0,7		0,2066

Os valores estão expressos em termos absolutos (g) e em termos relativos (percentual do peso da carcaça). Dados expressos como média ± desvio-padrão. ♦, diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo R-CON. R-CON, grupo com ração controle (n = 15); R-LEU, grupo suplementado com 50% de L-leucina (n = 13)

Figura 22. Gordura corporal (g) das carcaças ao final do experimento

*, diferença significativa em relação ao grupo R-CON ($P = 0,0361$). R-CON, grupo com ração controle ($n = 15$); R-LEU, grupo suplementado com 50% de L-leucina ($n = 13$)

6.2.5 Concentração de albumina e proteína total no soro

Pode-se observar na Tabela 19 que não houve diferença significativa entre os grupos em relação à concentração de albumina e proteína total no soro.

Tabela 19. Concentração de albumina e proteína total no soro

	R-CON	R-LEU	<i>P</i>
Albumina Sérica (g/dL)	4,43 ± 0,25	4,44 ± 0,23	0,9167
Proteína Total no Soro (g/dL)	6,73 ± 0,38	6,56 ± 0,34	0,2266

Dados expressos como média ± desvio-padrão. R-CON, grupo com ração controle ($n = 14$); R-LEU, grupo suplementado com 50% de L-leucina ($n = 12$)

6.2.6 Concentração de leptina sérica

Pode-se observar na Tabela 20 que não houve diferença significativa na concentração de leptina sérica entre os grupos ($P = 0,0763$), embora o grupo R-LEU apresentou valor 47% menor, comparado ao grupo R-CON. A concentração de leptina apresentou correlação diretamente proporcional com a quantidade ($r = 0,8801$, $P < 0,0001$) e com o percentual ($r = 0,8583$, $P < 0,0001$) de gordura corporal (Figura 23).

Tabela 20. Concentração de leptina sérica

	R-CON	R-LEU	<i>P</i>
Leptina Sérica (ng/mL)	2,47 ± 1,59	1,31 ± 0,74	0,0763

Dados expressos como média ± desvio-padrão. R-CON, grupo com ração controle ($n = 10$); R-LEU, grupo suplementado com 50% de L-leucina ($n = 8$)

Figura 23. Correlação parcial (Pearson) entre a concentração de leptina sérica e a quantidade de gordura corporal ($n = 8$ -10/grupo; $r = 0,8801$; $P < 0,0001$)

6.2.7 Concentração de proteína, RNA e DNA tecidual

Como pode ser observado na Tabela 21, o grupo R-LEU apresentou aumento significativo (+6%) na concentração de proteína hepática ($P = 0,0283$), porém não houve diferença entre os grupos nas concentrações de RNA e DNA, bem como nos conteúdos de proteína, RNA e DNA no fígado. No músculo gastrocnêmio, o grupo R-LEU apresentou aumento significativo (+7%) na concentração de RNA ($P = 0,0154$). Além disso, houve tendência da concentração de DNA estar aumentada (+13%, $P = 0,0641$) e o conteúdo de proteína diminuído (-4%, $P = 0,0609$) no músculo gastrocnêmio. Não foram observadas diferenças entre os grupos na concentração de proteína e nos conteúdos de RNA e DNA nesse músculo.

6.3 EXPERIMENTO III

6.3.1 Peso corporal, duração do jejum e horário da aplicação do anestésico

Pode-se observar na Tabela 22 que não houve diferença significativa entre os grupos submetidos ao jejum prolongado (~18 horas), em relação ao peso corporal no dia das coletas de sangue e no horário da aplicação do anestésico, para o procedimento de canulação.

A Tabela 23 apresenta os dados detalhados dos animais submetidos ao período de jejum curto (4 horas), antes do procedimento de canulação, desde o peso no dia do teste até o tempo que transcorreu entre a anestesia e o início das coletas de sangue. Não se observou qualquer diferença significativa entre os grupos em relação às variáveis.

Tabela 21. Concentrações e conteúdos de proteína, RNA e DNA total no fígado e no músculo gastrocnêmio

	R-CON	R-LEU	<i>P</i>
Fígado			
Proteína (mg/100 mg tecido)	12,18 ± 0,85	12,92 ± 0,82	♦ 0,0283
RNA (µg/mg proteína)	50,48 ± 5,62	48,74 ± 5,25	0,4074
DNA (µg/mg proteína)	16,66 ± 1,92	16,51 ± 2,45	0,8659
Conteúdo de proteína (mg)	900,6 ± 85,4	907,4 ± 96,4	0,8450
Conteúdo de RNA (mg)	45,4 ± 6,8	43,9 ± 3,6	0,7125
Conteúdo de DNA (mg)	15,1 ± 2,3	14,8 ± 1,7	0,7037
Músculo Gastrocnêmio			
Proteína (mg/100 mg tecido)	10,41 ± 0,44	10,15 ± 0,63	0,2031
RNA (µg/mg proteína)	8,29 ± 0,51	8,87 ± 0,67	♦ 0,0154
DNA (µg/mg proteína)	3,34 ± 0,47	3,76 ± 0,67	0,0641
Conteúdo de proteína (mg)	392,9 ± 19,1	377,2 ± 23,3	0,0609
Conteúdo de RNA (mg)	3,3 ± 0,3	3,3 ± 0,2	0,3878
Conteúdo de DNA (mg)	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,2	0,2472

Dados expressos como média ± desvio-padrão. ♦, diferença significativa em relação ao grupo R-CON ($P < 0,05$). R-CON, grupo com ração controle (n = 14-15); R-LEU, grupo suplementado com 50% de L-leucina (n = 12-13)

Tabela 22. Peso corporal e horário da aplicação do anestésico nos grupos de jejum prolongado (~ 18 horas)

Variável	CONTROLE			LEU+PHE-50%			LEU+PHE-100%			SALINA			P
Amostra (n)	6			6			6			5			
Peso corporal (g)	356,3	±	20,2	352,0	±	37,5	373,0	±	40,6	356,2	±	13,4	0,6585
Horário da aplicação do anestésico	10:58	±	0:46	12:52	±	0:18	12:07	±	0:18	11:05	±	0:10	0,6601

Dados expressos como média ± desvio-padrão. CONTROLE, ração AIN93-M; LEU-PHE-50%, ração suplementada com 50% de L-leucina e L-fenilalanina; LEU-PHE-100%, ração suplementada com 100% de L-leucina e L-fenilalanina; SALINA, animais receberam apenas infusão de solução salina (0,9% NaCl)

Tabela 23. Informações referentes aos animais dos grupos de jejum curto (~ 4 horas)

Variável	CONTROLE-SJ			LEU+PHE-50%-SJ			P
Amostra (n)	4			4			
Peso corporal (g)	410,3	±	29,9	421,8	±	12,6	0,5050
Horário do início do jejum	9:44	±	0:20	9:45	±	0:12	0,9190
Horário da aplicação do anestésico	13:51	±	0:25	13:49	±	0:19	0,8783
Tempo de jejum	4:08	±	0:05	4:04	±	0:08	0,4372
Tempo entre a anestesia e o início das coletas de sangue (min)	27,0	±	3,0	29,5	±	4,5	0,4422

Dados expressos como média ± desvio-padrão. CONTROLE-SJ, ração AIN93-M; LEU-PHE-50%-SJ, ração suplementada com 50% de L-leucina e L-fenilalanina

6.3.2 Intercorrências durante os procedimentos de canulação e de coleta das amostras de sangue

Em nenhum animal foi necessária a reaplicação da anestesia durante o procedimento de canulação, infusão intragástrica e coleta de sangue que, no total durava, em média, duas horas e trinta minutos. Após o aprendizado, desenvolvimento, aprimoramento e padronização de todo o método empregado no EXPERIMENTO III foram utilizados um total de 37 animais para a determinação da cinética da insulina. Desses, 31 foram de fato utilizados nos grupos experimentais, enquanto os 6 animais restantes tiveram problemas e foram descartados. Desses 6 ratos, 3 apresentaram problemas durante a canulação, 1 não conseguiu ser anestesiado, 1 morreu durante a infusão intragástrica por afogamento devido a refluxo, e o último foi descartado, pois suas amostras de sangue apresentaram acentuada hemólise.

6.3.3 Cinética da concentração de insulina após administração intragástrica de ração

A Figura 24 apresenta a média da concentração de insulina plasmática, nos grupos submetidos ao período de jejum de ~18 horas, antes do teste insulinêmico. O grupo LEU+PHE-50% apresentou a maior resposta insulinêmica, seguido pelo grupo CONTROLE, que foi o único grupo a apresentar apenas um pico bem definido, ocorrendo no tempo 15 minutos. O grupo LEU+PHE-100% apresentou um pico achatado e prolongado, entre os tempos 20 e 45 minutos. A resposta do grupo LEU+PHE-50% foi inesperada, pois, nota-se 3 breves picos, ocorrendo nos minutos 5, 15 e 45. Além disso, pode-se observar na Figura 24 que o grupo SALINA, como se esperava, apresentou uma reduzida concentração de insulina ao longo das coletas.

Figura 24. Cinética da concentração de insulina plasmática determinada na veia jugular, em resposta a administração intragástrica de ração (2 g/kg.rato), após jejum médio de 18 horas

Cada ponto representa a média dos valores dos animais do mesmo grupo, no tempo correspondente. CONTROLE, ração AIN93-M (n = 6); LEU+PHE-50%, ração suplementada com 50% de L-leucina e L-fenilalanina (n = 6); LEU+PHE-100%, ração suplementada com 100% de L-leucina e L-fenilalanina (n = 6); SALINA, animais receberam apenas infusão de solução salina (n = 5)

Nos animais submetidos ao período de jejum curto (4 horas), observou-se que a resposta insulinêmica do grupo LEU+PHE-50%-SJ foi mais acentuada até o minuto 60, em relação ao grupo CONTROLE-SJ (Figura 25). Depois desse ponto, as curvas convergiram-se. O grupo CONTROLE-SJ apresentou um aumento, formando um pico entre os tempos 30 e 45 minutos, e o grupo LEU+PHE-50%-SJ apresentou um aumento progressivo na concentração de insulina, até atingir um pico no minuto 30.

Ao se comparar as respostas entre os grupos em relação ao período de jejum, observa-se claramente que os grupos de jejum de 4 horas apresentaram um pico mais elevado (aproximadamente 10 e 7 ng/mL, respectivamente, para os grupos LEU+PHE-50%-SJ e CONTROLE-SJ), quando comparados aos

grupos de jejum de 18 horas (aproximadamente 4,5 e 3,5 ng/mL, respectivamente, para os grupos LEU+PHE-50% e CONTROLE).

Figura 25. Cinética da concentração de insulina plasmática determinada na veia jugular, em resposta a administração intragástrica de ração (2 g/kg.rato), após jejum de 4 horas

Cada ponto representa a média dos valores dos animais do mesmo grupo. CONTROLE-SJ, ração AIN93-M (n = 4); LEU-PHE-50%-SJ, ração suplementada com 50% de L-leucina e L-fenilalanina (n = 4)

6.3.4 Área sob a curva da concentração de insulina

Pode-se observar na Tabela 24 que não houve diferença significativa entre os grupos em relação a área sob a curva da concentração de insulina (o grupo SALINA não foi incluído na análise estatística, pois foi utilizado apenas como referência). Provavelmente, isso ocorreu devido à grande variância que foi observada nos grupos. Entretanto, o grupo LEU+PHE-50% apresentou valor 54,8% maior e o grupo LEU+PHE-100% valor 21% menor, em relação ao grupo CONTROLE. Como se esperava, a área sob a curva do grupo SALINA foi a menor entre os grupos, representando 41% da área do grupo CONTROLE.

Tabela 24. Área sob a curva da concentração de insulina, nos grupos submetidos ao jejum médio de 18 horas

	SALINA	CONTROLE	LEU+PHE 50%	LEU+PHE 100%	P
Área sob a curva da concentração de insulina	79,10 ± 57,40	193,05 ± 154,90	298,81 ± 252,63	152,58 ± 112,47	0,3838

Dados expressos como média ± desvio-padrão. O grupo SALINA não foi incluído na análise estatística. CONTROLE, ração AIN93-M (n = 6); LEU-PHE-50%, ração suplementada com 50% de L-leucina e L-fenilalanina (n = 6); LEU-PHE-100%, ração suplementada com 100% de L-leucina e L-fenilalanina (n = 6); SALINA, animais receberam apenas infusão de solução salina (n = 5)

A Tabela 25 apresenta os valores das áreas sob a curva dos grupos submetidos ao jejum de 4 horas. Também não houve diferença significativa entre os grupos. No entanto, o valor do grupo LEU+PHE-50%-SJ foi 40,2% maior que o grupo CONTROLE-SJ. O valor da área sob a curva do grupo CONTROLE-SJ (jejum curto de 4 horas) foi significativamente maior (296%; $P = 0,0173$), quando comparado ao valor do grupo CONTROLE (jejum de ~18 horas). Houve tendência do valor da área sob a curva do grupo LEU+PHE-50%-SJ (jejum curto de 4 horas) ser significativamente maior (268%; $P = 0,0608$) do que no grupo LEU+PHE-50% (jejum de ~18 horas).

Tabela 25. Área sob a curva da concentração de insulina, nos grupos submetidos a 4 horas de jejum

	CONTROLE-SJ	LEU+PHE-50%-SJ	P
Área sob a curva da concentração de insulina	571,33 ± 249,82	801,10 ± 482,81	0,4303

Dados expressos como média ± desvio-padrão. CONTROLE-SJ, ração AIN93-M (n = 4); LEU-PHE-50%-SJ, ração suplementada com 50% de L-leucina e L-fenilalanina (n = 4)

7. DISCUSSÃO

O presente trabalho estudou o efeito da suplementação crônica na ração com os aminoácidos LEU e PHE. A hipótese testada foi de que esses aminoácidos, talvez, poderiam minimizar as adaptações que são desencadeadas por situações de balanço energético negativo. Essas adaptações promovem economia de energia, tornando a redução ponderal menos eficaz e a recuperação do peso perdido mais fácil (LEIBEL, ROSENBAUM & HIRSCH, 1995). No caso deste trabalho, foi estudado o efeito de sucessivos episódios de VPC e a simples restrição alimentar de 50% (metade do consumo *ad libitum*).

A base teórica para a hipótese proposta se baseia em dois aspectos: 1) o hormônio insulina age como um sinalizador que informa ao SNC a respeito do estado nutricional do organismo (NISWENDER, BASKIN & SCHWARTZ, 2004); 2) certos aminoácidos, especialmente a LEU, atuam como sensores nutricionais celulares, com capacidade de regular a síntese protéica (ANTHONY *et al.*, 2001). Dessa forma, a suplementação com LEU e PHE tentou gerar uma situação artificial em relação aos dois aspectos citados: 1) LEU e PHE são secretagogos de insulina e poderiam gerar uma concentração de insulina maior do que seria produzida pela reduzida quantidade de ração consumida, durante os períodos de restrição alimentar, indicando para o SNC que “supostamente foi consumido mais ração do que realmente estava disponível” e, assim, reduzir as adaptações que aumentam a EM do organismo; 2) a maior disponibilidade, na circulação ou intracelular, de LEU e PHE poderia sinalizar para o organismo que existe mais nutrientes do que de fato foi consumido, amenizando possíveis reduções na taxa de síntese ou do *turnover* protéico.

Hipóteses semelhantes já foram testadas a partir da reposição de leptina em indivíduos em jejum (CHAN *et al.*, 2003; SCHURGIN *et al.*, 2004) ou em dietas de baixa ingestão de calorias (HUKSHORN *et al.*, 2003). Nesses trabalhos, ficou demonstrado o papel da redução na concentração da leptina, como um sinalizador da periferia que informa o SNC sobre o estado nutricional do organismo (DONATO, PEDROSA & TIRAPEGUI, 2004). Como a reposição

de leptina “rompeu” com a mensagem de balanço energético negativo, parte das adaptações endócrinas e metabólicas desencadeadas pelo jejum ou pela redução da ingestão energética foram simplesmente prevenidas ou minimizadas.

Um aspecto que, de certa forma, é paradoxal a respeito da hipótese do presente trabalho é a ação anabólica da insulina nos tecidos periféricos. Indubitavelmente a insulina estimula não só o anabolismo protéico, mas também o armazenamento de gordura e a lipogênese. Contudo, a insulina, ao ativar seu receptor no SNC, especialmente no hipotálamo, é capaz de promover um estado de catabolismo aumentado (redução do consumo calórico, aumento do gasto energético e redução do peso corporal). Por outro lado, a redução na concentração desse hormônio, conforme ocorre durante períodos de restrição calórica, faz com que o organismo estimule processos que aumentem a ingestão alimentar e a EM. Entretanto, o papel da insulina como um sinal que informa o SNC sobre o estado nutricional do organismo é controverso e ainda foi pouco pesquisado e, portanto, são necessários mais estudos para se compreender com mais clareza sua importância fisiológica (NISWENDER, BASKIN & SCHWARTZ, 2004; HELLSTRÖM *et al.*, 2004; STOCKHORST *et al.*, 2004).

A rotina de VPC foi escolhida como desenho experimental para verificar o efeito da suplementação com LEU+PHE, pois esse paradigma alimentar é associado a uma condição de aumento da EM, inclusive, segundo alguns autores (HILL *et al.*, 1988; JEN *et al.*, 1995; LIM *et al.*, 1996; PELLIZZON, BUISSON & JEN, 2000; SEA *et al.*, 2000), acima do que ocorre após um único episódio de redução ponderal.

Entre algumas questões pertinentes à metodologia adotada no EXPERIMENTO I, pode-se destacar o uso de ratos não obesos e a duração e a quantidade de ciclos de VPC. Em relação ao primeiro aspecto, os ratos inicialmente emagreceram e, depois, foi permitido que recuperassem o peso corporal. Esse desenho experimental é o inverso do que ocorre, durante o tratamento da obesidade, quando primeiro os indivíduos engordam, para, posteriormente, emagrecerem. Contudo, o intuito da adoção desse delineamento experimental visou reduzir ao máximo a interferência de outras variáveis, além da VPC, pois dietas que promovem obesidade em ratos afetam

significativamente o metabolismo e a capacidade de regulação do peso corporal dos animais (ARCHAMBAULT *et al.*, 1989; WAINWRIGHT *et al.*, 1991). No segundo aspecto, a duração e a quantidade dos ciclos de VPC, se o número de ciclos de VPC (foi utilizado 3 ciclos) e, principalmente, se a duração dos períodos de perda de peso (foi utilizada 1 semana por ciclo) e de recuperação do peso corporal (foi utilizado de 12 a 14 dias por ciclo) tivessem sido maiores, é provável que os efeitos da rotina de VPC seriam observados com mais intensidade, pois haveria mais tempo para que as adaptação no organismo, decorrentes da restrição alimentar, ocorressem; também haveria mais tempo para que essa adaptação resultasse em maior EM e acúmulo de peso e gordura na carcaça, durante os períodos de recuperação do peso corporal.

Observou-se, a partir dos resultados do EXPERIMENTO I, que os 3 grupos mantidos na rotina de VPC tenderam a ganhar mais peso e gordura corporal, além de apresentar maior EM (ganharam mais peso a partir de um consumo equivalente de ração) do que o grupo controle, que consumiu a mesma quantidade de ração, mas não foi submetido à rotina de VPC (grupo *pair-fed* ou PF). Embora os 3 grupos de VPC apresentaram esses resultados, não é possível afirmar que a rotina de VPC, ou popularmente chamada de “efeito sanfona”, aumente significativamente o peso, a EM, a quantidade e o percentual de gordura na carcaça dos animais, pois ao se comparar o grupo VP0 com o grupo PF, não há diferença estatística entre eles, nessas variáveis.

Nesse sentido, o grupo VP50 (submetido à rotina de VPC e à suplementação com LEU+PHE na dosagem de 50%), ao contrário do que foi inicialmente proposto, foi o grupo que mais ganhou peso (+35,7%) e cuja EM foi a maior (+23,76%), sendo o único grupo que apresentou diferença significativa nessas variáveis, em relação ao grupo PF. Uma explicação simples e razoável para esses resultados é o fato de que o aumento da insulinemia na circulação sistêmica, independentemente do organismo não apresentar resistência à insulina ou intolerância à glicose, estimula o anabolismo, cujo reflexo é o aumento do peso e da EM. Esse mesmo efeito acontece com indivíduos diabéticos que recebem tratamento com insulina (THE DCCT RESEARCH GROUP, 1988). Dessa forma, os efeitos periféricos anabólicos da insulina parecem sobrepujar sua ação anoréxica e termogênica no SNC. Ainda pode haver o fato de que o pico de secreção de insulina,

provocado pela suplementação, não foi suficientemente elevado para provocar repercussões no SNC, ou então, o transporte, da circulação sistêmica para o SNC, através da barreira hemato-encefálica, não foi suficiente para aumentar a concentração de insulina nos seus sítios de ligação no cérebro, uma vez que esse transporte sofre diversos tipos de influência, como pode ser observado em certas condições patológicas em que a relação entre a concentração da insulina sistêmica e a do SNC está alterada (FIGLEWICZ, 2003; STOCKHORST *et al.*, 2004).

Entretanto, os animais suplementados no EXPERIMENTO I também foram submetidos aos efeitos dos ciclos de VPC e houve tendência dessa rotina alimentar em promover aumento do peso, da gordura corporal e da EM. Ao se analisar a composição corporal, o grupo VP0 apresentou aumento de +36,09% e +24,75% na quantidade absoluta e no percentual de gordura corporal, respectivamente, em relação ao grupo PF. Os grupos VP50 e VP100, embora apresentassem maior conteúdo de gordura que os animais PF, tiveram menos gordura corporal, quando comparados ao grupo VP0. Em relação ao grupo PF, os grupos suplementados apresentaram aumento de VP50: +18,95% e +3,16%; VP100: +9,64% e +3,28%, na quantidade e no percentual de gordura na carcaça, respectivamente. Isso pode indicar que a rotina de VPC tende a aumentar a gordura corporal e que a suplementação com LEU+PHE ajudou a minimizar o quanto de gordura foi armazenado na carcaça.

Por outro lado, os grupos VP50 e VP100 aumentaram substancialmente a quantidade absoluta de massa magra e de proteína corporal, comparados ao grupo PF. Assim, embora a suplementação com os aminoácidos não foi capaz de reduzir o aumento da EM que acompanha os ciclos de VPC, tendendo a aumentá-lo ainda mais, ao se analisar por outro aspecto, esse efeito não refletiu em acúmulo de gordura. Houve redução na gordura e aumento da proteína corporal, em relação ao grupo VP0.

Examinado apenas em relação ao ganho de peso a suplementação foi prejudicial. No entanto, no que se refere às alterações na composição corporal, a suplementação foi benéfica, pois reduziu a gordura corporal (não significativamente) e aumentou a massa magra (diferença significativa apenas entre os grupos VP50 e PF) e a proteína total (VP50 foi significativamente maior que PF e VP0).

Ao se comparar apenas o efeito da VPC (grupos VP0 versus PF), o grupo VP0 apresentou conteúdo absoluto de proteína equivalente ao grupo PF (78,4g contra 76,3g, respectivamente), mas, em termos relativos, tendeu a ser menor (17,8% contra 18,6%, respectivamente). Os dados de gordura, massa magra e proteína corporais sugerem que os ciclos de VPC promovem uma composição corporal desfavorável (mais gordura e menos massa magra corporal), porém essa mudança não é suficientemente grande para haver diferença significativa.

Após a revisão da literatura científica, o único trabalho encontrado que estudou a suplementação com LEU (na realidade, a suplementação foi de BCAA), especificamente durante um período de restrição alimentar, também observou redução adicional da gordura corporal, especialmente dos depósitos viscerais, em humanos (MOURIER *et al.*, 1997a). STEIN *et al.* (2003) observaram aumento na retenção de nitrogênio no músculo esquelético, em indivíduos acamados e suplementados com BCAA. LYNCH *et al.* (2002b) suplementaram ratos com LEU ou norleucina durante 12 dias e verificaram que houve aumento da taxa de síntese protéica no tecido adiposo, no músculo esquelético e no fígado. Dessa maneira, os resultados observados pelo presente estudo, em relação à composição corporal, não são surpreendentes.

A explicação para o aumento da massa magra e, em especial, de proteína, pode estar relacionada com o fato da suplementação com os aminoácidos ativar duas vias de anabolismo protéico: a secreção de insulina (VAN LOON *et al.*, 2000a) e a tradução protéica celular. Nesse sentido, para um organismo sintetizar mais proteína e mantê-la, já que é uma estrutura metabolicamente ativa que consome energia, ele precisa aumentar a ingestão calórica ou terá que usar as reservas endógenas (gordura corporal) para dar conta de suprir essa demanda energética adicional. Como o consumo de ração dos animais PF, VP0, VP50 e VP100 foi equivalente, a justificativa para o menor percentual de gordura corporal observado nos grupos VP50 e VP100 pode ser que, simplesmente para “pagar o custoso” processo de síntese protéica e para manter essa massa corporal metabolicamente ativa, esses animais precisaram utilizar as próprias reservas corporais de gordura para gerar a energia necessária para esses processos metabólicos.

Obviamente, estas explicações são especulativas, uma vez que o gasto energético dos animais não foi mensurado neste experimento. Também não é descartada a hipótese de que os grupos apresentaram diferença na atividade física voluntária dentro das gaiolas. Além disso, os resultados observados na concentração do hormônio tireoidiano triiodotironina (T3) total podem oferecer uma terceira explicação, uma vez que sua concentração foi significativamente menor nos 3 grupos que variaram de peso, em relação ao grupo PF. O T3 é o hormônio com a maior atividade biológica da tireóide e uma de suas funções é manter o metabolismo corporal (GUYTON, 1986). Ademais, a restrição alimentar pode reduzir a concentração desse hormônio (SPENCER *et al.*, 1983; LoPRESTI, GRAY & NICOLOFF, 1991; HUKSHORN *et al.*, 2003; SCHURGIN *et al.*, 2004), por meio da supressão do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (CHAN *et al.*, 2003). Dessa forma, é possível que os ciclos de VPC tenham causado uma adaptação no organismo dos animais, aumentando a EM, por meio da supressão do eixo tireoidiano.

Por outro lado, não deixa de causar certa surpresa o fato do T3 estar diminuído nos 3 grupos com VPC, em relação ao grupo PF, uma vez que os grupos VPC foram sacrificados ao final da 3ª fase de reganho de peso (após 2 semanas de consumo *ad libitum*), ao passo que o grupo PF ficou submetido, até o final do experimento, a uma branda restrição alimentar (consumo equivalente a 85-90% do grupo *ad libitum*). Pode ser que a severidade da restrição calórica, mesmo que ocorrida em um momento anterior, seja mais relevante que o fato de estar sob restrição calórica no momento do sacrifício, para alterar a concentração de T3 total no soro.

Entretanto, os resultados observados na concentração sérica de T3 total não foram corroborados pela concentração sérica de tiroxina (T4) livre. O T4 é o hormônio predominantemente sintetizado pela glândula tireóide e sua conversão para T3 ocorre principalmente em tecidos periféricos (LoPRESTI, GRAY & NICOLOFF, 1991; LISBOA *et al.*, 2003). A manutenção da concentração do T4 livre entre os grupos pode indicar outra explicação: não houve supressão do eixo tireoidiano, uma vez que a concentração de T4 livre não foi reduzida, mas pode ter havido diminuição na conversão do T4 para T3. Essa conversão é catalisada pelas enzimas desidases do tipo I e, principalmente, do tipo II, cuja atividade é inibida pela restrição alimentar

(LoPRESTI, GRAY & NICOLOFF, 1991; LISBOA *et al.*, 2003). Assim, de um modo especulativo, os ciclos de VPC podem ter afetado a conversão de T4 a T3 e não a atividade do eixo tireoidiano. Além disso, ao se considerar o valor da concentração de T3 total do grupo de referência AL, pode-se sugerir que, na realidade, o valor da concentração do hormônio T3, nos grupos de VPC, estava próximo aos valores de ratos com consumo *ad libitum*. Por outro lado, o grupo PF apresentou aumento significativo em relação aos demais grupos. O fato dos animais do grupo PF terem permanecido todo o experimento em restrição calórica (85-90% do consumo do grupo AL) pode ter contribuído para o aumento na concentração das proteínas transportadoras dos hormônios tireoidianos e, conseqüentemente, para uma maior meia-vida desses hormônios, implicando em aumento na concentração sanguínea e redução da sua atividade biológica.

Tanto a suplementação com LEU+PHE, quanto a rotina de VPC, não afetaram significativamente a concentração de albumina e de proteína total no soro. Isso indica que o fato de não ter havido correção da ração, com adição de proteína na ração durante os períodos de restrição alimentar, não provocou alteração na capacidade, principalmente hepática, de sintetizar proteínas, ou seja, o estado protéico visceral foi mantido. Além disso, o aumento na proteína total na carcaça dos grupos suplementados não foi reflexo, pelo menos em parte, de mudança nas concentrações de proteínas circulantes.

Em relação à concentração de proteína tecidual, o grupo VP100 apresentou valor significativamente maior no músculo gastrocnêmio, comparado ao grupo PF (+6,88%). Os demais grupos que variaram de peso também apresentaram concentração de proteína muscular maior do que o grupo PF, mas sem diferença significativa. A suplementação na dose de 100% apóia os resultados de LYNCH *et al.* (2002b), que apontam para aumento significativo da taxa de síntese protéica no músculo gastrocnêmio, a partir da suplementação com LEU. No caso da concentração de proteína hepática, não houve diferença significativa ($P = 0,056$), apenas tendência dos grupos VP0, VP50 e VP100 apresentarem maior concentração, quando comparados ao grupo PF (+17,24%, +4,45% e +11,62%, respectivamente).

A maior quantidade de proteína total na carcaça, além do aumento na concentração de proteína tecidual nos grupos VPC, especialmente nos

suplementados com LEU+PHE, reforça ainda mais a idéia de que esses animais sofreram uma adaptação no organismo, ao aumentar expressivamente a EM. Esses grupos foram capazes, a partir de um consumo de ração equivalente ao grupo PF, de acumular e manter uma maior massa metabolicamente ativa de tecidos. Nesse sentido, a suplementação com LEU+PHE atuou de maneira contrária à esperada, a partir da base teórica, inicialmente proposta pelo presente trabalho. Em outras palavras, a suplementação com LEU+PHE, embora tenha resultado numa composição corporal mais benéfica, por outro lado, aumentou ainda mais a EM dos animais.

Porém, ao se verificar a incorporação de energia na carcaça entre os grupos, nota-se que, na realidade, a suplementação com LEU+PHE reduziu o conteúdo de energia total na carcaça, ao invés de aumentá-lo, como seria esperado, caso houvesse acréscimo adicional da EM. Multiplicando-se o valor absoluto de proteína total na carcaça por 4 kcal e o de gordura por 9 kcal e, depois somando-os, têm-se os seguintes valores: 889, 1109, 1064 e 995 kcal, respectivamente, para os grupos PF, VP0, VP50 e VP100. Ou seja, os grupos VP0, VP50 e VP100 terminaram o experimento com 24,73%, 19,64% e 11,95%, respectivamente, mais energia na carcaça, comparados ao grupo PF. Além disso, 65,68%, 71,73%, 65,30% e 64,36% da energia acumulada foi a partir de gordura nos grupos PF, VP0, VP50 e VP100, respectivamente. Visualizando por esse prisma, a suplementação com LEU+PHE reduziu, no contexto da rotina de VPC, a incorporação de energia na carcaça, além de diminuir o percentual dessa energia derivada a partir da gordura corporal. Por outro lado, a rotina de VPC (sem suplementação) aumentou o acúmulo de energia na carcaça e a proporção derivada de gordura.

Assim, pode-se sugerir que a rotina de VPC tende a aumentar a incorporação de energia na carcaça, a partir de um consumo de ração igual, ou seja, resultou em aumento da EM, e a suplementação com LEU+PHE tende a reduzir esse efeito, de uma maneira dose dependente. O fato da rotina de VPC aumentar a EM ou a incorporação de energia na carcaça é respaldado por estudos anteriores (BROWNELL *et al.*, 1986; CLEARY, 1986; HILL *et al.*, 1988; ILAGAN *et al.*, 1993; ROZEN, BRIGANT & APFELBAUM, 1994; LEVIN, 1994; JEN *et al.*, 1995; LIM *et al.*, 1996; ERNSBERGER *et al.*, 1996; TAGLIAFERRO *et al.*, 1997; PELLIZZON, BUISSON & JEN, 2000; SEA *et al.*, 2000), mas nem

por todos (HILL *et al.*, 1987; GRAY, FISLER & BRAY, 1988; GRAHAM *et al.*, 1990; WHEELER *et al.*, 1990; GRAND & MILLAR, 1990; REED *et al.*, 1993; KIM & SCARPACE, 2003).

Como último assunto referente à EM no EXPERIMENTO I, diversos estudos encontraram que, com o passar dos ciclos de VPC, o organismo se adapta, tornando os subseqüentes períodos de emagrecimento menos eficazes e os períodos de reganho de peso mais acelerados (HILL *et al.*, 1988; ARCHAMBAULT *et al.*, 1989; WAINWRIGHT *et al.*, 1991; SIMPSON *et al.*, 1994; JEN *et al.*, 1995; PELLIZZON, BUISSON & JEN, 2000). Esse efeito não foi observado no presente estudo. Os animais submetidos à rotina de VPC perderam, durante as fases de emagrecimento, aproximadamente a mesma quantidade peso em cada ciclo e ganharam quantidade equivalente de peso, nas fases de recuperação do peso corporal, nos 3 ciclos, com exceção do grupo VP50 que tendeu a ganhar mais peso no 1º ciclo, comparado ao 3º. Diferentes modelos experimentais, linhagens de animais, ração e idade explicam a divergência entre os resultados dos estudos científicos. Dessa forma, a partir dos resultados observados, não há evidências que confirmem a idéia de que, com o passar dos ciclos de VPC, o organismo tende a perder menos peso e passa a engordar com mais facilidade.

Em relação à concentração de glicogênio hepático, observou-se que os grupos VPC apresentaram menor concentração, comparados ao grupo PF, mas esse resultado não se deve à rotina de VPC ou à suplementação com LEU+PHE, conforme pode ser notado na comparação com os valores do grupo de referência AL, cujo glicogênio hepático foi equivalente aos dos grupos VPC. O glicogênio hepático do grupo PF estava aumentado, pois esses animais ainda estavam em restrição alimentar (85 a 90% do consumo do grupo *ad libitum*), no momento do sacrifício. Experimentos anteriores realizados em nosso laboratório já haviam encontrado resultados semelhantes (PEDROSA *et al.*, 2004). O mesmo acontece em animais no esquema *meal-feeding*, que estão cronicamente em restrição alimentar (CURI, HELL & TIMO-IARIA, 1990; BAZOTTE, BATISTA & CURI, 2000). Entre outras explicações, o aumento na concentração de glicocorticóides, decorrente da privação alimentar, estimula o armazenamento de glicogênio hepático (BERDANIER, WURDEMAN & TOBIN, 1976).

A concentração aumentada de glicogênio hepático no grupo PF confirma que esses animais vinham de uma condição de restrição alimentar e esse fato é relevante, pois demonstra que mesmo assim, as adaptações no metabolismo energético, sofridas por esses animais não se compararam àquelas dos grupos VPC. Em outras palavras, o grupo PF também estava exposto à restrição alimentar e, conseqüentemente, ao aumento da EM provocado por essa situação. Nesse sentido, é provável que o grau de restrição alimentar ou a intercalação entre períodos de perda e recuperação do peso corporal sejam variáveis importantes na adaptação do organismo às situações de balanço energético negativo e, por conseguinte, na forma como a EM é afetada.

Não houve diferença estatística entre os grupos em relação ao conteúdo de glicogênio no músculo gastrocnêmio, mas houve tendência dos animais submetidos aos ciclos de VPC de apresentarem maior conteúdo de glicogênio no músculo sóleo, que possui predominância de fibras musculares vermelhas (oxidativas ou do tipo I). Essa tendência foi estatisticamente significativa apenas no grupo VP50, em relação ao grupo PF. CURI, HELL & TIMO-IARIA (1990) também verificaram mudança no conteúdo de glicogênio no músculo sóleo, e não no gastrocnêmio, em animais submetidos a 4 semanas no esquema *meal-feeding*. Essa diferença, contudo, se deu na direção contrária. A divergência pode ser devido ao diferente desenho experimento (*meal-feeding* versus restrição alimentar), mas ressalta que os músculos com fibras musculares predominantemente oxidativas são mais sensíveis à mudança na disponibilidade de alimento, no que se refere ao conteúdo de glicogênio. Porém, PEDROSA *et al.* (2004) não encontraram diferença no conteúdo de glicogênio nos músculos gastrocnêmio e sóleo, em animais submetidos à restrição alimentar de 25 ou 50%, comparados ao grupo controle, com consumo de ração *ad libitum*.

TRAXINGER & MARSHALL (1989) verificaram que alguns aminoácidos são capazes de provocar resistência periférica à insulina, mais especificamente no transporte de glicose. Os presentes resultados não indicam diferença significativa entre os grupos a respeito da concentração plasmática de glicose e na concentração de insulina sérica, ambas de jejum. Além disso, o índice HOMA, que é um indicativo do grau de resistência periférica à insulina, não foi diferente entre os grupos. Esses dados sugerem que nem a suplementação

com LEU+PHE, nem a rotina de VPC, alteraram significativamente a resistência periférica à insulina. Na realidade, o valor do HOMA apresentou correlação diretamente proporcional com a quantidade ($r = 0,4773$, $P = 0,0213$) e o percentual de gordura corporal ($r = 0,4978$, $P = 0,0156$), demonstrando que os grupos que possuíam mais gordura, apresentavam menor sensibilidade à insulina. Essa constatação apenas confirma as observações da literatura científica (KOPELMAN, 2000). Além disso, não houve diferença significativa entre os grupos a respeito da concentração de triacilglicerol no soro, cujos valores mantiveram-se dentro da faixa de normalidade.

Todos esses dados indicam que não há evidências, a partir dos resultados do presente trabalho, que a rotina de VPC representa risco à saúde, ao menos nos parâmetros indicativos de risco cardiovascular analisados (resistência à insulina, glicemia e insulinemia de jejum e concentração de triacilglicerol no soro), conforme foi sugerido por alguns trabalhos (HAMM, SHEKELLE & STAMLER, 1989; LISSNER *et al.*, 1991; BLAIR *et al.*, 1993; REBUFFÉ-SCRIBE *et al.*, 1994; IRIBARREN *et al.*, 1995; FOLSOM *et al.*, 1996), mas por outros não (LISSNER *et al.*, 1990; STEVEN & LISSNER, 1990; JEFFERY, WING & FRENCH, 1992; NATIONAL TASK FORCE ON THE PREVENTION AND TREATMENT OF OBESITY, 1994; WING, JEFFERY & HELLERSTEDT, 1995; HANSON *et al.*, 1995; PETERSMARCK *et al.*, 1999). Finalmente, a rotina de VPC pode representar risco à saúde ao agir indiretamente, ao promover acréscimo de gordura corporal, como ficou demonstrado pela correlação entre o valor do HOMA e o da gordura corporal, confirmando os resultados de alguns pesquisadores (RÖSSNER, 1992; BENINI *et al.*, 2001; KROKE *et al.*, 2002; GRACI *et al.*, 2004).

Talvez, uma das questões mais polêmicas sobre os resultados do EXPERIMENTO I seja por que o grupo VP100 não apresentou os mesmos resultados que o grupo VP50? Praticamente todos os resultados do grupo VP100 ficaram em uma posição intermediária, entre os valores apresentados pelo grupo VP50 e os observados nos grupos PF e VP0.

De fato, não há uma resposta definitiva para essa pergunta, mas apenas hipóteses. Foi igualmente surpreendente o resultado da cinética de secreção de insulina, apresentado no EXPERIMENTO III, cuja resposta e a área sob a curva da razão com adição de 100% com LEU+PHE, não só foi menor em

relação ao grupo com ração suplementada com 50% de LEU+PHE, mas também menor do que os valores apresentados pelo grupo controle, cuja ração não foi suplementada.

Entre as possíveis hipóteses estão: 1) transporte intestinal limitado de aminoácidos purificados, fazendo com que dosagens maiores que 50% não causem maior captação pelo organismo, inclusive com a possibilidade de *down-regulation* dos transportadores intestinais dos grandes aminoácidos neutros (LEU e PHE fazem parte dos grandes aminoácidos neutros, e, portanto, competem pelos mesmos transportadores); 2) toxicidade da suplementação com aminoácidos purificados em dosagens superiores a 50% do consumo habitualmente ingerido, em rações preparadas com caseína; 3) alto custo metabólico do processamento bioquímico dos aminoácidos pelo organismo (transporte, desaminação, eliminação do nitrogênio pelo Ciclo da Uréia, etc), como pode ser observado pelo maior efeito térmico de refeições ricas em proteína, comparada a outros macronutrientes (RABEN *et al.*, 2003); 4) não é descartada a hipótese de que a dose de 100% com LEU+PHE conseguiu induzir os esperados efeitos de redução da EM dos animais, comparada à dosagem de 50%. Pode-se observar que o grupo VP100 apresentou a massa magra e, principalmente, a proteína corporal equivalentes ao grupo VP50, além de ter sido o grupo de VPC que apresentou o menor acúmulo de gordura e de energia na carcaça. Nesse sentido, é possível que a suplementação com 100% apresenta os mesmos benefícios da suplementação com 50% na massa magra e na proteína corporal, mas também consegue diminuir ainda mais a deposição de gordura corporal; 5) segundo SHIMOMURA *et al.* (2004), a suplementação apenas com LEU pode, teoricamente, causar degradação dos outros dois BCAA, pois, como a LEU e seu ceto ácido (alfa-cetoisocaproato) são potentes estímulos para a ativação do complexo BCKD, poderia haver maior degradação de todos os BCAA. Como apenas a LEU foi suplementada, a valina e a isoleucina poderiam ser demasiadamente degradadas, afetando negativamente diversos sistemas metabólicos, como a síntese de proteínas essenciais, pois poderia haver desbalanço nas concentrações intracelulares dos BCAA. Entretanto, LYNCH *et al.* (2002b) não encontraram diferença na concentração das enzimas envolvidas no metabolismo dos BCAA, após 12 dias de suplementação apenas com LEU em

ratos. Contudo, os pesquisadores não mensuraram a atividade dessas enzimas. Além disso, a alta ingestão de LEU não reduziu as concentrações plasmáticas de valina e isoleucina em trutas (CHOO *et al.*, 1991).

Em relação ao EXPERIMENTO II, observou-se que a suplementação com LEU-50%, em ratos submetidos a 6 semanas de restrição alimentar de 50%, não modificou a quantidade de peso perdido, nem o peso corporal final dos animais. Além disso, o peso absoluto e relativo ao peso corporal final do coração, rins, fígado, baço, intestino, estômago e do músculo gastrocnêmio também não apresentaram diferença significativa entre os grupos. No entanto, o peso do músculo sóleo foi significativamente maior no grupo R-LEU, comparado ao grupo R-CON.

Diferentemente do que foi observado no EXPERIMENTO I, no EXPERIMENTO II os animais suplementados apenas com LEU não apresentaram aumento significativo na quantidade absoluta ou no percentual de massa magra e de proteína total na carcaça. Embora os resultados entre os experimentos possam parecer contraditórios, na realidade existe uma explicação para essa diferença. No EXPERIMENTO I, a suplementação com LEU+PHE não alterou a quantidade de peso perdido, durante os 3 períodos de restrição alimentar. Já em relação às fases de reganho de peso, pode-se observar que os grupos suplementados, especialmente o grupo VP50, tenderam a ganhar mais peso, comparados ao grupo VP0. Ou seja, a diferença no peso corporal final e, provavelmente, na massa magra e no conteúdo de proteína total na carcaça, entre os grupos submetidos aos ciclos de VPC, ocorreu unicamente durante as fases de consumo *ad libitum* de ração.

No desenho experimental adotado no EXPERIMENTO II – restrição alimentar crônica – não houve “períodos de recuperação do peso corporal”. Assim, da mesma forma que nas fases de perda de peso do EXPERIMENTO I, a suplementação apenas com LEU no EXPERIMENTO II não foi capaz de alterar o peso corporal final e a taxa de redução ponderal, sugerindo que, em relação ao aumento de massa magra e de proteína corporal, a suplementação com LEU+PHE ou apenas LEU não é capaz de sobrepujar condições altamente catabólicas, como, por exemplo, períodos de restrição alimentar de 50%, sendo necessários períodos de consumo *ad libitum* intercalados para haver mudanças nessas variáveis da composição corporal.

Em relação à quantidade e o percentual de gordura na carcaça, foi observada tendência semelhante entre os EXPERIMENTO I e II. Entretanto, no EXPERIMENTO II, o grupo R-LEU apresentou valor absoluto (-24,5%) e percentual de gordura corporal (-22,6%) significativamente menor ($P < 0,05$), comparado ao grupo R-CON.

A concentração de leptina sérica no grupo R-LEU foi menor, comparada à observada no grupo R-CON, mas não foi encontrada diferença significativa entre os grupos ($P = 0,0763$). São inúmeros os trabalhos que demonstram que a concentração de leptina no sangue apresenta correlação positiva com a quantidade de gordura corporal (MIZUNO *et al.*, 1999; KIM & SCARPACE, 2003; LUSTIG *et al.*, 2004). Os valores de leptina encontrados no presente estudo corroboram os dados da literatura, pois sua concentração sérica apresentou correlação diretamente proporcional com a quantidade ($r = 0,8801$, $P < 0,0001$) e com o percentual ($r = 0,8583$, $P < 0,0001$) de gordura corporal. Alguns estudos demonstraram que a LEU é capaz de regular a síntese protéica no tecido adiposo (LYNCH *et al.*, 2002a), bem como a síntese e secreção *in vitro* de leptina (LYNCH, 2001; ROH *et al.*, 2002; LYNCH *et al.*, 2003). Poderia se especular se a suplementação crônica com LEU seria capaz de modificar a concentração sérica de leptina, independentemente da composição corporal. Caso a maior oferta de LEU fosse capaz de aumentar a secreção de leptina, um hormônio que estimula o gasto energético e reduz a ingestão alimentar (NISWENDER, BASKIN & SCHWARTZ, 2004; STOCKHORST *et al.*, 2004; DONATO, PEDROSA & TIRAPGUI, 2004), essa poderia ser uma hipótese que explicaria a menor quantidade de gordura corporal observada no grupo R-LEU. Entretanto, o fato do grupo R-LEU ter apresentado concentração de leptina 47% menor em relação ao grupo R-CON e os valores de leptina se correlacionarem com a gordura corporal descarta a possibilidade de interferência direta da suplementação na concentração desse hormônio.

Outra hipótese para explicar a menor quantidade de gordura corporal no grupo suplementado diz respeito ao efeito da LEU no aumento da síntese e/ou *turnover* protéico (PATTI *et al.*, 1998; ANTHONY *et al.*, 2001; LYNCH *et al.*, 2002b; MEIJER, 2003; O'CONNOR *et al.*, 2003; YOSHIZAWA, 2004; CROZIER *et al.*, 2005). O aumento da taxa de síntese protéica pode elevar o gasto energético e caso a ingestão calórica seja controlada, conforme ocorreu

durante todo o EXPERIMENTO II, essa demanda adicional de energia pode ser suprida, principalmente, pela oxidação da gordura corporal. Todavia, o aumento da taxa de síntese protéica não necessariamente resulta em acréscimo na quantidade de proteína na carcaça, pois pode haver aumento paralelo da degradação protéica. Nesse caso, há aumento do *turnover* protéico sem, no entanto, resultar em alteração na massa da proteína corporal (AFOLABI *et al.*, 2004). Futuros trabalhos que estudarem o efeito da suplementação crônica com LEU na perda de peso ou na composição corporal podem ajudar a responder essa questão, avaliando a taxa metabólica basal e o *turnover* protéico.

Todavia, também não está descartada a possibilidade dos aminoácidos promoverem um estado ainda mais catabólico, no que se refere ao SNC. A restrição alimentar crônica reduz significativamente a concentração de insulina na circulação e no SNC (STOCKHORST *et al.*, 2004; HALLSCHMID *et al.*, 2004a; HALLSCHMID *et al.*, 2004b). A diminuição da sinalização da insulina no SNC estimula a economia de energia e o aumento da EM (MIZUNO *et al.*, 1999; BRUNING *et al.*, 2000; OBICI & ROSSETTI, 2003). Pode ser que, a partir das propriedades insulínótropas da LEU (FLOYD *et al.*, 1966; ANELLO *et al.*, 2001; ZAWALICH *et al.*, 2004; CROZIER *et al.*, 2005; BAUM *et al.*, 2005), a suplementação tenha promovido elevações pós-prandiais mais acentuadas da insulinemia na circulação sistêmica. Esse aumento pode ter elevado a concentração da insulina no SNC, especialmente no hipotálamo, aumentando a ativação dos receptores de insulina. Como a sinalização da insulina no SNC provoca efeitos semelhantes ao da leptina (NISWENDER, BASKIN & SCHWARTZ, 2004), o aumento de sua sinalização, artificialmente gerado pela ação secretagoga de insulina dos aminoácidos suplementados, hipoteticamente, fez com que o organismo minimizasse as adaptações provocadas pela restrição alimentar. Como essas adaptações economizam energia, o fato do organismo deixar de poupar energia, dado um consumo constante de ração, levou ao dispêndio da gordura corporal.

Além disso, não é rejeitada a possibilidade desse efeito ter ocorrido também no EXPERIMENTO I, nos quais os aminoácidos, hipoteticamente, teriam sido eficazes na prevenção do aumento da EM, durante as fases de perda de peso, porém esse efeito teria sido parcialmente amenizado durante os

períodos de recuperação do peso corporal. Nessas últimas fases, o organismo poderia estar em um estado altamente anabólico, reduzindo os benefícios causados pelos aminoácidos nas fases de perda de peso. Contudo, o grande anabolismo durante os períodos de consumo *ad libitum* (verificado pela rápida recuperação do peso corporal), juntamente com o estímulo adicional dos aminoácidos para a síntese protéica, pode ter levado os grupos suplementados ao expressivo aumento da massa protéica corporal, conforme foi observado no EXPERIMENTO I.

Em relação à dose utilizada e a capacidade dessa quantidade de estimular o processo de síntese protéica, diversos estudos utilizaram doses elevadas de LEU, como a administração aguda de quantidades equivalentes ao consumo diário. Em um trabalho recentemente publicado, observou-se que quantidades equivalentes a 10% do consumo diário de LEU foram suficientes para aumentar agudamente a taxa de síntese protéica no músculo gastrocnêmio em ratos (CROZIER *et al.*, 2005). O caráter crônico do presente estudo também pode ter contribuído para que pequenos efeitos no metabolismo protéico dos animais, em termos agudos (uma única refeição), se somassem no longo prazo para produzir alterações significativas nas variáveis estudadas.

Períodos de restrição alimentar, dependendo da duração e do grau de severidade, podem afetar negativamente o estado nutricional protéico, ao reduzir as concentrações de proteína e RNA teciduais (REITER *et al.*, 2005). O grupo R-LEU apresentou aumento na concentração hepática de proteína e de RNA no músculo gastrocnêmio, em relação ao grupo R-CON. A diferença observada na resposta à suplementação, entre o fígado e o músculo esquelético, pode ser parcialmente explicada pela diferente sinalização celular, desencadeada pela LEU entre esses tecidos, pois existem evidências que a ação da LEU na regulação da síntese protéica é específica por tecido (LYNCH, 2001; YOSHIZAWA, 2004).

Parte do aumento de proteína e RNA teciduais, que ocorre em resposta à ingestão de ração em animais em jejum, é consequência da ativação do processo de tradução protéica (REITER *et al.*, 2005). Como a LEU estimula a inicialização da tradução protéica, levando principalmente à síntese de proteínas ribossomais (ANTHONY *et al.*, 2001), a maior disponibilidade desse

aminoácido também pode promover aumento nas concentrações de proteína e RNA teciduais (REITER *et al.*, 2005). A concentração de RNA total é um indicador da capacidade celular de síntese protéica, pois o RNA ribossomal representa a maior parte do RNA total. Dessa forma, a maior concentração de RNA muscular no grupo R-LEU pode ser indicativo de aumento da capacidade de síntese protéica nesse tecido. Além disso, alguns estudos sugerem que a LEU é capaz de estimular a síntese protéica, por meio da modulação da expressão gênica (JOUSSE *et al.*, 2004).

O EXPERIMENTO III foi desenvolvido para se obter mais informações a respeito da capacidade dos aminoácidos LEU e PHE de provocar aumento na secreção de insulina, no organismo de ratos *in vivo*. Como já mencionado, a ação insulínica da LEU e da PHE já foi estudada *in vitro* e em seres humanos. Em ratos *in vivo*, apenas a infusão intragástrica de LEU foi testada. A escolha dos aminoácidos LEU e PHE para a suplementação da ração teve como objetivo aumentar acentuadamente a secreção de insulina, durante cada refeição dos animais. Embora outros aminoácidos também sejam secretagogos de insulina, segundo VAN LOON *et al.* (2000a), a combinação de LEU com PHE, acrescida de carboidrato, foi capaz de promover, dentre diversos compostos testados, a maior resposta sinérgica no estímulo à secreção de insulina, ao menos em seres humanos. Além disso, não existem experimentos em ratos *in vivo* que testaram a resposta insulinêmica da administração intragástrica de ração (com todos seus componentes), suplementada com LEU e PHE.

Como segundo objetivo do EXPERIMENTO III, estudou-se a cinética da secreção de insulina após uma média de 18 horas ou após 4 horas de jejum, em ratos anestesiados. Conforme já observado por outros autores, o jejum prolongado pode reduzir a capacidade do organismo de responder a um estímulo para secreção de insulina (MALAISSE, MALAISSE & WRIGHT, 1967; SANTOS Jr, CARPINELLI & CURI, 1989). Entretanto, não se sabe se essa falha na secreção de insulina é capaz de anular o efeito insulínico dos aminoácidos suplementados. Os animais do EXPERIMENTO II, antes de ingerirem diariamente sua cota de ração (50% do consumo *ad libitum*), permaneciam aproximadamente 18 horas de jejum. O mesmo ocorria com os animais do EXPERIMENTO I, durante as fases de perda de peso. Dessa

forma, o jejum de 18 horas simulou o período de privação que os animais em restrição alimentar eram submetidos diariamente. Já em relação ao jejum de 4 horas, buscou-se um período de jejum que simulasse a condição basal de consumo *ad libitum*, conforme os animais do EXPERIMENTO I eram submetidos nas fases de reganho de peso, sem, no entanto, a possível interferência de alimento dentro do estômago. Por esse motivo, o jejum não foi menor que 4 horas, pois os animais ainda poderiam apresentar algum conteúdo intragástrico de ração, previamente consumida.

Um aspecto relevante para o presente trabalho a respeito do esquema *meal-feeding* é o tempo necessário para que as já mencionadas adaptações ocorram. LIMA *et al.* (1982) constataram que em apenas 1 semana de treinamento, os animais *meal-feeding* já apresentavam diversas adaptações no metabolismo de carboidratos, como alteração da resposta glicêmica, insulinêmica e do armazenamento de glicogênio hepático, após uma refeição. Entretanto, LEVEILLE (1966) verificou que é necessário mais tempo para que o esquema *meal-feeding* afete significativamente a capacidade de lipogênese de animais. Além disso, CURI *et al.* (1989) observaram que 5 semanas de consumo *ad libitum* é suficiente para reverter todas as mudanças metabólicas induzidas pelo esquema *meal-feeding* em ratos. Essas informações são relevantes, principalmente para EXPERIMENTO I, uma vez que os animais foram submetidos a 1 semana de restrição alimentar e apenas a 12-14 dias de consumo *ad libitum*, entre as fases de perda de peso. A questão é se a duração dos períodos de restrição alimentar foi suficiente para promover as adaptações, características do regime alimentar *meal-feeding*, e se os 12 a 14 dias subsequentes de consumo *ad libitum* foram suficientes para reverter essas adaptações, caso elas tenham ocorrido de fato.

Um ponto que merece menção é a escolha do anestésico. Na realidade foram testados diversos anestésicos antes da adoção do hidrato de cloral (ANEXOS, Tabela 27). Basicamente a escolha do hidrato de cloral como anestésico ocorreu por exclusão, pois todas as outras alternativas consultadas na literatura apresentavam problemas metodológicos ou não podiam ser adquiridos ou manuseados. Entretanto, alguns estudos mostram que o hidrato de cloral não interfere significativamente com a secreção de insulina (AROLA *et al.*, 1981; HINDLYCKE & JANSSON, 1992).

Ainda em relação à metodologia utilizada no EXPERIMENTO III, a escolha do uso da porção plasmática e, não a sérica, para a determinação da concentração de insulina, foi devido ao fato de que, dado um mesmo volume de sangue, obtém-se mais plasma do que soro. Essa característica é crucial, pois, como os animais sofreram onze coletas de sangue em um período relativamente curto, buscou-se alternativas de minimizar o volume retirado em cada coleta. Além disso, o volume recomendado de plasma ou soro para a determinação de insulina é de 100 μL , porém foi utilizado o volume de 50 μL e completado com 50 μL de solução tampão. No entanto, o manual do kit de determinação por radioimunoensaio de insulina, a partir de testes do fabricante, não encontrou diferença entre os resultados obtidos com volumes de 100 e 50 μL , indicando que o volume de 50 μL pode ser utilizado com confiabilidade.

No total, foram coletados cerca de 5,5 mL de sangue (11 coletas de $\sim 200 \mu\text{L}$ de descarte + $\sim 300 \mu\text{L}$ de sangue para as determinações) e infundido aproximadamente 1,8 mL de solução salina (9 infusões de $\sim 200 \mu\text{L}$). Deve-se observar que a maior parte da solução salina não atingiu a circulação sistêmica, preenchendo apenas o “volume-morto” da cânula. Da mesma forma, durante as coletas de descarte, uma parte considerável era composta de solução salina. Dessa forma, o balanço entre coletas e infusões foi de cerca de 3,7 mL. Segundo WEISS *et al.* (2000), um rato adulto possui cerca de 6,4% de seu peso corporal na forma de sangue. MOORE (1990) aponta para um volume de sangue entre 6-7% do peso corporal. Os ratos utilizados no EXPERIMENTO III possuíam mais de 350 g, o que representa um volume sangüíneo total entre 21,0 e 24,5 mL, pelo menos. Assim, o volume de 3,7 mL representa cerca de 15,1 a 17,6% do volume de sangue desses animais. IWARSSON *et al.* (1994) indicam que a coleta entre 10 a 15% do volume total de sangue não oferece perigo ao animal. FLECKNELL (1995) recomenda coletas de no máximo 10% do volume sangüíneo, quando não se deseja possíveis complicações circulatórias. Finalmente, WEISS *et al.* (2000) recomendam coletas abaixo de 10% do volume de sangue para não haver mecanismos compensatórios, porém coletas maiores (15-20%) não trariam grandes complicações aos animais, ocorrendo apenas redução da pressão arterial e do débito cardíaco. Todas essas recomendações são pautadas na faixa de segurança para que o

animal sobreviva após a coleta de sangue, sem maiores complicações. Uma vez que o EXPERIMENTO III foi de caráter agudo, sem a preocupação de manter o animal vivo após o término das coletas de sangue, o volume total retirado parece provocar mecanismos compensatórios, que poderiam levar a certo comprometimento da função cardíaca, caso o animal permanecesse vivo, mas provavelmente não causaram prejuízo quanto à qualidade das coletas durante o andamento do experimento. É sugerido que futuros estudos analisem a concentração de hematócritos antes e após o término das coletas de sangue para a determinação de mudanças significativas no volume plasmático.

Antes de comentar os resultados da cinética de secreção da insulina, cabe uma observação sobre a variabilidade acentuada entre as respostas dos animais, em todos os grupos. Houve animais que responderam muito bem à administração intragástrica de ração, enquanto outros simplesmente não obtiveram aumento significativo na secreção de insulina. Foi tomado o cuidado de registrar qualquer acontecimento fora do previsto durante os procedimentos de anestesia, canulação, infusão intragástrica e coleta de sangue dos animais. Como não ocorreu nenhum fato inesperado, foi descartada a possibilidade de que eventuais problemas nas coletas de sangue foram responsáveis pela acentuada variabilidade na resposta dos animais. Além disso, tanto a dose do anestésico quanto a quantidade de ração foram calculadas pelo peso corporal, a fim de se obter melhor padronização (400 mg de hidrato de cloral e 2 g de ração, ambos para cada kg do peso corporal dos ratos).

Muito embora houve bastante treinamento do procedimento, antes das coletas definitivas, pode ser que tenha havido certa influência da habilidade na execução das coletas, ao longo dos animais estudados. Porém, como as coletas eram intercaladas por grupo, esse hipotético efeito não gerou qualquer tendência nos resultados entre os grupos, mas pode ter contribuído para o aumento da variabilidade dentro de cada grupo.

Em relação aos resultados do EXPERIMENTO III, pode-se observar que o grupo SALINA manteve sua insulinemia praticamente estável ao longo do procedimento, como era esperado. Esse grupo representou todas as interferências do procedimento na concentração sangüínea de insulina, da mesma forma quer um “efeito ruído” ou uma “amostra branco”. Nos animais submetidos ao jejum médio de 18 horas, observou-se que a suplementação

com LEU+PHE na dosagem de 50% promoveu a maior resposta insulinêmica, representada tanto pela cinética, como pela área sob a curva. Entretanto, cabe ressaltar que a área sob a curva da concentração de insulina não apresentou diferença estatística entre os grupos, embora o grupo LEU+PHE-50% tenha apresentado valor 54,8% maior, em relação ao grupo CONTROLE.

Embora os resultados encontrados com a dose de 50% fossem esperados, causou surpresa o fato do grupo LEU+PHE na dosagem de 100% apresentar resposta menor que o grupo CONTROLE, porém, também, sem apresentar diferença significativa em relação aos demais grupos. Foi observado que o grupo LEU+PHE-100% apresentou valor 21% menor, quando comparado ao grupo CONTROLE. Simplesmente, até o momento, não há explicação para esse resultado, porém não deixa de ser interessante a coincidência entre a menor resposta insulinêmica da dose de 100% com a reduzida ação, nos resultados do EXPERIMENTO I, obtida pelo grupo VP100, em relação ao grupo VP50. Da mesma forma, o grupo LEU+PHE-50%-SJ apresentou tendência de uma resposta insulinêmica mais acentuada (+40,2%), comparado ao grupo CONTROLE-SJ. Porém, esses valores não apresentaram diferença estatística ($P = 0,4303$).

Como já discutido, o jejum prolongado resulta em uma menor resposta insulinêmica (MALAISSE, MALAISSE & WRIGHT, 1967; SANTOS Jr, CARPINELLI & CURI, 1989). Esse comportamento foi confirmado a partir da comparação entre os resultados dos animais de jejum de 4 horas, em relação ao jejum de 18 horas. Nota-se que a magnitude (+100%) e a área sob a curva (quase 3 vezes maior) da resposta insulinêmica foram bem maiores nos animais submetidos ao jejum curto, quando comparados aos animais expostos ao jejum prolongado.

Os dados da resposta insulinêmica sugerem que a adição na ração de aminoácidos purificados, com propriedades secretagogas de insulina, como é o caso da LEU e da PHE, é capaz de provocar respostas pós-prandiais mais acentuadas na secreção de insulina. Mesmo que não tenha sido encontrada diferença significativa na área sob a curva de secreção da insulina, entre os grupos no mesmo período de jejum, é razoável avaliar esses resultados pelo aspecto fisiológico e clínico, uma vez que a adição de LEU e PHE na dose de 50% foi capaz de aumentar em aproximadamente 50% a resposta insulinêmica.

Possíveis deficiências metodológicas (vaso sangüíneo escolhido para a coleta de sangue, animal sob efeito da anestesia, modo de infusão da ração, etc) podem parcialmente explicar a ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Além disso, a pequena dose de LEU e PHE, utilizada na suplementação das rações, também pode ter contribuído para não ter havido diferença significativa na resposta insulinêmica. Nesse sentido, em um estudo que administrou LEU agudamente, observou-se que apenas a partir de doses equivalentes à 50% da ingestão diária desse aminoácido foi verificado aumento significativo na concentração de insulina, após 30 minutos, em ratos Sprague-Dawley machos (CROZIER *et al.*, 2005).

Dessa forma, esses resultados dão suporte à argumentação de que, pelo menos parte das adaptações causadas pela suplementação crônica com LEU e PHE no EXPERIMENTO I e possivelmente com LEU no EXPERIMENTO II, podem ser resultado da alteração na cinética da concentração de insulina. Além disso, como os ratos estudados no EXPERIMENTO III não sofreram nenhum tratamento prévio (como no EXPERIMENTO I e II), não é possível saber se a suplementação crônica ou as rotinas alimentares estudadas alteram a resposta insulinêmica dos animais à ração e à suplementação.

Além disso, cabe ainda salientar que alguns animais, especialmente dos grupos LEU-PHE-50%, LEU-PHE-50%-SJ e CONTROLE-SJ, apresentaram um padrão de curva bifásica, ou seja, houve um primeiro pico, seguido pela diminuição da concentração da insulina e, finalmente, ocorria um segundo pico, em geral, mais acentuado que o primeiro. Também não há resposta definitiva que explique esse comportamento, mas pode-se especular que os primeiros picos representam a 1ª fase da secreção de insulina, normalmente visível apenas em estudos *in vitro* ou a partir da infusão endovenosa de secretagogos de insulina. Assim, a 1ª fase de secreção de insulina é resultado de uma rápida e potente estimulação das células beta pancreáticas (CAUMO & LUZI, 2004). Embora tamanha estimulação, em geral, não ocorre durante a ingestão de alimentos, NEBENDAHL (2000) sugere que a infusão de líquidos diretamente no estômago de ratos (a ração estava diluída em 4 mL de solução salina/kg.peso do animal), pode fazer com que uma substancial quantidade do volume administrado passe rapidamente pelo estômago, atingindo o intestino

delgado. Isso faz com que as substâncias administradas sejam rapidamente absorvidas, causando picos acentuados na concentração dessas substâncias na circulação, ao invés de um lento e prolongado aumento (efeito semelhante ao fenômeno conhecido como *dumping*). Isso pode ter ocorrido, pois os animais que apresentaram dois picos de insulina, tiveram o 1º sempre antes dos 10 primeiros minutos, conforme é o comportamento da 1ª fase de secreção de insulina (CAUMO & LUZI, 2004).

Em resumo, o presente trabalho traz evidências a respeito da influência da suplementação com os aminoácidos purificados LEU e PHE, no metabolismo e na composição corporal, em ratos adultos. Os resultados do EXPERIMENTO I demonstram que a rotina de VPC tende a aumentar a EM, o ganho de peso e a gordura corporal, e que a suplementação com LEU+PHE é capaz de aumentar a quantidade de massa magra e de proteína total na carcaça, bem como reduzir, parcialmente, o acúmulo de gordura provocado pela rotina de VPC. Não houve evidências de que a perda de peso se torna mais difícil e de que o ganho de peso mais fácil, no decorrer dos ciclos de VPC. Além disso, a suplementação com LEU, durante a restrição alimentar crônica, é capaz de diminuir significativamente a gordura corporal, hipoteticamente a partir da amenização das adaptações normalmente desencadeadas por situações de balanço energético negativo que visam à economia de energia, como, por exemplo, a supressão do anabolismo protéico. Essa hipótese é corroborada pelo melhora significativa no estado protéico hepático e na capacidade de síntese protéica muscular (concentração de RNA) dos animais suplementados com LEU. Parte das conseqüências provocadas pela suplementação com LEU e PHE pode ser resultado da maior secreção de insulina, que a adição desses aminoácidos à ração provocam. Ainda são necessários mais estudos para que, talvez, as respostas observadas por esse trabalho possam resultar em recomendações práticas para indivíduos que tentam emagrecer.

8. CONCLUSÕES

EXPERIMENTO I

A variação do peso corporal tendeu a aumentar a eficiência metabólica, pois os animais submetidos a essa rotina ganharam mais peso, a partir de um mesmo consumo de ração.

Não foi observada redução na perda de peso ou maior ganho ponderal, no decorrer dos ciclos de variação do peso corporal.

Foi observado aumento da gordura corporal (+36%) nos ratos submetidos à rotina de variação do peso. Não houve alteração nos demais parâmetros da composição corporal.

A suplementação com LEU e PHE promoveu ganho adicional de peso, consequência do aumento expressivo da massa magra e da proteína corporal.

A suplementação com LEU e PHE foi capaz de amenizar parcialmente o acúmulo de gordura, provocado pela rotina de variação do peso corporal.

EXPERIMENTO II

A suplementação com LEU reduziu significativamente a gordura na carcaça, mas não alterou expressivamente os demais parâmetros da composição corporal de ratos submetidos à restrição alimentar crônica.

A suplementação com LEU teve efeitos benéficos em alguns parâmetros do estado nutricional protéico, pois aumentou significativamente a concentração de proteína no fígado e a concentração de RNA muscular.

EXPERIMENTO III

A adição na ração de LEU e PHE, na dosagem de 50%, foi capaz de aumentar a resposta insulinêmica, tanto no jejum curto (4 horas), quanto no jejum prolongado (18 horas), em ratos *in vivo*. Contudo, a área sob a curva de insulina não foi estatisticamente diferente entre os grupos estudados.

O jejum prolongado reduz de maneira significativa a secreção de insulina em resposta a administração intragástrica de ração. Contudo, o efeito insulínico da adição de LEU e PHE na ração não é anulado.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFOLABI, P.R.; JAHOOOR, F.; GIBSON, N.R. & JACKSON, A.A. Response of hepatic proteins to the lowering of habitual dietary protein to the recommended safe level of intake. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.287, p.E327-E330, 2004.

ALQUIER, T. & KAHN, B.B. Peripheral signals set the tone for central regulation of metabolism. **Endocrinology**, v.145, p.4022-4024, 2004.

ANELLO, M.; UCCIARDELLO, V.; PIRO, S.; PATANÉ, G.; FRITTITTA, L.; CALABRESE, V.; STELLA, A.M.G.; VIGNERI, R.; PURRELLO, F. & RABUAZZO, A.M. Chronic exposure to high leucine impairs glucose-induced insulin release by lowering the ATP-to-ADP ratio. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.281, p.E1082-E1087, 2001.

ANTHONY, J.C.; ANTHONY, T.G.; KIMBALL, S.R. & JEFFERSON, L.S. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. **J. Nutr.**, v.131, p.856S-860S, 2001.

ARCHAMBAULT, C.M.; CZYZEWSKI, D.; CORDUA Y CRUZ, G.D.; FOREYT, J.P. & MARIOTTO, M.J. Effects of weight cycling in female rats. **Physiol. Behav.**, v.46, p.417-421, 1989.

AROLA, LL.; PALOU, A.; REMESAR, X.; HERRERA, E. & ALEMANY, M. Effect of ether, sodium pentobarbital and chloral hydrate anesthesia on rat plasma metabolite concentrations. **Rev. Esp. Fisiol.**, v.37, p.379-386, 1981.

AYYAD, C. & ANDERSEN, T. Long-term efficacy of dietary treatment of obesity: a systematic review of studies published between 1931 and 1999. **Obes. Rev.**, v.1, p.113-119, 2000.

BAUM, J.I.; O'CONNOR, J.C.; SEYLER, J.E.; ANTHONY, T.G.; FREUND, G.G. & LAYMAN, D.K. Leucine reduces the duration of insulin-induced PI 3-kinase activity in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.288, p.E86-E91, 2005.

BAZOTTE, R.B.; BATISTA, M.R. & CURI, R. Meal-feeding scheme: twenty years of research in Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.33, p.985-991, 2000.

BENDIXEN, H.; MADSEN, J.; BAY-HANSEN, D.; BOESEN, U.; OVESEN, L.F.; BARTELS, E.M. & ASTRUP, A. An observational study of slimming behaviour in Denmark in 1992 and 1998. **Obes. Res.**, v.10, p.911-922, 2002.

BENINI, Z.L.; CAMILLONI, M.A.; SCORDATO, C.; LEZZI, G.; SAVIA, G.; ORIANI, G.; BERTOLI, S.; BALZOLA, F.; LIUZZI, A. & PETRONI, M.L. Contribution of weight cycling to serum leptin in human obesity. **Int. J. Obes.**, v.25, p.721-726, 2001.

BERDANIER, C.D.; WURDEMAN, R. & TOBIN, R.B. Further studies on the role of the adrenal hormones in the responses of rats to meal-feeding. **J. Nutr.**, v.106, p.1791-1800, 1976.

BERGMEYER, H.U. Determination with glucose oxidase and peroxidase. In: _____. *Methods of enzymatic analyses*, p.1205-1212, 1974.

BLACKBURN, G.L.; WILSON, G.T.; KANDERS, B.S.; STEIN, L.J.; LAVIN, P.T.; ADLER, J. & BROWNELL, K.D. Weight cycling: the experience of human dieters. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.49, p.1105-1109, 1989.

BLAIR, S.N.; SHATEN, J.; BROWNELL, K.; COLLINS, G. & LISSNER, L. Body weight change, all-cause mortality, and cause-specific mortality in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. **Ann. Intern. Med.**, v.119, p.749-757, 1993.

BLOCK, K.P. & HARPER, A.E. High levels of dietary amino and branched-chain alpha-keto acids alter plasma and brain amino acid concentrations in rats. **J. Nutr.**, v.121, p.663-671, 1991.

BLOCK, K.P.; AFTRING, R.P. & BUSE, M.G. Regulation of rat liver branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase activity by meal frequency and dietary protein. **J. Nutr.**, v.120, p.793-799, 1990.

BOLSTER, D.R.; JEFFERSON, L.S. & KIMBALL, S.R. Regulation of protein synthesis associated with skeletal muscle hypertrophy by insulin-, amino acid- and exercise-induced signalling. **Proc. Nutr. Soc.**, v.63, p.351-356, 2004.

BRIEF, D.J. & DAVIS, J.D. Reduction of food intake and body weight by chronic intraventricular insulin infusion. **Brain Res. Bull.**, v.12, p.571-575, 1984.

BROWNELL, K.D.; GREENWOOD, M.R.; STELLAR, E. & SHRAGER E.E. The effects of repeated cycles of weight loss and regain in rats. **Physiol. Behav.**, v.38, p.459-464, 1986.

BROWNLOW, B.S.; PARK, C.R.; SCHWARTZ, R.S. & WOODS, S.C. Effect of meal pattern during food restriction on body weight loss and recovery after refeeding. **Physiol. Behav.**, v.53, p.421-424, 1993.

BRUNING, J.C.; GAUTAM, D.; BURKS, D.J.; GILLETE, 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, p.2122-2125, 2000.

CAMMISOTTO, P.G. & BUKOWIECHI, L.J. Mechanisms of leptin secretion from white adipocytes. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v.283, p.C244-C250, 2002.

CANNON, G. & EINZIG, H. Dieting makes you fat? London:Century Publishing, 1983.

CARLSON, M.G. & CAMPBELL, P.J. Intensive insulin therapy and weight gain in IDDM. **Diabetes**, v.42, p.1700-1707, 1993.

CAUMO, A. & LUZI, L. First-phase insulin secretion: does it exist in real life? Considerations on shape and function. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.287, p.E371-E385, 2004.

CECCHI, H.M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. Campinas: Unicamp, 1999.

CHAN, J.L.; HEIST, K.; DEPAOLI, A.M.; VELDHUIS, J.D. & MANTZOROS, C.S. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. **J. Clin. Invest.**, v.111, p.1409-1421, 2003.

CHOO, P.S.; SMITH, T.K.; CHO, C.Y. & FERGUSON, H.W. Dietary excesses of leucine influence growth and body composition of rainbow trout. **J. Nutr.**, v.121, p.1932-1939, 1991.

CLEARY, M.P. Response of adult lean and obese female Zucker rats to intermittent food restriction/refeeding. **J. Nutr.**, v.116, p.1489-1499, 1986.

CLEGG, D.J.; RIEDY, C.A.; SMITH, K.A.; BENOIT, S.C. & WOODS, S.C. Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. **Diabetes**, v.52, p.682-687, 2003.

CROZIER, S.J.; KIMBALL, S.R.; EMMERT, S.W.; ANTHONY, J.C. & JEFFERSON, L.S. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. **J. Nutr.**, v.135, p.376-382, 2005.

CURI, R.; BAZOTTE, R.B.; HELL, N.S. & TIMO-IARIA, C. Reversibility of metabolic changes induced by feeding schedule in rats. **Physiol. Behav.**, v.45, p.249-254, 1989.

CURI, R.; HELL, N.S.; BAZOTTE, R.B. & TIMO-IARIA, C. Metabolic performance of free fed rats subjected to prolonged fast as compared to the metabolic pattern in rats under long term food restriction. **Physiol. Behav.**, v.33, p.525-531, 1984.

DESAUTELS, M. & DULOS, R.A. Effects of repeated cycles of fasting-refeeding on brown adipose tissue composition in mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.255, p.E120-E128, 1988.

DONATO JR, J.; PEDROSA, R.G. & TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais da regulação do peso corporal: ação da leptina no desequilíbrio energético. **Rev. Bras. Cien. Farm.**, v.40, p.273-287, 2004

DOUMAS, B.T.; WATSON, W.A.; BIGGS, H.G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clin. Chem. Acta.**, v.31, p.87-96, 1971.

ERNSBERGER, P.; KOLETSKY, R.J.; BASKIN, J.S. & COLLINS, L.A. Consequences of weight cycling in obese spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.270, p.R864-R872, 1996.

FIELD, A.E.; AUSTIN, S.B.; TAYLOR, C.B.; MALSPEIS, S.S.M.; ROSNER, B.; ROCKETT, H.R.; GILLMAN, M.W. & COLDITZ, G.A. Relation between dieting and weight change among preadolescents and adolescents. **Pediatrics**, v.112, p.900-906, 2003.

FIELD, A.E.; MANSON, J.E.; LAIRD, N.; WILLIAMSON, D.F.; WILLETT, W.C. & COLDITZ, G.A. Weight cycling and the risk of developing type 2 diabetes among adult women in the United States. **Obes. Res.**, v.12, p.267-274, 2004a.

FIELD, A.E.; MANSON, J.E.; TAYLOR, C.B.; WILLETT, W.C. & COLDITZ, G.A. Association of weight change, weight control practices, and weight cycling among women in the Nurses' Health Study II. **Int. J. Obes.**, v.28, p.1134-1142, 2004b.

FIELD, K.J.; WHITE, W.J. & LANG, C.M. Anaesthetic effects of chloral hydrate, pentobarbitone and urethane in adult male rats. **Laboratory Animals.**, v.27, p.258-269, 1993.

FIGLEWICZ, D.P. Adiposity signals and food reward: expanding the CNS roles of insulin and leptin. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.284, p.R882-R892, 2003.

FLECKNELL, P.A. Non-surgical experimental procedures. In: TUFFERY, A.A. Laboratory animals: an introduction for experimenters. 2^{ed}. Chichester:John Wiley, 1995.

FLOYD JR, J.C.; FAJANS, S.S.; CONN, J.W.; KNOPF, R.F. & RULL, J. Stimulation of insulin secretion by amino acids. **J. Clin. Invest.**, v.45, p.1487-1502, 1966.

FOLSOM, A.R.; FRENCH, S.A.; ZHENG, W.; BAXTER, J.E. & JEFFERY, R.W. Weight variability and mortality: the Iowa Women's Health Study. **Int. J. Obes.**, v.20, p.704-709, 1996.

FRITSCHKE, A. & HÄRING, H. At last, a weight neutral insulin? **Int. J. Obes.**, v.28, p.S41-S46, 2004.

FRÜHBECK, G.; GÓMEZ-AMBROSI, J.; MURUZÁBAL, F.J. & BURRELL, M.A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.280, p.E827-E847, 2001.

GENDIMENICO, G.J.; BOUQUIN, P.L. & TRAMPOSCH, K.M. Diphenylamine-colorimetric method for DNA assay: a shortened procedure by incubating samples at 50 degrees C. **Anal. Biochem.**, v.173, p.45-48, 1988.

GERARDO-GETTENS, T.; MILLER, G.D.; HORWITZ, B.A.; McDONALD, R.B.; BROWNELL, K.D.; GREENWOOD, M.R.C.; RODIN, J. & STERN, J.S. Exercise decreases fat selection in female rats during weight cycling. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.260, p.R518-R524, 1991.

GRACI, S.; IZZO, G.; SAVINO, S.; CATTANI, L.; LEZZI, G.; BERSELLI, M.E.; BALZOLA, F.; LIUZZI, A. & PETRONI, M.L. Weight cycling and cardiovascular risk factors in obesity. **Int. J. Obes.**, v.28, p.65-71, 2004.

GRAHAM, B.; CHANG, S.; LIN, D.; YAKUBU, F. & HILL, J.O. Effect of weight cycling on susceptibility to dietary obesity. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.259, p.R1096-R1102, 1990.

GRAND, T.C. & MILLAR J.S. The effects of intermittent dietary restriction on weight gain and body fat in white-footed mice, *peromyscus leucopus*. **Physiol. Behav.**, v.48, p.221-224, 1990.

GRAY, D.S.; FISLER, J.S. & BRAY G.A. Effects of repeated weight loss and regain on body composition in obese rats. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.47, p.393-399, 1988.

GUAGNANO, M.T.; BALLONE, E.; PACE-PALITTI, V.; VECCHIA, R.D.; ORAZIO, N.D.; MANIGRASSO, M.R.; MERLITTI, D. & SENSI, S. Risk factors for hypertension in obese women. The role of weight cycling. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.54, p.356-360, 2000.

GUNAWARDANA, S.C.; LIU, Y-J.; MacDONALD, M.J.; STRAUB, S.G. & SHARP, G.W.G. Anaplerotic input is sufficient to induce time-dependent potentiation of insulin release in rat pancreatic islets. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.287, p.E828-E833, 2004.

GUYTON, A.C. Tratado de fisiologia médica. 6ª ed., Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1986.

HALLSCHMID, M.; BENEDICT, C.; BORN, J.; FEHM, H-L. & KERN, W. Manipulating central nervous mechanisms of food intake and body weight regulation by intranasal administration of neuropeptides in man. **Physiol. Behav.**, v.83, p.55-64, 2004a.

HALLSCHMID, M.; BENEDICT, C.; SCHULTES, B.; FEHM, H-L.; BORN, J. & KERN, W. Intranasal insulin reduces body fat in men but not in women. **Diabetes**, v.53, p.3024-3029, 2004b.

HAMEL, F.G.; UPWARD, J.L.; SIFORD, G.L. & DUCKWORTH, W.C. Inhibition of proteasome activity by selected amino acids. **Metabolism**, v.52, p.810-814, 2003.

HAMM, P.; SHEKELLE, R.B. & STAMLER, J. Large fluctuations in body weight during young adulthood and twenty-five year risk of coronary death in men. **Am. J. Epidemiol.**, v.129, p.312-318, 1989.

HANSON, R.L.; JACOBSSON, L.T.H.; McCANCE, D.R.; NARAYAN, K.M.V.; PETTITT, D.J.; BENNETT, P.H. & KNOWLER, W.C. Weight fluctuation, mortality and vascular disease in Pima Indians. **Int. J. Obes.**, v.20, p.463-471, 1995.

HARRIS, R.A.; JOSHI, M. & JEOUNG, N.H. Mechanisms responsible for regulation of branched-chain amino acid catabolism. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.313, p.391-396, 2004.

HASSID, W.Z. & ABRAHAMSON, S. Chemical procedures for analyses of polysaccharides. **Methods Enzymol.**, v.3, p.34-51, 1957.

HEITMANN, B.L. & GARBY, L. Composition (lean and fat tissue) of weight changes in adult Danes. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.75, p.840-847, 2002.

HELLSTRÖM, P.M.; GELIEBTER, A.; NÄSLUND, E.; SCHMIDT, P.T.; YAHAV, E.K.; HASHIM, S.A. & YEOMANS, M.R. Peripheral and central signals in the control of eating in normal, obese and binge-eating human subjects. **Br. J. Nutr.**, v.92, p.S47-S57, 2004.

HENRY, R.J.; CANNON, D.C. & WINKELMAN, J.W; In: _____. Clinical chemistry: principles and techniques. 2.ed., v.1, Hagerstown:Haper & How, p.405-502, 1974.

HILL, A.J. Does dieting make you fat? **Br. J. Nutr.**, v.92, p.S15-S18, 2004.

HILL, J.O.; THACKER, S.; NEWBY, D.; NICKEL, M. & DIGIROLAMO, M. A comparison of constant feeding with bouts of fasting-refeeding at three levels of nutrition in the rat. **Int. J. Obes.**, v.11, p.251-262, 1987.

HILL, J.O.; THACKER, S.; NEWBY, D.; SYKES, M.N. & DIGIROLAMO, M. Influence of food restriction coupled with weight cycling on carcass energy restoration during ad-libitum refeeding. **Int. J. Obes.**, v.12, p.547-555, 1988.

HINDLYCKE, M. & JANSSON, L. Glucose tolerance and pancreatic islet blood flow in rats after intraperitoneal administration of different anesthetic drugs. **Upsala. J. Med. Sci.**, v.97, p.27-35, 1992.

HUKSHORN, C.J.; MENHEERE, P.P.C.A.; WESTERTERP-PLANTENGA, M.S. & SARIS, W.H.M. The effect of pegylated human recombinant leptin (PEG-OB) on neuroendocrine adaptations to semi-starvation in overweight men. **Eur. J. Endocrinol.**, v.148, p.649-655, 2003.

ILAGAN, J.; BHUTANI, V.; ARCHER, P.; LIN, P.K. & JEN, K.L. Estimation of body composition changes during weight cycling by bioelectrical impedance analysis in rats. **J. Appl. Physiol.**, v.74, p.2092-2098, 1993.

IRIBARREN, C.; SHARP, D.S.; BURCHFIEL, C.M. & PETROVITCH, H. Association of weight loss and weight fluctuation with mortality among Japanese American men. **N. Engl. J. Med.**, v.333, p.686-692, 1995.

IWARSSON, K.; LINDBERG, L. & WALLER, T. Common non-surgical techniques and procedures. In: SVENDSEN, P. & HAU, J. Handbook of laboratory animal science: selection and handling of animals in biomedical research. 1^oed, v.I. Boca Raton: CRC Press, 1994.

JEBB, S.A.; GOLDBERG, G.R.; COWARD, W.A.; MURGATROYD, P.R. & PRENTICE, A.M. Effects of weight cycling caused by intermittent dieting on metabolic rate and body composition in obese women. **Int. J. Obes.**, v.15, p.367-374, 1991.

JEFFERY, R.W. Does weight cycling present a health risk? **J. Nutr.**, v.63, p.452S-455S, 1996.

JEFFERY, R.W.; WING, R.R. & FRENCH, S.A. Weight cycling and cardiovascular risk factors in obese men and women. **Am J. Clin. Nutr.**, v.55, p.641-644, 1992.

JEN, K.L.; LU, H.; SAVONA, L.; WATKINS, A. & SHAW, M. Long-term weight cycling reduces body weight and fat free mass, but not fat mass in female Wistar rats. **Int. J. Obes.**, v.19, p.699-708, 1995.

JOUSSE, C.; AVEROUS, J.; BRUHAT, A.; CARRARO, V.; MORDIER, S. & FAFOURNOUX, P. Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.313, p.447-452, 2004.

KADOWAKI, M. & KANAZAWA, T. Amino acids as regulators of proteolysis. **J. Nutr.**, v. 133, p.S2052-S2056, 2003.

KAJIOKA, T.; TSUZUKU, S.; SHIMOKATA, H. & SATO, Y. Effects of intentional weight cycling on non-obese young women. **Metabolism**, v.51, p.149-154, 2002.

KIM, Y-W. & SCARPACE, P.J. Repeated fasting/refeeding elevates plasma leptin without increasing fat mass in rats. **Physiol. Behav.**, v.78, p.459-464, 2003.

KOPELMAN, P.G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v.404, p.635-643, 2000.

KOPP, W. High-insulinogenic nutrition – an etiologic factor for obesity and the metabolic syndrome? **Metabolism**, v.52, p.840-844, 2003.

KOPPEL, J.; KUCHAR, S.; MOZES, S.; PETRUSOVA, K. & JASENOVEC, A. Changes in blood sugar after administration of xylazine and adrenergic blockers in the rat. **Vet. Med. (Praha)**, v.27, p.113-118, 1982.

KROKE, A.; LIESE, A.D.; SCHLZ, M.; BERGMANN, M.M.; KLIPSTEIN-GROBUSCH, K.; HOFFMANN, K. & BOEING, H. Recent weight changes and weight cycling as predictors of subsequent two year weight change in a middle-aged cohort. **Int. J. Obes.**, v.26, p.403-409, 2002.

LAYMAN, D.K. & BAUM, J.I. Dietary protein impact on glycemic control during weight loss. **J. Nutr.**, v.134, p.S968-S973, 2004.

LAYMAN, D.K. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. **J. Nutr.**, v.133, p.S261, S267, 2003.

LEIBEL, R.L.; ROSENBAUM, M. & HIRSCH, J. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. **N. Eng. J. Med.**, v.332, p.621-628, 1995.

LEVEILLE, G.A. Glycogen metabolism in meal-fed rats and chicks and the time sequence of lipogenic and enzymatic adaptive changes. **J. Nutr.**, v.90, p.449-460, 1966.

LEVEILLE, G.A. Lipogenic adaptations related to pattern of food intake. **Nutr. Rev.**, v.30, p.151-155, 1972.

LEVIN, B.E. Diet cycling and age alter weight gain and insulin levels in rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.267, p.527-535, 1994.

LIM, K.; MURAKAMI, E.; LEE, S.; SHIMOMURA, Y. & SUZUKI, M. Effects of intermittent food restriction and refeeding on energy efficiency and body fat deposition in sedentary and exercised rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v.42, p.449-468, 1996.

LISBOA, P.C.; OLIVEIRA, K.J.; CABANELAS, A.; ORTIGA-CARVALHO, T.M. & PAZOS-MOURA, C.C. Acute cold exposure, leptin, and somatostatin analog (octreotide) modulate thyroid 5'-deiodinase activity. **Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.284, p.E1172-E1176, 2003.

LISSNER, L.; ANDRES, R. MULLER, D.C. & SHIMOKATA, H. Body weight variability in men: metabolic rate, health and longevity. **Int. J. Obes.**, v.14, p.373-383, 1990.

LISSNER, L.; ODELL, P.M.; D'AGOSTINO, R.B.; STOKES III, J.; KREGER, B.E.; BELANGER, A.J. & BROWNELL, K.D. Variability of body weight and health outcomes in the Framingham population. **N. Engl. J. Med.**, v.324, p.1839-1844, 1991.

LoPRESTI, J.S.; GRAY, D. & NICOLOFF, J.T. Influence of fasting and refeeding on 3,3',5'-triiodothyronine metabolism in man. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.72, p.130-136, 1991.

LOWE, M.R. & TIMKO, C.A. Dieting: really harmful, merely ineffective or actually helpful? **Br. J. Nutr.**, v.92, p.S19-S22, 2004.

LOWRY, D.H.; ROSEBROUGH, J.N.; FARR, A.L. & RANDAL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.266-275, 1951.

LUSTIG, R.H.; SEN, S.; SOBERMAN, J.E. & VELASQUEZ-MIEYER, P.A. Obesity, leptin resistance, and the effects of insulin reduction. **Int. J. Obes.**, v.28, p.1344-1348, 2004.

LYNCH, C.J. Role of leucine in the regulation of mTOR by amino acids: revelations from structure-activity studies. **J. Nutr.**, v.131, p.861S-865S, 2001.

LYNCH, C.J.; HALLE, B.; FUJII, H.; VARY, T.C.; WALLIN, R.; DAMUNI, Z. & HUTSON, S.M. Potential role of leucine metabolism in the leucine-signaling pathway involving mTOR. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.285, p.E854-E863, 2003.

LYNCH, C.J.; HUTSON, S.M.; PATSON, B.J.; VAVAL, A. & VARY, T.C. Tissue-specific effects of chronic dietary leucine and norleucine supplementation on protein synthesis in rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.283, p.E824-E835, 2002b.

LYNCH, C.J.; PATSON, B.J.; ANTHONY, J.; VAVAL, A.; JEFFERSON, L.S. & VARY, T.C. Leucine is a direct-acting nutrient signal that regulates protein synthesis in adipose tissue. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.283, p.E503-E513, 2002a.

MALAISSE, W.J.; MALAISSE-LAGAE, F. & WRIGHT, P.H. Effect of fasting upon insulin secretion on the rat. **Am J. Physiol.**, v.213, p.843-848, 1967.

MATTHEWS, D.R.; HOSKER, J.P.; RUDENSKI, A.S.; NAYLOR, B.A.; TREACHER, D.F. & TURNER, R.C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. **Diabetologia**, v.28, p.412-419, 1985.

MEIJER, A.J. & DUBBELHUIS, P.F. Amino acid signalling and the integration of metabolism. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.313, p.397-403, 2004.

MEIJER, A.J. Amino acids as regulators and components of nonproteinogenic pathways. **J. Nutr.**, v.133, p.S2057-S2062, 2003.

MELBY, C.L.; SCHMIDT, W.D. & CORRIGAN, D. Resting metabolic rate in weight-cycling collegiate wrestlers compared with physically active, noncycling control subjects. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.52, p.409-414, 1990.

MIZUNO, T.M.; MAKIMURA, H.; SILVERSTEIN, J.; ROBERTS, J.L.; LOPINGCO, T. & MOBBS, C.V. Fasting regulates hypothalamic neuropeptide Y, agouti-related peptide, and proopiomelanocortin in diabetic mice independent of changes in leptin or insulin. **Endocrinology**, v.140, p.4551-4557, 1999.

MOORE, D.M. Rats. In: ROLLIN, B.E. & KESEL, M.L. The experimental animal in biomedical research. 1^oed. v.II. Boca Raton: CRC Press, 1990.

MOTAL, S.M.A. & SHARP, G.W.G. Inhibition of glucose-induced insulin release by xylazine. **Endocrinology**, v.116, p.2337-2340, 1985.

MOURIER, A.; BIGARD, A.X.; De KERVILER, E.; ROGER, B.; LEGRAND, H. & GUEZENNEC, C.Y. Combined effects of caloric restriction and branched-chain amino acid supplementation on body composition and exercise performance in elite wrestlers. **Int. J. Sports Med.**, v.18, p.47-55, 1997a.

MOURIER, A.; GAUTIER, J-F.; De KERVILER, E.; BIGARD, A.X.; VILLETTE, J-M.; GARNIER, J-P.; DUVALLET, A.; GUEZENNEC, C.Y. & CATHELINEAU, G. Mobilization of visceral adipose tissue related to the improvement in insulin sensitivity in response to physical training in NIDDM: effects of branched-chain amino acid supplements. **Diabetes Care**, v.20, p.385-391, 1997b.

MULS, E.; KEMPEN, K.; VANSANT, G. & SARIS, W. Is weight cycling detrimental to health? A review of the literature in humans. **Int. J. Obes.**, v.19, p.S46-S50, 1995.

MUNRO, N.N. & FLECK, A. The determination of nucleic acids. **Methods Biochem. Anal.**, v.14, p.113-176, 1966.

NATIONAL TASK FORCE ON THE PREVENTION AND TREATMENT OF OBESITY. Weight cycling. **JAMA**, v.272, p.1196-1202, 1994.

NAVIA, B.; ORTEGA, R.M.; REQUEJO, A.M.; MENA, M.C.; PEREA, J.M. & LÓPEZ-SOBALER, A.M. Influence of the desire to lose weight on food habits, and knowledge of the characteristics of a balanced diet, in a group of Madrid university students. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.57, p.S90-S93, 2003.

NEBELING, L.; ROGERS, C.J.; BERRIGAN, D.; HURSTING, S. & BALLARD-BARBASH, R. Weight cycling and immunocompetence. **J. Am. Diet. Assoc.**, v.104, p.892-894, 2004.

NEBENDAHL, K. Routes of administration. In: KRINKE, G.J. The laboratory rat. 1^oed. San Diego: Academic Press, 2000.

NISWENDER, K.D.; BASKIN, D.G. & SCHWARTZ, M.W. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. **Trends Endocrinol. Metab.**, v.15, p.362-369, 2004.

OBICI, S. & ROSSETTI, L. Minireview: nutrient sensing and the regulation of insulin action and energy balance. **Endocrinology**, v.144, p.5172-5178, 2003.

O'CONNOR, P.M.J.; KIMBALL, S.R.; SURYAWAN, A.; BUSH, J.A.; NGUYEN, H.V.; JEFFERSON, L.S. & DAVIS, T.A. Regulation of translation initiation by insulin and amino acids in skeletal muscle of neonatal pigs. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.285, p.E40-E53, 2003.

OKAMOTO, H. & ACCILI, D. In vivo mutagenesis of the insulin receptor. **J. Biol. Chem.**, v.31, p.28359-28362, 2003.

PATTI, M-E.; BRAMBILLA, E.; LUZI, L.; LANDAKER, E.J. & KAHN, C.R. Bidirectional modulation of insulin action by amino acids. **J. Clin. Invest.**, v.101, p.1519-1529, 1998.

PAXTON, R. & HARRIS, R.A. Regulation of branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.231, p.48-57, 1984.

PEDROSA, R.G.; TIRAPEGUI, J.; ROGERO, M.M.; CASTRO, I.A.; PIRES, I.S.O. & OLIVEIRA, A.A.M. Influência do exercício físico na composição química da massa corporal magra de ratos submetidos à restrição alimentar. **Rev. Bras. Cien. Farm.**, v.40, p.27-34, 2004.

PELLIZZON, M.A.; BUISSON, A.M. & JEN, K.L. Short-term weight cycling in aging female rats increases rate of weight regain but not body fat content. **Int. J. Obes.**, v.24, p.236-245, 2000.

PETERSMARCK, K.A.; TEITELBAUM, H.S.; BOND, J.T.; BIANCHI, L; HOERR, S.M. & SOWERS, M.F. The effect of weight cycling on blood lipids and blood pressure in the multiple risk factor intervention trial special intervention group. **Int. J. Obes.**, v.23, p.1246-1255, 1999.

PODAR, T.; SOLNTSEV, A.; VÄLI, M.; VINOGRADOVA, T. & PODAR, I. No deterioration of glucose tolerance in weight cycling obese. **Int. J. Obes.**, v.20, p.921-924, 1996.

PRENTICE, A.M.; JEBB, S.A.; GOLDBERG, G.R.; COWARD, W.A.; MURGATROYD, P.R.; POPPITT, S.D. & COLE, T.J. Effects of weight cycling on body composition. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.56, p.209S-216S, 1992.

PURNELL, J.Q.; HOKANSON, J.E.; MARCOVINA, S.M.; STEFFES, M.W.; CLEARY, P.A. & BRUNZELL, J.D. Effect of excessive weight gain with intensive therapy of type 1 diabetes on lipid levels and blood pressure. **JAMA**, v.280, p.140-146, 1998.

RABEN, A.; AGERHOLM-LARSEN, L.; FLINT, A.; HOLST, J.J. & ASTRUP, A. Meals with similar energy densities but rich in protein, fat, carbohydrate, or alcohol have different effects on energy expenditure and substrate metabolism but not on appetite and energy intake. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.77, p.91-100, 2003.

RABINOWITZ, D.; MERIMEE, T.J.; MAFFEZZOLI, R. & BURGESS, J.A. Patterns of hormonal release after glucose, protein, and glucose plus protein. **Lancet**, v.2, p.454-456, 1966.

REBUFFÉ-SCRIVE, M.; HENDLER, R.; BRACERO, N.; CUMMINGS, N.; McCARTHY, S. & RODIN, J. Biobehavioral effects of weight cycling. **Int. J. Obes.**, v.18, p.651-658, 1994.

REED, G.W.; COX, G.; YAKUBU, F.; DING, L. & HILL, J.O. Effects of weight cycling in rats allowed a choose of diet. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.264, p.R35-R40, 1993.

REEVES, P.G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **J. Nutr.**, v.127, p.838S-841S, 1997.

REITER, A.K.; CROZIER, S.J.; KIMBALL, S.R. & JEFFERSON, L.S. Meal feeding alters translational control of gene expression in rat liver. **J. Nutr.**, v.135, p.367-375, 2005.

RODIN, J.; RADKE-SHARPE, N.; REBUFFÉ-SCRIVE, M. & GREENWOOD, M.R.C. Weight cycling and fat distribution. **Int. J. Obes.**, v.14, p.303-310, 1990.

ROH, C.; HAN, J.; TZATSOS, A. & KANDROR, K.V. Nutrient-sensing mTOR-mediated pathway regulates leptin production in isolated rat adipocytes. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.284, p.E322-E330, 2003.

ROSSETTI, L.; HAWKINS, M.; CHEN, W.; GINDI, J. & BARZILAI, N. In vivo glucosamine infusion induces insulin resistance in normoglycemic but not in hyperglycemic conscious rats. **J. Clin. Invest.**, v.96, p.132-133, 1995.

RÖSSNER, S. Pregnancy, weight cycling and weight gain in obesity. **Int. J. Obes.**, v.16, p.145-147, 1992.

ROZEN, R.; BRIGANT, L. & APFELBAUM, M. Effects of cycles of food restriction followed by ad libitum refeeding on body composition and energy expenditure in obese rats. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.59, p.560-565, 1994.

SANTOS, A.; CARPINELLI, A.R. & CURI, R. The effect of controlled feeding conditions on the metabolic characteristics of rats. **Physiol. Behav.**, v.45, p.529-532, 1989.

SARIS, W.H.M. Physiological aspects of exercise in weight cycling. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.49, p.1099-1104, 1989.

SCHMIDT, W.D.; CORRIGAN, D. & MELBY, C.L. Two seasons of weight cycling does not lower resting metabolic rate in college wrestlers. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v.25, p.613-619, 1993.

SCHURGIN, S.; CANAVAN, B.; KOUTKIA, P.; DePAOLI, A.M. & GRINSPOON, S. Endocrine and metabolic effects of physiologic r-methuleptin administration during acute caloric deprivation in normal-weight women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.89, p.5402-5409, 2004.

SEA, M.M.; FONG, W.P.; HUANG, Y. & CHEN, Z.Y. Weight cycling-induced alterations in fatty acid metabolism. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.279, p.R1145-R1155, 2000.

SERDULA, M.K.; MOKDAD, A.H.; WILLIAMSON, D.F.; GALUSKA, D.A.; MENDLEIN, J.M. & HEATH, G.W. Prevalence of attempting weight loss and strategies for controlling weight. **JAMA**, v.282, p.1353-1358, 1999.

SHADE, E.D.; ULRICH, C.M.; WENER, M.H.; WOOD, B.; YASUI, Y.; LaCROIX, K.; POTTER, J.D. & McTIERNAN, A. Frequent intentional weight loss is associated with lower natural killer cell cytotoxicity in postmenopausal women: possible long-term immune effects. **J. Am. Diet. Assoc.**, v.104, p.903-912, 2004.

SHIBUTANI, M. Anesthesia, artificial ventilation and perfusion fixation. In: KRINKE, G.J. The laboratory rat. 1^oed. San Diego: Academic Press, 2000.

SHIMOMURA, Y.; MURAKAMI, T.; NAKAI, N.; NAGASAKI, M. & HARRIS, R.A. Exercise promotes BCAA catabolism: effects of BCAA supplementation on skeletal muscle during exercise. **J. Nutr.**, v.134, p.S1583-S1587, 2004.

SIMPSON, J.A.; WAINWRIGHT, P.E.; HOFFMAN-GOETZ, L. & LEVESQUE S. Effects of different weight loss treatments on weight cycling and metabolic measures in male mice. **Physiol. Behav.**, v.56, p.197-201, 1994.

SPENCER, C.A.; LUM, S.M.C.; WILBER, J.F.; KAPTEIN, E.M. & NICOLOFF, J.T. Dynamic of serum thyrotropin and thyroid hormone changes in fasting. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.56, p.883-888, 1983.

STEIN, C.J. & COLDITZ, G.A. The epidemic of obesity. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.89, p.2522-2525, 2004.

STEIN, T.P.; DONALDSON, M.R.; LESKIW, M.J.; SCHLUTER, M.D.; BAGGETT, D.W. & BODEN, G. Branched-chain amino acid supplementation during bed rest: effect on recovery. **J. Appl. Physiol.**, v.94, p.1345-1352, 2003.

STEVEN, J. & LISSNER, L. Body variability and mortality in the Charleston Heart Study. **Int. J. Obes.**, v.14, p.385-386, 1990.

STOCKHORST, U.; FRIES, D.; STEINGRUEBER, H-J. & SCHERBAUM, W.A. Insulin and the CNS: effects on food intake, memory, and endocrine parameters and the role of intranasal insulin administration in humans. **Physiol. Behav.**, v.83, p.47-54, 2004.

SURYAWAN, A.; O'CONNOR, P.M.J.; KIMBALL, S.R.; BUSH, J.A.; NGUYEN, H.V.; JEFFERSON, L.S. & DAVIS, T.A. Amino acids do not alter the insulin-induced activation of the insulin signaling pathway in neonatal pigs. **J. Nutr.**, v.134, p.24-30, 2004.

SZEPESI, B. & EPSTEIN, M.G. Effect of repeated food restriction-refeeding on growth rate and weight. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.30, p.1692-1702, 1977.

TAGLIAFERRO, A.R.; RONAN, A.M.; MEEKER, L.D.; THOMPSON, H.J. & SCOTT, A.L. Cyclic food restriction, insulin and mammary cell proliferation in the rat. **Carcinogenesis**, v.18, p.2271-2276, 1997.

THE DCCT RESEARCH GROUP. Weight gain associated with intensive therapy in the diabetes control and complications trial. **Diabetes Care**, v.11, p.567-573, 1988.

THIBAUT, L.; WOODS, S.C. & WESTERTEP-PLANTENGA, M.S. The utility of animal models of human energy homeostasis. **Br. J. Nutr.**, v.92, p.S41-S45, 2004.

TOSO, C.F.R.; LINARES, L.M. & RODRIGUEZ, R.R. Blood sugar concentrations during ketamine or pentobarbitone anesthesia in rats with or without alpha and beta adrenergic blockade. **Medicina (B Aires)**, v.55, p.311-316, 1995.

TRAXINGER, R.R. & MARSHALL, S. Role of amino acids in modulating glucose-induced desensitization of glucose transport system. **J. Biol. Chem.**, v.264, p.20910-20916, 1989.

UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). **LANCET**, v.352, p.854-865, 1998.

VAN DALE, D. & SARIS, W.H.M. Repetitive weight loss and weight regain: effects on weight reduction, resting metabolic rate, and lipolytic activity before and after exercise and/or diet treatment. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.49, p.409-416, 1989.

VAN GAAL, L.F.; WAUTERS, M.A. & DE LEEUW, I.H. The beneficial effects of modest weight loss on cardiovascular risk factors. **Int. J. Obes.**, v.21, p.S5-S9, 1997.

VAN LOON, L.J.C.; KRUIJSLOOP, M.; VERHAGEN, H.; SARIS, W.H.M. & WAGENMAKERS, A.J.M. Ingestion of protein hydrolysate and amino acid-carbohydrate mixtures increases postexercise plasma insulin responses in men. **J. Nutr.**, v.130, p.2508-2513, 2000b.

VAN LOON, L.J.C.; SARIS, W.H.M.; VERHAGEN, H. & WAGENMAKERS, A.J.M. Plasma insulin responses after ingestion of different amino acid or protein mixtures with carbohydrate. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.72, p.96-105, 2000a.

VELASQUEZ-MIEYER, P.A.; COWAN, P.A.; ARHEART, K.L.; BUFFINGTON, C.K.; SPENCER, K.A.; CONNELLY, B.E.; COWAN, G.W. & LUSTIG, R.H. Suppression of insulin secretion is associated with weight loss and altered macronutrient intake and preference in a subset of obese adults. **Int. J. Obes.**, v.27, p.219-226, 2003.

VENTRUCCHI, G.; SILVA, L.G.R.; MELLO, M.A.R. & MARCONDES, M.C.G. Effects of a leucine-rich diet on body composition during nutritional recovery in rats. **Nutrition**, v.20, p.213-217, 2004.

WAINWRIGHT, P.E.; SIMPSON, J.A.; CAMERON, R.; HOFFMAN-GOETZ, L.; WINFIELD, D.; MCCUTCHEON, D. & MACDONALD, M. Effects of treadmill exercise on weight cycling in female mice. **Physiol. Behav.**, v.49, p.639-642, 1991.

WALLACE, T.M.; LEVY, J.C. & MATTHEWS, D.R. Use and abuse of HOMA modeling. **Diabetes Care**, v.27, p.1487-1495, 2004.

WALLNER, S.J.; LUSCHNIGG, N.; SCHNEDL, W.J.; LAHOUSEN, T.; SUDI, K.; MÖLLER, R.; TAFEIT, E. & HOREJSI, R. Body fat distribution of overweight females with a history of weight cycling. **Int. J. Obes.**, v.28, p.1143-1148, 2004.

WEISS, J.; TAYLOR, G.R.; ZIMMERMANN, F. & NEBENDAHL, K. Collection of body fluids. In: KRINKE, G.J. The laboratory rat. 1^oed. San Diego: Academic Press, 2000.

WHEELER, J.; MARTIN, R.; LIN, D.; YAKUBU, F. & HILL, J.O. Weight cycling in female rats subjected to varying meal patterns. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.258, p.R124-R129, 1990.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. **WHO Tech. Report. Series**, v.894, p.1-251, 2000.

WILLIAMSON, D.F. "Weight cycling" and mortality: how do the epidemiologists explain the role of intentional weight loss? **J. Am. Coll. Nutr.**, v.15, p.6-13, 1996.

WING, R.R.; JEFFERY, R.W. & HELLERSTEDT, W.L. A prospective study of effects of weight cycling on cardiovascular risk factors. **Arch. Int. Med.**, v.155, p.1416-1422, 1995.

WOODS, S.C.; LOTTER, E.C.; McKAY, L.D. & PORTE Jr, D. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. **Nature**, v.282, p.503-505, 1979.

YOSHIZAWA, F. Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.313, p.417-422, 2004.

ZAWALICH, W.S.; YAMAZAKI, H.; ZAWALICH, K.C. & CLINE, G. Comparative effects of amino acids and glucose on insulin secretion from isolated rat or mouse islets. **J. Endocrinol.**, v.183, p.309-319, 2004.

10. ANEXOS

Tabela 26. Aminograma da caseína utilizada na preparação das rações para o EXPERIMENTO II.

COMPONENTE	g/100g.caseína	g/kg.ração
CONTEÚDO PROTÉICO BRUTO	86,710	121,394
AMINOÁCIDOS		
Lisina	6,901	9,661
Treonina	3,717	5,204
Metionina	2,246	3,144
Cistina	0,432	0,605
Metionina + Cistina	2,677	3,748
Alanina	2,741	3,837
Arginina	2,966	4,152
Ácido Aspártico	6,279	8,791
Ácido Glutâmico	18,894	26,452
Glicina	1,680	2,352
Histidina	2,251	3,151
Isoleucina	4,251	5,951
Leucina	8,442	11,819
Fenilalanina	4,304	6,026
Serina	4,887	6,842
Tirosina	4,828	6,759
Valina	5,511	7,715

Tabela 27. Lista de anestésicos testados, além de potenciais candidatos e a justificativa de porque não foram empregados

Anestésico	Porque não foi utilizado
Pentobarbital Sódico (Hypnol [®] , Cristália)	1) Por ser um barbitúrico sua venda é extremamente controlada 2) O laboratório Cristália descontinuou a produção de pentobarbital sódico, não sendo possível comprá-lo
Éter etílico (Synth)	1) Duração de anestesia curta 2) Necessidade de manter o rato exposto ao éter durante o procedimento 3) Não é permitido pelo Comitê de Ética Animal para procedimentos cirúrgicos
Quetamina (Betaset [®] , Fort Dodge) + Xilazina (Coopazine [®] , Coopers)	1) Duração de anestesia moderada (insuficiente, sendo necessário de 2 a 3 reaplicações por animal) 2) Xilazina provoca hiperglicemia, insulinopenia e intolerância a glicose (KOPPEL <i>et al.</i> , 1982; MOTAL & SHARP, 1985). Provavelmente esse efeito se deve ao fato da xilazina ser um potente agonista dos receptores adrenérgicos α_2 3) Quetamina inibe a secreção de insulina (TOSO <i>et al.</i> , 1995)
Tiletamina + Zolazepam (Zoletil [®] , Virbac)	1) Anestésicos de elevado preço e baixo rendimento 2) Dificil aplicação (intramuscular ou intravenosa) 3) Duração de anestesia moderada (insuficiente) 4) A anestesia não provocava analgesia profunda 5) Escassez de estudos que investigaram seu efeito no metabolismo de secreção da insulina
Anestésicos não testados	Porque não foram testados
Halotano (Hoescht)	1) Anestésico inalatório 2) Necessidade de aparelhos para a aplicação e treinamento especializado

Tiopental (Thionembital [®] , Abbott)	1) Por ser um barbitúrico sua venda é extremamente controlada 2) Duração de anestesia curta (seriam necessárias diversas reaplicações)
Anestésico utilizado	Justificativa para seu uso
Hidrato de cloral (Deg)	1) Duração de anestesia longa 2) Baixo custo e alto rendimento 3) Fácil aplicação e armazenagem 4) Não provoca vasoconstrição, nem redução do fluxo sangüíneo no pâncreas e nas ilhotas pancreáticas (HINDLYCKE & JANSSON, 1992) 5) Não reduz a secreção de insulina, especialmente em resposta ao aumento da glicemia (AROLA <i>et al.</i> , 1981) 6) Como ponto negativo a seu uso, o hidrato de cloral provoca leve intolerância a glicose (HINDLYCKE & JANSSON, 1992), possivelmente pela redução da captação e utilização da glicose plasmática (AROLA <i>et al.</i> , 1981). Além disso, pode haver diminuição ou inibição da gliconeogênese (AROLA <i>et al.</i> , 1981)