



UNESP – Universidade Estadual Paulista

Faculdade de Medicina – Botucatu

Departamento de Clínica Médica – Laboratório Biologia Molecular

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES DOSES
SUPRAFISIOLÓGICAS DE TRIIODOTIRONINA SOBRE
ADIPOCINAS NA OBESIDADE E APÓS A PERDA DE PESO**

Renata de Azevedo Melo Luvizotto

BOTUCATU

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Renata de Azevedo Melo Luvizotto

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES DOSES SUPRAFISIOLÓGICAS DE
TRIIODOTIRONINA SOBRE ADIPOCINAS NA OBESIDADE
E APÓS A PERDA DE PESO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Nogueira

BOTUCATU

2010

"Eu aprendi...

... que a melhor sala de aula do mundo está aos pés de uma pessoa mais velha;

... que ser gentil é mais importante que estar certo;

... que é o amor; e não o tempo, que cura as feridas;

... que deveríamos ser gratos a Deus por não nos dar tudo o que Lhe pedimos;

...que ignorar os fatos não os altera;

... que cada pessoa que a gente conhece deve ser saudada com um sorriso;

... que ninguém é perfeito até você se apaixonar por esta pessoa;

... que algumas vezes tudo o que precisamos é de uma mão para segurar e de um coração para nos entender;

... que a maneira mais fácil para eu crescer como pessoa é me cercar de gente mais inteligente que eu;

... que todos querem viver no topo da montanha, mas toda felicidade e crescimento ocorre quando você está escalando-a;

... que são os pequenos acontecimentos diários que tornam a vida espetacular; ..."

(William Shakespeare)

A toda minha família, em especial, a meu marido, André

e a meus pais, Dener e Maria de Lourdes

Dedico

Agradecimentos

A Deus, simplesmente, por tudo que me concedeu!

Aos meus pais amados, em quem me espelho, exemplos de caráter e dignidade, que sempre me ensinaram e mostraram, com muito amor e dedicação, o caminho a seguir, proporcionando todos os meios para minhas conquistas. Esta também é vocês!

Ao meu marido, André, luz aos meus olhos, chão aos meus pés... presente de Deus, que me completa... meu eterno companheiro e grande amor! Obrigada pelo apoio, motivação, compreensão e, simplesmente por estar aqui... te amo, muito!!

À minha orientadora, Profa. Dra. Célia Regina Nogueira, exemplo de profissional e pessoa, por me oferecer oportunidades de crescimento e acreditar no meu trabalho. Obrigada pela amizade, orientação, incentivo, dedicação e disponibilidade sempre!

Aos meus irmãos (Gustavo, Roberta e Rachel), meus cunhados (Tháísa, Luiz, Daniel, Ivan, Juliana e Luciane), meus avós (vó Cecília e vô Estigarríbia, vó Maria e vô Chico), meus sogros (Sr. Evanir e D. Margarida), meus tios (tia Vera e tio Junior, Binha e tio Ênio, Deber e Lena, tio Lui e tia Gilda, Deniah), meus primos (Gabriela, Rogério, Valéria, Augusto, Marcelo, Flávia, Vanessa, Ana Luísa, Azael, João Paulo, Isabela, Pedro Henrique, Paulo Eduardo e Maria Luíza), meu sobrinho que está a caminho (Thales)... enfim, toda minha família. Motivos de meu orgulho e admiração... amo vocês!!

À nossa família em Botucatu, Fran e Rodrigo, Lidi, Miguel e Fafá, Ana e André, Aline (Jaca), Ana e Thiago, Ana e Zé Alípio. A cumplicidade, carinho e amizade de vocês nos fortalecem e enchem nossa vida de alegria. Adoramos vocês!!

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna, modelo de competência e entusiasmo científico, pelo incentivo, sugestões e contribuições sempre.

À Profa. Dra. Ana Lúcia dos Anjos Ferreira, pelo desprendimento em nos abrir as portas do *Nutrition and Cancer Laboratory – HNRCA – Tufts University*, e nos permitir viver uma época linda de nossas vidas! Sua alma é enorme!!! Obrigada também pelas valiosas sugestões durante o exame geral de qualificação.

À Profa. Dra. Gláucia MFS Mazeto pela disponibilidade sempre e pelas considerações e sugestões durante o exame geral de qualificação que contribuíram imensamente para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Xiang-Dong Wang e toda sua equipe no *Nutrition and Cancer Laboratory – HNRCA – Tufts University*, que nos receberam de braços abertos e foram sempre muito pacientes e amáveis conosco! O crescimento pessoal e científico durante este período é evidente!

Aos amigos Carol, Fernando, Camila, Márcio, Marina, Ana e Cris. Vocês fizeram com que nossa estada em Boston fosse menos saudosa e extremamente agradável... foi maravilhoso compartilhar aqueles momentos com vocês! Nós os adoramos!!

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani pelos ensinamentos, estímulo e auxílio para a realização da análise estatística deste trabalho.

À Maria Teresa e Regiane, amigas queridas, vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho...

À Sueli Clara pela amizade e colaboração durante todos estes anos e pelo auxílio nas dosagens hormonais realizadas!

À Sandra Fábio pela amizade, ensinamentos e atenção sempre!! Obrigada pelas dosagens bioquímicas realizadas neste estudo!!

Aos amigos do Laboratório Experimental: Sandro, Sueli Clara, Regina, Maria Teresa, Regiane, Juliana, Miriane, Fábio, Vânia, Nancy, Denise, Patrícia, Mário Sugizaki, Ana, André, Dijon, Paula, Sílvio, Loreta, Danielle, Sandrinha, Meleca, Paula, Vexa, Suflê, +uma, Marcelo, Ricardo, Morango, Zé, Mário, Camila Corrêa, Cora, Fernanda, Rogerinho, Boca, Elenize, Cris, Carlos, Patrícia, Renata, Paulinha, Adriana, Carolina, Olga, Camila Bonomo, Daniele, Camila, Sueli Garcia, Ângelo, Vitor, De Lalla, Mariele, Dani Moris, Bruna, Priscila, Natasha, Marcus... Obrigada pelo convívio agradável, amizade, ajuda e momentos de descontração!

Aos funcionários e amigos do Departamento de Clínica Médica (Ana Mengue, Elizangela, Bruno, Renato e Alexandre) pela simpatia com que sempre fui recebida e por estarem sempre prontos a me auxiliar.

Aos funcionários e amigos da seção de Pós-graduação (Regina, Nathanael, Janete, Andréa e Lílian) pelo carinho, simpatia e disposição em ajudar sempre!

Ao Beto, da Comissão de Ética em Experimentação Animal, à Juliana e todo o pessoal do GAP pela gentileza e boa vontade! Obrigada pelo apoio.

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

À bibliotecária Rosemeire Aparecida Vicente pela confecção da ficha catalográfica desde trabalho.

Ao departamento de Clínica Medica e Laboratório Experimental – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro (processo nº 06/58177-0) e por viabilizar a realização deste estudo.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho!

Muito obrigada!

*"Todo olhar é um sinal.
Todo desafio é uma oportunidade.
Toda alegria é uma luz.
Todo sonho é um caminho.
Toda opção é um descanso.
Toda chegada é um novo começo."*

(Canisio Mayer)

Obesidade, uma alteração do estado nutricional, é definida como um acúmulo excessivo ou anormal de tecido adiposo que pode deteriorar a saúde. O tecido adiposo participa ativamente na regulação de energia corporal. As células adiposas produzem várias substâncias biologicamente ativas, as adipocinas, com diferentes funções fisiológicas. A disfunção dos adipócitos, como ocorre na obesidade, pode alterar a liberação de adipocinas, como leptina, resistina e adiponectina. A restrição calórica afeta a regulação da expressão gênica do tecido adiposo, normalizando as alterações das adipocinas causadas pela obesidade; entretanto, este mecanismo ainda é pouco conhecido. Sabe-se que resistina, adiponectina, leptina e hormônios tireoidianos estão envolvidos na regulação do balanço energético. Entretanto, não é bem estabelecido os efeitos do hipertireoidismo sobre as adipocinas em ratos obesos e obesos submetidos à restrição calórica. O objetivo deste estudo foi analisar a influência de diferentes doses de triiodotironina (T_3) sobre a concentração sérica e expressão gênica de leptina, resistina e adiponectina em animais obesos e obesos submetidos à restrição calórica. Para isto, foram utilizados ratos *Wistar* machos separados inicialmente em controle (C) e obeso (OB). Os animais C receberam dieta padrão e os OB receberam dieta hipercalórica por 20 semanas. Após o período de indução de obesidade, os animais OB foram randomizados em grupo obeso (OB), obeso com dose de 5 μg de T_3 /100g de peso do animal (OS1), obeso com dose de 25 μg de T_3 /100g de peso do animal (OS2), obeso submetido à restrição calórica (RC), RC com dose de 5 μg de T_3 /100g de peso do animal (RS1) e RC com dose de 25 μg de T_3 /100g de peso do animal (RS2). Os grupos restritos receberam 75% do

consumo alimentar do grupo controle, durante 8 semanas. Após este período, os animais OS1, OS2, RS1 e RS2 foram submetidos ao tratamento com T₃ por 2 semanas; volumes apropriados de salina foram administrados nos grupos C, OB e RC. Ao final do tratamento os animais foram eutanasiados e amostras de sangue e tecido adiposo foram coletadas para dosagens bioquímicas e hormonais, e de expressão gênica de leptina, resistina e adiponectina pela técnica de PCR em tempo real. Os resultados deste estudo mostram que a administração exógena de T₃ aumentou os níveis séricos de T₃ livre, mostrando a efetividade do tratamento, e diminuiu o peso corporal e o índice de adiposidade nos grupos tratados. A concentração sérica de leptina e resistina foi diminuída com o tratamento de 25 µg de T₃, enquanto os níveis séricos de adiponectina foram diminuídos com a dose de 5 µg. Administração de T₃ diminuiu a expressão gênica de leptina, de maneira dose dependente na obesidade e apenas com a maior dose administrada na restrição calórica; a expressão de resistina não foi influenciada pelo tratamento com T₃; e a expressão de adiponectina foi diminuída apenas no grupo restrito, independente da dose de T₃ administrada. Em conclusão, a administração de dose suprafisiológica de T₃ causou diminuição na concentração sérica e expressão gênica de leptina na obesidade e na restrição alimentar. Não influenciou a expressão de resistina, entretanto a maior dose de T₃ levou à sua diminuição sérica. T₃ diminuiu a expressão de adiponectina, independente da dose administrada, apenas no processo de restrição alimentar. Estes resultados sugerem uma modulação do T₃ sobre as adipocinas.

Palavras-chave: obesidade induzida por dieta, restrição alimentar, adipocinas, triiodotironina.

Abstract

Obesity, an alteration of the nutritional state, is defined as an excessive or abnormal accumulation of adipose tissue that can cause health to deteriorate. Adipose tissue actively participates in the regulation of bodily energy. Adipose cells produce several biologically active substances, including adipokines, with different physiological functions. Dysfunction of adipocytes, as occurs in obesity, can alter the release of adipokines such as leptin, resistin and adiponectin. Calorie restriction affects the regulation of gene expression of adipose tissue, normalizing the alterations of adipokines caused by obesity; however, this mechanism remains poorly understood. It is known that resistin, adiponectin, leptin and thyroidal hormones are involved in the regulation of energetic balance. However, the effects of hyperthyroidism on adipokines in obese rats, submitted and not submitted to calorie restriction, are not well established. The present study aimed to analyze the influence of different doses of triiodothyronine (T_3) on the serum concentration and gene expression of leptin, resistin and adiponectin in obese animals, submitted and not submitted to calorie restriction. Were used male *Wistar* rats initially separated into control (C) and obese (OB) groups. The C animals received control diet while OB received hypercaloric diet for 20 weeks. After the obesity-induction period the OB animals were randomly divided into obese (OB), obese with 5 μ g dose of T_3 /100g animal body weight (OS1), obese with 25 μ g dose of T_3 /100g body weight (OS2), obese submitted to calorie restriction (CR), CR with 5 μ g dose of T_3 /100g body weight (RS1) and CR with 25 μ g does of T_3 /100g body weight (RS2). The restricted groups received 75% of control group food consumption for 8 weeks. After this period, animals OS1, OS2, RS1 and

RS2 were submitted to T₃ treatment for 2 weeks; appropriate volumes of saline were administered in the C, OB and CR groups. At the end of the treatment the animals were euthanized and samples of blood and adipose tissue were collected for biochemical and hormonal dosing and gene expression of leptin, resistin and adiponectin by real-time PCR. The results of the present study show that the exogenous T₃ administration increased serum levels of free T₃, showing the effectiveness of the treatment, and diminished body weight and adiposity index in treated groups. Serum concentrations of leptin and resistin were diminished by treatment with 25 µg T₃, while serum adiponectin levels were lowered by the 5 µg dose. Administration of T₃ reduced leptin gene expression in a dose-dependent manner under obesity and only at the higher dose under calorie restriction; resistin expression was not influenced by T₃ treatment; and adiponectin expression was diminished only in the restricted group, independent of the T₃ dose administered. In conclusion, administration of a supraphysiological dose of T₃ lowered serum concentration and gene expression of leptin under obesity and calorie restriction. Resistin expression was not influenced, although the highest T₃ dose caused its serum diminution. T₃ reduced adiponectin expression, independent of the administered dose, only under calorie restriction groups. These results suggest a modulation of T₃ on adipokines.

Key words: diet-induced obesity, calorie restriction, adipokines, triiodothyronine.

Lista de Figuras

Figura 1- Protocolo experimental	34
Figura 2- Representação esquemática do critério de caracterização dos grupos	37
Figura 3- Composição dos grupos	47
Figura 4- Evolução do peso corporal.....	48
Figura 5- Concentração sérica de insulina	57
Figura 6- Concentração sérica de leptina.....	58
Figura 7- Concentração sérica de adiponectina	59
Figura 8- Concentração sérica de resistina.....	60
Figura 9- Expressão gênica de leptina no tecido adiposo	62
Figura 10- Expressão gênica de resistina no tecido adiposo	63
Figura 11- Expressão gênica de adiponectina no tecido adiposo	64
Figura 12- Expressão gênica de TR β no tecido adiposo.....	65
Figura 13- Ilustração da concentração sérica e expressão gênica de leptina, resistina e adiponectina para todos os grupos.....	68
Figura A- Visualização em gel de agarose da integridade do RNA - grupo C.....	110
Figura B- Visualização em gel de agarose da integridade do RNA - grupo OB	110
Figura C- Visualização em gel de agarose da integridade do RNA - grupo RC	111
Figura D- Visualização em gel de agarose da integridade do RNA - grupo OS1	111
Figura E- Visualização em gel de agarose da integridade do RNA - grupo RS1.....	112
Figura F- Visualização em gel de agarose da integridade do RNA - grupo OS2.....	112
Figura G- Visualização em gel de agarose da integridade do RNA - grupo RS2	113
Figura H- Visualização das curvas de amplificação de PCR em tempo real	114

Lista de Quadros

Quadro 1- Composição de macro e micronutrientes das rações (%)	36
Quadro 2- Ensaio utilizado para PCR em Tempo Real.....	44
Quadro A- Composição percentual de ácidos saturados e insaturados das rações padrão e hipercalórica.....	106
Quadro B- Composição percentual de aminoácidos das rações padrão e hipercalórica.....	107
Quadro C- Composição percentual de carboidratos das rações padrão e hipercalórica.....	108
Quadro D- Enriquecimento de micronutrientes, por quilograma, das rações padrão e hipercalórica.....	109
Quadro E- Quantificação de RNA para animais controle	110
Quadro F- Quantificação de RNA para animais obeso.....	110
Quadro G- Quantificação de RNA para animais com restrição alimentar.....	111
Quadro H- Quantificação de RNA para animais obeso com 5µg/100g de T ₃	111
Quadro I- Quantificação de RNA para animais restrito com 5µg/100g de T ₃	112
Quadro J- Quantificação de RNA para animais obeso com 25µg/100g de T ₃	112
Quadro L- Quantificação de RNA para animais restrito com 25µg/100g de T ₃	113

Lista de Tabelas

Tabela 1- Características morfométricas: peso inicial e final, e comprimento naso-anal.....	49
Tabela 2- Características nutricionais: ingestão de ração (g), ingestão calórica (kcal) e eficiência alimentar (EA).....	50
Tabela 3- Composição de gordura corporal: depósitos de gordura retraperitoneal, epididimal, visceral, total e índices de adiposidade e de Lee	52
Tabela 4- Análise bioquímica: glicose, colesterol total, triglicérides, HDL, LDL e ácidos graxos livres	54
Tabela 5- Razão insulina/glicose plasmática.....	55
Tabela 6- Dosagem hormonal de triiodotironina (T ₃) livre, tiroxina (T ₄) livre, hormônio estimulador da tireóide (TSH).....	56
Tabela 7- Associação entre os níveis séricos de T ₃ e níveis séricos de leptina, resistina e adiponectina.....	66
Tabela 8- Associação entre os níveis séricos de T ₃ e expressão gênica de TR β , leptina, resistina e adiponectina	67

Sumário

1- Introdução	17
2- Hipótese	28
3- Objetivo	30
4- Material e Métodos.....	32
4.1- Protocolo Experimental	33
4.2- Composição das dietas padrão e hipercalórica.....	35
4.3- Caracterização dos grupos	36
4.4- Eficiência alimentar e ingestão calórica.....	38
4.5- Resistência sistêmica à insulina.....	38
4.6- Depósitos de gordura corporal	38
4.7- Análise bioquímica sérica	39
4.8- Análise hormonal.....	39
4.9- Expressão Gênica	40
4.9.1 Extração do ácido ribonucléico (RNA)	40
4.9.2 Transcrição reversa do RNA (RT)	42
4.9.3 PCR em tempo real.....	43
4.10- Análise estatística.....	44
5- Resultados	45
5.1- Constituição dos grupos	46

5.2- Evolução de Peso.....	46
5.3- Características gerais	49
5.4- Análise Bioquímica.....	53
5.5- Resistência sistêmica à insulina	53
5.6- Dosagens hormonais	55
5.7- Expressão gênica	61
5.8- Estudo de associação	66
6- Discussão.....	69
7- Conclusão	83
Referências	85
Apêndices.....	105
A1- Perfil dos macronutrientes e enriquecimento de micronutrientes das dietas	106
A2- Qualidade da extração de RNA e visualização em gel de agarose 1%.....	110
A3- Visualização das curvas de amplificação de PCR em tempo real.....	114
A4- Artigos.....	115
Artigo 1.....	115
Artigo 2.....	141

1-Introdução

Obesidade é uma doença endócrino-metabólica crônica caracterizada pelo excesso de gordura corporal. Sua causa básica é multifatorial e, provavelmente, uma combinação entre genética, meio ambiente e fatores psicossociais que determinam o balanço entre a ingestão alimentar e o gasto energético ⁽¹⁾.

A incidência e prevalência da obesidade têm aumentado progressivamente nas últimas décadas ⁽²⁾. De acordo com a Organização Mundial de Saúde ⁽³⁾ mais de um bilhão de adultos apresentam sobrepeso e, aproximadamente, 400 milhões são obesos. No Brasil cerca de 40 milhões de pessoas estão acima do peso ideal e 10,5 milhões são obesas ⁽⁴⁾. A obesidade é considerada uma epidemia global e um importante problema de saúde pública, que afeta países desenvolvidos e em desenvolvimento ^(5, 6). Também é fator de risco para muitas comorbidades, como diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias, doenças cardiovasculares, respiratórias, digestivas, osteoarticulares, inflamatórias e psicológicas, as quais estão envolvidas com diminuição da qualidade de vida e aumento da mortalidade ^(1, 3, 7).

Uma das estratégias mais utilizadas para perda de peso é a redução da ingestão calórica ⁽⁸⁾. As dietas hipocalóricas têm papel central na redução de gordura em indivíduos obesos. Entretanto, as principais vias metabólicas ou de sinalização que regulam a depleção lipídica em resposta a restrição calórica ainda são desconhecidas ⁽⁹⁾.

A restrição alimentar em modelos experimentais induz redução na taxa de mortalidade e aumento da longevidade. Entre humanos obesos, a perda de peso está associada com redução de fatores de risco para doenças cardiovasculares, diminuição da taxa de incidência de Diabetes Mellitus tipo 2 e aumento da qualidade de vida ^(10, 11).

Os hormônios tireoidianos desempenham papel central na regulação do metabolismo do tecido adiposo ⁽¹²⁾, estando relacionados com mudanças de peso corporal. A glândula tireóide produz, principalmente, os hormônios tireoidianos triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4). Entretanto, também produz pequenas quantidades de outras iodotironinas, como T_3 reverso e 3,5-diiodo-l-tironina. Esta glândula faz parte do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. A secreção dos hormônios tireoidianos é regulada pelo mecanismo clássico de *feedback* negativo; resumidamente, o hormônio liberador da tireóide (TRH), produzido predominantemente por neurônios do núcleo paraventricular no hipotálamo, estimula a liberação de hormônio estimulador da tireóide (TSH) na hipófise e este, por sua vez, estimula a síntese e liberação dos hormônios tireoidianos. O aumento nas concentrações séricas dos hormônios tireoidianos inibe a produção de ambos TRH e TSH, levando à diminuição da função da tireóide. A conseqüente diminuição nos níveis séricos dos hormônios tireoidianos, por sua vez, estimula TRH e TSH, aumentando novamente a concentração dos hormônios ⁽¹³⁾. Os hormônios tireoidianos atuam no organismo por meio do acoplamento aos seus receptores α ($TR\alpha$) e β ($TR\beta$). Os receptores de hormônio tireoidiano (TRs), membros da superfamília de receptores nucleares, interagem com uma seqüência específica de DNA, denominada elemento responsivo, na região promotora do gene alvo e regula a transcrição gênica ⁽¹⁴⁾. Geralmente, os TRs são repressores na ausência do ligante T_3 e ativadores transcricionais na sua presença ⁽¹⁵⁾.

Os hormônios tireoidianos são essenciais para a sobrevivência tanto de humanos quanto de roedores ⁽¹⁶⁾. Entretanto, distúrbios na função tireoidiana levam a alterações em parâmetros metabólicos. Por exemplo, o excesso de hormônio

tireoidiano está associado com perda de peso e redução de massa muscular e de gordura ⁽¹⁷⁾.

O TSH e os hormônios tireoidianos periféricos (T_3 e T_4) estão aumentados na obesidade. A causa desse aumento não está clara. O aumento na concentração dos hormônios tireoidianos pode indicar resistência hormonal, parecida com a resistência à insulina que ocorre na obesidade. Corroborando esta teoria está o fato de que, na obesidade, os receptores para T_3 e o *feedback* negativo entre T_3 , T_4 e TSH encontram-se diminuídos ⁽¹⁸⁾. Além disso, a leptina, hormônio que se encontra aumentado na obesidade, pode atuar no eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. Estudos mostram que a leptina estimula diretamente o hipotálamo, através de seus receptores, causando a liberação do TRH, que por sua vez estimula o TSH e, conseqüentemente, os hormônios tireoidianos; pode também estimular diretamente a produção de T_3 , via conversão de T_4 em T_3 ⁽¹⁹⁾.

Segundo Kim e col. ⁽¹⁹⁾, a inanição está associada à depressão do eixo hipotálamo – hipófise – tireóide. Sendo assim, T_3 , T_4 e TSH estão reduzidos em humanos durante a restrição alimentar. As baixas concentrações de T_3 , em pacientes anoréxicas, podem estar relacionadas com a perda da conversão periférica de T_4 em T_3 associada a alterações no estado nutricional ⁽²⁰⁾.

O tecido adiposo não é apenas considerado como depósito passivo de estoque de triacilglicerol, sendo atualmente reconhecido como um órgão endócrino com múltiplas funções ^(21, 22). Participa ativamente na regulação de energia corporal, principalmente, através de uma rede de sinais endócrinos, parácrinos e autócrinos, o que permite que o adipócito tenha um papel metabólico em outros tecidos. As células adiposas produzem várias substâncias biologicamente ativas com diferentes funções fisiológicas. Estas substâncias, denominadas adipocitocinas ou adipocinas,

podem influenciar a função bem como a integridade estrutural de outros tecidos, e controlam a ingestão, termogênese, imunidade, hormônios tireoidianos e reprodutivos, e função neuroendócrina ^(23, 24). Alguns exemplos destas adipocinas são o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), proteína estimuladora de acetilação (ASP), interleucina-6 (IL-6), leptina, resistina e adiponectina ^(22, 24, 25).

A disfunção dos adipócitos, como ocorre na obesidade, pode alterar a liberação das adipocinas, pelo tecido adiposo, levando a distúrbios metabólicos e energéticos ^(26, 27). A restrição calórica afeta a regulação da expressão gênica do tecido adiposo, normalizando as alterações das adipocinas causadas pela obesidade ⁽²⁸⁾. Entretanto, ainda é pouco conhecido sobre as vias que os macronutrientes e a restrição calórica afetam a regulação da expressão gênica do tecido adiposo ⁽²⁹⁾.

O peso corporal é regulado por uma interação complexa entre hormônios e neuropeptídeos, sob controle principal de núcleos hipotalâmicos ⁽¹⁹⁾. Resistina, adiponectina, leptina e hormônios tireoidianos estão envolvidos na regulação do balanço energético ⁽³⁰⁾.

Resistina é uma proteína de 12,5 kDa, membro da família de proteínas secretórias ricas em cisteína, descoberta recentemente, chamada “resistin-like molecules” ⁽³⁰⁾. Possui atividades semelhantes às citocinas, sendo secretada por monócitos e adipócitos ⁽³¹⁾. Apesar de expressa e secretada em indivíduos magros, níveis elevados estão associados à obesidade, tanto em humanos como em modelos experimentais ⁽³²⁾. A resistina aumenta as concentrações de glicose e insulina no sangue e prejudica a resposta hipoglicêmica à infusão de insulina ^(33, 34).

Os dados sobre a expressão de resistina ainda são conflitantes. Na obesidade, enquanto alguns estudos mostram que a expressão de resistina está

aumentada ^(35, 36), outros têm demonstrado que a mesma encontra-se diminuída ⁽³⁷⁻³⁹⁾. Em ratos, a resistina é predominantemente expressa no tecido adiposo branco ^(35, 40). A administração de resistina recombinante resultou em intolerância à glicose, enquanto a imunoneutralização da resistina endógena melhorou a sensibilidade à insulina em animais com obesidade induzida por dieta ⁽³⁵⁾.

Rajala e cols ⁽⁴¹⁾ encontraram níveis elevados de resistina circulante em ratos obesos, apesar de níveis reduzidos de ácido ribonucleíco mensageiro (RNAm) no tecido adiposo. Uma razão potencial para os altos níveis séricos de resistina, em ratos obesos, inclui o prolongamento da meia-vida da proteína, como resultado da ligação de fatores séricos e/ou redução do *clearance*. Também é possível que os altos níveis de resistina circulante possam suprimir a expressão gênica de resistina por um mecanismo de *feedback* negativo, resultando na divergência entre RNAm e proteína.

Kim e cols. ⁽⁴²⁾ mostraram que níveis de RNAm de resistina estavam diminuídos durante o jejum, mas aumentaram consideravelmente quando estes animais foram realimentados ou após a infusão de insulina.

Os hormônios tireoidianos parecem regular a resistina, pelo menos em ratos ⁽⁴³⁾. Entretanto, em humanos, estudos sobre os níveis de resistina e *status* tireoidiano apresentam resultados conflitantes. Alguns estudos reportam que pacientes com hipertireoidismo apresentam aumento na concentração de resistina quando comparados com indivíduos controles eutireóides. A normalização da circulação de hormônios tireoidianos foi acompanhada por uma diminuição significativa nas concentrações de resistina ⁽⁴⁴⁾. Outros mostraram que pacientes com hipertireoidismo exibem diminuição significativa nos níveis de resistina quando comparados com indivíduos eutireóides. A normalização dos hormônios

tireoidianos circulantes não foi acompanhada por nenhuma alteração significativa nos níveis de resistina. Após o ajuste do peso pelo IMC, os níveis de resistina dos pacientes com hipertireoidismo foram parecidos com os de indivíduos eutireoideos (45).

A adiponectina, também conhecida como Acrp 30 (adipocyte complement related protein) ou adipQ, é uma proteína de 30 kDa expressa, exclusivamente, nos adipócitos diferenciados (33). Ao contrário dos outros fatores secretados pelo tecido adiposo, age como fator protetor para doenças cardiovasculares e aumenta a sensibilidade à insulina (30).

O principal tecido alvo e o mecanismo preciso da ação da adiponectina ainda não estão completamente esclarecidos. A atividade da adiponectina é provavelmente regulada em vários níveis, incluindo a expressão gênica, modificações pós-transcricionais, formação de complexos oligoméricos, e clivagem proteolítica em fragmentos menores e talvez mais ativos (46).

Existem evidências crescentes de que a adiponectina está associada com múltiplas anormalidades metabólicas comumente observadas na síndrome metabólica (47). A expressão e os níveis séricos de adiponectina estão diminuídos em humanos e em animais com resistência à insulina e obesidade (48-51). *In vivo*, a adiponectina melhora a utilização de ácidos graxos livres no fígado e no músculo esquelético de camundongos e reduz os níveis basais de glicose, sem afetar as concentrações de insulina e glucagon (52-54).

Alguns modelos experimentais sugerem que a expressão de adiponectina está associada com obesidade e resistência à insulina. A expressão da adiponectina pode ser ativada durante a adipogênese, mas a inibição do *feedback* na sua produção pode estar envolvida no desenvolvimento da obesidade. Foi demonstrado

que a expressão de genes adipogênicos foi supressa durante o desenvolvimento da obesidade e de *diabetes mellitus* em camundongos ⁽⁵⁵⁾. Uma correlação negativa entre obesidade e adiponectina circulante tem sido bem aceita, e a concentração de adiponectina aumenta concomitantemente com a perda de peso ⁽⁵⁶⁾.

Estudo experimental sobre a restrição calórica mostrou aumento nos níveis de adiponectina circulante ⁽⁵²⁾. Em concordância, Zhu e cols ⁽⁵⁷⁾ mostraram que animais caloricamente restritos exibiram aumento significativo nos níveis plasmáticos de adiponectina acompanhado por declínio significativo nos níveis de triglicérides.

Os hormônios tireoidianos compartilham algumas ações fisiológicas com a adiponectina, como a redução da gordura corporal pelo aumento da termogênese e oxidação lipídica ⁽²⁴⁾.

Iglesias e cols. ⁽⁴⁵⁾ não encontraram diferença significativa nos níveis de adiponectina entre os indivíduos com hipertireoidismo e o grupo controle, apesar disso, os pacientes com hipertireoidismo mostraram níveis de adiponectina significativamente mais baixos do que os com hipotireoidismo.

Estudos de uma possível relação entre adiponectina e alteração no metabolismo lipídico associado com disfunção tireoidiana são escassos. Pacientes com hipertireoidismo mostraram um aumento no peso corpóreo, IMC e níveis séricos de colesterol após o controle da tireotoxicose. A ausência de correlação entre estes parâmetros e níveis séricos de adiponectina sugere que mudanças na composição corpórea e no perfil lipídico, observadas no hipertireoidismo, são independentes da adiponectina. Em contraste, pacientes com hipotireoidismo mostraram elevados níveis de colesterol e triglicérides quando comparados com indivíduos normais. O controle da função tireoidiana foi seguido por uma diminuição significativa de colesterol sérico e concentração de triglicérides. Entretanto não foi possível

encontrar relação entre adiponectina e perfil lipídico antes ou depois da terapia. Além disso, depois de ajustar os níveis de adiponectina para o IMC, nenhuma alteração significativa foi observada em pacientes com hiper e hipotireoidismo, sugerindo que os hormônios tireoidianos desempenham um pequeno papel na modulação nos níveis de adiponectina ⁽⁴⁵⁾.

A leptina é uma proteína sérica de 16 kDa com meia vida de 25 – 40 minutos. É sintetizada e secretada principalmente pelos adipócitos, mas também encontrada na placenta, coração, ovários, glândulas mamárias e endotélio gástrico ⁽¹⁶⁾. Possui estrutura que sugere pertencer à família das citocinas ⁽⁵⁸⁾. Os efeitos da leptina são mediados por seus receptores, predominantemente, encontrados no hipotálamo, e são essenciais para que haja os efeitos centrais e periféricos ⁽¹⁾. A leptina age como sinal de saciedade no hipotálamo e, deste modo, controla o peso corporal não somente pela diminuição da ingestão de alimentos, mas também pelo aumento do gasto energético ⁽⁵⁹⁾.

Os níveis de leptina no sistema circulatório estão aumentados após as refeições; este aumento se dá devido à estimulação direta da expressão gênica e/ou da secreção da leptina do tecido adiposo pela glicose e insulina ⁽¹⁾. Na obesidade, está bem estabelecido que os níveis de leptina estão aumentados ^(1, 10), este aumento pode ser devido à adiposidade corporal, uma vez que há forte correlação entre os níveis de leptina e tecido adiposo ⁽⁶⁰⁾. Em contrapartida, na restrição alimentar a leptina encontra-se diminuída ^(12, 28).

Durante restrição alimentar a atividade da tireóide cai, levando a redução do gasto energético. A secreção de leptina também cai com a restrição de alimentos, sugerindo que a leptina e a tireóide podem responder paralelamente ⁽¹²⁾. Alguns estudos têm descrito a correlação entre a leptina e TSH ^(12, 18). Estudos

experimentais mostram que jejum prolongado é acompanhado por baixos níveis séricos de leptina, T_3 e T_4 e níveis baixos ou normais de TSH são restaurados após injeção de leptina ^(61, 62).

Tem sido demonstrado que o TSH estimula a secreção de leptina por efeito direto sobre o adipócito ⁽⁶³⁾. Este dado sugere que o TSH pode representar um marcador da alteração do balanço energético na obesidade ⁽⁶⁴⁾. Da mesma maneira, os hormônios tireoidianos podem regular o metabolismo da leptina, como tem sido reportado em estudos realizados com animais ^(65, 66). Alguns autores consideram que o *status* tireoidiano pode influenciar os níveis circulantes de leptina, através da regulação da massa de gordura corporal em ratos ⁽⁶⁶⁾. Estudo em humanos demonstrou que HT circulantes desempenham papel relevante na regulação do metabolismo da leptina independentemente do IMC e massa de gordura corporal ⁽⁶⁷⁾.

Os hormônios tireoidianos regulam a expressão de RNAm e secreção de leptina pelos adipócitos *in vitro*. A concentração de leptina é aumentada ou não se altera em resposta ao hipertireoidismo, enquanto no hipotireoidismo ela cai e se correlaciona positivamente com a diminuição do gasto energético. A significância funcional dos níveis séricos mais baixos de leptina, no hipotireoidismo, permanece desconhecida ⁽⁵⁸⁾.

Estudos prévios, realizados em nosso laboratório, mostraram que administração de doses fisiológicas de T_3 , em ratos obesos submetidos à restrição alimentar, aumenta a expressão gênica de leptina. Esses achados sugerem que níveis fisiológicos de hormônios tireoidianos podem ser necessários para que haja uma apropriada secreção de leptina ⁽⁶⁸⁾. Por outro lado, Yoshida e cols. ⁽⁶⁹⁾ notaram que os níveis séricos de leptina em pacientes com hipertireoidismo foram semelhantes aos níveis de indivíduos normais. O excesso de hormônios tireoidianos

nesses pacientes não causou elevação da concentração sérica de leptina comparado aos níveis esperados para o IMC.

Na obesidade e após a perda de, aproximadamente, 10% do peso corporal, ainda é pouco entendida a influência que altas doses de HT exercem sobre a leptina, resistina e adiponectina. Também não está claro, na literatura, a associação entre estes hormônios, para o modelo proposto.

2-Hipótese

Os hormônios tireoidianos estão envolvidos na regulação do tecido adiposo e este é responsável pela síntese e liberação de leptina, resistina e adiponectina. Assim, hipotetizamos que altas doses de T_3 afetarão de maneira dose-dependente a síntese e secreção dos hormônios produzidos pelo tecido adiposo, diminuindo os níveis de leptina e resistina e aumentando os de adiponectina, tanto na obesidade quanto no processo de restrição calórica.

3-Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes doses suprafisiológicas de triiodotironina sobre a concentração sérica e expressão gênica de leptina, resistina e adiponectina em animais obesos e animais obesos submetidos à restrição alimentar.

4- Material e Métodos

4.1- Protocolo Experimental

Para o desenvolvimento do estudo foram utilizados 130 ratos *Wistar* machos, pesando aproximadamente 150g, com 40 dias de idade, provenientes do biotério do Laboratório Experimental da Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Os ratos foram randomizados em dois grupos: controle (C, n= 20), obeso (OB, n= 110). Os animais C receberam dieta padrão (DP) e os OB dietas hipercalóricas (DH), por 20 semanas. Após este período todos os animais foram caracterizados de acordo com seus grupos, e o grupo OB foi separado em seis grupos: animais obeso (OB, n= 13), obeso com dose suprafisiológica de T_3 (OS1, n= 13) na concentração de 5 μg de $T_3/100$ g de peso do animal ⁽⁷⁰⁾, obeso com dose suprafisiológica de T_3 (OS2, n= 13) na concentração de 25 μg de $T_3/100$ g de peso do animal ⁽⁷¹⁾, que continuaram recebendo DH e restrição calórica (RC, n= 13), restrição calórica com dose suprafisiológica de T_3 (RS1, n= 13) na concentração de 5 μg de $T_3/100$ g de peso do animal, restrição calórica com dose suprafisiológica de T_3 (RS2, n= 13) na concentração de 25 μg de $T_3/100$ g de peso do animal. Os animais obesos submetidos à restrição calórica passaram a ser alimentados com DP, a partir da 20ª semana, e receberam 75% da quantidade ingerida pelo grupo C. Assim, a restrição aplicada a esses grupos foi de 25% ⁽⁷²⁾. As diferentes doses de triiodotironina foram administradas por meio de injeções subcutâneas, durante 2 semanas ^(73, 74); volumes apropriados de solução salina foram administrados, por meio de injeções subcutâneas, nos grupos C, OB e RC, como delineado na Figura 1.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno individuais forradas com maravalha de *Pinus* esterilizada, com tampa de arame cromado, em ambiente com temperatura (22 – 26° C) e luminosidade (ciclo claro-escuro de 12h)

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

O protocolo experimental seguiu as recomendações do “Guia para Cuidados e Usos de Animais Experimentais” e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, sob protocolo nº 566.

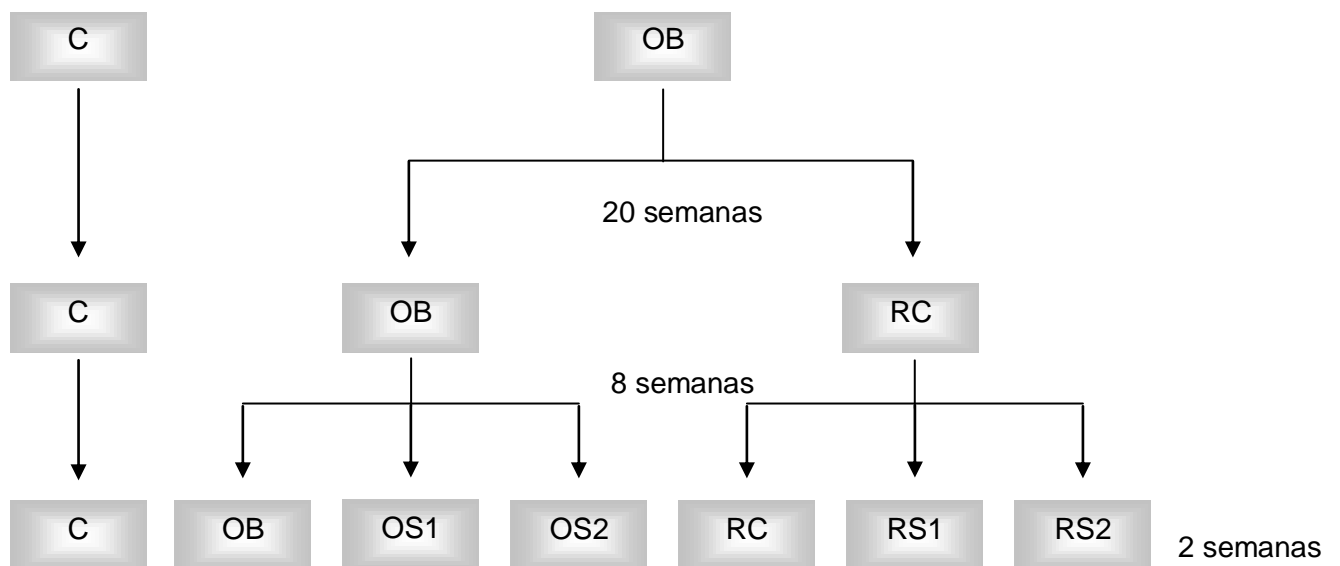


Figura 1. Protocolo experimental. C, controle; OB, obeso; OS1, obeso com dose de triiodotironina na concentração de 5 µg/100 g de peso; OS2, obeso com dose de triiodotironina na concentração de 25 µg/100 g de peso; RC, obeso submetido à restrição calórica; RS1, RC com dose de triiodotironina na concentração de 5 µg/100 g de peso; RS2, RC com dose de triiodotironina na concentração de 25 µg/100 g de peso.

4.2- Composição das dietas padrão e hipercalórica

As dietas experimentais estão de acordo com as especificações do guia “Nutrient requirements of the laboratory rat” para ratos de laboratório ⁽⁷⁵⁾. As dietas hipercalóricas foram padronizadas pela empresa Agrocere[®] Nutrição Animal, Rio Claro, SP, Brasil. A dieta padrão RC Focus 1765 é composta pelos seguintes ingredientes: fosfato bicálcico, óleo de soja degomado, cloreto de sódio, milho moído, aditivo antioxidante, farelo de soja, farelo de trigo, farinha de carne e ossos, farinha de peixe, premix mineral e vitamínico. As quatro dietas hipercalóricas apresentam a mesma composição nutricional, sendo constituídas por cloreto de sódio, caseína, soro de leite em pó, concentrado protéico de soja, milho integral moído, farinha de bolacha, fosfato bicálcico, carbonato de cálcio, aditivo emulsificante, óleo de milho, aditivos antioxidante e flavorizante, premix mineral e vitamínico, porém, acrescida com aromas e sabores diferentes, como queijo, bacon, chocolate e baunilha. A composição de macro e micronutrientes das dietas está apresentada no Quadro 1. Os perfis de ácidos graxos, aminoácidos, carboidratos e enriquecimento de micronutrientes das dietas estão apresentados na seção apêndice (A1).

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

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

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

4.3- Caracterização dos grupos

Para a caracterização dos grupos C e OB foi utilizado um critério estatístico aplicado sobre o peso corporal final (PCF), de acordo com estudo prévio ⁽⁷⁶⁾. Resumidamente, o critério foi estabelecido da seguinte maneira: foi construído um intervalo de confiança (IC) de 95% para a média do PCF de ambos os grupos. Foi adotado como ponto de separação (PS) entre os grupos, o ponto médio entre o

limite superior do controle e o limite inferior do obeso, sendo excluídos do grupo controle os animais com peso corporal acima do PS e do grupo obeso os animais com peso corporal abaixo do PS (Figura 2).

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

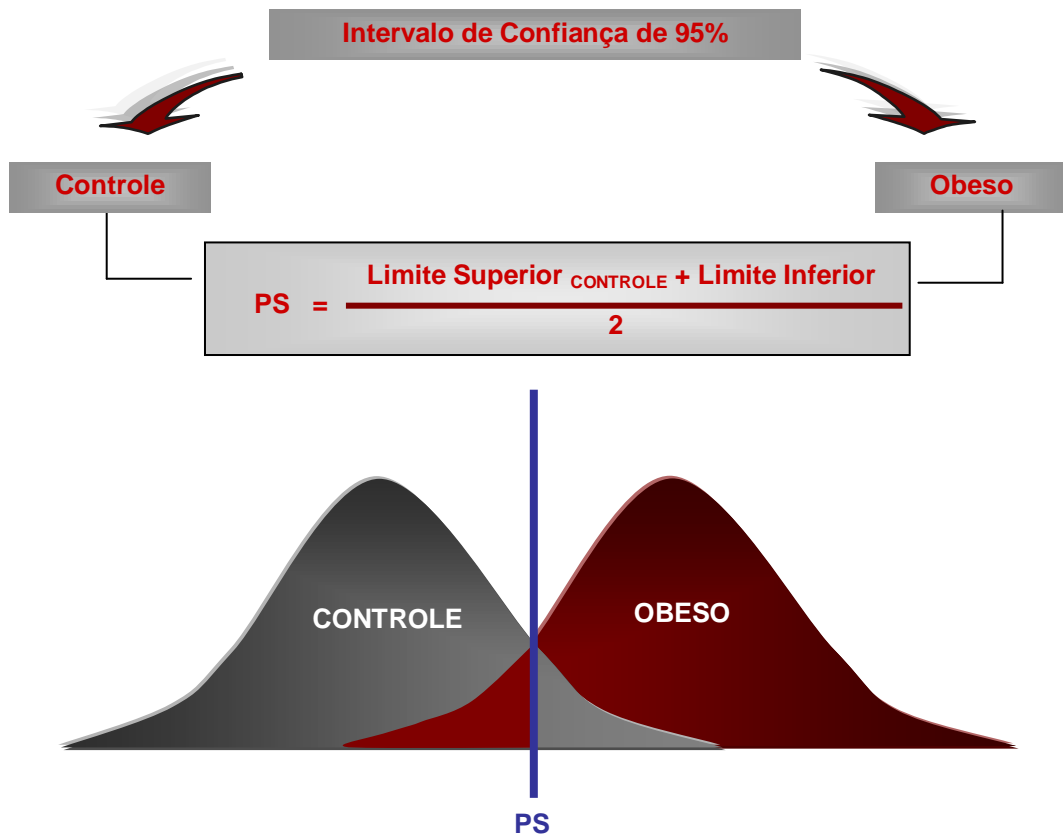


Figura 2. Representação esquemática do critério utilizado para a caracterização dos grupos controle e obeso. PS: ponto de separação ⁽⁷⁶⁾.

4.4- Eficiência alimentar e ingestão calórica

Com a finalidade de analisar a capacidade de o animal converter a energia alimentar consumida em peso corporal, foi calculada a eficiência alimentar (EA), dividindo-se o ganho total de peso dos animais (g) pela energia total ingerida (Kcal)⁽⁷⁷⁾. A ingestão calórica foi calculada da seguinte forma: ingestão alimentar semanal multiplicada pelo valor calórico de cada dieta (g x kcal).

4.5- Avaliação da resistência sistêmica à insulina

Como os animais obesos podem apresentar resistência à ação da insulina ⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾, a razão insulina/glicose foi calculada. O Cálculo desta razão baseia-se na concentração de insulina plasmática (mg/dL) dividida pela concentração de glicose plasmática (mg/dL)⁽⁸¹⁾.

4.6- Depósitos de gordura corporal

A gordura corporal total (GCT) foi mensurada pela soma dos depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral ⁽⁸²⁾. Este dado foi utilizado para confirmar a obesidade nos animais. Além disso, o índice de Lee [raiz cúbica do peso corporal final (gramas) sobre o comprimento naso-anal (CNA; milímetros) multiplicado por 10000 ⁽⁸³⁾] e o índice de adiposidade (gordura corporal total sobre o peso corporal final multiplicado por 100, adaptado de Boustany e cols. ⁽⁸⁴⁾) foram calculados.

4.7- Análise bioquímica sérica

Os animais foram submetidos a jejum por 12 a 15 horas, anestesiados com pentobarbital sódico, 50mg/kg/ip, e sacrificados por decapitação, na 30ª semana. O sangue foi coletado em tubos secos, em seguida, centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos e o soro armazenado à -80°C. As concentrações séricas de glicose, triacilglicerol (TG), colesterol total (COL), lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram determinadas por kits específicos (CELM[®], São Paulo, Brasil). A determinação de ácidos graxos livres (AGL) foi realizada por meio de kit comercial (WAKO, WAKO Pure Chemical Industries Ltd, Osaka, Japan). As dosagens foram analisadas pelo método enzimático colorimétrico automatizado (Technicon, RA-XT[™] System, Global Medical Instrumentation, Minnesota, USA).

4.8- Análise hormonal

Foram dosados no soro (coleta descrita anteriormente) de todos os animais, a concentração sérica de insulina, leptina, resistina, adiponectina, T₃ livre, T₄ livre e TSH. As dosagens foram realizadas por meio de imuno-ensaio, com auxílio de um leitor de micro-placa (Spectra Max 190 – Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Para a dosagem de leptina, insulina, adiponectina (kit ELISA Linco Research), resistina (kit ELISA B-Bridge) e hormônios tireoidianos (Kit ELISA USCN Life Science & Technology Company) foram utilizados kits comerciais.

4.9- Expressão Gênica

4.9.1 Extração do ácido ribonucléico (RNA)

Fragmentos do tecido adiposo retroperitoneal ⁽⁶⁸⁾ foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em Freezer a -80 °C, após eutanásia dos animais. A amostra congelada foi homogeneizada em aparelho Polytron (Ika Ultra Turrax[®] T25 Basic, Wilmington, NC, USA) após adição de 1 ml de TRIzol[®] (Invitrogen Brasil, São Paulo) para cada 100 mg de tecido. O TRIzol[®], solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, tem como finalidade manter a integridade do RNA durante a lise celular que ocorre no processo de homogeneização.

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

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

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

O RNA foi analisado com auxílio de um espectrofotômetro (GeneQuant[™] RNA/DNA Calculator, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England) pela sua absorvância em 260 nm. A pureza do RNA foi constatada pela razão das absorvâncias em 260/280 nm. As amostras, cujas razões foram inferiores a 1,6, foram descartadas por apresentarem contaminação por proteínas. A concentração do RNA foi quantificada de acordo com a relação:

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

[RNA] = concentração de RNA (µg/ml)

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

40 = fator de conversão (1 unidade de densidade óptica ≈ 40 µg/ml RNA)

70 = fator de diluição

Para verificar a integridade do RNA, amostras de 1 µL do RNA total foram diluídas em 8 µL de água ultrapura e 1 µL de corante (Orange G, Acros Organics, New Jersey, USA), aplicadas em gel de agarose 1% (0,3 g agarose, 30 mL de TAE Buffer 1x, 3 µL de brometo de etídio) e submetidas a uma voltagem de 80 mV (Power Pac Basic[™] Bio-Rad, Hercules, CA, USA) por 20 minutos. A integridade do

RNA foi constatada pela visualização das bandas de RNA ribossômico, 28S e 18S, e ausência de rastros do RNA no gel. As amostras que se mostraram íntegras foram utilizadas como substrato para a transcrição reversa.

4.9.2 Transcrição reversa do RNA (RT)

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

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

substituída por 1 μ L de H₂O DEPC. Esse produto foi utilizado nas reações de PCR e a ausência de DNA genômico residual foi confirmada pela ausência de produtos de amplificação.

4.9.3 PCR em tempo real

O PCR em tempo real foi realizado com ensaios prontos (Applied Biosystems, CA, USA) contendo sonda TaqMan MGB (FAM) e primers específicos. A identificação dos ensaios está apresentada no Quadro 2. O sistema TaqMan utiliza uma sonda fluorescente que permite a detecção de um produto específico da PCR conforme seu acúmulo durante os ciclos da reação. A sonda é constituída por um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5' e um corante *quencher* (silenciador) na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do *quencher* reduz bastante a fluorescência emitida pelo corante *reporter* através da transferência de energia por ressonância de fluorescência. A sonda se anela a seqüência antes dos primers e é clivada por meio da atividade da nuclease 5' da Taq DNA polimerase enquanto o *primer* é estendido. A clivagem da sonda separa o corante *reporter* do corante *quencher*, aumentando o sinal da fluorescência emitida pelo corante *reporter*. A fluorescência foi monitorada em tempo real com um aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems, CA, USA). As amostras foram normalizadas pelo controle interno *Ciclofilina* e a quantificação da expressão realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, conforme manual do fabricante.

Quadro 2. Ensaios utilizados para PCR em Tempo Real

Gene	Ensaios
Leptina	Rn 00565158_m1
Resistina	Rn 00595224_m1
Adiponectina	Rn 00595250_m1
TR β	Rn 00562044_m1
Ciclofilina	Rn 00690933_m1

4.10- Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. Para comparar a evolução do peso corporal entre os grupos foi utilizado o intervalo de confiança de 95%; para as variáveis morfométricas, nutricionais, bioquímicas, avaliação da gordura corporal, dosagens hormonais e expressão gênica foi utilizada a técnica da análise de variância (ANOVA) de duas vias, completamente casualizado, complementada com o teste de Bonferroni. Para verificar associação entre concentrações séricas e expressões dos hormônios foi utilizada a técnica de correlação linear de Pearson ⁽⁸⁵⁾. O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 5%.

5-Resultados

5.1- Constituição dos grupos

No início do estudo, o grupo C foi composto por 20 animais e OB por 110. Após a aplicação do critério para caracterização dos grupos, o grupo C passou a ser constituído por 14 animais e o OB por 83. É importante salientar que dois animais do grupo OB morreram antes da caracterização dos grupos. Assim, a percentagem de animais excluídos pelo critério foi de 30% para o grupo C e de 22,7% para o grupo OB. Após a caracterização, a composição de cada grupo ficou da seguinte forma: 16 ratos no grupo RS2, 14 nos grupos C, OB, OS1 e 13 nos grupos OS2, RC e RS1. Três animais RS2 morreram antes do término do estudo. Ao final do experimento, um animal do grupo C, um do OB e um do OS1 foram sorteados aleatoriamente e excluídos do estudo para que cada grupo experimental fosse composto por 13 animais (Figura 3).

5.2- Evolução de Peso

A evolução do peso dos animais está apresentada na Figura 4. Os animais que consumiram as dietas hipercalóricas apresentaram maior ganho de peso a partir da 12ª semana de experimento. Após a 2ª semana de instauração da restrição alimentar, o grupo RC apresentou peso semelhante ao grupo C. Houve estabilização da perda de peso (9,6%) dos animais RC a partir da 6ª semana de restrição alimentar. O tratamento com T₃ reduziu o peso em todos os grupos tratados (OS1, OS2, RS1 e RS2), sendo que OS2 e RS1 apresentaram peso semelhante ao grupo C no final do experimento, enquanto OS1 permaneceu com o peso corporal maior e os animais RS2 apresentaram diminuição de peso em comparação ao grupo C.

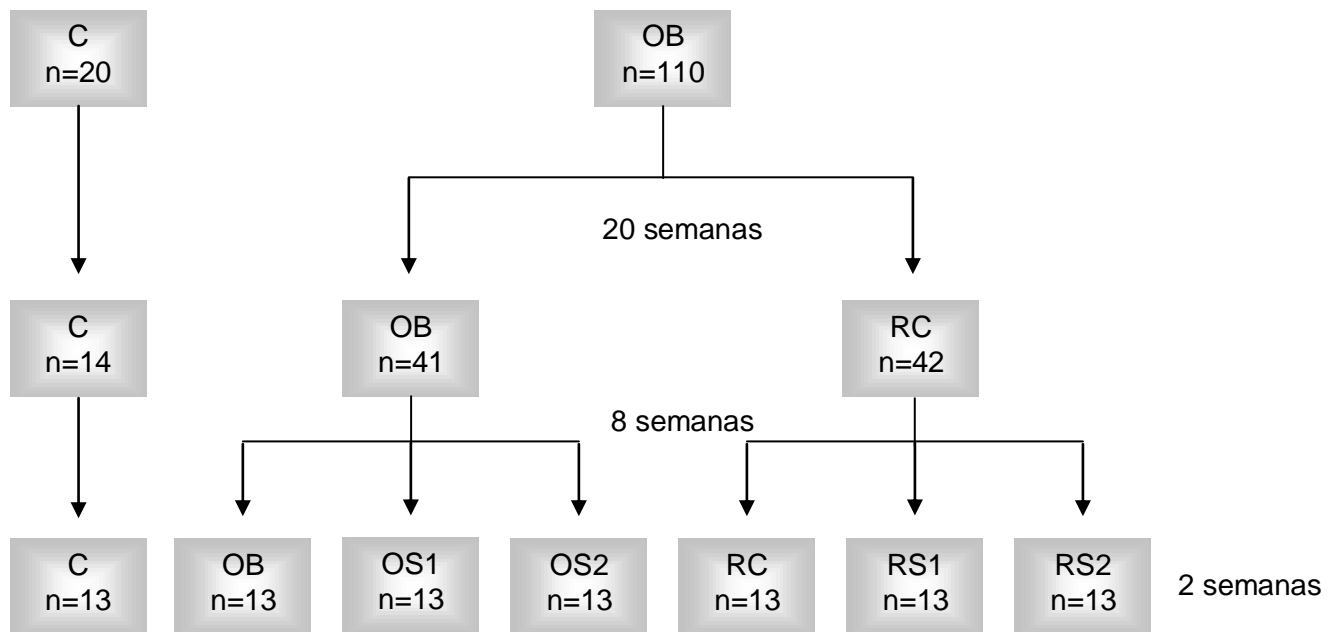


Figura 3. Composição dos grupos após o critério de exclusão. C, controle; OB, obeso; OS1, obeso com dose de triiodotironina na concentração de 5 $\mu\text{g}/100$ g de peso; OS2, obeso com dose de triiodotironina na concentração de 25 $\mu\text{g}/100$ g de peso; RC, obeso submetido à restrição calórica; RS1, RC com dose de triiodotironina na concentração de 5 $\mu\text{g}/100$ g de peso; RS2, RC com dose de triiodotironina na concentração de 25 $\mu\text{g}/100$ g de peso.

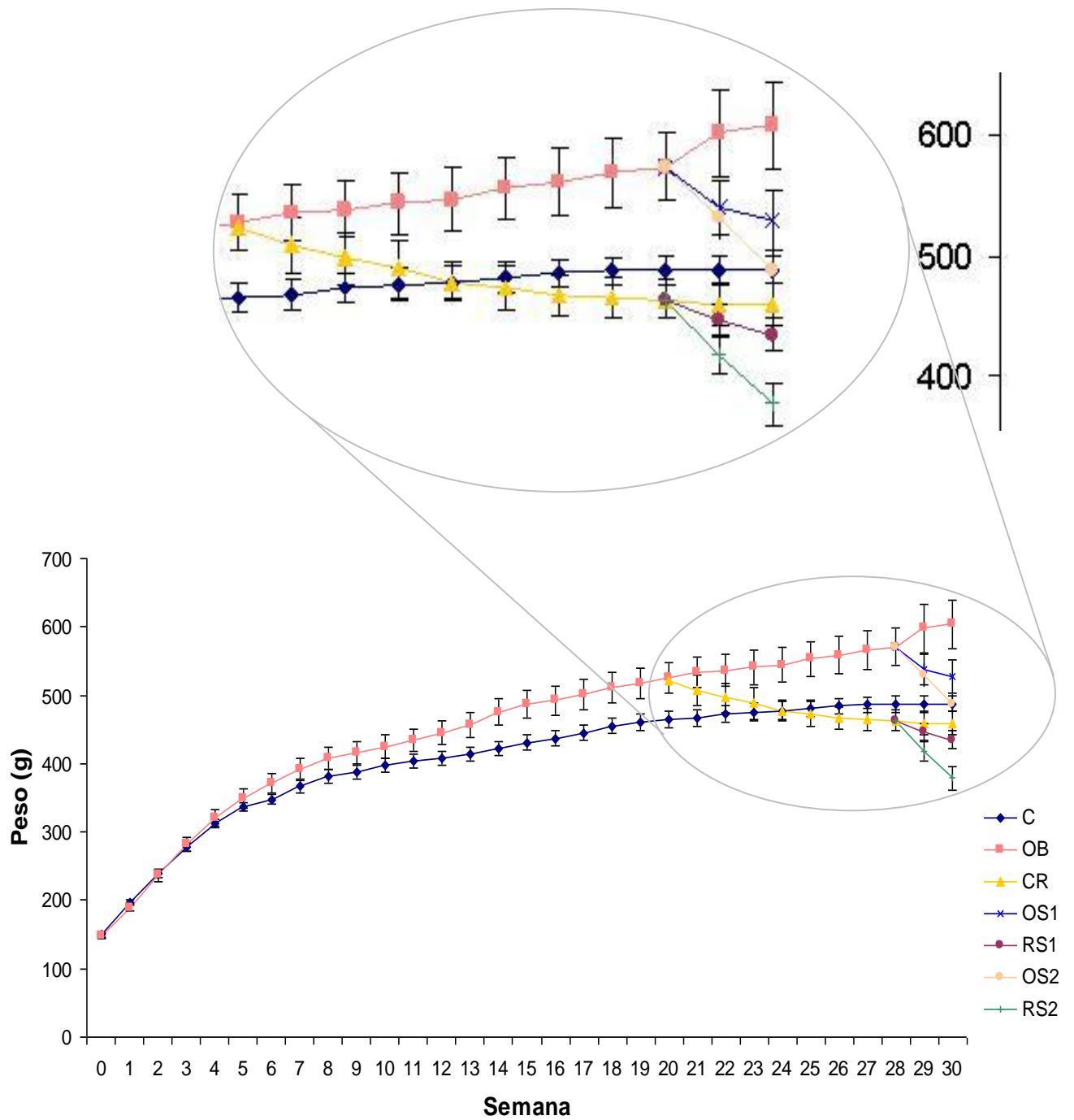


Figura 4. Evolução semanal do peso corporal dos grupos controle (n=13), obeso (OB, n=13), obeso com 5µg de T₃/ 100g de peso (OS1, n=13), obeso com 25µg de T₃/100g de peso (OS2, n=13), obeso submetido à restrição calórica (RC, n=13), RC com 5µg de T₃/100g de peso (RS1, n=13) e RC com 25µg de T₃/100g de peso (RS2, n=13). Dados expressos em média e intervalo de confiança de 95%.

5.3- Características gerais

Todos os animais apresentavam pesos semelhantes no início do estudo. Após o período de indução de obesidade, os animais que consumiram dieta hipercalórica apresentaram peso corporal maior que os animais com dieta padrão. Houve perda de peso nos animais RC quando comparados aos animais OB. A administração de T₃ provocou perda de peso, independente da dose hormonal administrada nos animais que receberam dieta hipercalórica e de maneira dose dependente nos animais submetidos à restrição alimentar. Não houve diferença estatística para comprimento naso-anal em todos os grupos estudados (Tabela 1).

Tabela 1. Características morfométricas: peso corporal inicial e final, e comprimento naso-anal.

Variável	Grupos	Tratamento		
		Salina	5 µg T ₃ / 100 g	25 µg T ₃ / 100 g
PCI (g)	C	150 ± 6 a	-----	-----
	OB	147 ± 7 Aa	149 ± 7 Aa	147 ± 6 Aa
	RC	149 ± 8 Aa	148 ± 4 Aa	150 ± 7 Aa
PCF (g)	C	488±23 a	-----	-----
	OB	604±72 Bb	527±49 Ab	488±32 Ab
	RC	459±34 Ca	435±27 Ba	379±34 Aa
CNA (cm)	C	27 ± 0,9 a	-----	-----
	OB	28 ± 0,9 Aa	28 ± 0,7 Aa	28 ± 0,7 Aa
	RC	27 ± 0,6 Aa	27 ± 0,6 Aa	27 ± 1,3 Aa

T₃, triiodotironina; PCI, peso corporal inicial; PCF, peso corporal final; CNA, comprimento naso-anal; C, controle; OB, obeso; RC, obesos submetidos à restrição calórica. Dados expressos em média ± desvio-padrão. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Bonferroni. Letras maiúsculas, comparações dentro do grupo (OB x OS1 x OS2 ou RC x RS1 x RS2); letras minúsculas, comparações entre os grupos (C x OB x RC ou OS1 x RS1 ou OS2 x RS2); letras iguais = p>0,05; letras diferentes = p<0,05.

Apesar do grupo OB ingerir menos dieta, seu consumo calórico foi maior que o do grupo C. O grupo RC apresentou diminuição na quantidade de ração e calorias ingeridas quando comparado aos grupos C e OB. O mesmo ocorreu aos grupos RS1 e RS2 em relação aos OS1 e OS2, respectivamente. A eficiência alimentar no grupo OB foi maior em relação aos demais grupos e doses supra fisiológicas de T_3 diminuíram a eficiência alimentar nos grupos tratados de maneira dose dependente (Tabela 2).

Tabela 2. Características nutricionais: ingestão de ração (g), ingestão calórica (kcal) e eficiência alimentar (EA).

Variável	Grupos	Tratamento		
		Salina	5 μ g T_3 / 100 g	25 μ g T_3 / 100 g
Ingestão (g)	C	26,1 \pm 1,2 c	-----	-----
	OB	21,7 \pm 2,4 Ab	21,4 \pm 1,4 Aa	21,2 \pm 1,2 Aa
	RC	20,1 \pm 0,7 Aa	20,1 \pm 0,8 Aa	19,9 \pm 0,8 Aa
Ingestão (kcal)	C	74,8 \pm 3,4 b	-----	-----
	OB	82,1 \pm 9,2 Ac	81 \pm 5,4 Ab	80,2 \pm 4,6 Ab
	RC	67,1 \pm 2,8 Aa	67,2 \pm 3,1 Aa	66,4 \pm 2,9 Aa
EA	C	4,5 \pm 0,2 a	-----	-----
	OB	5,5 \pm 0,6 Cb	4,6 \pm 0,3 Bb	4,2 \pm 0,3 Ab
	RC	4,6 \pm 0,4 Ba	4,3 \pm 0,3 Ba	3,4 \pm 0,5 Aa

T_3 , triiodotironina; EA, eficiência alimentar; C, controle; OB, obeso; RC, obesos submetidos à restrição calórica. Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Bonferroni. Letras maiúsculas, comparações dentro do grupo (OB x OS1 x OS2 ou RC x RS1 x RS2); letras minúsculas, comparações entre os grupos (C x OB x RC ou OS1 x RS1 ou OS2 x RS2); letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$.

Os depósitos de gordura foram significativamente aumentados no grupo OB em relação aos demais, exceto para o depósito de gordura epididimal que foi semelhante ao grupo OS1. O grupo RC foi semelhante aos grupos C e RS1. Os animais RS2 apresentaram diminuição importante de gordura corporal. Para peso corporal total e índice de adiposidade, o grupo OB mostrou aumento significativo quando comparado aos grupos C, RC e OS2. Os animais OS1 apresentaram níveis semelhantes ao OB e aumentados em relação OS2. RC foi similar aos grupos C e RS1, enquanto RS2 mostrou diminuição significativa para estas variáveis. Os animais alimentados com dieta hipercalórica apresentaram maior índice de Lee em relação aos demais grupos. O tratamento com T_3 nos animais obesos mostrou diminuição deste índice de maneira dose dependente, enquanto apenas a maior dose de T_3 administrada apresentou redução do índice no grupo RS2. Os depósitos de gordura retroperitoneal, epididimal, visceral, gordura corporal total e os índices de Lee e adiposidade estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Composição de gordura corporal: depósitos de gordura retroperitoneal, epididimal, visceral, total e índices de adiposidade e de Lee.

Variável	Grupos	Tratamento		
		Salina	5 µg T ₃ / 100 g	25 µg T ₃ / 100 g
G. Epid.	C	8,5±1,7 a	-----	-----
	OB	13,1±2,5 Bb	11,3±2,4 Bb	6,6±1,5 Ab
	RC	6,5±1,3 Ba	5,9±2,4 Ba	1,0±0,6 Aa
G. Retro	C	9,8±3,1 a	-----	-----
	OB	21,1±5,9 Cb	14,1±5,8 Bb	8,1±3,9 Ab
	RC	6,3±2,1 Ba	5,9±3,9 Ba	0,5±0,8 Aa
G. Visc.	C	6,5±1,7 a	-----	-----
	OB	12,6±3,7 Cb	9,5±3,1 Bb	5,7±1,8 Ab
	RC	4,6±1,3 Ba	4,6±1,6 Ba	1,0±0,6 Aa
G. Total	C	24,8±5,7 a	-----	-----
	OB	46,4±10,4 Bb	34,9±10,3 Bb	20,3±6,8 Ab
	RC	17,5±4,2 Ba	16,4±7,8 Ba	2,4±1,9 Aa
I. Adipos.	C	5,1±1,1 a	-----	-----
	OB	7,6±1 Bb	6,6±1,6 Bb	4,2±1,4 Ab
	RC	3,8±1,1 Ba	3,7±1,6 Ba	0,6±0,5 Aa
I. Lee	C	2,6±0,02 a	-----	-----
	OB	2,8±0,09 Cb	2,7±0,07 Bb	2,6±0,05 Ab
	RC	2,6±0,06 Ba	2,5±0,05 Ba	2,4±0,07 Aa

T₃, triiodotironina; G. Epid, gordura epididimal; G. Retro, gordura retroperitoneal; G. Visc., gordura visceral; G. Total, gordura corporal total; I. Adipos., índice de adiposidade; I. Lee, índice de Lee; C, controle; OB, obeso; RC, obesos submetidos à restrição calórica. Dados expressos em média ± desvio-padrão. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Bonferroni. Letras maiúsculas, comparações dentro do grupo (OB x OS1 x OS2 ou RC x RS1 x RS2); letras minúsculas, comparações entre os grupos (C x OB x RC ou OS1 x RS1 ou OS2 x RS2); letras iguais = p>0,05; letras diferentes = p<0,05.

5.4– Análise Bioquímica

A Tabela 4 apresenta valores para glicose, triacilglicerol, colesterol total, lipoproteína de baixa densidade, lipoproteína de alta densidade e ácidos graxos livres. Nos níveis de glicose, não houve diferença estatística entre os animais que receberam salina, contudo os animais OS1 e OS2 mostraram aumento significativo em relação aos grupos RS1 e RS2, respectivamente. Para colesterol total, apenas o grupo OS2 apresentou níveis diminuídos quando comparado ao grupo OB. Os níveis de TG foram diminuídos nos animais RS2 em relação aos RC e OS2. HDL foi estatisticamente elevado no grupo OB quando comparado ao RC e LDL foi significativamente diminuído nos grupos OS2 e RS2 quando comparado aos grupos OB, OS1 e RC, RS1, respectivamente. RS1 apresentou níveis elevados em relação ao OS1. Os níveis de AGL foram estatisticamente aumentados nos grupos OS2 e RS2 em relação aos grupos OS1 e RC, RS1, respectivamente.

5.5– Resistência sistêmica à insulina

Para evidenciar resistência à insulina, a razão insulina/glicose plasmática foi calculada (Tabela 5). A razão insulina/glicose foi aumentada nos animais OB em relação aos grupos C, RC e OS2. Não houve influência da dieta nos grupos tratados com T₃. Dose de 25 µg de T₃ /100g de peso do animal diminuiu estatisticamente a razão insulina/glicose, quando comparados os grupos que receberam a dose de 5 µg de T₃ /100g de peso do animal.

Tabela 4. Análise bioquímica: glicose, colesterol total, triglicérides, HDL, LDL e ácidos graxos livres.

Variável	Grupos	Tratamento		
		Salina	5 µg T ₃ / 100 g	25 µg T ₃ / 100 g
Glicose	C	92,2±7,6 a	-----	-----
	OB	93,2±6,9 Aa	91,7±6,9 Ab	104,9±10,6 Bb
	RC	85,3±5,1 Aa	77,5±7,6 Aa	76,8±14,9 Aa
COL	C	91 ± 24 a	-----	-----
	OB	94 ± 14 Ba	83 ± 11 ABa	74 ± 17 Aa
	RC	75 ± 11 Aa	77 ± 19 Aa	69 ± 10 Aa
TG	C	82 ± 34 a	-----	-----
	OB	83 ± 14 Aa	74 ± 18 Aa	72 ± 23 Ab
	RC	70 ± 16 Ba	64 ± 14 ABa	46 ± 16 Aa
HDL	C	69 ± 15 ab	-----	-----
	OB	82 ± 18 Ab	71 ± 13 Aa	72 ± 10 Aa
	RC	64 ± 9 Aa	67 ± 14 Aa	71 ± 10 Aa
LDL	C	19 ± 5 a	-----	-----
	OB	18 ± 5 Ba	14 ± 3 Ba	8 ± 2 Aa
	RC	15 ± 3 Ba	19 ± 8 Bb	9 ± 2 Aa
AGL	C	0,51±0,1 a	-----	-----
	OB	0,61±0,2 ABa	0,49±0,1 Aa	0,66±0,2 Ba
	RC	0,61±0,1 Aa	0,59±0,2 Aa	0,77±0,1 Ba

T₃, triiodotironina; COL, colesterol total; TG, triglicérides; HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade; AGL, ácidos graxos livres; C, controle; OB, obeso; RC, obesos submetidos à restrição calórica. Dados expressos em média ± desvio-padrão. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Bonferroni. Letras maiúsculas, comparações dentro do grupo (OB x OS1 x OS2 ou RC x RS1 x RS2); letras minúsculas, comparações entre os grupos (C x OB x RC ou OS1 x RS1 ou OS2 x RS2); letras iguais = p>0,05; letras diferentes = p<0,05.

Tabela 5. Razão insulina/glicose plasmática

Variável	Grupos	Tratamento		
		Salina	5 µg T ₃ / 100 g	25 µg T ₃ / 100 g
Ins/Gli	C	12,4 ± 6,0 a	-----	-----
	OB	21,3 ± 7,1 Bb	19 ± 5,2 Ba	11,5 ± 3,4 Aa
	RC	12,8 ± 3,6 ABa	15 ± 5,0 Ba	7,1 ± 2,2 Aa

T₃, triiodotironina; Ins/Gli: razão insulina/glicose plasmática; C, controle; OB, obeso; RC, obesos submetidos à restrição calórica. Dados expressos em média ± desvio-padrão. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Bonferroni. Letras maiúsculas, comparações dentro do grupo (OB x OS1 x OS2 ou RC x RS1 x RS2); letras minúsculas, comparações entre os grupos (C x OB x RC ou OS1 x RS1 ou OS2 x RS2); letras iguais = p>0,05; letras diferentes = p<0,05.

5.6- Dosagens hormonais

Os níveis séricos de T₃ livre foram diminuídos no grupo RC quando comparado ao C, mas não ao OB. As doses administradas aumentaram os níveis de hormônio de maneira dose dependente, mostrando a efetividade do tratamento. Já os níveis de T₄ livre diminuíram nos animais RC em relação aos OB, que foram estatisticamente menor que os C. Houve diminuição para OS1 e OS2 quando comparados a OB, mas não houve diferença entre as duas doses administradas. Os níveis de TSH acompanharam os de T₄, exceto para o grupo OB que foi semelhante ao C (Tabela 6). As concentrações séricas para insulina foram maiores no grupo OB. Os grupos OS1 e OS2 apresentaram níveis elevados em relação aos grupos RS1 e RS2, respectivamente. A administração de hormônio, tanto nos animais obesos quanto nos restritos, diminuiu a concentração de insulina apenas com a dose de 25 µg de T₃ /100g de peso do animal (Figura 5). Houve aumento nos níveis de leptina nos animais que receberam as dietas hipercalóricas. Os grupos OS2 e RS2 apresentaram diminuição nos níveis de leptina quando comparados com os animais

OB, OS1 e RC, RS1, respectivamente (Figura 6). Os grupos que foram submetidos à restrição calórica apresentaram níveis elevados de adiponectina. Houve diminuição nos níveis de adiponectina nos animais que receberam dose de 5 μg de T_3 /100g de peso do animal. Os grupos OS2 e RS2 não apresentaram diferença estatística em relação aos demais grupos (Figura 7). Houve aumento de resistina nos animais OB quando comparados aos C, mas não aos RC. RS2 foi diminuído quando comparado à OS2 e ambos os grupos apresentaram diminuição nos níveis de resistina em relação aos grupos RC e OB, respectivamente (Figura 8).

Tabela 6. Dosagem hormonal de triiodotironina (T_3) livre, tiroxina (T_4) livre e hormônio estimulador da tireóide (TSH).

Variável	Grupos	Tratamento		
		Salina	5 μg T_3 / 100 g	25 μg T_3 / 100 g
T_3 livre	C	0,14 \pm 0,08 b	-----	-----
	OB	0,11 \pm 0,03 Aab	0,17 \pm 0,03 Ba	0,22 \pm 0,04 Ca
	RC	0,08 \pm 0,02 Aa	0,18 \pm 0,03 Ba	0,23 \pm 0,04 Ca
T_4 livre	C	48,3 \pm 1,4 c	-----	-----
	OB	43,1 \pm 2,3 Bb	38 \pm 1,4 Aa	37,7 \pm 1,6 Aa
	RC	37,2 \pm 1,6 Aa	37,9 \pm 1,3 Aa	37,8 \pm 1,5 Aa
TSH	C	14,3 \pm 1,1 b	-----	-----
	OB	12,9 \pm 1,2 Bb	10,9 \pm 1,1 Aa	10,9 \pm 1,2 Aa
	RC	10,1 \pm 1,8 Aa	10,9 \pm 1,7 Aa	10,8 \pm 1,1 Aa

C, controle; OB, obeso; RC, obesos submetidos à restrição calórica. Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Bonferroni. Letras maiúsculas, comparações dentro do grupo (OB x OS1 x OS2 ou RC x RS1 x RS2); letras minúsculas, comparações entre os grupos (C x OB x RC ou OS1 x RS1 ou OS2 x RS2); letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$.

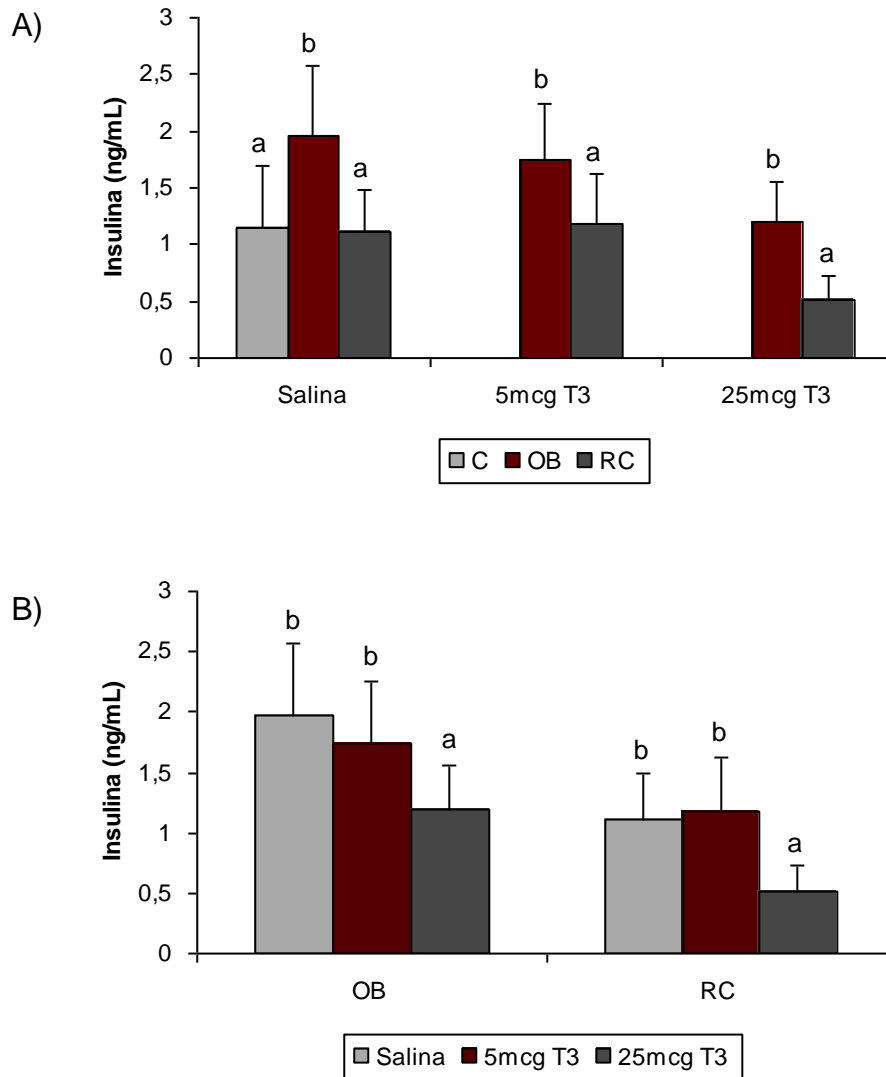


Figura 5. A) Influência da dieta sobre a concentração sérica de insulina. B) Influência das diferentes doses de T₃ sobre a concentração sérica de insulina. C, controle; OB, obeso; RC, obeso submetido à restrição calórica; T₃, triiodotironina. Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Bonferroni. Letras iguais = p>0,05; letras diferentes = p<0,05.

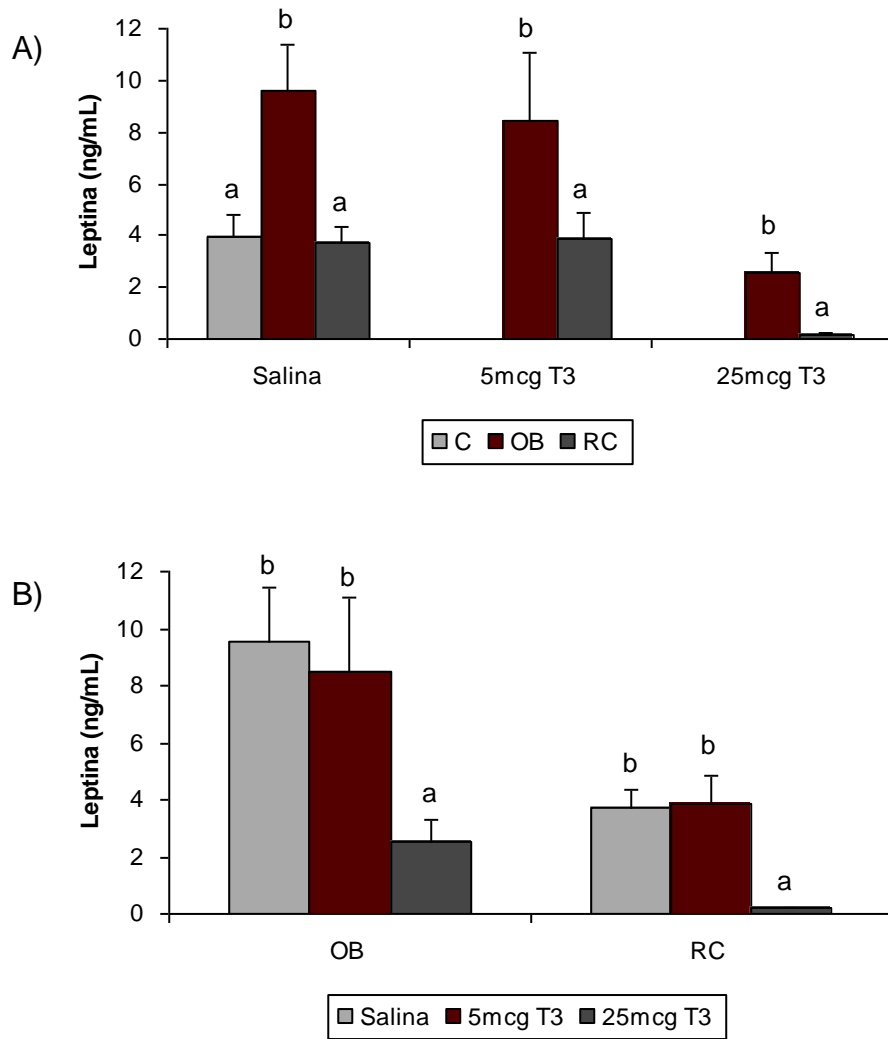


Figura 6. A) Influência da dieta sobre a concentração sérica de leptina. B) Influência das diferentes doses de T_3 sobre a concentração sérica de leptina. C, controle; OB, obeso; RC, obeso submetido à restrição calórica; T_3 , triiodotironina. Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Bonferroni. Letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$.

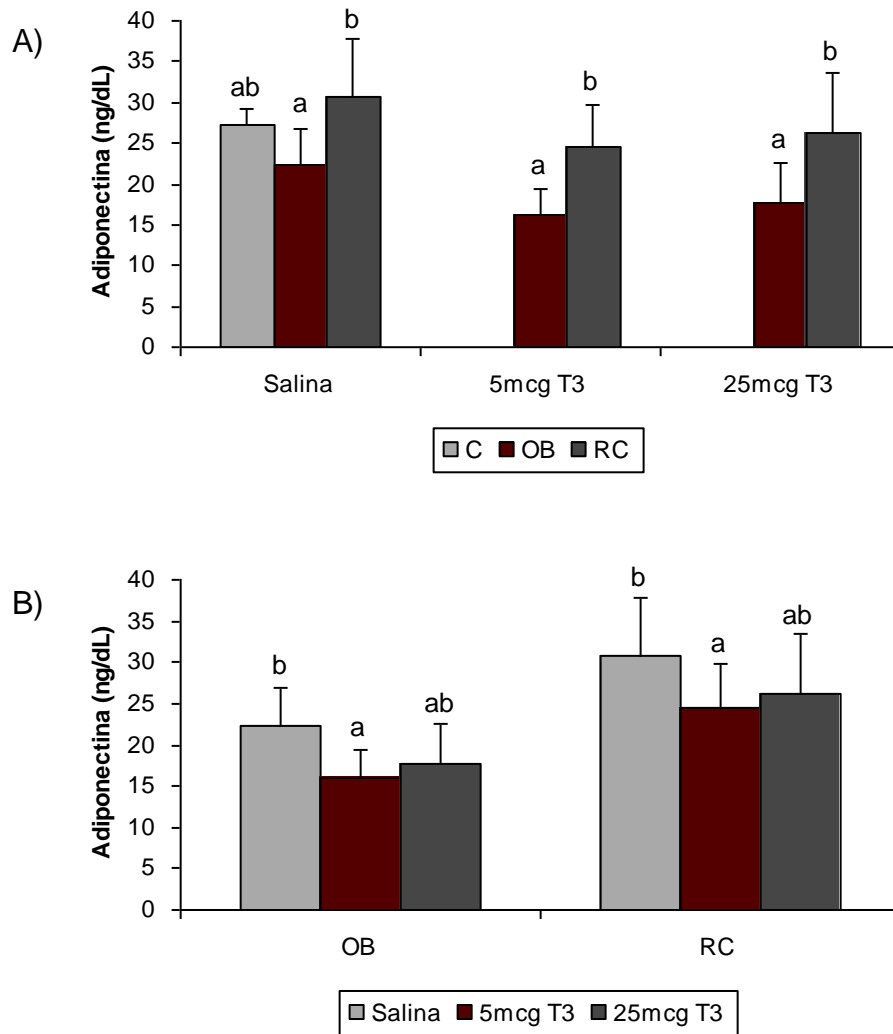


Figura 7. A) Influência da dieta sobre a concentração sérica de adiponectina. B) Influência das diferentes doses de T_3 sobre a concentração sérica de adiponectina. C, controle; OB, obeso; RC, obeso submetido à restrição calórica; T_3 , triiodotironina. Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Bonferroni. Letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$.

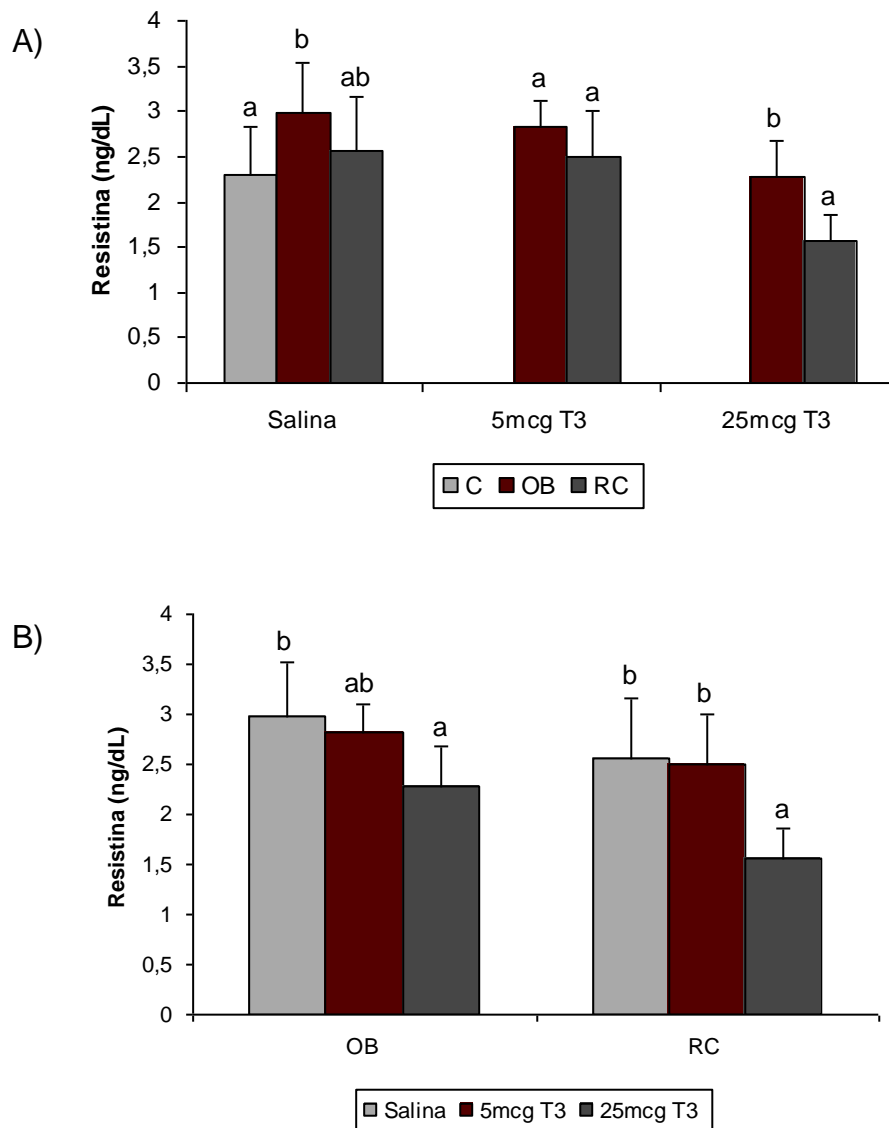


Figura 8. A) Influência da dieta sobre a concentração sérica de resistina. B) Influência das diferentes doses de T₃ sobre a concentração sérica de resistina. C, controle; OB, obeso; RC, obeso submetido à restrição calórica; T₃, triiodotironina. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Bonferroni. Dados expressos em média e desvio-padrão. Letras iguais = p>0,05; letras diferentes = p<0,05.

5.7- Expressão gênica

Para verificação da expressão gênica, por PCR quantitativo, foi utilizado amostra de 6 animais por grupo (a qualidade da extração de RNA e visualização em gel de agarose 1% para todos os grupos estão apresentadas na seção apêndice – A2). As amostras foram ajustadas pelo controle interno (ciclofilina) e o grupo C foi ajustado para 1 (a visualização das curvas de amplificação de PCR em tempo real para cada gene está apresentada nas seção apêndice – A3). A expressão gênica de leptina foi aumentada nos grupos OB, OS1 e OS2 quando comparados aos RC, RS1 e RS2, respectivamente. Não houve diferença entre RC e RS1, contudo RS2 mostrou diminuição da expressão de leptina. Para os animais com dieta hipercalórica houve diminuição da expressão de acordo com a dose de hormônio administrada, ou seja, quanto maior a dose, menor a expressão de leptina (Figura 9). Não houve diferença para a expressão de resistina (Figura 10). Para adiponectina, houve aumento no grupo RC e diminuição no OB quando comparados ao C. Os animais OS1 e OS2 apresentaram aumento na expressão de adiponectina em relação aos grupos RS1 e RS2, respectivamente. Não houve diferença para as diferentes doses de T_3 administradas (Figura 11). A expressão gênica de $TR\beta$ apresentou aumento significativo no grupo RC tanto em relação aos grupos C e OB como para os grupos RS1 e RS2 (Figura 12).

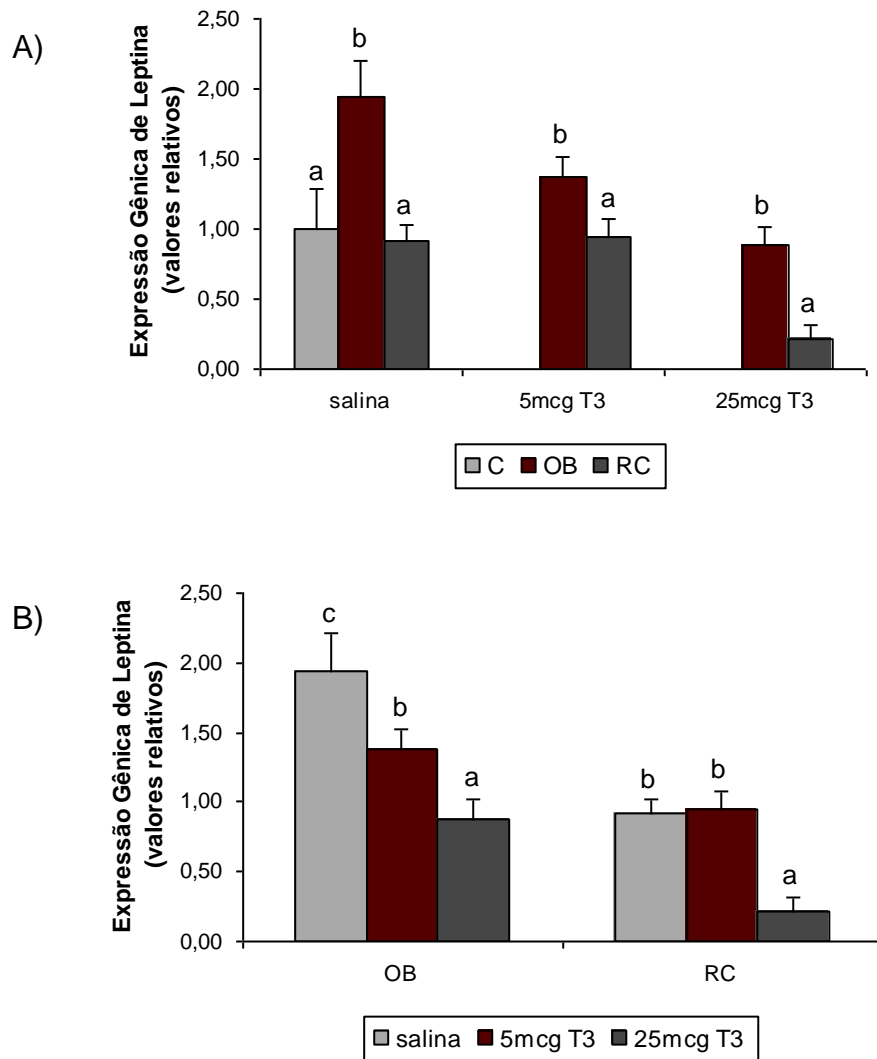


Figura 9. A) Influência da dieta sobre a expressão gênica de leptina no tecido adiposo. B) Influência das diferentes doses de T₃ sobre a expressão gênica de leptina no tecido adiposo. C, controle; OB, obeso; RC, obeso submetido à restrição calórica; T₃, triiodotironina. O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Dados expressos, em porcentagem, em média e desvio-padrão. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Bonferroni. Letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$.

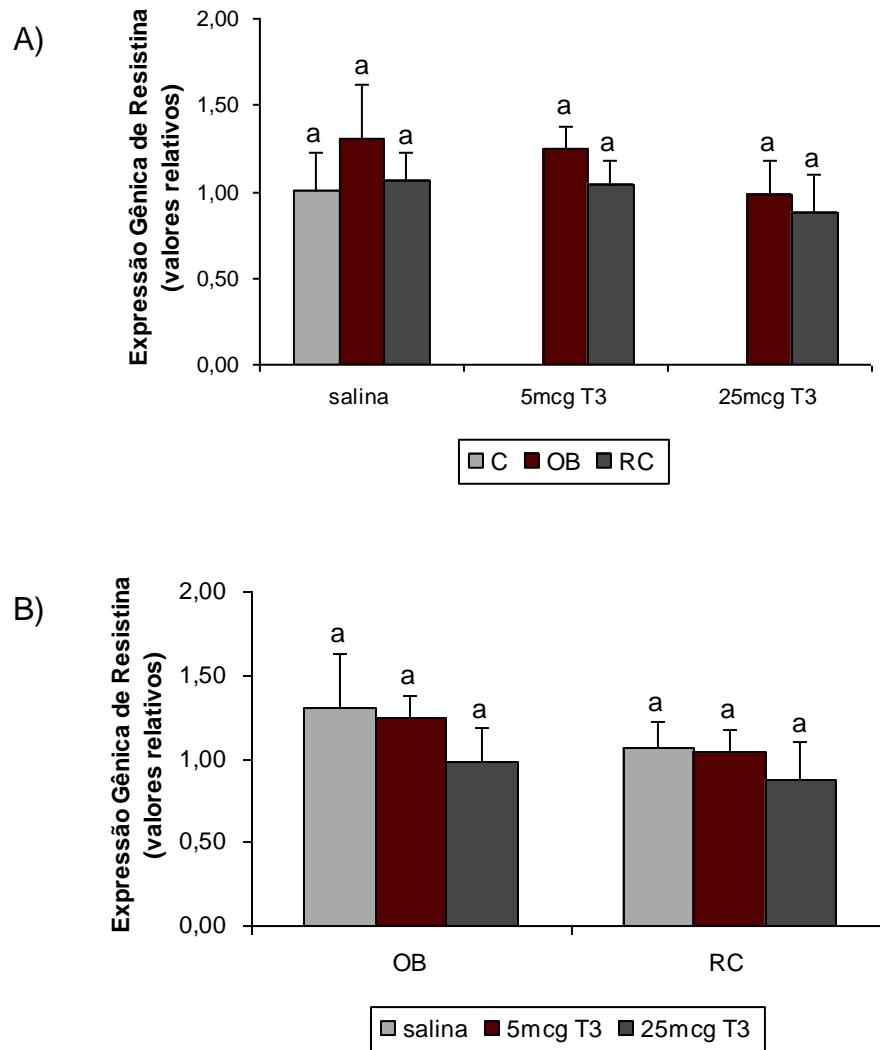


Figura 10. A) Influência da dieta sobre a expressão gênica de resistina no tecido adiposo. B) Influência das diferentes doses de T₃ sobre a expressão gênica de resistina no tecido adiposo. C, controle; OB, obeso; RC, obeso submetido à restrição calórica; T₃, triiodotironina. O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Dados expressos, em porcentagem, em média e desvio-padrão. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Bonferroni. Letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$.

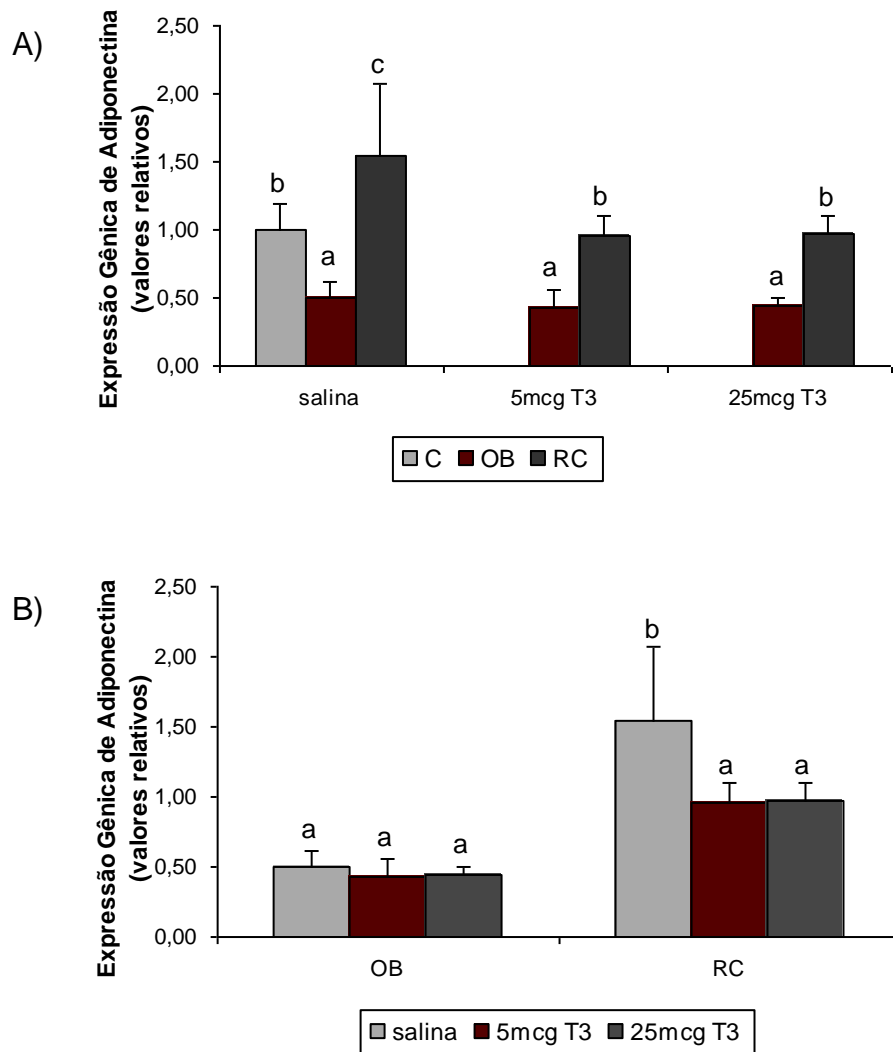


Figura 11. A) Influência da dieta sobre a expressão gênica de adiponectina no tecido adiposo. B) Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão gênica de adiponectina no tecido adiposo. C, controle; OB, obeso; RC, obeso submetido à restrição calórica; T_3 , triiodotironina. O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Dados expressos, em porcentagem, em média e desvio-padrão. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Bonferroni. Letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$.

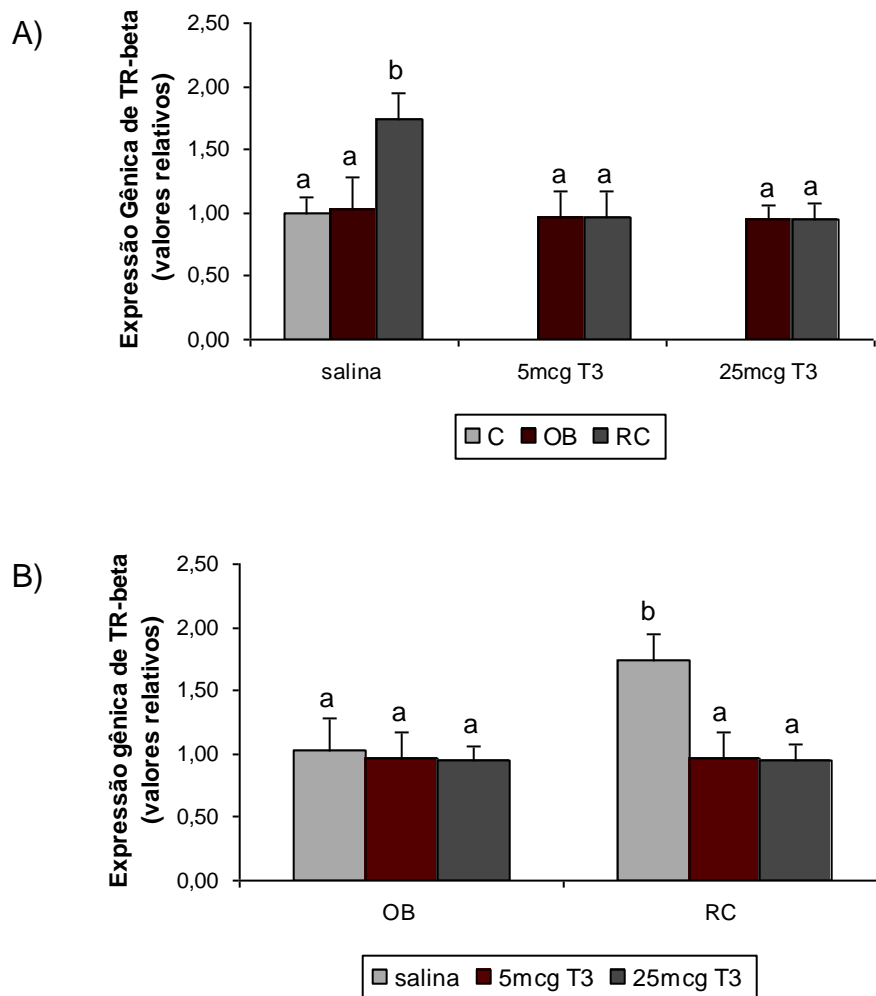


Figura 12. A) Influência da dieta sobre a expressão gênica de TR β no tecido adiposo. B) Influência das diferentes doses de T₃ sobre a expressão gênica de TR β no tecido adiposo. C, controle; OB, obeso; RC, obeso submetido à restrição calórica; T₃, triiodotironina. O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizados 6 animais por grupo. Dados expressos, em porcentagem, em média e desvio-padrão. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Bonferroni. Letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$.

5.8- Estudos de associação

Para verificar a associação do T₃ com os níveis hormonais (Tabela 7) e com as expressões gênicas (Tabela 8) dos hormônios estudados, foi utilizada a técnica de correlação linear de Pearson, para cada grupo experimental. Para os níveis séricos, houve correlação negativa apenas entre os níveis de T₃ e leptina para o grupo RC. Em relação à associação entre níveis séricos T₃ e expressão gênica, somente a expressão de resistina se correlacionou positivamente com os níveis de T₃ para o grupo OB e negativamente com os níveis de T₃ para o grupo RC. A administração exógena de ambas as doses suprafisiológicas de T₃ não se correlacionou com a expressão gênica ou os níveis séricos dos hormônios estudados.

Tabela 7. Associação entre níveis séricos de T₃ e níveis séricos de leptina, resistina e adiponectina.

Associação	Grupos					
	OB	OS1	OS2	RC	RS1	RS2
T ₃ vs Leptina	r=0,182 p>0.05	r=-0,104 p>0.05	r=0,467 p>0.05	r=-0,717 p<0.05	r=-0,196 p>0.05	r=-0,175 p>0.05
T ₃ vs Resistina	r=-0,013 p>0.05	r=0,059 p>0.05	r=-0,229 p>0.05	r=-0,377 p>0.05	r=-0,041 p>0.05	r=0,048 p>0.05
T ₃ vs Adiponectina	r=-0,017 p>0.05	r=0,147 p>0.05	r=0,028 p>0.05	r=0,04 p>0.05	r=0,008 p>0.05	r=-0,183 p>0.05

T₃, triiodotironina; OB, obeso; OS1, obeso com 5µg de T₃/100g de peso; OS2, obeso com 25µg de T₃/100g de peso; RC, obeso submetido à restrição calórica; RS1, RC com 5µg de T₃/100g de peso; RS2, RC com 25µg de T₃/100g de peso. Para análise da associação entre os níveis séricos hormonais foi utilizado o coeficiente de correlação linear de Pearson. Nível de significância, p<0,05.

Tabela 8. Associação entre níveis séricos de T₃ e expressão gênica de TR β , leptina, resistina e adiponectina.

Associação	Grupos					
	OB	OS1	OS2	RC	RS1	RS2
T ₃ vs TR β	r=0,807 p>0.05	r=-0,677 p>0.05	r=0,531 p>0.05	r=-0,160 p>0.05	r=0,149 p>0.05	r=0,618 p>0.05
T ₃ vs Leptina	r=0,524 p>0.05	r=-0,117 p>0.05	r=-0,127 p>0.05	r=0,181 p>0.05	r=0,716 p>0.05	r=0,754 p>0.05
T ₃ vs Resistina	r=0,888 p<0.05	r=-0,325 p>0.05	r=-0,617 p>0.05	r=-0,969 p<0.05	r=0,790 p>0.05	r=-0,072 p>0.05
T ₃ vs Adiponectina	r=-0,190 p>0.05	r=-0,607 p>0.05	r=0,007 p>0.05	r=-0,241 p>0.05	r=-0,154 p>0.05	r=0,667 p>0.05

T₃, triiodotironina; TR β , receptor β de hormônio tireoidiano; OB, obeso; OS1, obeso com 5 μ g de T₃/100g de peso; OS2, obeso com 25 μ g de T₃/100g de peso; RC, obeso submetido à restrição calórica; RS1, RC com 5 μ g de T₃/100g de peso; RS2, RC com 25 μ g de T₃/100g de peso. Para análise da associação entre os níveis séricos de T₃ e expressão gênica dos hormônios estudados foi utilizado o coeficiente de correlação linear de Pearson. Nível de significância, p<0,05.

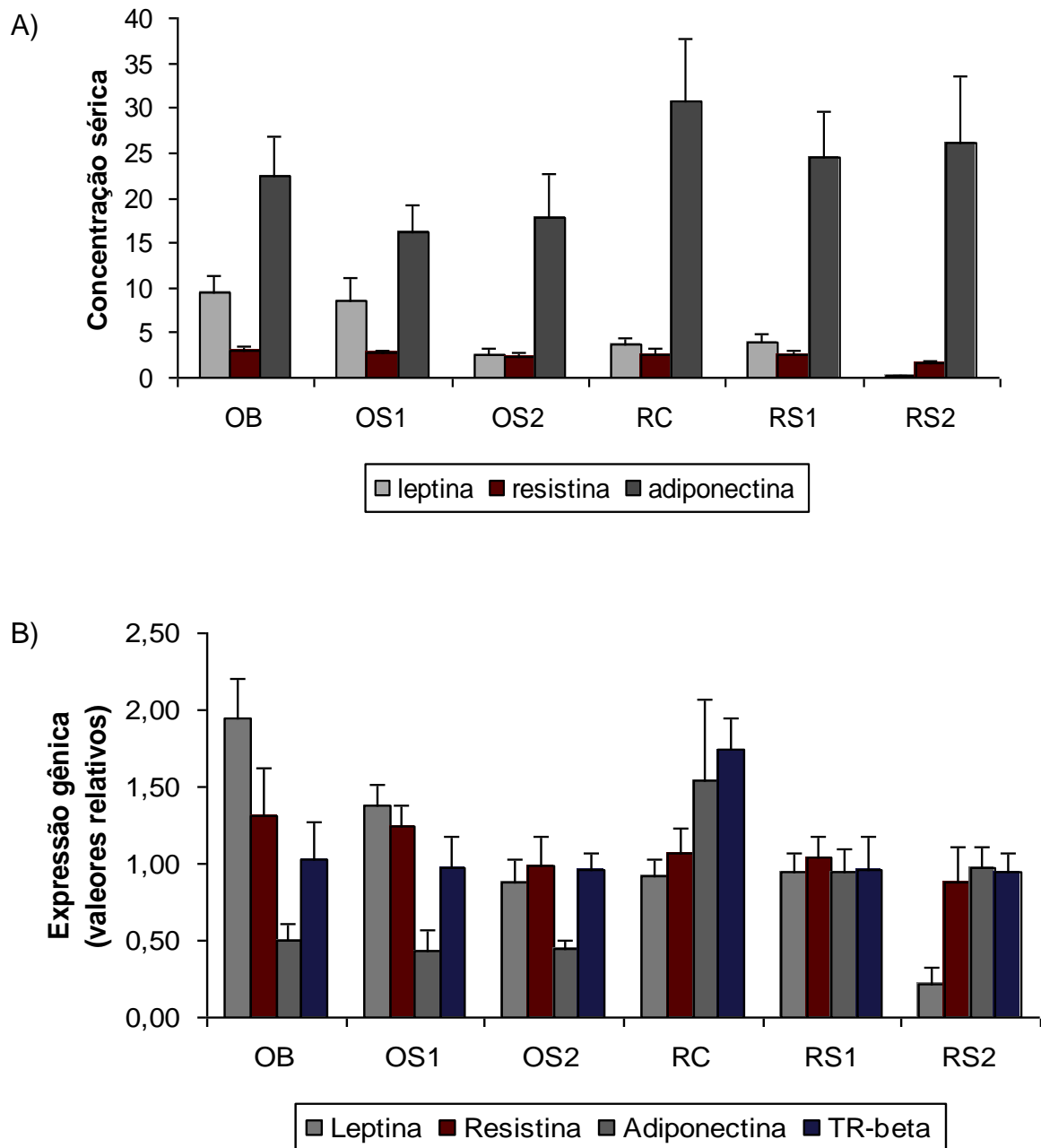


Figura 13. A) Ilustração da concentração sérica de leptina, resistina e adiponectina para todos os grupos experimentais. B) Ilustração da expressão gênica de leptina, resistina, adiponectina e TR β no tecido adiposo. OB, obeso; OS1, obeso com 5 μ g de T $_3$ /100g de peso; OS2, obeso com 25 μ g de T $_3$ /100g de peso; RC, obeso submetido à restrição calórica; RS1, RC com 5 μ g de T $_3$ /100g de peso; RS2, RC com 25 μ g de T $_3$ /100g de peso; TR β , receptor β de hormônio tireoidiano. Dados expressos, em porcentagem, em média e desvio-padrão.

Obesidade é uma condição que tem alcançado níveis epidêmicos nos últimos anos ⁽²⁾. É uma doença complexa, onde o estilo de vida interage com a susceptibilidade genética para produzir o fenótipo obeso. Desde que a genética, em humanos ou animais, não se alterou nos últimos 40 anos, o aumento substancial dos índices de obesidade parece ser devido ao estilo de vida da população, que é reconhecido por desempenhar papel central na etiologia de doenças crônicas ⁽⁸⁶⁾. Assim, a atual epidemia da obesidade é conseqüência da maior disponibilidade e consumo de dietas altamente palatáveis e da diminuição do gasto energético ⁽⁸⁷⁾. Deste modo, modelos experimentais, que utilizam manipulações dietéticas para promover obesidade, são considerados mais apropriados para estudar as conseqüências desta patologia, desde que a experimentação em humanos apresenta limitações éticas. Neste estudo, a dieta hipercalórica utilizada, rica em ácidos graxos insaturados, foi eficiente em promover obesidade.

A restrição alimentar é uma estratégia comum para o tratamento da resistência à insulina, obesidade e DM2. Foi demonstrado que a restrição da ingestão alimentar de 30 – 50% em ratos apresentou importante benefício na expectativa de vida e prevenção de doenças associadas com idade. Isto parece estar relacionado com os efeitos da restrição alimentar sobre os níveis de glicose e insulina plasmáticas ⁽⁸⁸⁾. A restrição calórica reduz a incidência de alguns cânceres relacionados com a idade, doenças cardiovasculares e deficiências em funções imunes em animais. Além disso, a restrição alimentar é a única intervenção que mostrou retardar o envelhecimento e manter a vitalidade ⁽⁸⁹⁾.

Em obesos, a estabilização da perda de peso, mesmo em restrição calórica ⁽⁹⁰⁾, tem sido atribuída à diminuição nas concentrações de T₃ sérico, levando a uma redução na taxa metabólica ⁽⁹¹⁾. O risco da administração de hormônios tireoidianos

é o desenvolvimento de hipertireoidismo subclínico, o qual é definido pela supressão de TSH basal sem elevação das concentrações de T₃ e T₄ livre ou total ⁽⁹²⁾. Apesar de não aceita como tratamento da obesidade, a administração de hormônios tireoidianos isoladamente ou associado a dietas hipocalóricas, algumas vezes, é utilizada de maneira ilícita. Ainda não estão bem estabelecidos os efeitos dos hormônios tireoidianos sobre o tecido adiposo e a liberação de adipocinas, entretanto, sabe-se que altas doses de hormônio tireoidiano estão associadas com danos cardíacos, perda muscular e aumento de estresse oxidativo ⁽⁹²⁻⁹⁴⁾. No presente estudo, para verificar se a liberação de adipocinas pelo tecido adiposo responde de maneira dose-dependente a administrações suprafisiológicas de T₃, utilizamos duas dosagens hormonais: 5 ⁽⁷⁰⁾ e 25 ⁽⁷¹⁾ µg de T₃/100 g de peso animal, ou seja, um aumento de 10x e 50x, respectivamente, em relação à concentração fisiológica.

Em estudos experimentais, mesmo mantidas as condições laboratoriais, não está assegurado um comportamento homogêneo dos animais. Neste sentido, ratos submetidos às rações padrão ou hipercalórica, em modelos de obesidade induzida por dieta, podem apresentar características comuns de respostas ⁽⁷⁶⁾. Assim, erros de classificação podem ocorrer, ou seja, animais submetidos à dieta padrão podem ser classificados como controle, quando na realidade, exibem respostas semelhantes aos animais que se tornaram obesos pela dieta hipercalórica, ou vice versa. Por esta razão, torna-se necessário estabelecer um critério que possibilite a separação dos animais em controle ou obeso. Estudo, em nosso laboratório, mostrou que o melhor indicador de obesidade é a adiposidade corporal, contudo este índice é obtido após a eutanásia do animal. Entretanto, neste estudo, foi demonstrado que o peso corporal, avaliado *in vivo*, apresenta boa correlação com o

índice de adiposidade ⁽⁷⁶⁾. Com isso, os grupos controle e obeso foram constituídos utilizando-se um critério de classificação aplicado sobre o peso corporal, na 20ª semana do estudo.

Tanto no grupo OB como no RC, a administração de doses suprafisiológicas de T₃ foi efetiva, aumentando de maneira dose dependente a concentração sérica de T₃ ⁽⁹⁵⁾. Apesar de alguns autores encontrarem níveis aumentados de T₃ na obesidade ^(18, 96), estes resultados não foram reproduzidos em nosso estudo, onde a dosagem sérica de T₃ livre foi similar entre os grupos C e OB. A restrição calórica resultou em diminuição significativa nos níveis de T₃ livre quando comparado aos animais C ^(18, 97). Em estudo realizado por Cao e cols. ⁽⁹⁸⁾, a restrição alimentar diminuiu a expressão de deiodinase iodotironina tipo I (Diol). A *down-regulation* desta enzima pode ser responsável pelos baixos níveis de T₃ circulante encontrado em roedores submetidos à restrição calórica. As concentrações séricas de T₄ livre foram maiores no grupo OB, enquanto as de TSH apresentaram níveis semelhantes entre os animais C e OB e diminuição significativa para os animais RC. Não houve diferença estatística entre os animais que foram submetidos à restrição calórica sem ou com administração do hormônio. Isto pode evidenciar uma adaptação do organismo para poupar energia, uma vez que T₃, hormônio metabolicamente ativo, leva à redução da gordura corporal pelo aumento da termogênese e oxidação lipídica ⁽⁹⁹⁾. Para os animais OS1 e OS2 houve diminuição significativa nos níveis de T₄ livre e TSH em relação à OB, uma vez que administração exógena de T₃ suprimiu a secreção endógena de TSH e a produção de T₄ pela tireóide ⁽¹⁰⁰⁾.

A epidemia da obesidade, geralmente, está associada ao maior consumo de dietas altamente energéticas e uma diminuição do gasto calórico ⁽⁸⁷⁾. Estudos experimentais mostram que dietas ricas em gordura promovem obesidade em ratos

(78). Apesar de alguns estudos mostrarem que estas dietas provocam hiperfagia, por promoverem menos saciedade e conseqüentemente maior ingestão alimentar (101-103), os animais do grupo OB, que receberam dieta hipercalórica, consumiram menor quantidade de dieta, porém com ingestão calórica maior que os animais C. Os animais OS1 e OS2 mesmo apresentando consumo em gramas semelhante aos grupos RS1 e RS2, respectivamente, mostraram ingestão calórica significativamente elevada. Esses dados são concordantes com outros encontrados na literatura (104), que mostraram que dietas ricas em gordura aumentam a secreção de colecistoquinina, hormônio envolvido no processo de saciedade (105, 106), diminuindo a quantidade ingerida por estes animais. Estes dados indicam que a eficiência alimentar nos grupos que receberam dietas hipercalóricas foi maior quando comparado com os grupos que receberam dieta padrão (Tabela 2).

Foi demonstrado neste estudo que as dietas hipercalóricas oferecidas aos animais OB induziu acentuado ganho de peso e adiposidade, quando comparados aos demais grupos (101, 107, 108). Estudos mostram que o consumo de dietas ricas em gordura não é acompanhado por aumento proporcional da sua oxidação. Este fenômeno favorece a deposição de lipídeos no tecido adiposo, como triacilglicerol, acarretando aumento no peso corporal (109, 110). A restrição calórica aplicada, de 25%, foi eficiente em reduzir o peso e a adiposidade dos animais, como descrito em outros estudos (88, 111, 112). As doses supra-fisiológicas de T_3 nos animais OB diminuíram o peso, independente da dose administrada, e adiposidade apenas na dose de 25 μg de T_3 /100 g de peso do animal; enquanto que nos animais RC a diminuição de peso ocorreu de maneira dose dependente e a diminuição da adiposidade apenas com a dose de 25 μg de T_3 /100 g de peso do animal (Tabela 1). Em relação aos depósitos de gordura, isoladamente, nossos dados mostram que

dietas ricas em ácidos graxos insaturados apresentam aumento dos depósitos de gordura retroperitoneal, visceral e epididimal, em relação aos grupos C e RC. A administração de T_3 diminuiu de maneira dose-dependente os depósitos de gordura visceral e retroperitoneal, nos grupos OS1 e OS2, enquanto o depósito de gordura epididimal foi diminuído apenas o grupo OS2. Para os animais restritos, apenas a maior dose de T_3 apresentou diminuição de significativa para os depósitos de gordura (Tabela 3), mostrando que manipulações dietéticas induzem respostas metabólicas distintas em diferentes depósitos de gordura ⁽¹¹³⁾.

Como encontrado neste estudo, alguns trabalhos têm mostrado que dietas ricas em gordura insaturada não altera o perfil lipídico ^(114, 115). Nossos dados não apresentam diferenças para os níveis de colesterol total, TG, LDL e AGL entre os grupos C, OB e RC, contudo mostra um aumento nos níveis de HDL do grupo OB em relação ao RC. No entanto, um fator importante deve ser ressaltado, este resultado pode ter ocorrido devido à composição lipídica da dieta utilizada neste estudo, rica em ácidos graxos insaturados. Em concordância, Estadella e cols. ⁽¹¹⁶⁾, e Cintra e cols. ⁽¹¹⁷⁾, que relataram que o grupo alimentado com dieta rica em lipídeos insaturados apresentou níveis de HDL maior que o grupo normal. Segundo Mahan e cols. ⁽¹¹⁸⁾, os efeitos dos ácidos graxos insaturados sobre a HDL dependem do conteúdo total destes ácidos graxos na dieta; o aumento em seus níveis ocasiona uma discreta elevação de HDL. Sabe-se que os hormônios tireoidianos regulam o metabolismo de lipídeos ⁽¹¹⁹⁾, e que seu excesso, entre outros, aumenta lipólise, a concentração plasmática de lipídeos intermediários e oxidação lipídica ⁽¹²⁰⁾. A administração de T_3 , neste estudo, diminuiu os níveis de TG apenas em animais restritos tratados com a maior dose hormonal. Entretanto, alguns autores descreveram que os níveis de TG não são influenciados pelo hormônio tireoidiano

⁽¹²¹⁾. Os níveis de colesterol total foram diminuídos apenas nos animais OS2, enquanto os níveis séricos de LDL sofreram diminuição em ambos os grupos tratados com 25 µg de T₃/100 g de peso do animal, OS2 e RS2. O estado de hipertireoidismo aumenta a excreção de colesterol. Os hormônios tireoidianos podem estimular a enzima hidroximetil glutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima de biossíntese do colesterol, e induzir o aumento na síntese de colesterol. Entretanto, os níveis séricos de colesterol são diminuídos, principalmente, devido ao aumento simultâneo da degradação de LDL. Além disso, a região promotora do receptor de LDL possui elemento responsivo ao hormônio tireoidiano (TRE), o qual permite que T₃ module a expressão gênica do receptor de LDL resultando em um aumento do *clearance* de LDL ⁽¹¹⁹⁾. As concentrações de ácidos graxos livres são usadas para indicar a mobilização de gordura ⁽¹²²⁾. A liberação de ácidos graxos dos adipócitos é regulada pela enzima lipase hormônio-sensível (LHS) ⁽¹²³⁾. Esta enzima promove lipólise, levando ao aumento de ácidos graxos livres na circulação. Ainda não está claro, mas especula-se que os hormônios tireoidianos possam estimular diretamente a atividade da lipase hormônio-sensível; também é possível que os hormônios tireoidianos influenciem a ação lipolítica de outros hormônios, como hormônio de crescimento e catecolaminas, que podem ativar LHS ⁽¹²⁰⁾. Nossos dados mostram que a administração de T₃ aumentou a lipólise apenas com a dose de 25 µg de T₃/100 g de peso do animal, sendo que RS2 apresentou níveis elevados de AGL quando comparado aos grupos RC e RS1; e OS2 apenas em relação ao OS1 (Tabela 4).

Não houve diferença nos níveis glicêmicos de jejum entre os grupos C, OB e RC, contudo, os animais OS1 e OS2 apresentaram aumento significativo em relação aos grupos RS1 e RS2, respectivamente. A administração de T₃ aumentou os níveis

glicêmicos de jejum apenas no grupo OS2, não havendo diferença nos demais grupos tratados. Apesar de ter sido relatado que o excesso de hormônio tireoidiano aumenta a glicose plasmática ⁽¹²⁴⁾, a influência exata dos hormônios tireoidianos sobre a sensibilidade da insulina e o metabolismo da glicose ainda é controversa ⁽¹²⁵⁾.

Nossos dados mostram que os animais que receberam dieta hipercalórica apresentaram hiperinsulinemia em relação ao grupo C e aos que foram submetidos à restrição calórica, dados corroborados com outros encontrados na literatura ^(102, 126). O grupo RC apresentou níveis plasmáticos de insulina similares aos encontrados no grupo C ^(88, 102, 127, 128). Por outro lado, já foi relatado aumento nos níveis plasmáticos de insulina em animais submetidos à restrição alimentar ⁽¹²⁹⁾. A administração de T₃, neste estudo, mostrou uma diminuição significativa nos níveis plasmáticos de insulina dos animais tratados com dose de 25 µg de T₃ /100g de peso. Contudo, opiniões sobre a influência do excesso de hormônios tireoidianos sobre a secreção de insulina variam; enquanto alguns autores relatam aumento ^(130, 131), outros mostram redução nos níveis de insulina ⁽¹³²⁾. A divergência de resultados indica que a influência dos hormônios tireoidianos sobre o metabolismo da insulina ainda não estão completamente elucidados. Usando o índice insulina plasmática/glicose plasmática ⁽⁸¹⁾, foi sugerida uma resistência à insulina para o grupo OB, achados consistentes com outros estudos da literatura, que demonstram uma associação entre dieta rica em gordura com resistência à insulina ^(133, 134). Resistência à insulina é a falta de habilidade dos tecidos periféricos responderem apropriadamente a concentrações normais e aumentadas de insulina circulante ⁽¹³⁵⁾. Está bem estabelecido que os hormônios tireoidianos afetam a ação da insulina ⁽¹³¹⁾. A dose suprafisiológica de 25 µg de T₃ /100g de peso do animal aumentou a

sensibilidade da insulina em relação à dose de 5 μg de T_3 /100g de peso, em ambos os grupos, OB e RC. Resultado discordante aos encontrados na literatura, onde tem sido encontrado que o excesso de HT induz a resistência à insulina, enquanto a falta desse hormônio, em humanos, ainda apresenta resultados conflitantes ⁽¹²⁴⁾. Entretanto, um fator importante deve ser ressaltado neste estudo, os hormônios tireoidianos induzem à perda de peso, e esta está relacionada com a melhora da resistência à insulina ^(136, 137). Em adição, também podemos especular que a melhora da sensibilidade à insulina foi decorrente dos maiores níveis de adiponectina (figura 7), que mesmo não apresentando diferença significativa, os grupos OS2 e RS2 apresentam um leve aumento em relação aos grupos OS1 e RS1. Além dos maiores níveis de adiponectina estarem relacionados com menor peso e adiposidade ⁽³⁹⁾, eles aumentam a sensibilidade à insulina ⁽³⁰⁾. Assim, neste estudo os hormônios tireoidianos parecem afetar indiretamente a concentração de insulina.

Os resultados para os níveis séricos leptina mostram que os animais OB apresentaram hiperleptinemia quando comparados aos demais animais ^(1, 10, 107, 126). A restrição calórica retornou os níveis de leptina aos níveis do grupo C ^(29, 102, 127, 128), e a dose de 25 μg de T_3 /100g de peso do animal diminuiu significativamente os níveis de leptina tanto nos animais OS2 quanto nos RS2, indicando que a administração de T_3 diminui as concentrações séricas de leptina ⁽¹³⁸⁾. Entretanto, a associação entre leptina e HT apresenta resultados inconsistentes, enquanto alguns estudos relatam uma correlação negativa ^(65, 95), como ocorreu neste estudo para o grupo RC, outros mostram que a associação entre leptina e HT não foi observada ^(18, 97, 139). Também tem sido reportado que os hormônios tireoidianos influenciam a concentração de leptina apenas indiretamente pela da variação da massa de gordura corporal ⁽⁶⁶⁾. Assim, o aumento nos níveis de leptina é melhor explicado pelo

aumento da gordura corporal ^(110, 128, 140). Além disso, estudos experimentais sugerem que a sensibilidade a leptina pode estar sob controle hormonal e nutricional ⁽¹⁴¹⁾.

Näslund e cols. ⁽¹³⁹⁾ relataram aumento significativo de leptina plasmática em pacientes que ganharam peso comparado com os que perderam peso. Demonstraram que pacientes com alta concentração de leptina por unidade de IMC não pode sustentar a perda de peso durante os programas de restrição alimentar. Contudo, não está claro porque a concentração plasmática de leptina inicial pode prever o sucesso de programas que visam a perda de peso. Torgerson e cols. ⁽⁹⁷⁾ sugerem que uma redução nos níveis de leptina em resposta a restrição calórica não parece regular a resposta hormonal à restrição em obesos, mas de certo modo manter a perda de peso.

Como reportado em estudos com obesidade induzida por dieta ⁽¹⁴²⁻¹⁴⁴⁾, foi encontrado, neste experimento, aumento na expressão gênica de leptina para os animais OB. Está claro na literatura a correlação positiva entre tecido adiposo e expressão de leptina ⁽⁶⁰⁾. Para os animais que receberam restrição calórica houve diminuição significativa da expressão de leptina em relação ao grupo OB ^(60, 145). A restrição calórica é a estratégia mais relevante para determinar a regulação da expressão de leptina. Está claro que animais submetidos a jejum de 24 horas apresentam diminuição substancial nos níveis circulantes de leptina, acompanhada por redução significativa da expressão de RNAm de leptina no tecido adiposo ⁽⁶⁰⁾. Neste estudo, as doses suprafisiológicas de T₃ reduziram a expressão gênica de leptina de maneira dose dependente. Contudo, os efeitos do T₃ sobre a expressão gênica de leptina apresentam resultados inconsistentes; apesar de dados *in vitro* mostrarem que o T₃ aumenta de maneira dose dependente a expressão de leptina

⁽¹⁴⁶⁾, Pinkney e cols. ⁽¹²⁾ observaram diminuição da expressão em resposta ao tratamento com T₃. Em concordância, Zabrocka e cols. ⁽⁹⁵⁾ relataram diminuição da expressão de leptina quando há aumento da concentração sérica de T₃. Também tem sido mostrado que o TSH estimula a secreção de leptina nos adipócitos ⁽⁶³⁾. Como os hormônios tireoidianos agem por mecanismo de *feedback* negativo, a administração de doses suprafisiológicas de T₃ diminuem os níveis de TSH, sugerindo que esta diminuição pode contribuir para a inibição da expressão gênica de leptina ⁽⁹⁵⁾. Por outro lado, estudo desenvolvido em nosso laboratório mostrou que doses fisiológicas de T₃ aumentaram a expressão de leptina para os níveis dos animais controle, sugerindo que os hormônios tireoidianos modulam a expressão de leptina em condições de restrição calórica ⁽⁶⁸⁾.

O papel fisiológico da adiponectina ainda não está completamente elucidado. Entretanto, dados experimentais sugerem que a adiponectina aumenta a sensibilidade à insulina e pode apresentar propriedades anti-aterogênicas e antiinflamatórias ⁽¹⁴⁷⁻¹⁴⁹⁾. Como ocorreu neste estudo, tem sido documentado que os níveis de adiponectina são inversamente proporcionais ao grau de adiposidade ^(48, 49) e a perda de peso aumenta a produção endógena de adiponectina ^(150, 151). A administração de T₃ levou à diminuição da concentração de adiponectina nos grupos OS1 e RS1 em relação aos OB e RC, enquanto os grupos OS2 e RS2 foram semelhantes aos demais grupos. Em contrapartida, estudo experimental de ratos com hipertireoidismo mostrou aumento importante na concentração sérica de adiponectina ⁽¹⁵²⁾. Em humanos, o hipertireoidismo tem sido associado a concentrações semelhantes ^(45, 153, 154) ou elevadas ⁽¹⁵⁵⁻¹⁵⁷⁾ de adiponectina. Estudo mostrou que terapia para a normalização do hipertireoidismo reduziu significativamente os níveis circulantes de adiponectina ⁽¹⁵⁶⁾, enquanto outro não

apresentou nenhuma alteração ⁽⁴⁵⁾, mostrando a divergência de dados sobre a interação entre hormônios tireoidianos e concentração de adiponectina.

Nossos dados mostram aumento da expressão de adiponectina para os grupos que foram submetidos à restrição calórica. Dado semelhante aos encontrados por outros autores ⁽³⁹⁾. Neste estudo, o aumento ocorrido nos grupos RS1 e RS2, em relação aos grupos OS1 e OS2, parecem ser devido à restrição alimentar e não à administração de T₃. Não foram encontrados na literatura estudos sobre expressão gênica de adiponectina e doses suprafisiológicas de T₃. Pelo nosso conhecimento, nosso estudo é o primeiro a mostrar que o hormônio tireoidiano, nas doses de 5 e 25 µg de T₃/100 g de peso do animal diminui a expressão gênica de adiponectina em animais obesos submetidos à restrição alimentar, sugerindo uma modulação do hormônio tireoidiano sobre a expressão de adiponectina. Entretanto, outros trabalhos são necessários para avaliar se este efeito é direto ou indireto.

Estudos mostram que a resistina prejudica a homeostase da glicose e ação da insulina em camundongos ^(158, 159). Assim, tem sido proposto que a resistina possa desempenhar um papel entre obesidade e resistência à insulina em roedores, contudo este papel ainda é questionado para humanos ⁽¹⁶⁰⁻¹⁶²⁾. Os níveis séricos de resistina foram aumentados nos animais OB ⁽¹⁶³⁾, enquanto os RC apresentaram níveis semelhantes aos C ⁽³⁰⁾. Poucos estudos têm avaliado as concentrações séricas de resistina no hipertireoidismo ^(44, 45, 155). Nossos dados mostram que a administração de T₃, dose de 25 µg/100 g de peso do animal, diminuiu significativamente os níveis séricos de resistina. Em concordância, o primeiro estudo realizado em humanos mostrou que pacientes com hipertireoidismo exibiam níveis séricos de resistina diminuídos quando comparados a pacientes eutireoideos ⁽⁴⁵⁾. Entretanto, estes achados iniciais contrastam com estudos posteriores que relatam

aumento nos níveis de resistina em pacientes com hipertireoidismo ^(44, 155). Além disso, foi relatado que os níveis de resistina se correlacionam positivamente com T₃ livre e T₄ livre, e negativamente com TSH ⁽¹⁵⁵⁾.

A expressão de resistina é aumentada em animais obesos ⁽³⁵⁾, e a restrição alimentar leva à diminuição dessa expressão ⁽⁴³⁾. Estudos em humanos apresentam resultados conflitantes, enquanto alguns autores encontram aumento na expressão gênica de resistina em obesos ^(31, 32), outros não encontram uma relação entre expressão de resistina e adiposidade ⁽¹⁶⁴⁾. Em concordância com Nagaev e cols. ⁽¹⁶⁴⁾ nossos achados mostram que a expressão de resistina foi semelhante entre os grupos C, OB e RC. Existem poucos dados sobre a expressão de resistina e hipertireoidismo, os quais mostraram que a expressão de resistina é quase indetectável em ratos com hipertireoidismo ⁽⁴³⁾. Por outro lado, a administração de T₃, nesse estudo, não alterou a expressão de resistina em ambos os grupos tratados.

Os hormônios tireoidianos agem por meio do acoplamento aos seus receptores (TR α e TR β) ⁽¹⁴⁾. Estudos anteriores do nosso grupo mostraram que o tecido adiposo apresenta níveis de expressão quase indetectáveis de TR α ; assim, neste estudo, apenas TR β foi avaliado. A expressão gênica de TR β , no tecido adiposo, não mostrou diferença entre os grupos OB e C. A literatura apresenta dados conflitantes em relação à expressão gênica de TR β , enquanto alguns autores relatam aumento da expressão em animais obesos ⁽¹⁴²⁾, outros mostram redução de TR β no tecido adiposo branco ⁽¹⁶⁵⁾. Não foram encontrados na literatura estudos experimentais sobre a expressão de TR β em animais submetidos à restrição alimentar, bem como com doses suprafisiológicas de T₃. Entretanto, nossos dados mostram que os animais obesos submetidos à restrição alimentar apresentaram

aumento importante na expressão de TR β , isto indica um mecanismo de *up-regulation*, ou seja, a diminuição nos níveis séricos de T₃ ocasiona o aumento na expressão gênica de TR β . A administração de doses supra-fisiológicas de T₃ não influenciou os níveis de expressão de TR β nos animais OS1 e OS2; em contraste, diminuiu a expressão nos animais RS1 e RS2, independente da dose administrada, para os níveis dos animais C.

Não foi possível verificar associação entre as concentrações séricas de T₃ e os hormônios estudados, com exceção do grupo RC que apresentou uma associação negativa entre os níveis séricos de T₃ e de leptina, apesar de os níveis médios tanto de T₃ quanto de leptina terem diminuído, isto significa que os animais que apresentavam maiores níveis de T₃, apresentavam menores níveis de leptina, ou vice-versa. Também observamos correlação entre os níveis séricos de T₃ e expressão gênica de resistina, positiva para o grupo OB e negativa para o RC. Os demais homônios não apresentaram correlação com os níveis de T₃ (Tabela 5). Nossos dados mostram que as doses supra-fisiológicas de T₃ administradas não se correlacionam com os níveis e expressão de leptina, resistina ou adiponectina.

7-Conclusão

O tratamento exógeno com T3 foi eficaz, aumentando os níveis séricos de T3 livre e diminuindo as concentrações de T4 livre e TSH.

A dieta rica em ácidos graxos insaturados induziu obesidade e a restrição alimentar utilizada neste estudo foi eficiente em minimizar os efeitos da obesidade. A administração de T3 promoveu perda de peso, independente da dose utilizada na obesidade e de maneira dose dependente durante a restrição alimentar, enquanto a adiposidade foi afetada somente com a maior dose administrada. A administração de 25 μg de T₃/100g de peso do animal diminuiu a concentração sérica de leptina por meio da diminuição da sua expressão tanto na obesidade quanto na restrição. Em ambos os tratamentos dietéticos houve diminuição nos níveis séricos de resistina na dose de 25 μg de T₃/100g de peso do animal, sem alterar a expressão gênica. A concentração sérica de adiponectina foi reduzida apenas na dose de 5 μg de T₃/100g de peso do animal, em relação aos grupos salina. A administração de T₃ não alterou a expressão de adiponectina na obesidade, enquanto diminuiu sua expressão durante o processo de restrição alimentar.

Assim, sugerimos que o T₃ age, direta ou indiretamente, sobre a concentração sérica e expressão gênica das adipocinas, modulando-as na obesidade e após a perda de peso.

Referências

1. Bell-Anderson KS, Bryson JM. Leptin as a potencial treatment for obesity. *Treat Endocrinol.* 2004; 3:11-8.
2. Mathew B, Patel SB, Reams GP, Freeman RH, Spear RM, Villareal D. Obesity-hypertension: emerging concepts in pathophysiology and treatment. *Am J Med Sci.* 2007; 334(1):23-30.
3. World Health Organization. Obesity and Overweight. Geneva: WHO [acessado em abril de 2010]. Disponível em <http://www.who.int/en>
4. BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003. Antropometria e análise do estado nutricional de crianças e adolescentes no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2006.
5. O'Brien PE, Dixon JB. The extent of the problem of obesity. *Am J Surg.* 2002; 184(6B):S4-8.
6. Aranceta J, Moreno B, Moya M, Anadón A. Prevention of overweight and obesity from a public health perspective. *Nutr Rev.* 2009; 67(Suppl.1):S83-8.
7. Malnick SDH, Knobler H. The medical complications of obesity. *QJM.* 2006; 99(9):565-79.
8. Weiss EC, Galuska DA, Khan LK, Serdula MK. Weight-Control Practices Among U.S. Adults, 2001 – 2002. *Am J Prevent Med.* 2006; 31:18-24.
9. Dahlman I, Linder K, Nordström EA, Andresson I, Lidén J, Verdich C, *et al.* Changes in adipose tissue gene expression with energy-restricted diets in obese women. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81:1275-85.
10. Vasselli JR, Weindruch R, Heymsfield SB, Pi-Sunyer FX, Boozer CN, Yi N, *et al.* Intentional weight loss reduces mortality rate in a rodent model of dietary obesity. *Obes Res.* 2005; 13:693-702.

11. Strychar I. Diet in the management of weight loss. *Canadian Medical Association Journal*. 2006; 174:56-63.
12. Pinkney JH, Goodrick SJ, Katz J, Johnson AB, Lightman SL, Copack SW, *et al*. Leptin and the pituitary – thyroid axis: a comparative study in lean, obese, hypothyroid and hyperthyroid subjects. *Clin Endocrinol*. 1998; 49:583-8.
13. Silvestri E, Schiavo L, Lombardi A, Goglia F. Thyroid hormones as molecular determinants of thermogenesis. *Acta Physiol Scand*. 2005; 184:265-83.
14. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*. 2001; 81:1097-142.
15. Bassett JH, Harvey CB, Williams GR. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2003; 213:1-11.
16. Flier JS, Harris M, Hollenberg AN. Leptin, nutrition, and the thyroid: the why, the wherefore, and the wiring. *J Clin Invest*. 2000; 105:859-61.
17. Feldt-Rasmussen U. Thyroid and leptin. *Thyroid*. 2007; 17(5):413-9.
18. Reinerh T, Andler W. Thyroid hormones before and after weight loss in obesity. *Archives of Disease in Childhood*. 2002; 87:320-6.
19. Kim MS, Small CJ, Stanley AS, Morgan DGA, Seal LJ, Kong W. *et al*. The central melanocortin system affects the hypothalamopituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *J Clin Invest*. 2000; 105:1005-11.
20. Reinehr T. Obesity and thyroid function. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 316(2):165-71.
21. Rondinone CM. Adipocyte-derived hormones, cytokines, and mediators. *Endocrine*. 2006; 29(1):81-90.
22. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89:2548-56.

23. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation, and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6:772-83.
24. Ahima RS, Qi Y, Singhal NS, Jackson MB, Scherer PE. Brain adipocytokine action and metabolic regulation. *Diabetes*. 2006; 55(Suppl.2):S145-54.
25. Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)*. 2006; 14(Suppl.5):S242-9.
26. Garg A. Adipose tissue dysfunction in obesity and lipodystrophy. *Clin Cornerstone*. 2006; 8(Suppl.4):S7-13.
27. Matsuzawa Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS*. 2006; 580:2917-21.
28. Fontana L. Neuroendocrine factors in the regulation of inflammation: excessive adiposity and calorie restriction. *Exp Gerontol*. 2009; 44:41-5.
29. Viguier N, Vidal H, Arner P, Holst C, Verdich C, Avizou S, *et al*. Adipose tissue gene expression in obese subjects during low-fat and high-fat hypocaloric diets. *Diabetologia*. 2005; 48:123-31.
30. Vendrell J, Montserrat B, Vilarrasa N, Molina A, Gomez JM, Gutierrez C, *et al*. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes Res*. 2004; 12:962-71.
31. McTernan PG, McTernan CL, Chetty R, Jenner K, Fisher FM, Lauer MN, *et al*. Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87:2407-10.
32. Savage DB, Sewter CP, Klent ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV. Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes*. 2001; 50:2199-202.

33. Meier U, Gressner AM. Endocrine Regulation of Energy Metabolism: Review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem*. 2004; 50:1511-25.
34. Shuldiner AR, Yang R, Gong DW. Resistin, obesity and insulin resistance--the emerging role of the adipocyte as an endocrine organ. *N Engl J Med*. 2001;345(18):1345-6.
35. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001; 409:307-12.
36. Stepan CM, Lazar MA. Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*. 2002; 13:18-23.
37. Juan CC, Au LC, Fang VS, Kang SF, Ko YH, Kuo SF, et al. Suppressed gene expression of adipocyte resistin in an insulin-resistant rat model probably by elevated free fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;289(5):1328-33.
38. Le Lay S, Boucher J, Rey A, Castan-Laurell I, Krief S, Ferre P, et al. Decreased resistin expression in mice with different sensitivities to a high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 289:564-7.
39. Milan G, Granzotto M, Scarda A, Calcagno A, Pagano C, Federspil G, et al. Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss. *Obes Res*. 2002; 10(11):1095-103.
40. Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W, et al. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J*. 2000;19:4046-55.
41. Rajala MW, Qi Y, Patel HR, Takahashi N, Banerjee R, Padjvani UB, et al. Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes*. 2004; 53:1671-9.

42. Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 2001; 276:11252-6.
43. Nogueiras R, Gualillo O, Caminos JE, Casanueva FF, Diéguez C. Regulation of resistin by gonadal, thyroid hormone, and nutritional status. *Obes Res.* 2003;11:408-14.
44. Krassas GE, Pontikides N, Loustis K, Koliakos G, Constantinidis T, Panidis D. Resistin levels in hyperthyroid patients before and after restoration of thyroid function: relationship with body weight and body composition. *Eur J Endocrinol.* 2005; 153:217-21.
45. Iglesias P, Alvarez FP, Codoceo R, Díez JJ. Serum concentrations of adipocytokines in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism before and after control of thyroid function. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003; 59:621-9.
46. ShklyaeV S, Aslanidi G, Tennant M, Prima V, Kohlbrenner E, Kroutov V, et al. Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(24):14217-22.
47. Ukkola O, Santaniemi M. Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities? *J Mol Med.* 2002; 80:696-702.
48. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;257:79-83.
49. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20:1595-9.

50. Statnick MA, Beavers LS, Conner LJ, Corominola H, Johnson D, Hammond CD, et al. Decreased expression of apM1 in omental and subcutaneous adipose tissue of humans with type 2 diabetes. *Int J Exp Diabetes Res.* 2000; 1:81-8.
51. Tsao TS, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Lodish HF. Oligomerization state-dependent activation of NF-Kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). *J Biol Chem.* 2002; 277(33):29359-62.
52. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med.* 2001; 7:947-53.
53. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acids oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:2005-10.
54. Yamauchi T, Kamom J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med.* 2001; 7:941-6.
55. Nedvídková J, Smitka K, Kopský V, Hainer V. Adiponectin, an adipocyte-derived protein. *Physiol Res.* 2005; 54:133-40.
56. Faraj M, Havel PJ, Phélis S, Blank D, Sniderman AD, Cianflone K. Plasma acylation-stimulating protein, adiponectin, leptin, and ghrelin before and after weight loss induced by gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(4):1594-602.
57. Zhu M, Miura J, Lu LX, Bernier M, DeCabo R, Lane MA, et al. Circulating adiponectin levels increase in rats on caloric restriction: the potential for insulin sensitization. *Exp Gerontol.* 2004; 39:1049-59.

58. Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Int Med.* 1999; 130:671-80.
59. Giacobino JP. Uncoupling proteins, leptin and obesity: an update review. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 967:398-402.
60. Frederich RC, Löllmann B, Hamann A, Napolitano-Rosen A, Kahn BB, Lowell BB, *et al.* Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents – impact of nutrition and obesity. *J Clin Invest.* 1995; 96:1658-63.
61. Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinol.* 1997; 138:2569-76.
62. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, *et al.* Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature.* 1996; 382:250-2.
63. Menendez C, Baldelli R, Camina JP, Escudero B, Peino R, Dieguez C, *et al.* TSH stimulates leptin secretion by a direct effect on adipocytes. *J Endocrinol.* 2003; 176(1):7-12.
64. Iacobellis G, Ribaldo MC, Zappaterreno A, Iannucci CV, Leonetti F. Relationship of thyroid function with body mass index, leptin, insulin sensitivity and adiponectin in euthyroid obese women. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005; 62:487-91.
65. Escobar-Morreale HF, Rey FE, Escobar GM. Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat. *Endocrinol.* 1997; 138:4485-8.
66. Syed MA, Thompson MP, Pachucki J, Burmeister LA. The effect of thyroid hormone on size of fat depots accounts for most of the changes in leptin mRNA and serum levels in the rat. *Thyroid.* 1999; 9:503-12.

67. Hsieh CJ, Wang PW, Wang ST, Liu RT, Tung SC, Chien WY, et al. Serum leptin concentrations of patients with sequential thyroid function changes. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002; 57:29-34.
68. Luvizotto RAM, Conde SJ, Sibio MT, Nascimento AF, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, et al. Administration of physiological levels of triiodothyronine increases leptin expression in calorie-restricted obese rats, but does not influence weight loss. *Metabolism*. 2010; 59:1-6.
69. Yoshida T, Momotani N, Hayashi M, Monkawa T, Ito K, Saruta T. Serum leptin concentrations in patients with thyroid disorders. *Clin Endocrinol*. 1998; 48:299-302.
70. Silva FG, Giannocco G, Santos MF, Nunes MT. Thyroid hormone induction of actin polymerization in somatotrophs of hypothyroid rats: potential repercussions in growth hormone synthesis and secretion. *Endocrinology*. 2006; 147:5777–85.
71. Giannocco G, Santos RA, Nunes MT. Thyroid hormone stimulates myoglobin gene expression in rat cardiac muscle. *Mol Cell Endocrinol*. 2004; 226:19-26.
72. Fernández-Galaz C, Fernández-Agulló T, Pérez C, Peralta S, Arribas C, Andrés A, et al. Long-term food restriction prevents ageing-associated central leptin resistance in wistar rats. *Diabetologia*. 2002; 45:997-1003.
73. Minatoya Y, Ito K, Kagaya Y, Asaumi Y, Takeda, M, Nakayama M. Depressed contractile reserve and impaired calcium handling of cardiac myocytes from chronically unloaded hearts are ameliorated with the administration of physiological treatment dose of T3 in rats. *Acta Physiol*. 2007; 189:221–31.
74. Kokkinos A, Mourouzis I, Kyriaki D, Pantos C, Katsilambros N, Cokkinos DV. Possible implications of leptin, adiponectin and ghrelin in the regulation of energy homeostasis by thyroid hormone. *Endocrine*. 2007; 32(1):30-2.

75. The National Academy of Sciences. Nutrient requirements of the laboratory rat. 1995;4th ed. Washington.
76. Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nogueira CR, Novelli EL, et al. Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. *Biol Res.* 2008;41:253-9.
77. Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, Sutherland A, Petro AE, Opara EC, et al. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism* 1995; 44: 645-651.
78. Akiyama T, Tachibana I, Shirohara H, Watanabe N, Otsuki M. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Diabetes Res Clin Pract.* 1996; 31(1-3):27-35.
79. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio DA, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr.* 2003; 133(4):1081-7.
80. Nivoit P, Morens C, Van Assche FA, Jansen E, Poston L, Remacle C, et al. Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia.* 2009; 52(6):1133-42.
81. Sedova L, Seda O, Krenova D, Kren V, Kazdova L. Isotretinoin and fenofibrate induce adiposity with distinct effect on metabolic profile in a rat model of the insulin resistance syndrome. *Int J Obes.* 2004; 28:719-25.
82. Levin BE, Dunn-Meynell AA. Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283:R941-R948.
83. Rogers P, Webb GP. Estimation of body fat in normal and obese mice. *Br J Nutr* 1980; 43: 83- 86.
84. Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-

- induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287:R943-R949.
85. Zar JH. *Biostatistical Analysis*. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1999. 663p.
86. Booth FW, Gordon, SE. Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. *J Appl Physiol*. 2000; 88:774-87.
87. Astrup A, Buemann B, Western P, Toubro S, Raben A, Christensen NJ. Obesity as an adaptation to a high-fat diet: evidence from a cross-sectional study. *Am J Clin Nutr*. 1994; 59(2):350-5.
88. Alonso A, Fernández Y, Fernández R, Ordóñez P, Moreno M, Díaz F, *et al*. Effect of food restriction on the insulin signalling pathway in rat skeletal muscle and adipose tissue. *J Nutr Biochem*. 2005; 16:602-9.
89. Spindler SR. Rapid and reversible induction of the longevity, anticancer and genomic effects of caloric restriction. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2005; 126:960-6.
90. Moore R, Grant AM, Howard AN, Mills IH. Treatment of obesity with triiodothyronine and a very-low-calorie liquid formula diet. *Lancet*. 1980; 1:223-6.
91. Moreira-Andrés MN, Del Cañizo-Gómez FJ, Black EG, Hoffenberg R. Long-term evaluation of thyroidal response to partial calorie restriction in obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1981;15:621-6.
92. Biondi B, Palmieri EA, Fazio S, Cosco C, Nocera M, Saccà L, *et al*. Endogenous subclinical hyperthyroidism affects quality of life and cardiac morphology and function in young and middle-aged patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85:4701-5.

93. Brennam MD, Powell C, Kaufman KR, Sun PC, Bahn RS, Nair KS. The impact of overt and subclinical hyperthyroidism on skeletal muscle. *Thyroid*. 2006; 16:375-80.
94. Magsino Junior C, Hamouda W, Ghanim H, Browne R, Aljada A, Dandona P. Effect of triiodothyronine on reactive oxygen species generation by leukocytes, indices of oxidative damage, and antioxidant reserve. *Metabolism*. 2000; 49(6):799-803.
95. Zabrocka L, Klimek J, Swierczynski J. Evidence that triiodothyronine decreases rat serum leptin concentration by down-regulation of leptin gene expression in white adipose tissue. *Life Sciences*. 2006; 79:1114-20.
96. Krotkiewski M. Thyroid hormones in the pathogenesis and treatment of obesity. *Eur J Pharmacol*. 2002; 440:85-98.
97. Torgerson JS, Carlsson B, Stenlöf K, Carlsson LMS, Bringman E, Sjöström L. A low serum leptin level at baseline and a large early decline in leptin predict a large 1-year weight reduction in energy-restricted obese humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84:4197-203.
98. Cao SX, Dhahbi JM, Mote PL, Spindler SR. Genomic profiling of short- and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice. *PNAS*. 2001; 98:10630-5.
99. Obregon MJ. Thyroid economy – regulation, cell biology, thyroid hormone metabolism and action: the special edition: metabolic effects of thyroid hormone. *Thyroid*. 2008; 18:185-95.
100. Abel ED, Moura EG, Ahima, RS, Campos-Barros A, Pazos-Moura CC, Boers M, *et al*. Dominant inhibition of thyroid hormone action selectively in the pituitary of thyroid hormone receptor- β null mice abolishes the regulation of thyrotropin by thyroid hormone. *Mol Endocrinol*. 2003; 17:1767-76.

101. Harris RBS. Factors influencing energy intake of rats fed either a high-fat or a fat mimetic diet. *Int J Obes.* 1994; 18:632-40.
102. Elliott JC, Harrold JA, Brodin P, Enquist K, Bäckman A, Byström M. *et al.* Increases in melanin-concentrating hormone and MCH receptor levels in the hypothalamus of dietary-obese rats. *Molecular Brain Research.* 2004; 128:150-9.
103. Dourmashkin JT, Chang GQ, Gayles EC, Hill JO, Fried SK, Julien C, *et al.* Different forms of obesity as a function of diet composition. *Int J Obes.* 2005; 29(11):1368-78.
104. Gaíva MHG, Couto RC, Oyama LM, Couto GEC, Silveira VLF, Ribeiro EB, *et al.* Polyunsaturated fatty acid-rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. *British Journal of Nutrition.* 2001; 86:371-7.
105. French SJ, Murray B, Rumsey RDE, Fadzlin R, Read NW. Adaptation to high-fat diets: effects on eating behaviour and plasma colecystokinin. *British Journal of Nutrition.* 1995; 73:179-89.
106. Horn C, Tordoff MG, Friedman MI. Does ingested fat produce satiety? *Am J Physiol.* 1996; 39:R761-5.
107. Ainslie DA, Proietto J, Fam BC, Thorburn AW. Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71:438-42.
108. Roberts CK, Barnard RJ, Liang KH, Varizi ND. Effect of diet on adipose tissue and skeletal muscle VLDL receptor and LPL: implications for obesity and hyperlipidemia. *Atherosclerosis.* 2002; 161:133-41.
109. Tentolouris N, Pavlatos S, Kokkinos A, Perrea D, Pagoni S, Katsilambros N. Diet-induced thermogenesis and substrate oxidation are not different between lean and obese women after two different isocaloric meals, one rich in protein and one rich in fat. *Metabolism.* 2008; 57:313-20.

110. Schrauwen P, Westerterp KR. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. *Br J Nutr* 2000; 84:417-27.
111. Thompson WG, Holdman NR, Janzow DJ, Slezak JM, Morris KL, Zemel MB. Effect of energy-reduced diets high in dairy products and fiber on weight loss in obese adults. *Obes Res*. 2005; 13:1344-53.
112. Daly ME, Paisey R, Millward BA, Eccles C, Williams K, Hammersley S, *et al*. Short-term effects of severe dietary carbohydrate-restriction advice in type 2 diabetes – a randomized controlled trial. *Diabetic Med*. 2005; 23:15-20.
113. Pond CM. Physiological specialization of adipose tissue. *Prog Lip Res*. 1999; 38:225-48.
114. Fielding CJ, Havel RJ, Todd KM, Yeo KE, Schioetter MC, Weinberg V, *et al*. Effects of dietary cholesterol and fat saturation on plasma lipoproteins in an ethnically diverse population of health young men. *J Clin Invest*. 1995; 95:611-8.
115. Spady DK, Dietschy JM. Interaction of dietary cholesterol and triglycerides in the regulation of hepatic low density lipoprotein transport in the hamster. *J Clin Invest*. 1988; 81:300-9.
116. Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Nascimento CMO. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutr*. 2004; 20:218-24.
117. Cintra DEC, Costa AGV, Peluzio MCG, Matta SLP, Silva MTC, Costa NMB. Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout, or chicken skin. *Nutr*. 2006; 22:197-205.
118. Mahan LK, Escott-Stump S. *Alimentos, nutrição e dietoterapia*. 9ª ed. São Paulo: Roca; 1998.
119. Duntas LH. Thyroid disease and lipids. *Thyroid*. 2002; 12(4): 287-93.

120. Riis ALD, Gravholt CH, Djurhuus CB, Norrelund H, Jorgensen JOL, Weeke J, et al. Elevated regional lipolysis in hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(10):4747-53.
121. Kung A, Pang R, Lander I, Lam k, Janus E. Changes in serum lipoprotein (a) and lipids during treatment of hyperthyroidism. *Clin Chem.* 1995; 41:226-31.
122. Holmes, JH, Lambourne LJ. The relation between plasma free fatty acid concentration and the digestible intake cattle. *Rev Vet Sci.* 1970; 11(1):27-36.
123. Birnbaum MJ. Lipolysis: more than just a lipase. *J Cell Biol.* 2003; 161(6):1011-2.
124. Dimitriadis GD, Raptis SA. Thyroid hormone excess and glucose intolerance. *Exp Clin Endocrinol Diab.* 2001; 109:S225-39.
125. Setia S, Sridhar MG, Koner BC, Bobby Z, Bhat V, Chaturvedula L. Increased insulin sensitivity in intrauterine growth retarded newborns – Do thyroid hormones play a role? *Clinica Chimica Acta.* 2006; 4p.
126. Barnes MJ, Lapanowski K, Conley A, Rafols JÁ, Jen KLC, Dunbar JC. High fat feeding is associated with increased blood pressure, sympathetic nerve activity and hypothalamic mu opioid receptors. *Brain Research Bulletin.* 2003; 61:511-9.
127. Levin BE, Dunn-Meynell AA. Chronic exercise lowers the defended body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats. *Am J Physiol.* 2004; 286:R771-8.
128. Wolfe BE, Jimerson DC, Orlova C, Mantozoros CS. Effect of dieting on plasma leptin, soluble leptin receptor, adiponectin and resistin levels in healthy volunteers. *Clin Endocrinol.* 2004; 61:332-8.

129. Stelmaska E, Korczynska J, Swierczynski J. Tissue-specific effect of refeeding after short and long-term caloric restriction on malic enzyme gene expression in rats tissues. *Acta Biochimica Polonica*. 2004; 51:805-14.
130. Fickova M, Zorad S, Macho L. The effect of *in vivo* thyroxine treatment on insulin receptors, glucose transport and GLUT4 in rat adipocytes. *Horm Metab Res*. 1997; 29:16-9.
131. Mackowiak P, Ginalska E, Nowak-Strojec E, Szkudelski T. The influence of hypo- and hyperthyroidism on insulin receptors and metabolism. *Arch Physiol Biochem*. 1999; 107(4):273-9.
132. Casla A, Arrieta F, Grant C, Casanova B, Rovira A. Effect of short- and long-term experimental hyperthyroidism on plasma glucose level and insulin secretion during an intravenous glucose load and on insulin binding, insulin receptor kinase activity, and insulin action on adipose tissue. *Metabolism*. 1993; 42:814-21.
133. Brown JL, Spicer MT, Spicer LJ. Effect of high-fat diet on body composition and hormone responses to glucose tolerance test. *Endocrine*. 2002; 19:327-32.
134. Van Dam RM, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ, Hu FB. Dietary fat and meat intake in relation to risk of type 2 diabetes in men. *Diabetes Care*. 2002; 25:417-24.
135. Zhao R, Li Q, Xiao B. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on the improvement of insulin resistance in NIDDM rats. *Yakugaku Zasshi*. 2005; 125:981-8.
136. Reinehr T, Kiess W, Kapellen T, Andler W. Insulin sensitivity among obese children and adolescents, according to degree of weight loss. *Pediatrics*. 2004; 114:1569-73.

137. Goodpaster BH, Kelley DE, Wing RR, Meier A, Thaete FL. Effects of weight loss on regional fat distribution and insulin sensitivity in obesity. *Diabetes*. 1999; 48:839-47.
138. Kristensen K, Pedersen SB, Langdahl BL, Richelsen B. Regulation of leptin by thyroid hormone in humans: studies in vivo and in vitro. *Metabolism*. 1999; 48:1603-7.
139. Näslund E, Andersson I, Degerblad M, Kogner P, Kral JG, Rössner S, *et al.* Associations of leptin, insulin resistance and thyroid function with long-term weight loss in dieting obese men. *J Int Med*. 2000; 248:299-308.
140. Johnstone AM, Murison SD, Duncan JS, Rance KA, Speskman JR. Factors influencing in basal metabolic rate include fat-free mass, fat mass, age, and circulating thyroxine but not sex, circulating leptin, or triiodothyronine. *Am J Clin Nutr*. 2005; 82:941-8.
141. Bennet PA, Lindell K, Karlsson C, Robinson ICAF, Carlsson LMS, Carlsson B. Differential expression and regulation of leptin receptor isoforms in the rat brain: effects of fasting and oestrogen. *Neuroendocrinology*. 1998; 67:29-36.
142. López IP, Marti A, Milagro FI, Zulet MA, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA, *et al.* DNA microarray analysis of genes differentially expressed in diet-induced (cafeteria) obese rats. *Obes Res*. 2003; 11:188-94.
143. Kim SO, Yun S, Jung B, Lee EH, Halm D, Shim I, *et al.* Hypolipidemic effects of crude extract of adlay seed (*Coix lachrymajobi var. mayuen*) in obesity rat feed high fat diet: Relations of TNF- α and leptin mRNA expressions and serum lipid levels. *Life Sciences*. 2004; 75:1391-1404.

144. Wang M, Orci L, Ravazzola M, Unger R. Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: Implications for treatment of human obesity. *PNAS*. 2005; 102:18011-6.
145. Gallardo N, Arribas C, Villar M, Ros M, Carrascosa JM, Martinez C, *et al*. ObRa and ObRe are differentially expressed in adipose tissue in aged food-restricted rats: effects on circulating soluble leptin receptor levels. *Endocrinol*. 2005; 146:4934-42.
146. Yoshida T, Monkawa T, Hayashi M, Saruta T. Regulation of expression of leptin mRNA and secretion of leptin by thyroid hormone in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 232:822-6.
147. Goldstein BJ, Scalia R. Adipokines and vascular disease in diabetes. *Curr Diab Rep*. 2007;7:25-33.
148. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, *et al*. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation*. 2000; 102:1296-301.
149. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, *et al*. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood*. 2000;96:1723-32.
150. Yang WS, Jeng CY, Wu TJ, Tanaka S, Funahashi T, Matsuzawa Y, *et al*. Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, rosiglitazone, increases plasma levels of adiponectin in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2002; 25:376-80.
151. Hirose H, Kawai T, Yamamoto Y, Taniyama M, Tomita M, Matsubara K, *et al*. Effects of pioglitazone on metabolic parameters, body fat distribution, and serum

- adiponectin levels in Japanese male patients with type 2 diabetes. *Metabolism*. 2002; 51:314-7.
152. Aragao CN, Souza LL, Cabanelas A, Oliveira KJ, Pazos-Moura CC. Effect of experimental hypo- and hyperthyroidism on serum adiponectin. *Metabolism*. 2007; 56:6-11.
153. Santini F, Marsili A, Mammoli C, Valeriano R, Scartabelli G, Pelosini C, et al. Serum concentrations of adiponectin and leptin in patients with thyroid dysfunctions. *J Endocrinol Invest*. 2004; 27:RC5-7.
154. Altinova AE, Toruner FB, Akturk M, Bukan N, Cakir N, Ayvaz G, et al. Adiponectin levels and cardiovascular risk factors in hypothyroidism and hyperthyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006; 65:530-5.
155. Yaturu S, Prado S, Grimes SR. Changes in adipocyte hormones leptin, resistin, and adiponectin in thyroid dysfunction. *J Cell Biochem*. 2004; 93:491-6.
156. Saito T, Kawano T, Saito T, Ikoma A, Namai k, Tamemoto H, et al. Elevations of serum adiponectin levels in Basedow disease. *Metabolism*. 2005; 54:1461-6.
157. Yu HY, Yang Y, Zhang MX, Lu HL, Zhang JH, Wang HW, et al. Thyroid status influence on adiponectin, acylation stimulating protein and complement C3 in hyperthyroid and hypothyroid subjects. *Nutr Metab (Lond)*. 2006; 3:13.
158. Stepan CM, Lazar MA. The current biology of resistin. *J Intern Med*. 2004; 255:439-47.
159. Nakata M, Okada T, Ozawa K, Yada T. Resistin induces insulin resistance in pancreatic islets to impair glucose-induced insulin release. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 353:1046-51.
160. Rea R, Donnelly R. Resistin: an adipocyte-derived hormone. Has it a role in diabetes and obesity? *Diabetes Obes Metab*. 2004; 6:163-70.

161. Bo S, Gambino R, Pagani A, Guidi S, Gentile L, Cassader M, et al. Relationships between human serum resistin, inflammatory markers and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)*. 2005; 29:1315-20.
162. Iqbal N, Seshadri P, Stern L, Loh J, Kundu S, Jafar T, et al. Serum resistin is not associated with obesity or insulin resistance in humans. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2005; 9:161-5.
163. Baranova A, Gowder SJ, Schlauch K, Elariny H, Collantes R, Afendy A, et al. Gene expression of leptin, resistin, and adiponectin in the white adipose tissue of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Obes Surg*. 2006; 16:1118-25.
164. Nagaev I, Smith U. Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 285:561-4.
165. Redonnet A, Groubet R, Noël-Suberville C, Bonilla S, Martinez A, Higuieret P. Exposure to an obesity-inducing diet early affects the pattern of expression of peroxisome proliferator, retinoic acid, and triiodothyronine nuclear receptors in the rat. *Metabolism*. 2001; 50:1161-7.

Apêndices

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

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

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

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

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

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

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

** Aminoácidos essenciais.

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

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

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

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

Componentes	Rações	
	Padrão	Hipercalórica*
Ferro (mg)	100	100
Manganês (mg)	75	75
Magnésio (mg)	2	-
Zinco (mg)	60	100
Cobre (mg)	10	10
Iodo (mg)	2	2
Cobalto (mg)	1,5	1,5
Selênio (mg)	0,2	0,2
Colina (mg)	500	600
Vitamina A (UI)	12600	12750
Vitamina D (UI)	2500	2500
Vitamina E (mg)	60	60
Vitamina K (mg)	10	10
Vitamina B1 (mg)	5	10
Vitamina B2 (mg)	6	6
Vitamina B6 (mg)	8	8
Vitamina B12 (mcg)	30	30
Niacina (mg)	65	65
Ácido Pantotênico (mg)	25	25
Ácido Fólico (mg)	3	4,5
Biotina (mg)	0,4	0,4

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

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

Quadro E. Quantificação de RNA para animais controle

Animal	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Razão	Pureza	[] RNA
C 2	0,459	0,248	1,894	94%	1285,2
C 3	0,948	0,491	1,929	96%	2654,4
C 6	1,425	0,729	1,954	97%	3990,0
C 10	0,639	0,331	1,929	96%	1789,2
C 14	0,739	0,386	1,912	95%	2069,2
C 20	0,863	0,452	1,909	95%	2416,4

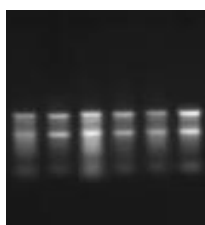


Figura A. Visualização em gel de agarose 1% da integridade do RNA para o grupo C

Quadro F. Quantificação de RNA para animais obeso

Animal	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Razão	Pureza	[] RNA
OB 37	0,645	0,339	1,902	95%	1806,0
OB 83	0,491	0,255	1,927	96%	1374,8
OB 115	0,468	0,241	1,943	97%	1310,4
OB 119	0,568	0,289	1,967	98%	1590,4
OB 123	0,561	0,287	1,953	97%	1570,8
OB 124	0,698	0,361	1,936	96%	1954,4

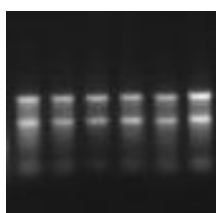


Figura B. Visualização em gel de agarose 1% da integridade do RNA para o grupo OB

Quadro G. Quantificação de RNA para animais com restrição alimentar

Animal	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Razão	Pureza	[] RNA
RC 21	0,904	0,475	1,902	95%	2531,2
RC 38	0,411	0,214	1,922	96%	1150,8
RC 61	0,370	0,199	1,861	93%	1036,0
RC 82	0,634	0,33	1,919	95%	1775,2
RC 93	0,337	0,178	1,891	94%	943,6
RC 120	0,319	0,17	1,879	93%	893,2

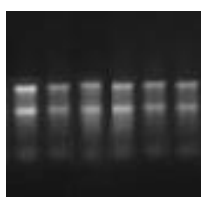


Figura C. Análise em gel de agarose 1% da integridade do RNA para o grupo RC

Quadro H. Quantificação de RNA para animais obeso com 5µg/100g de T₃

.Animal	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Razão	Pureza	[] RNA
OS1 22	0,568	0,301	1,884	94%	1590,4
OS1 24	0,862	0,453	1,903	95%	2413,6
OS1 84	0,577	0,308	1,872	93%	1615,6
OS1 89	0,550	0,29	1,894	94%	1540,0
OS1 108	0,434	0,227	1,912	95%	1215,2
OS1 109	0,776	0,403	1,927	96%	2172,8

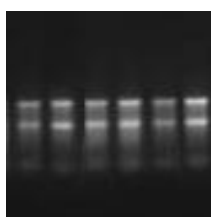


Figura D. Análise em gel de agarose 1% da integridade do RNA para o grupo OS1

Quadro I. Quantificação de RNA para animais restritos com 5 μ g/100g de T₃

Animal	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Razão	Pureza	[] RNA
RS1 29	0,727	0,727	1,897	94%	2035,6
RS134	0,399	0,399	1,932	96%	1117,2
RS1 70	0,575	0,575	1,902	95%	1610,0
RS1 96	0,509	0,509	1,92	96%	1425,2
RS1 111	1,31	1,31	1,923	96%	3668,0
RS1 125	1,545	1,545	1,88	94%	4326,0

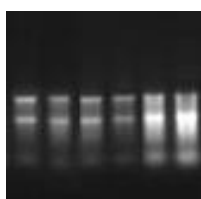


Figura E. Análise em gel de agarose 1% da integridade do RNA para o grupo RS1

Quadro J. Quantificação de RNA para animais obesos com 25 μ g/100g de T₃

Animal	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Razão	Pureza	[] RNA
OS2 27	0,574	0,301	1,904	95%	1607,2
OS2 44	0,663	0,348	1,904	95%	1856,4
OS2 52	0,549	0,29	1,896	94%	1537,2
OS2 64	0,883	0,463	1,908	95%	2472,4
OS2 75	1,092	0,562	1,942	97%	3057,6
OS2 118	0,415	0,219	1,894	94%	1162,0

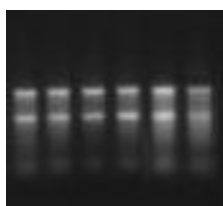


Figura F. Análise em gel de agarose 1% da integridade do RNA para o grupo OS2

Quadro L. Quantificação de RNA para animais restritos com 25 μ g/100g de T₃

Animal	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Razão	Pureza	[] RNA
RS2 54	0,712	0,372	1,913	95%	1993,6
RS2 60	1,709	0,882	1,938	96%	4785,2
RS2 79	1,156	0,596	1,938	96%	3236,8
RS2 91	1,603	0,832	1,926	96%	4488,4
RS2 101	2,025	1,044	1,939	96%	5670,0
RS2 103	1,811	0,932	1,944	97%	5070,8

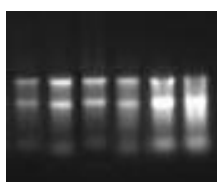


Figura G. Análise em gel de agarose 1% da integridade do RNA para o grupo RS2

A3 - Visualização das curvas de amplificação de PCR em tempo real

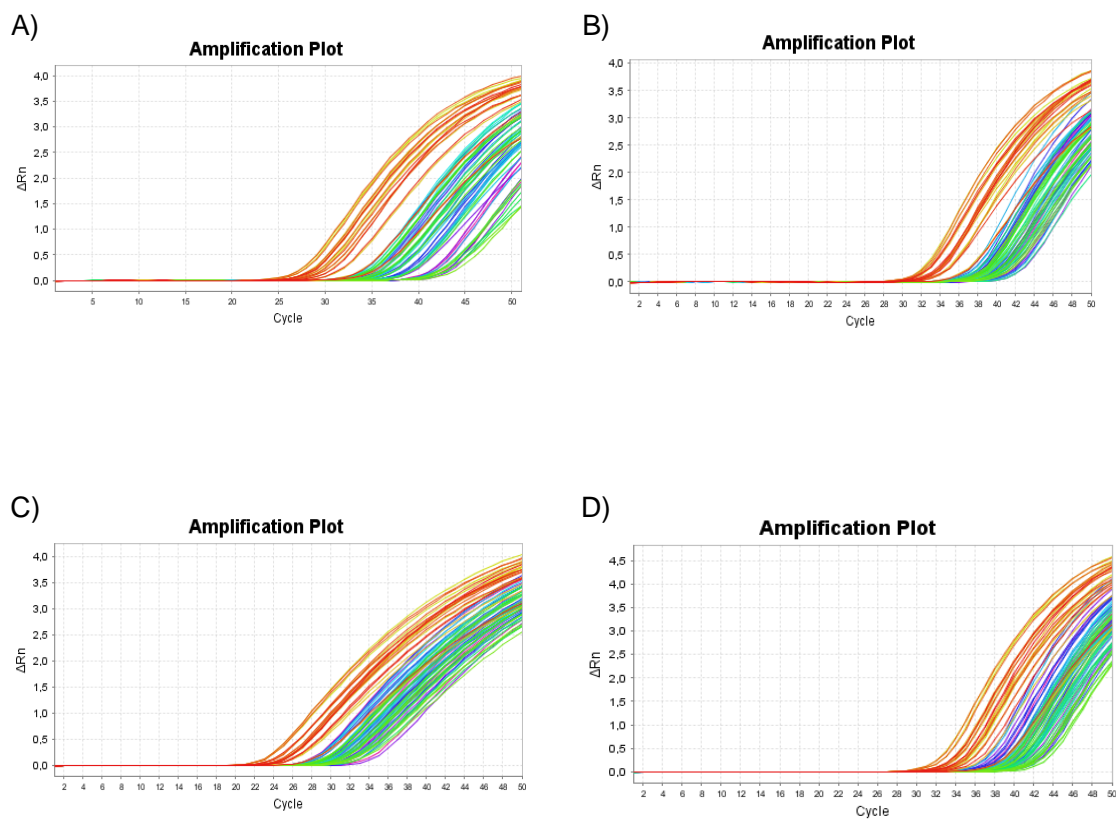


Figura H. A) Curvas de amplificação do experimento de PCR em tempo real para o gene da leptina; B) Curvas de amplificação do experimento de PCR em tempo real para o gene da resistina; C) Curvas de amplificação do experimento de PCR em tempo real para o gene da adiponectina; D) Curvas de amplificação do experimento de PCR em tempo real para o gene do TR β .

A4 – Artigos

Artigo 1. High triiodothyronine doses diminish serum leptin by down-regulating its gene expression and diminishes serum concentration of resistin and adiponectin without altering their gene expressions in obese animals – an effect that may indicate the use of TR β analogues in obesity treatment

Abstract

The relationship among thyroid hormone and adipokines in obesity is controversial and has been scarcely addressed. The objective of this study was to analyze the influence of supraphysiological doses of T₃ on the gene expression and serum concentration of leptin, resistin and adiponectin in obese animals. Forty-five *Wistar* rats were feed a hypercaloric diet to induce obesity, for 20 weeks. The control animals, of the same age, were utilized for the group characterization. After this period, the rats continued receiving a hypercaloric diet and were randomized into three groups: obese animals (OB), obese with 5 μ g T₃/100 BW (OS1), and obese with 25 μ g T₃/100 g BW (OS2). The T₃ doses were administered in the last 2 weeks of the study. At the end of the treatment the animals were euthanized. Samples of blood and adipose tissue were collected for biochemical and hormonal analyses and gene expression of leptin, resistin and adiponectin. The data show that administration of T₃ promotes weight loss, independent of the dose utilized, while adiposity is affected only at the higher dose administered. 25 μ g T₃/100g BW diminishes serum leptin by reducing its expression, and decreases resistin serum concentration without alter its gene expression. The serum concentration of adiponectin is reduced only at 5 μ g T₃/100g BW, relative to the saline group, and does not alter its expression in

obesity. These results suggest that T_3 modulate leptin gene expression, but do not alter resistin and adiponectin expressions in obesity.

Key words: obesity, triiodothyronine, leptin, resistin, adiponectin.

Introduction

Obesity is a public health problem associated with innumerable incapacitating and chronic diseases such as diabetes mellitus type 2, cardiovascular diseases and some forms of cancer ⁽¹⁾. Defined as an excessive or abnormal accumulation of adipose tissue that can be detrimental to health ⁽²⁾, obesity is a chronic endocrinal-metabolic disease of multifactorial etiology ⁽³⁾.

The thyroid hormones influence energetic metabolism ⁽⁴⁾ and perform a central role in the regulation of adipose tissue metabolism ⁽⁵⁾. Disturbances of these hormones are associated with alterations of body weight and energy expenditure ⁽⁶⁾. TSH and the peripheral thyroid hormones (T_3 and T_4) are elevated in obesity. The augmented concentration of thyroid hormones may indicate a hormonal resistance, resembling the insulin resistance that occurs in obesity ⁽⁷⁾.

The adipose tissue, a functionally active organ and not only a storehouse for excess fat, produces a variety of biologically active substances. These substances are denominated adipokines and can influence the function and structural integrity of other tissues ^(8, 9). The dysfunction of adipose tissue, as occurs in obesity, can alter the release of adipokines such as leptin, resistin and adiponectin ⁽¹⁰⁾.

Leptin acts as a signal of satiety in the hypothalamus and thus controls the body weight not only by diminishing the ingestion of foods but also by increasing

energetic expenditure ⁽¹¹⁾. The levels of leptin in the circulatory system are elevated after meals; this increase is due to direct stimulation of expression of the *ob* gene and/or secretion of leptin from adipose tissue by glucose and insulin ⁽³⁾. Resistin is secreted by monocytes and adipocytes, and present pro-inflammatory properties such as TNF α and IL-6, ⁽¹²⁾. Despite being expressed and secreted in thin individuals, elevated levels are associated with obesity both in humans and in experimental models ⁽¹³⁾. Adiponectin is expressed exclusively in differentiated adipocytes ⁽¹⁴⁾. Contrary to the other factors secreted by adipose tissue, it acts as a protective factor against cardiovascular diseases and augments sensitivity to insulin ⁽¹⁵⁾. In humans, adiponectin levels are inversely proportional to the degree of adiposity ⁽¹⁶⁾. The target tissue and the precise action mechanism of adiponectin have not yet been completely elucidated ⁽¹⁷⁾.

Thyroid hormones are involved in the regulation of adipose tissue whereas the hormones produced by adipose tissue such as resistin, adiponectin and leptin are involved in regulation of the energetic balance ⁽¹⁵⁾; however, the relationship among these hormones in obesity is controversial and has been scarcely addressed. Thus, we hypothesize that supraphysiological doses of T₃ would diminish the levels of leptin and resistin and increase adiponectin levels. In this context, our objective was to analyze the influence of supraphysiological doses of T₃ on the gene expression and serum concentration of leptin, resistin and adiponectin in obese animals. Our data show that administration of 25 μ g T₃/100g BW diminishes serum leptin by reducing its expression, and decreases resistin serum concentration without alter its gene expression. The serum concentration of adiponectin is reduced only at 5 μ g T₃/100g BW, relative to the saline group, and does not alter its expression in obesity.

Materials and Methods

Animals and experimental protocol

characterization of obese animals, the animals continued receiving a hypercaloric diet. For this study we utilized 45 male *Wistar* rats weighing approximately 150g, obtained from the Animal Center of the Experimental Laboratory for Clinical Medicine at the “Júlio de Mesquita Filho” Paulista State University at Botucatu, Sao Paulo state, Brazil. For 20 weeks, all the animals received a hypercaloric diet to induce obesity. After this period, the rats were submitted to a statistical criterion to characterize the obese group. The control animals of the same age were fed a normocaloric diet and utilized for the characterization of groups as described previously ⁽¹⁸⁾. After the until the end of the experiment and were randomized into three groups: obese animals (OB, n = 13), obese with supraphysiological dose of T₃ (OS1, n = 13) at the concentration of 5 µg/100 g of animal body weight (BW) ⁽¹⁹⁾ and obese with supraphysiological dose of T₃ (OS2, n = 13) at the concentration of 25 µg/100 g BW ⁽²⁰⁾. The different doses of triiodothyronine were administered by means of subcutaneous injections, in the last 2 weeks of the study ^(21, 22); appropriate volumes of saline were administered, by subcutaneous injections, to the OB group, as delineated in Figure 1. The animals were kept in individual cages, at ambient temperature (22 – 26 °C) and lighting (12h light-dark cycle) controlled. The consumption of the diet was controlled daily and the weight measured weekly. The experimental protocol was approved by the Commission for Ethics in Animal Experimentation at the Botucatu – UNESP School of Medicine, and followed the “Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals”.

Deposits of body fat

The total body fat was measured as the sum of epididymal, retroperitoneal and visceral fat deposits ⁽²³⁾. This data point was utilized to confirm obesity in the animals. In addition, the adiposity index (adapted from Boustany et al. 2004 ⁽²⁴⁾) was calculated.

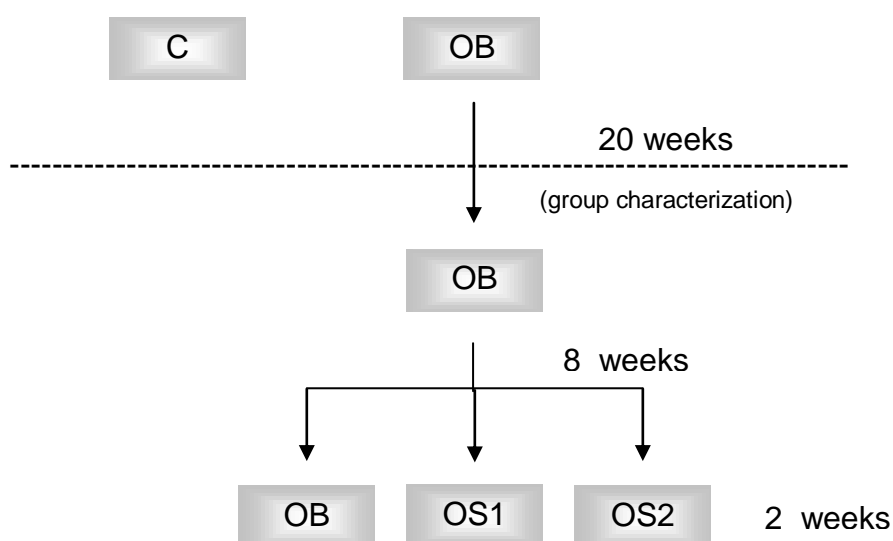


Figure 1. Protocol of study. C, control; OB, obese; OS1, obese with triiodothyronine dose at concentration of 5 $\mu\text{g}/100$ g BW; OS2, obese with triiodothyronine dose at concentration of 25 $\mu\text{g}/100$ g BW.

Biochemical analysis of serum

The animals were submitted to fasting for 12 to 15 hours, anesthetized with sodium pentobarbital, 50mg/kg/ip, and sacrificed by decapitation. The blood was collected in dry tubes then centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes; the serum was stored at -80°C . The serum concentrations of glucose and triacylglycerol (TG) were determined by specific kits (CELM[®], São Paulo, Brazil). The determination of free fatty acids (FFA) was accomplished by a commercial kit (WAKO, WAKO Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan). The dosings were analyzed by the

automated colorimetric enzyme method (Technicon, RA-XT™ System, Global Medical Instrumentation, Minnesota, USA).

Hormonal measurements

In the serum (collected as previously described) of all animals, were measured the serum concentrations of insulin, leptin, resistin, adiponectin, free T₃, free thyroxine (T₄) and TSH. The measurements were performed by immuno-assay with the aid of a microplate reader (Spectra Max 190 – Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). For the measurement of leptin, insulin, adiponectin (kit ELISA Linco Research), resistin (kit ELISA B-Bridge) and thyroid hormones (Kit ELISA USCN Life Science & Technology Company), commercial kits were utilized.

Gene expression

Whole RNA was extracted from adipose tissue using the reagent Trizol (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. 1000 ng of whole RNA was utilized for the synthesis of 20 µL of complementary DNA (cDNA) employing the kit *SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR*® (Invitrogen, Sao Paulo, Brazil).

The mRNA levels of leptin, resistin and adiponectin were determined by the technique of real-time PCR. Quantitative measurements were made with the commercial kit TaqMan qPCR (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions, in the detection system Applied Biosystems StepOne Plus. Cycling conditions in real time were as follows: enzyme activation at 50 °C for 2 min then denaturation at 95 °C for 10 min, the cDNA products were amplified in 40 cycles, each at the denaturation temperature of 95 °C for 15 s and annealing/extension at 60

°C for 1 min. Gene expression was quantified in relation to the values of the OB group after normalization by the internal control (cyclophilin) by the method $2^{-\Delta\Delta CT}$ as previously described⁽²⁵⁾.

Statistical analysis

The evolution of body weight was evaluated by a confidence interval of 95%. Data for gene expression, biochemistry and hormones were analyzed statistically by analysis of variance (ANOVA) technique complemented by Bonferroni's test. The data are expressed as mean \pm standard deviation. A 5% significance level was adopted.

Results

Evolution of body weight

All the animals presented similar body weights at the beginning of the study. At the end of the experiment, the OB group presented a mean body weight of 604g \pm 36g, while treatment with T₃ reduced the weights in groups OS1 (538g \pm 24g) and OS2 (529g \pm 16g) in a dose-dependent manner (Figure 2).

Body Fat

Administration of T₃ caused diminution of retroperitoneal and visceral fat deposits in a dose-dependent manner. The epididymal deposit showed fat reduction only at the dose of 25 μ g/100 g BW; the same behavior was observed in the analysis of total body fat. The adiposity index also presented diminution only at the higher T₃ concentration (Table 1).

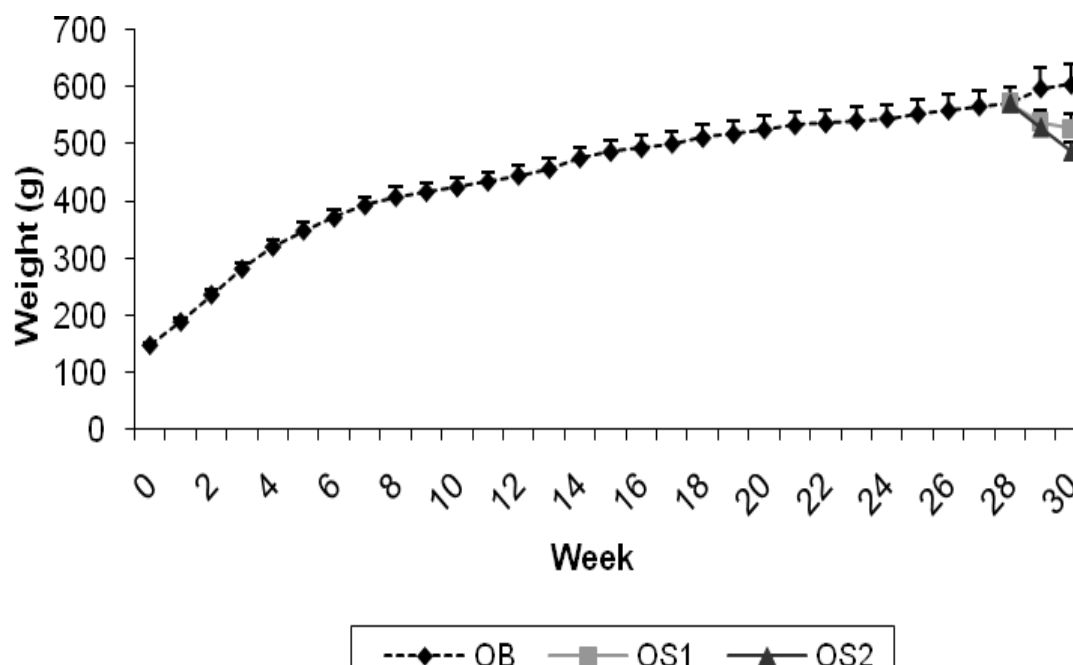


Figure 2. Weekly evolution of body weight in the groups obese (OB, n=13), obese with 5 μ g T₃/100g BW (OS1, n=13) and obese with 25 μ g T₃/100g BW (OS2, n=13). Data are expressed as means with a 95% confidence interval.

Biochemical analysis

Table 2 presents the values for glucose, TG and free fatty acids. There was a rise in glucose levels in the OS2 group, in relation to the other groups, while AGL was diminished only in OS2 animals when compared to OS1. There was no statistical difference among the groups in TG levels.

Table 1. Composition of body fat: retroperitoneal, epididimal, visceral and total fat deposits and adiposity index.

Variable	Groups		
	OB	OS1	OS2
Epid. Fat	13.1±2.5 b	11.3±2.4 b	6.6±1.5 a
Retro Fat	21.1±5.9 c	14.1±5.8 b	8.1±3.9 a
Visc. Fat	12.6±3.7 c	9.5±3.1 b	5.7±1.8 a
Total Fat	46.4±10.4 b	34.9±10.3 b	20.3±6.8 a
Adipos. I.	7.6±1 b	6.6±1.6 b	4.2±1.4 a

Epid. Fat, epididimal fat; Retro. Fat, retroperitoneal fat; Visc. Fat, visceral fat; Total Fat, total body fat; Adipos. I., adiposity index; OB, obese; OS1, obese with 5µg T₃/100g BW; OS2, obese with 25µg T₃/100g BW. Data expressed as mean ± standard deviation. ANOVA was utilized, complemented by Bonferroni's test. Same letters = p>0.05; different letters = p<0.05.

Table 2. Biochemical analysis: glucose, triglycerides and free fatty acids.

Variable	Groups		
	OB	OS1	OS2
Glucose	93.2±6.9 a	91.7±6.9 a	104.9±10.6 b
TG	83 ± 14 a	74 ± 18 a	72 ± 23 a
FFA	0.61±0.2 a	0.49±0.1 a	0.66±0.2 b

TG, triglycerides; FFA, free fatty acids; OB, obese; OS1, obese with 5µg T₃/100g BW; OS2, obese with 25µg T₃/100g BW. Data expressed as mean ± standard deviation. ANOVA was utilized, complemented by Bonferroni's test. Same letters = p>0.05; different letters = p<0.05.

Hormonal measurements

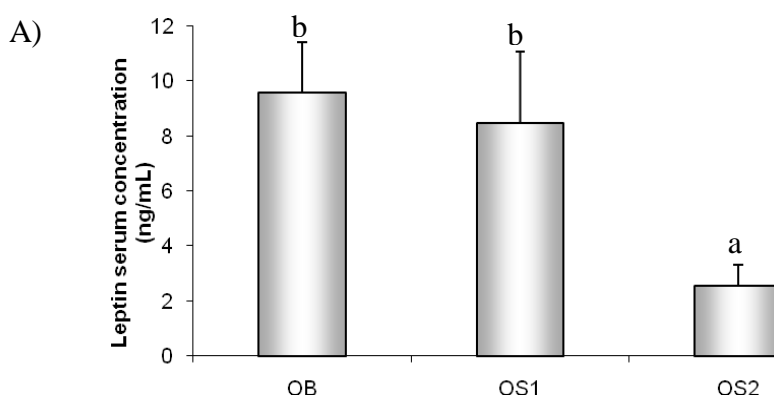
The administered doses elevated the T₃ levels in a dose-dependent manner, while the serum concentrations of free T₄ and TSH were diminished in OS1 and OS2, with no difference between these two groups (Table 3). Administration of hormone reduced the leptin concentration only at the dose of 25 µg/100 g BW (Figure 3A). The

resistin concentration was reduced in a dose-dependent manner, yet only group OS2 was statistically different from OB (Figure 3B). As to the serum levels of adiponectin, only the concentration of 5 $\mu\text{g}/100\text{ g BW}$ caused a significant drop relative to the OB group (Figure 3C).

Table 3. Hormonal measurement of free triiodothyronine (T_3), free thyroxine (T_4) and thyroid stimulating hormone (TSH).

Variable	Groups		
	OB	OS1	OS2
Free T3	0.11 \pm 0.03 a	0.17 \pm 0.03 b	0.22 \pm 0.04 c
Free T4	43.1 \pm 2.3 b	38 \pm 1.4 a	37.7 \pm 1.6 a
TSH	12.9 \pm 1.2 b	10.9 \pm 1.1 a	10.9 \pm 1.2 a

TSH, thyroid stimulating hormone; T3, triiodothyronine; T4, thyroxine; OB, obese; OS1, obese with 5 $\mu\text{g T}_3/100\text{g BW}$; OS2, obese with 25 $\mu\text{g T}_3/100\text{g BW}$. Data expressed as mean \pm standard deviation. ANOVA was utilized, complemented by Bonferroni's test. Same letters = $p>0.05$; different letters = $p<0.05$.



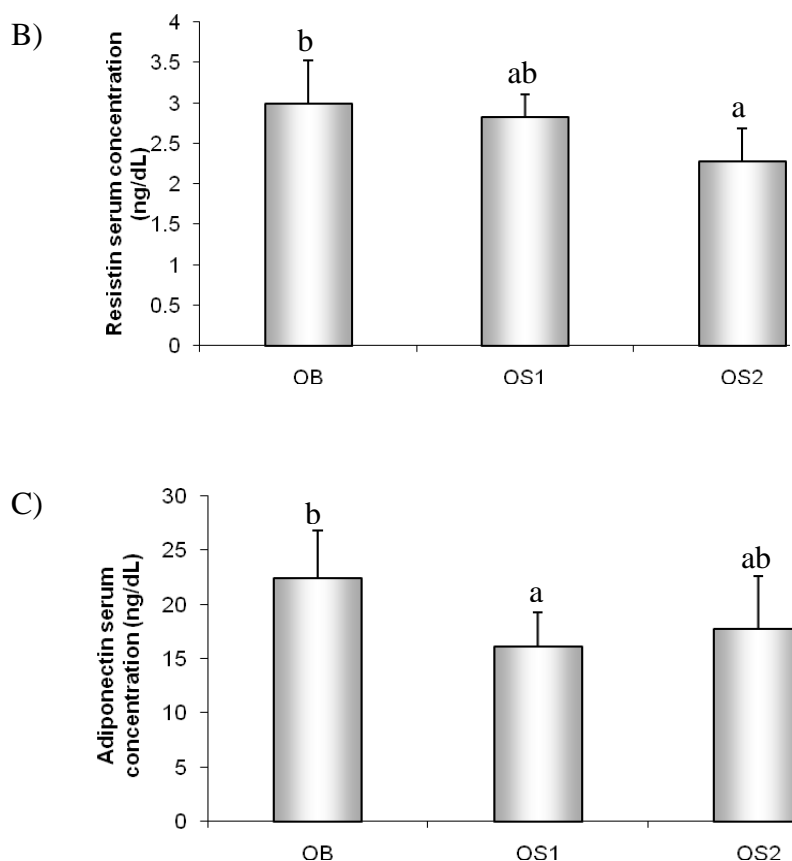


Figure 3. Influence of different doses of T_3 on serum concentration of leptin (A), resistin (B) and adiponectin (C). OB, obese; OS1, obese with $5\mu\text{g } T_3/100\text{g BW}$; OS2, obese with $25\mu\text{g } T_3/100\text{g BW}$. Data are expressed as mean \pm standard deviation. ANOVA was utilized, complemented by Bonferroni's test. Same letters = $p > 0.05$; different letters = $p < 0.05$.

Gene expression

To verify gene expression by means of real-time PCR, a sample of 6 animals per group was utilized. The samples were normalized by the internal control (cyclophilin) and the OB group was normalized by 1. The gene expression of leptin was diminished in a dose-dependent fashion (Figure 4A). There was no significant difference in the gene expressions of resistin (Figure 4B) and adiponectin (Figure 4C).

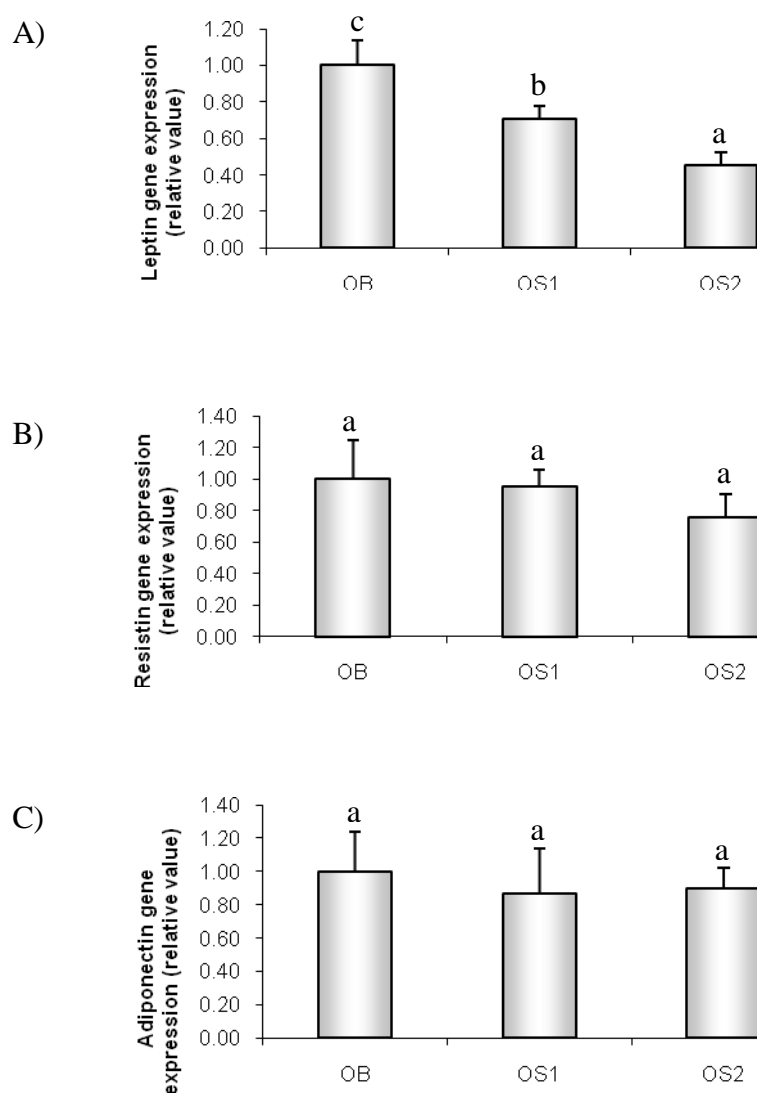


Figure 4. Influence of different T₃ doses on the gene expression of leptin (A), resistin (B) and adiponectin (C). OB, obese; OS1, obese with 5 μg T₃/100g BW; OS2, obese with 25 μg T₃/100g BW. Data are expressed as mean ± standard deviation. ANOVA was utilized, complemented by Bonferroni's test. Same letters = p > 0.05; different letters = p < 0.05.

Discussion

Obesity is a condition that has reached epidemic levels in recent years ⁽²⁶⁾. It is a complex disease, where lifestyle interacts with genetic susceptibility to produce the obese phenotype. Since the genetic aspect, in humans or other animals, has not

been altered in the last 40 years, a substantial rise in obesity indices appears to be due to the lifestyle of the population ⁽²⁷⁾, specifically given the use of inappropriate diets and the lack of physical activity ⁽²⁸⁾. Lifestyle is highly recognized as playing a central role in the etiology of chronic diseases ⁽²⁷⁾. Furthermore, obesity is associated with several chronic diseases including coronary arterial disease, hypertension, diabetes mellitus type 2 (DM2) and some forms of cancer ⁽¹⁾.

The homogenous behavior of the animals is not assured in experimental studies, even when they are maintained under laboratory conditions. In this context, rats submitted to normocaloric or hypercaloric rations, in models of diet-induced obesity, can present different responses with common characteristics ⁽¹⁸⁾. Thus, classification errors may occur, that is, animals submitted to a normocaloric diet can be classified as controls, when in fact they exhibit responses similar to animals that became obese via a hypercaloric diet, or vice versa. For this reason, it becomes necessary to establish a criterion that would enable the separation of animals into control or obese ones. A study in our laboratory showed that the best indicator of obesity is bodily adiposity, but this index is obtained after the animal is euthanized. However, it was demonstrated that body weight, evaluated *in vivo*, presents a good correlation with the adiposity index. In this context, the control and obese groups were constituted by applying body weight as the classification criterion at the 20th week of the study.

Administration of supraphysiological doses of T₃ augmented the serum concentration of T₃ in a dose-dependent manner ⁽²⁹⁾. In the OS1 and OS2 animals there was a significant diminution in free T₄ and TSH levels in relation to OB, since the exogenous administration of T₃ suppresses the endogenous secretion of TSH and the production of T₄ by the thyroid ⁽³⁰⁾.

Hypercaloric diets induce accentuated weight gain and adiposity⁽³¹⁻³³⁾. Studies show that the consumption of diets rich in fat do not augment lipid peroxidation in the same proportion, which leads to the elevation of body weight due to the deposition of triacylglycerol in adipose tissue^(34, 35). The supraphysiological doses of T₃ diminished the weight of OB animals independent of the dose administered, and reduced the adiposity index only at the dose of 25 µg T₃/100 g BW (Figure 2, Table 1).

It has been demonstrated that dietary manipulations, hormones and cytokines induce distinct metabolic responses in different fat deposits⁽³⁶⁾. Our data show that the administration of T₃ diminishes the deposits of retroperitoneal and visceral fat in a dose-dependent manner, while the epididimal deposit type was reduced only with the higher dose of T₃ (Table 1).

It is known that thyroid hormones regulate the metabolism of lipids⁽³⁷⁾, and that their excess, among other effects, augments lipolysis, the plasmatic concentration of intermediate lipids and lipid peroxidation⁽³⁸⁾. Administration of T₃, in the present study, did not alter TG levels. In agreement, some authors have reported that TG levels are not influenced by thyroid hormone⁽³⁹⁾. Concentrations of free fatty acids are employed to indicate the mobilization of fat⁽⁴⁰⁾. Our data show that the administration of T₃ elevates lipolysis only at the dose of 25 µg T₃/100 g BW in relation to OS1 (Table 2).

It is reported that an excess of hormone thyroid augments plasmatic glucose⁽⁴¹⁾, a finding confirmed in group OS2, but not in OS1. Nevertheless, the exact influence of thyroid hormones on insulin sensitivity and glucose metabolism remains controversial⁽⁴²⁾. The administration of T₃, in the present study, produced a significant diminution of plasma insulin levels in the animals treated at the 25 µg dose

of T₃ /100g BW. Nevertheless, opinions as to the influence of excessive thyroid hormones on the secretion of insulin vary; while some authors report augmentation (43, 44), others show a reduction in insulin levels (45). The ratio of plasmatic insulin to plasmatic glucose is utilized to indicate resistance to insulin. Insulin resistance is an inability of peripheral tissues to respond appropriately to normal or elevated concentrations of circulating insulin (46). It is well established that the thyroid hormones affect the action of insulin (47). Our data show that a supraphysiological dose of 25 µg T₃ /100g BW increased the insulin sensitivity in relation to a 5 µg T₃/100g BW. Divergence results are found in the literature, where an excess of thyroid hormone induces resistance to insulin, and the lack of this hormone, in humans, still present conflicting results (41). However, one important factor to highlight in this study is that the thyroid hormones induce weight loss in a manner related to the improvement of resistance to insulin (48, 49).

A 25 µg dose of T₃ /100g BW significantly diminished leptin levels. Leptin can influence the interaction between genes and environmental factors, since it was shown that diets rich in fat raise leptin levels, an effect that can explain the variability of body composition among individuals that consume similar diets. However, the rise in leptin levels is better explained by increase in body fat (35, 50). Experimental studies suggest that sensitivity to leptin can be controlled by hormonal and nutritional factors (51). The literature shows a clear positive correlation between adipose tissue and leptin expression (52). Studies of obesity induced by diet report elevation in the gene expression of leptin (53,54). However, the effects of T₃ on the gene expression of leptin present inconsistent results; despite the *in vitro* data showing that T₃ produces a dose-dependent rise in leptin expression (55), our data reveal that supraphysiological doses reduced leptin gene expression in a dose-dependent fashion. In concordance,

Pinkney *et al.* ⁽⁵⁾ and Zabrocka *et al.* ⁽²⁹⁾ observed a diminution of leptin expression in response to treatment with T₃. It has also been shown that TSH stimulates the secretion of leptin in adipocytes ⁽⁵⁶⁾. Given that the thyroid hormones acts by a negative feedback mechanism, the administration of supraphysiological T₃ doses diminishes TSH levels, suggesting that this diminution can contribute to inhibiting the gene expression of leptin ⁽²⁹⁾.

The physiological role of adiponectin has not yet been completely elucidated. However, experimental data suggest that adiponectin augments sensitivity to insulin and can present anti-atherogenic and anti-inflammatory properties ^(57, 58). It has been documented that adiponectin levels are inversely proportional to the degree of adiposity ^(59, 60) while the weight loss elevates the endogenous production of adiponectin ^(61, 62). In the present study, T₃ administration led to diminution of the adiponectin concentration only in the OS1 group. In contrast, an experimental study of rats with hyperthyroidism showed an important rise in serum adiponectin ⁽⁶³⁾. No studies were found in the literature on the gene expression of adiponectin and supraphysiological T₃ doses. Our findings show that T₃ at the doses of 5 and 25 µg per 100 g BW does not influence adiponectin expression.

Studies show that resistin prejudices glucose homeostasis and insulin action in mice ^(64, 65). Thus, it has been proposed that resistin may perform an intermediary role between obesity and insulin resistance in rodents, although this role is still questioned in humans ^(66, 67). The significant diminution of serum resistin in the OS2 group in the present study corroborates the first such study performed on humans, in which patients with hyperthyroidism exhibited low serum resistin concentrations ⁽⁶⁸⁾. However, these initial findings contrast with subsequent studies that report high resistin levels in hyperthyroidism patients ^(69, 70), showing a divergence in the data.

Nevertheless, some authors have demonstrated that resistin expression is almost undetectable in rats with hyperthyroidism ⁽⁷¹⁾. Our results show that administering supraphysiological doses of T₃ did not affect resistin expression.

The supraphysiological doses utilized in the present study may indicate the use of TR β analogues. Recent studies show that the use of these analogues as a treatment against obesity can become a safe effective method since these compounds are highly efficient at stimulating energy expenditure as is T₃ itself. Furthermore, analogues of TR β affect body composition in animals, reducing overall body weight and, more specifically, fat mass, without apparent loss of lean mass or cardiac compromise ⁽⁷²⁾.

In summary, the exogenous treatment with T₃ is effective in augmenting serum levels of free T₃ and diminishing concentrations of free T₄ and TSH. Administration of T₃ promotes weight loss, independent of the dose utilized, while adiposity is affected only at the higher dose administered. Administering 25 μ g T₃/100g of animal weight diminishes serum leptin by reducing its expression. Of the doses tested, the serum concentration of adiponectin is reduced only at 5 μ g T₃/100g of animal weight, relative to the saline group. Administering T₃ does not alter adiponectin expression in obesity. The diminution of serum resistin provoked by the 25 μ g T₃ /100g of animal weight does not alter its gene expression. The use of TR β analogues may constitute a promising strategy for treating obesity, although more studies are necessary to clarify their effects. Our data demonstrate that T₃ acts, directly or indirectly, to diminish the gene expression of leptin, but does not influence the expression of adiponectin or resistin in obesity.

References

- 1) Malnick SDH, Knobler H. The medical complications of obesity. *QJM*. 2006; 99(9):565-79.
- 2) World Health Organization. Obesity and Overweight. Geneva: WHO [acessado em abril de 2010]. Disponível em <http://www.who.int/en>
- 3) Bell-Anderson KS, Bryson JM. Leptin as a potencial treatment for obesity. *Treat Endocrinol*. 2004; 3:11-8.
- 4) Krotkiewski M. Thyroid hormones in the pathogenesis and treatment of obesity. *Eur J Pharmacol*. 2002; 440:85-98.
- 5) Pinkney JH, Goodrick SJ, Katz J, Johnson AB, Lightman SL, Cop.Ack SW, *et al*. Leptin and the pituitary – thyroid axis: a comparative study in lean, obese, hypothyroid and hyperthyroid subjects. *Clin Endocrinol*. 1998; 49:583-8.
- 6) Feldt-Rasmussen U. Thyroid and leptin. *Thyroid*. 2007; 17(5):413-9.
- 7) Reinerh T, Andler W. Thyroid hormones before and after weight loss in obesity. *Archives of Disease in Childhood*. 2002; 87:320-6.
- 8) Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6:772-83.
- 9) Ahima RS, Qi Y, Singhal NS, Jackson MB, Scherer PE. Brain adipocytokine action and metabolic regulation. *Diabetes*. 2006;55(Suppl. 2):S145-54.
- 10)Garg A. Adipose tissue dysfunction in obesity and lipodystrophy. *Clin Cornerstone*. 2006;8(Suppl. 4):S7-13.
- 11)Giacobino JP. Uncoupling proteins, leptin and obesity: an update review. *Annals of the New York Academy of Sciences, Geneva, Switzerland*, v 967, pp 398 – 402, 2002.

- 12)McTernan PG, McTernan CL, Chetty R, Jenner K, Fisher FM, Lauer MN, et al. Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87:2407-10.
- 13)Savage DB, Sewter CP, Klent ES, Segal DG, Vidal-Puing A, Considine RV. Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes.* 2001; 50:2199-202.
- 14)Meier U, Gressner AM. Endocrine Regulation of Energy Metabolism: Review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem.* 2004; 50:1511-25.
- 15)Vendrell J, Montserrat B, Vilarrasa N, Molina A, Gomez JM, Gutierrez C, *et al.* Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes Res.* 2004; 12:962-71.
- 16)Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:1930-5.
- 17)Shklyayev S, Aslanidi G, Tennant M, Prima V, Kohlbrenner E, Kroutov V, et al. Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(24):14217-22.
- 18)Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nogueira CR, Novelli EL, et al. Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. *Biol Res.* 2008;41:253-9.

- 19) Silva FG, Giannocco G, Santos MF, Nunes MT. Thyroid hormone induction of actin polymerization in somatotrophs of hypothyroid rats: potential repercussions in growth hormone synthesis and secretion. *Endocrinology*. 2006; 147:5777–85.
- 20) Giannocco G, Santos RA, Nunes MT. Thyroid hormone stimulates myoglobin gene expression in rat cardiac muscle. *Mol Cell Endocrinol*. 2004; 226:19-26.
- 21) Minatoya Y, Ito K, Kagaya Y, Asaumi Y, Takeda, M, Nakayama M. Depressed contractile reserve and impaired calcium handling of cardiac myocytes from chronically unloaded hearts are ameliorated with the administration of physiological treatment dose of T3 in rats. *Acta Physiol*. 2007; 189:221–31.
- 22) Kokkinos A, Mourouzis I, Kyriaki D, Pantos C, Katsilambros N, Cokkinos DV. Possible implications of leptin, adiponectin and ghrelin in the regulation of energy homeostasis by thyroid hormone. *Endocrine*. 2007; 32(1):30-2.
- 23) Levin BE, Dunn-Meynell AA. Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283:R941-R948.
- 24) Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287:R943-R949.
- 25) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 2001;25:402–8.
- 26) Mathew B, Patel SB, Reams GP, Freeman RH, Spear RM, Villareal D. Obesity-hypertension: emerging concepts in pathophysiology and treatment. *Am J Med Sci*. 2007; 334(1):23-30.

- 27)Booth FW, Gordon, SE. Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. *J Apl Physiol*. 2000; 88:774-87.
- 28)Astrup A, Buemann B, Western P, Toubro S, Raben A, Christensen NJ. Obesity as an adaptation to a high-fat diet: evidence from a cross-sectional study. *Am J Clin Nutr*. 1994; 59(2)350-5.
- 29)Zabrocka L, Klimek J, Swierczynski J. Evidence that triiodothyronine decreases rat serum leptin concentration by down-regulation of leptin gene expression in white adipose tissue. *Life Sciences*. 2006; 79:1114-20.
- 30)Abel ED, Moura EG, Ahima, RS, Campos-Barros A, Pazos-Moura CC, Boers M, *et al*. Dominant inhibition of thyroid hormone action selectively in the pituitary of thyroid hormone receptor- β null mice abolishes the regulation of thyrotropin by thyroid hormone. *Mol Endocrinol*. 2003; 17:1767-76.
- 31)Harris RBS. Factors influencing energy intake of rats fed either a high-fat or a fat mimetic diet. *Int J Obes*. 1994; 18:632-40.
- 32)Ainslie DA, Proietto J, Fam BC, Thorburn AW. Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats. *Am J Clin Nutr*. 2000; 71:438-42.
- 33)Roberts CK, Barnard RJ, Liang KH, Varizi ND. Effect of diet on adipose tissue and skeletal muscle VLDL receptor and LPL: implications for obesity and hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 2002; 161:133-41.
- 34)Tentolouris N, Pavlatos S, Kokkinos A, Perrea D, Pagoni S, Katsilambros N. Diet-induced thermogenesis and substrate oxidation are not different between lean and obese women after two different isocaloric meals, one rich in protein and one rich in fat. *Metabolism*. 2008; 57:313-20.
- 35)Schrauwen P, Westerterp KR. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. *Br J Nutr* 2000; 84:417-27.

- 36) Pond CM. Physiological specialization of adipose tissue. *Prog Lip Res.* 1999; 38:225-48.
- 37) Duntas LH. Thyroid disease and lipids. *Thyroid.* 2002; 12(4): 287-93.
- 38) Riis ALD, Gravholt CH, Djurhuus CB, Norrelund H, Jorgensen JOL, Weeke J, et al. Elevated regional lipolysis in hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(10):4747-53.
- 39) Kung A, Pang R, Lander I, Lam k, Janus E. Changes in serum lipoprotein (a) and lipids during treatment of hyperthyroidism. *Clin Chem.* 1995; 41:226-31.
- 40) Holmes, JH, Lambourne LJ. The relation between plasma free fatty acid concentration and the digestible intake cattle. *Rev Vet Sci.* 1970; 11(1):27-36.
- 41) Dimitriadis GD, Raptis SA. Thyroid hormone excess and glucose intolerance. *Exp Clin Endocrinol Diab.* 2001; 109:S225-39.
- 42) Setia S, Sridhar MG, Koner BC, Bobby Z, Bhat V, Chaturvedula L. Increased insulin sensitivity in intrauterine growth retarded newborns – Do thyroid hormones play a role? *Clinica Chimica Acta.* 2006; 4p.
- 43) Fickova M, Zorad S, Macho L. The effect of *in vivo* thyroxine treatment on insulin receptors, glucose transport and GLUT4 in rat adipocytes. *Horm Metab Res.* 1997; 29:16-9.
- 44) Mackowiak P, Ginalska E, Nowak-Strojec E, Szkudelski T. The influence of hypo- and hyperthyroidism on insulin receptors and metabolism. *Arch Physiol Biochem.* 1999; 107(4):273-9.
- 45) Casla A, Arrieta F, Grant C, Casanova B, Rovira A. Effect of short- and long-term experimental hyperthyroidism on plasma glucose level and insulin secretion during an intravenous glucose load and on insulin binding, insulin receptor kinase activity, and insulin action on adipose tissue. *Metabolism.* 1993; 42:814-21.

- 46) Zhao R, Li Q, Xiao B. Effect of *Lycium barbarum* polisaccharide on the improvement of insulin resistance in NIDDM rats. *Yakugaku Zasshi*. 2005; 125:981-8.
- 47) Mackowiak P, Ginalska E, Nowak-Strojec E, Szkudelski T. The influence of hypo- and hyperthyroidism on insulin receptors and metabolism. *Arch Physiol Biochem*. 1999; 107(4):273-9.
- 48) Reinehr T, Kiess W, Kapellen T, Andler W. Insulin sensitivity among obese children and adolescents, according to degree of weight loss. *Pediatrics*. 2004; 114:1569-73.
- 49) Goodpaster BH, Kelley DE, Wing RR, Meier A, Thaete FL. Effects of weight loss on regional fat distribution and insulin sensitivity in obesity. *Diabetes*. 1999; 48:839-47.
- 50) Johnstone AM, Murison SD, Duncan JS, Rance KA, Speskman JR. Factors influencing in basal metabolic rate include fat-free mass, fat mass, age, and circulating thyroxine but not sex, circulating leptin, or triiodothyronine. *Am J Clin Nutr*. 2005; 82:941-8.
- 51) Bennet PA, Lindell K, Karlsson C, Robinson ICAF, Carlsson LMS, Carlsson B. Differential expression and regulation of leptin receptor isoforms in the rat brain: effects of fasting and oestrogen. *Neuroendocrinology*. 1998; 67:29-36.
- 52) Frederich RC, Löllmann B, Hamann A, Napolitano-Rosen A, Kahn BB, Lowell BB, *et al*. Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents – impact of nutrition and obesity. *J Clin Invest*. 1995; 96:1658-63.
- 53) Kim SO, Yun S, Jung B, Lee EH, Halm D, Shim I, *et al*. Hipolipidemic effects of crude extract of adlay seed (*Coix lachrymajobi var. mayuen*) in obesity rat feed

- high fat diet: Relations of TNF- α and leptin mRNA expressions and serum lipid levels. *Life Sciences*. 2004; 75:1391-1404.
- 54) Wang M, Orci L, Ravazzola M, Unger R. Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: Implications for treatment of human obesity. *PNAS*. 2005; 102:18011-6.
- 55) Yoshida T, Monkawa T, Hayashi M, Saruta T. Regulation of expression of leptin mRNA and secretion of leptin by thyroid hormone in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 232:822-6.
- 56) Menendez C, Baldelli R, Camina JP, Escudero B, Peino R, Dieguez C, et al. TSH stimulates leptin secretion by a direct effect on adipocytes. *J Endocrinol*. 2003; 176(1):7-12.
- 57) Goldstein BJ, Scalia R. Adipokines and vascular disease in diabetes. *Curr Diab Rep*. 2007;7:25-33.
- 58) Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, et al. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation*. 2000; 102:1296-301.
- 59) Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;257:79-83.
- 60) Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20:1595-9.
- 61) Yang WS, Jeng CY, Wu TJ, Tanaka S, Funahashi T, Matsuzawa Y, et al. Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist,

- rosiglitazone, increases plasma levels of adiponectin in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2002; 25:376-80.
- 62) Hirose H, Kawai T, Yamamoto Y, Taniyama M, Tomita M, Matsubara K, et al. Effects of pioglitazone on metabolic parameters, body fat distribution, and serum adiponectin levels in Japanese male patients with type 2 diabetes. *Metabolism*. 2002; 51:314-7.
- 63) Aragao CN, Souza LL, Cabanelas A, Oliveira KJ, Pazos-Moura CC. Effect of experimental hypo- and hyperthyroidism on serum adiponectin. *Metabolism*. 2007; 56:6-11.
- 64) Stepan CM, Lazar MA. The current biology of resistin. *J Intern Med*. 2004; 255:439-47.
- 65) Nakata M, Okada T, Ozawa K, Yada T. Resistin induces insulin resistance in pancreatic islets to impair glucose-induced insulin release. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 353:1046-51.
- 66) Bo S, Gambino R, Pagani A, Guidi S, Gentile L, Cassader M, et al. Relationships between human serum resistin, inflammatory markers and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)*. 2005; 29:1315-20.
- 67) Iqbal N, Seshadri P, Stern L, Loh J, Kundu S, Jafar T, et al. Serum resistin is not associated with obesity or insulin resistance in humans. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2005; 9:161-5.
- 68) Iglesias P, Alvarez FP, Codoceo R, Díez JJ. Serum concentrations of adipocytokines in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism before and after control of thyroid function. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003; 59:621-9.
- 69) Krassas GE, Pontikides N, Loustis K, Koliakos G, Constantinidis T, Panidis D. Resistin levels in hyperthyroid patients before and after restoration of thyroid

function: relationship with body weight and body composition. *Eur J Endocrinol.* 2005; 153:217-21.

70) Yaturu S, Prado S, Grimes SR. Changes in adipocyte hormones leptin, resistin, and adiponectin in thyroid dysfunction. *J Cell Biochem.* 2004; 93:491-6.

71) Nogueiras R, Gualillo O, Caminos JE, Casanueva FF, Diéguez C. Regulation of resistin by gonadal, thyroid hormone, and nutritional status. *Obes Res.* 2003;11:408-14.

72) Ribeiro MO. Effects of thyroid hormone analogs on lipid metabolism and thermogenesis. *Thyroid.* 2008;18(2):197-203.

Artigo 2. Supraphysiological triiodothyronine doses diminish gene expression of leptin and adiponectin, but do not influence resistin expression in calorie restricted obese rats

Abstract

It is known that resistin, adiponectin, leptin and thyroidal hormones are involved in the regulation of energetic balance. However, the effects of hyperthyroidism on adipokines in calorie restricted obese rats are unknown. The present study aimed to analyze the influence of different supraphysiological doses of triiodothyronine (T_3) on the serum concentration and gene expression of leptin, resistin and adiponectin in calorie restricted obese animals. For this, male *Wistar* rats received hypercaloric diet for 20 weeks. After the obesity-induction period the OB animals were randomly divided into obese submitted to calorie restriction (OR), OR with 5 μg of $T_3/100\text{g}$ BW (RS1) and OR with 25 μg of $T_3/100\text{g}$ BW (RS2). The animals were submitted to T_3 treatment for 2 weeks. At the end of the treatment the animals were euthanized and samples of blood and adipose tissue were collected for biochemical and hormonal analyses and gene expression of leptin, resistin and adiponectin. The results show that the exogenous T_3 administration increased serum levels of free T_3 , demonstrating the effectiveness of the treatment, and diminished body weight and adiposity index in treated groups. Serum concentrations of leptin and resistin were diminished in RS2, while serum adiponectin levels were lowered in RS1. Administration of T_3 reduced leptin gene expression only at the higher; resistin expression was not influenced by T_3 treatment; and adiponectin expression was diminished, independent of the T_3 dose administered. These results indicate that T_3 ,

directly or indirectly, inhibits the expressions of leptin and adiponectin in calorie restricted obese animals.

Key words: obesity, calorie restriction, adipokines, triiodothyronine.

Introduction

The thyroid hormones are essential for the survival of both humans and rodents, and, among several functions, regulate gene transcription by the organism ⁽¹⁾. Disturbances in thyroid function lead to alteration in metabolic parameters as in, for example, the association between an excess of thyroid hormone and reductions in body weight, muscle mass and fat tissue ⁽²⁾.

In obesity, the thyroid hormones are elevated; although the cause of this elevation is not clear, it may indicate a hormonal resistance similar to the resistance to insulin that occurs in obesity ⁽³⁾. As a counterpart, it has been shown that during calorie restriction the thyroid hormones are reduced ^(3, 4), a reduction apparently related to harm to the hypothalamic-pituitary axis and diminution in secretion of thyroid releasing hormone (TRH) and thyroid stimulating hormone (TSH) ^(5, 6), and alterations in the peripheral deiodination of thyroid hormones ⁽⁷⁾.

The thyroid hormones perform a central role in regulating the metabolism of adipose tissue ⁽⁸⁾, which produces various biologically active substances denominated adipocytokines or adipokines, among which are included leptin, resistin and adiponectin ^(9, 10).

Leptin, resistin and adiponectin are involved in regulating the energetic balance. However, there is still little knowledge on the mechanisms by which calorie restriction affects the regulation of gene expression in adipose tissue ⁽¹¹⁾.

Leptin is synthesized and secreted principally by adipocytes ⁽¹⁾, and controls body weight not only by diminishing food intake but also by augmenting energy expenditure ⁽¹²⁾. Experimental studies show that during calorie restriction leptin levels are diminished ^(13, 14). Furthermore, it was demonstrated that TSH stimulates the secretion of leptin by acting directly on the adipocyte ⁽¹⁵⁾. In rats, resistin is expressed predominantly in white adipose tissue ^(16, 17). Resistin augments blood concentrations of glucose and insulin and prejudices the hypoglycemic response to an infusion of insulin ⁽¹⁸⁾. In rats, the thyroid hormones appear to regulate resistin ⁽¹⁹⁾. However, in humans, studies on resistin levels and thyroid status present conflicting results ^(20, 21). Adiponectin is expressed exclusively in differentiated adipocytes ⁽¹⁸⁾. Calorie restriction produced elevated levels of circulating adiponectin in an experimental study ⁽²²⁾. The thyroid hormones share some physiological actions with adiponectin such as the reduction of body fat by the increase of thermogenesis and lipid oxidation ⁽¹⁰⁾. However, some authors did not find significant alterations in patients with hyperthyroidism when compared to the control group ⁽²¹⁾.

Despite not being accepted as an obesity treatment, the administration of thyroid hormones, in isolation or in association with hypocaloric diets, is sometimes used illicitly. The thyroid hormones regulate the energetic balance and act on the adipokines, such leptin, resistin and adiponectin. However, a clear association has not yet been established between calorie restriction in obesity and the effect of high doses of triiodothyronine (T₃) on these adipokines. Thus, our objective was to analyze the influence of different T₃ doses on the gene expression and serum

concentrations of leptin, resistin and adiponectin in obese animals submitted to calorie restriction.

Materials and Methods

Animals

This study utilized 50 male *Wistar* rats, weighing approximately 150g, supplied by the Animal Center of the Experimental Laboratory for Clinical Medicine at the “Júlio de Mesquita Filho” Paulista State University in Botucatu, Sao Paulo, Brazil. For 20 weeks, all the animals received a hypercaloric diet (Table 1) in order to induce obesity. After this period, the rats were submitted to a statistical criterion to characterize the obese group. Control animals of the same age, fed a normocaloric diet, were utilized for characterization of the obese group, as previously described⁽²³⁾, and used as a reference of alimentary ingestion in the restriction process. After the characterization of the obese group, the animals were randomized into three groups: obese animals with calorie restriction (OR, n=13), OR with supraphysiological dose of T₃ (RS1, n=13) at the concentration of 5 µg/100 g animal body weight (BW)⁽²⁴⁾ and OR with supraphysiological dose of T₃ (RS2, n=13) at the concentration of 25 µg/100 g BW⁽²⁵⁾, and were submitted to the process of calorie restriction, wherein they received a normocaloric diet and 75% of the quantity ingested by the control group, for 8 weeks. Thus, the restriction applied was 25%⁽²⁶⁾. The different triiodothyronine doses were administered by subcutaneous injections, during the final 2 weeks^(27, 28). The animals were housed in individual cages, at ambient temperature (22 – 26° C) and lighting (12h light-dark cycle) controlled. Dietary consumption was controlled daily and the weight assessed weekly. The

experimental protocol was approved by the Commission for Ethics in Animal Experimentation at the Botucatu – UNESP School of Medicine, and followed the “Guidelines for the Care and Use of Experimental Animals”.

Deposits of body fat

The total body fat (TBF) was measured as the sum of epididymal, retroperitoneal and visceral fat deposits ⁽²⁹⁾. This data point was utilized to confirm obesity in the animals. In addition, the adiposity index (total body fat divided by final body weight multiplied by 100, adapted from Boustany et al. ⁽³⁰⁾) was calculated.

Biochemical analysis of serum

The animals were submitted to fasting for 12 to 15 hours, anesthetized with sodium pentobarbital, 50mg/kg/ip, and sacrificed by decapitation. The blood was collected in dry tubes then centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes; the serum was stored at -80°C. The serum concentrations of glucose and triacylglycerol (TG) were determined by specific kits (CELM[®], São Paulo, Brazil). The determination of non-esterified fatty acids (NEFA) was accomplished by a commercial kit (WAKO, WAKO Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan). The dosings were analyzed by the automated colorimetric enzyme method (Technicon, RA-XT[™] System, Global Medical Instrumentation, Minnesota, USA).

Hormonal measurements

In the serum (collected as previously described) of all animals, were measured the serum concentrations of insulin, leptin, resistin, adiponectin, free T₃, free thyroxine (T₄) and TSH. The measurements were performed by immuno-assay with

the aid of a microplate reader (Spectra Max 190 – Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). For the measurement of leptin, insulin, adiponectin (kit ELISA Linco Research), resistin (kit ELISA B-Bridge) and thyroid hormones (Kit ELISA USCN Life Science & Technology Company), commercial kits were utilized.

Gene expression

Whole RNA was extracted from retroperitoneal adipose tissue using the reagent Trizol (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. 1000 ng of whole RNA was utilized for the synthesis of 20 μ L of complementary DNA (cDNA) employing the kit *SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR*[®] (Invitrogen, Sao Paulo, Brazil).

The mRNA levels of leptin, resistin and adiponectin were determined by real-time PCR. Quantitative measurements were made with the commercial kit TaqMan qPCR (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions, in the detection system Applied Biosystems StepOne Plus. Cycling conditions in real time were as follows: enzyme activation at 50 °C for 2 min then denaturation at 95 °C for 10 min, the cDNA products were amplified in 40 cycles, each at the denaturation temperature of 95 °C for 15 s and annealing/extension at 60 °C for 1 min. Gene expression was quantified in relation to the values of the OR group after normalization by the internal control (cyclophilin) by the method $2^{-\Delta\Delta CT}$ as previously described⁽³¹⁾.

Statistical analysis

The evolution of body weight was evaluated by a confidence interval of 95%. Data for gene expression, biochemistry and hormones were analyzed statistically by analysis of variance (ANOVA) technique complemented by Bonferroni's test. The

data are expressed as mean \pm standard deviation. A 5% significance level was adopted.

Results

Evolution of body weight

All of the animals presented similar body weights at the beginning of the study. At the 20th week, when calorie restriction was initiated, all the animals fed the hypercaloric diet presented similar weights. There was stabilization of body weight in the OR animals starting from the 6th week of calorie restriction. At the end of the experiment, the T₃ treatment significantly reduced the weight in groups RS1 (435 \pm 27) and RS2 (379 \pm 34), in a dose-dependent manner, when compared to OR animals (459 \pm 34). The weight evolution of the groups is presented in Figure 1.

Body fat

Group RS1 presented similar indices of body fat and adiposity to the OR group. Only the administration of 25 μ g T₃/100 g BW caused an important diminution in all the indices for fat deposits, total body fat and adiposity (Table 1).

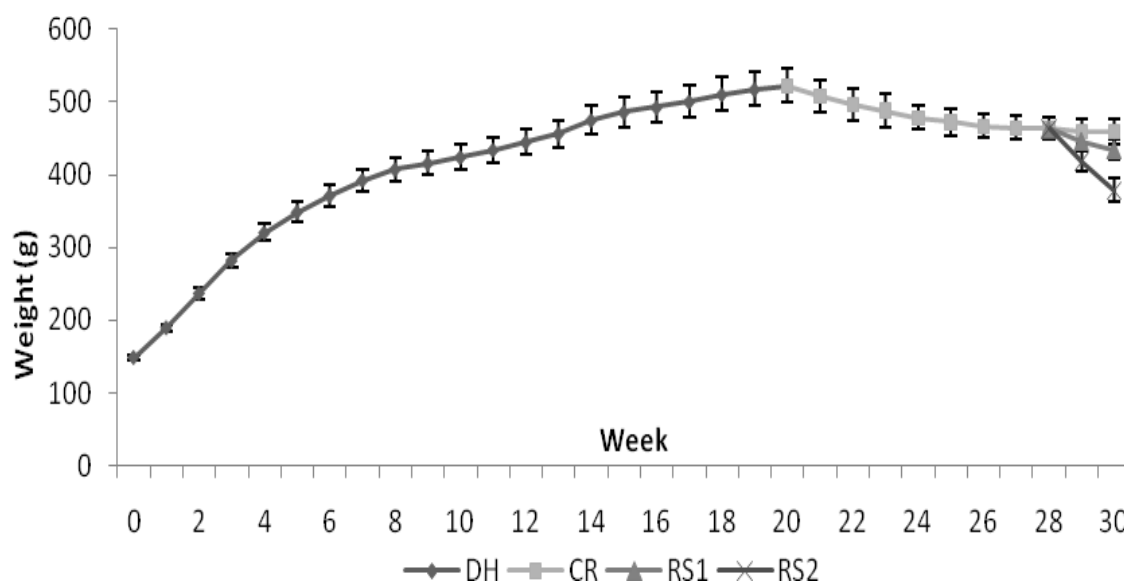


Figure 1. Weekly body weight evolution of groups that received hypercaloric diet (HD, n=13), obese submitted to calorie restriction (OR, n=13), OR with 5µg T₃/100g BW (RS1, n=13) and OR with 25µg T₃/100g BW (RS2, n=13). Data are expressed as mean using a 95% confidence interval.

Table 1. Composition of body fat: retroperitoneal, epididimal, visceral and total fat deposits and adiposity index.

Variable	Groups		
	OR	RS1	RS2
Epid. Fat	6.5±1.3 b	5.9±2.4 b	1.0±0.6 a
Retro. Fat	6.3±2.1 b	5.9±3.9 b	0.5±0.8 a
Visc. Fat	4.6±1.3 b	4.6±1.6 b	1.0±0.6 a
Total Fat	17.5±4.2 b	16.4±7.8 b	2.4±1.9 a
Adipos. I.	3.8±1.1 b	3.7±1.6 b	0.6±0.5 a

Epid. Fat, epididimal fat; Retro. Fat, retroperitoneal fat; Visc. Fat, visceral fat; Total Fat, total body fat; Adipos. I., adiposity index; OR, obese submitted to calorie restriction; RS1, OR with 5µg T₃/100g BW; RS2, OR with 25µg T₃/100g BW. Data expressed as mean ± standard deviation. ANOVA was utilized, complemented by Bonferroni's test. Same letters = p>0.05; different letters = p<0.05.

Biochemical analysis

A Table 2 presents the values for glucose, triglycerides (TG) and non-esterified fatty acids (NEFA). The administration of T_3 did not alter the serum glucose levels. However, the higher dose administered (25 μg of $T_3/100$ g BW) significantly diminished TG levels and augmented NEFA levels in relation to the other groups.

Table 2. Biochemical analysis: glucose, triglycerides and non-esterified fatty acids.

Variable	Groups		
	OR	RS1	RS2
Glucose	85.3 \pm 5.1 a	77.5 \pm 7.6 a	76.8 \pm 14.9 a
TG	70 \pm 16 b	64 \pm 14 ab	46 \pm 16 a
NEFA	0.61 \pm 0.1 a	0.59 \pm 0.2 a	0.77 \pm 0.1 b

TG, triglycerides; NEFA, non-esterified fatty acids; OR, obese submitted to calorie restriction; RS1, OR with 5 μg of $T_3/100\text{g}$ BW; RS2, OR with 25 μg of $T_3/100\text{g}$ BW. Data expressed as mean \pm standard deviation. ANOVA was utilized, complemented by Bonferroni's test. Same letters = $p > 0.05$; different letters = $p < 0.05$.

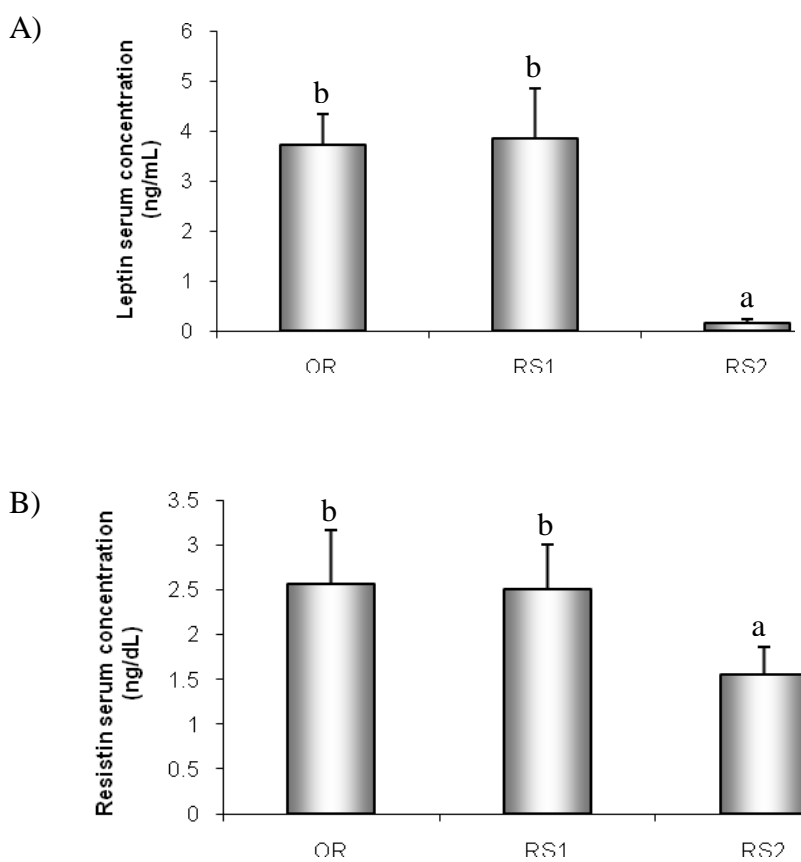
Hormonal measurements

The administered doses elevated the T_3 levels in a dose-dependent manner, thus showing the efficacy of the treatment. There was no statistical difference in the levels of T_4 or TSH (Table 3). Hormone administration diminished the concentrations of leptin and resistin only at the dose of 25 $\mu\text{g}/100$ g BW. As to serum levels of adiponectin, only the concentration of 5 $\mu\text{g}/100$ g BW caused a significant diminution in relation to the OR group (Figure 2).

Table 3. Hormonal measurement of free triiodothyronine (T₃), free thyroxine (T₄) and thyroid stimulating hormone (TSH).

Variable	Groups		
	OR	RS1	RS2
Free T ₃	0.08±0.02 a	0.18±0.03 b	0.23±0.04 c
Free T ₄	37.2±1.6 a	37.9±1.3 a	37.8±1.5 a
TSH	10.1 ± 1.8 a	10.9 ± 1.7 a	10.8 ± 1.1 a

TSH, thyroid stimulating hormone; T₃, triiodothyronine; T₄, thyroxine; OR, obese submitted to calorie restriction; RS1, OR with 5µg T₃/100g BW; RS2, OR with 25µg T₃/100g BW. Data expressed as mean ± standard deviation. ANOVA was utilized, complemented by Bonferroni's test. Same letters = p>0.05; different letters = p<0.05.



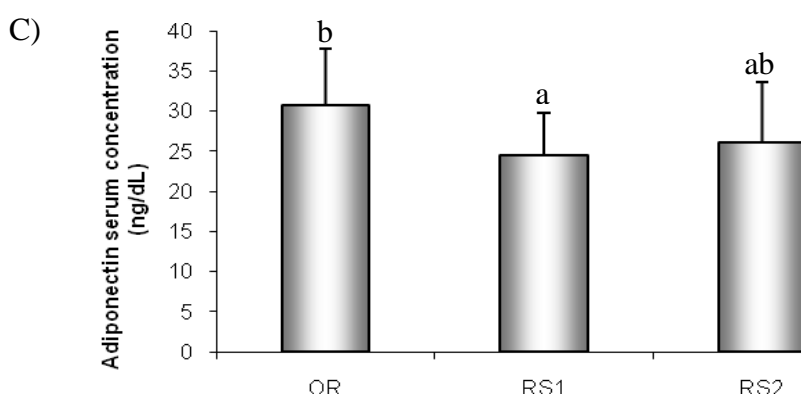
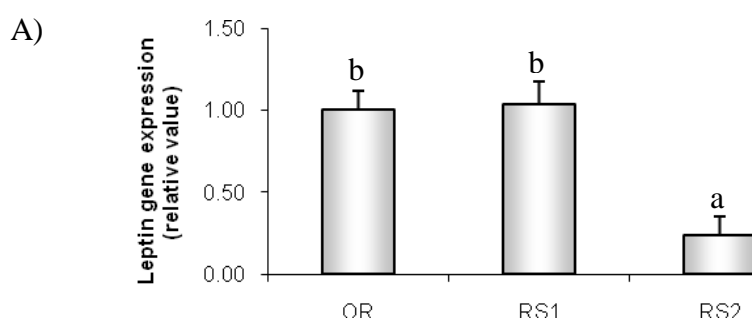


Figure 2. Influence of different T_3 doses on serum concentration of leptin (A), resistin (B) and adiponectin (C). OR, obese rats submitted to calorie restriction; RS1, OR with $5\mu\text{g } T_3/100\text{g BW}$; RS2, OR with $25\mu\text{g } T_3/100\text{g BW}$. Data expressed as mean \pm standard deviation. ANOVA was utilized, complemented by Bonferroni's test. Same letters = $p>0.05$; different letters = $p<0.05$.

Gene expression

To verify gene expression by means of real-time PCR, a sample of 6 animals per group was utilized. The samples were normalized by the internal control (cyclophilin) and the OR group was normalized by 1. Similar to the serum concentration, only the dose of $25\mu\text{g } T_3/100\text{g BW}$ statistically diminished leptin gene expression. There was no significant difference in resistin gene expression. The expression of adiponectin was diminished at both of the doses administered (Figure 3).



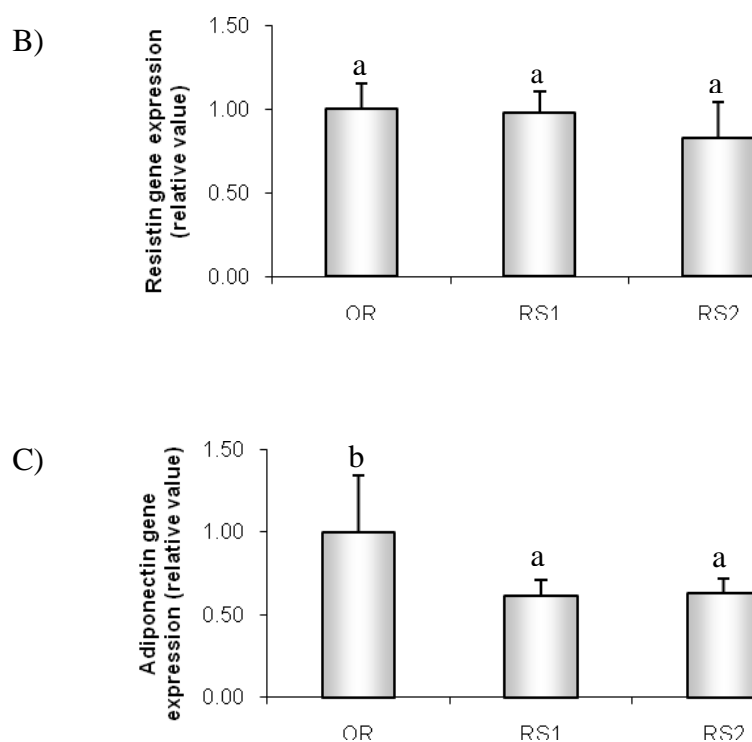


Figure 3. Influence of different doses of T_3 on gene expression of leptin (A), resistin (B) and adiponectin (C). OR, obese submitted to calorie restriction; OS1, OR with $5\mu\text{g } T_3/100\text{g BW}$; OS2, OR with $25\mu\text{g } T_3/100\text{g BW}$. Data expressed as mean \pm standard deviation. ANOVA was utilized, complemented by Bonferroni's test. Same letters = $p > 0.05$; different letters = $p < 0.05$.

Discussion

Calorie restriction is a common strategy for treating insulin resistance, obesity and DM2. It was demonstrated that a restriction of food ingestion of 30 to 50% produced important benefits in rats in relation to not only life expectancy but also preventing diseases associated with aging. This phenomenon appears to be related to the effects of calorie restriction on the plasma levels of insulin and glucose ⁽³²⁾. Calorie restriction reduces the incidences of some cancers related to age, cardiovascular diseases and deficiencies in immune functions in animals.

Furthermore, calorie restriction is the only intervention that has been shown to retard aging and maintain vitality ⁽³³⁾.

In the obese, stabilization of weight loss, even under calorie restriction ⁽³⁴⁾, has been attributed to diminution in serum T₃ concentrations, leading to a reduction in the metabolic rate ⁽³⁵⁾. The risk of administering thyroid hormones is the development of sub-clinical hyperthyroidism, which is defined as the suppression of baseline TSH without elevation of concentrations of total or free T₃ or T₄ ⁽³⁶⁾. The administration of thyroid hormones, even in an illicit form, is sometimes used as a treatment against obesity. Although the effects of thyroid hormones on adipose tissue and the release of adipokines is still not well established, it is known that high doses of thyroid hormone are associated with cardiac damage, loss of muscle mass and the increase of oxidative stress ⁽³⁶⁻³⁸⁾.

The administration of supraphysiological doses of T₃ was effective in raising the serum T₃ concentration in a dose-dependent manner ⁽³⁹⁾. There was no statistical difference in the levels of T₄ or TSH among the animals that were submitted to calorie restriction with or without hormone administration. This may evidence an adaptation by the organism to save energy, since T₃, a metabolically active hormone, leads to a reduction of body fat by increasing thermogenesis and lipid oxidation ⁽⁴⁰⁾. In concordance with this pattern, the present study found that supraphysiological doses of T₃ in OR animals led to a dose-dependent weight diminution and to reduction of adiposity only at the T₃ dose of 25 µg /100 g BW (Table 1).

Our data show that the thyroid hormones did not influence serum glucose levels. It has been reported that an excess of thyroid hormone augments plasma glucose ⁽⁴¹⁾, but it is important to emphasize that the animals were under calorie restriction, which improve the plasmatic glucose levels. However, the exact influence

of thyroid hormones on insulin sensitivity and glucose metabolism remains controversial ⁽⁴²⁾. The administration of T₃, in the present study diminished TG levels only in the animals treated with the higher hormonal dose. However, some authors observed that TG levels are not influenced by thyroid hormone ⁽⁴³⁾. Nevertheless, it is known that the thyroid hormones regulate lipid metabolism ⁽⁴⁴⁾, and that their excess, among other effects, elevates lipolysis, the plasma concentration of intermediate lipids and lipid oxidation ⁽⁴⁵⁾. NEFA concentrations are utilized to indicate the mobilization of fat ⁽⁴⁶⁾. The release of fatty acids from adipocytes is regulated by the enzyme hormone-sensitive lipase (HSL) ⁽⁴⁷⁾. This enzyme promotes lipolysis, leading to elevation of circulating NEFA. Although it has not yet been elucidated, it is speculated that thyroid hormones could directly stimulate the activity of hormone-sensitive lipase; also it is possible that the thyroid hormones influence the lipolytic action of other hormones such as growth hormone and catecholamines, which can activate HSL ⁽⁴⁵⁾. These hypotheses can explain the augmentation of NEFA levels in the group RS2.

The dose of 25 µg T₃/100g BW significantly diminished leptin levels ⁽⁴⁸⁾. However, the association between leptin and thyroid hormone presents inconsistent results; while some studies report a negative correlation ^(39, 49), others found no leptin-TH association ^(3, 50). It also has been reported that the thyroid hormones influence the concentration of leptin only indirectly through the variation in the mass of body fat ⁽⁵¹⁾. Thus, the increase in leptin levels is better explained by the increase in body fat ^(52, 53). It is clear that animals submitted to 24 hours of fasting present substantial diminution in circulating leptin levels, accompanied by a significant reduction in the expression of leptin RNAm in adipose tissue ⁽⁵⁴⁾. In the present study, only the supraphysiological dose of 25 µg T₃/100g BW significantly reduced leptin gene

expression. Although some authors have shown that T_3 increases leptin expression in a dose-dependent manner ⁽⁵⁵⁾, others have reported diminution in leptin expression when there is an elevation of serum T_3 concentration ^(8, 39). On the other hand, a study developed in our laboratory demonstrated that physiological T_3 doses augmented leptin expression to the levels of the control animals, indicating that physiological doses of thyroid hormones are necessary to enable adequate leptin expression under conditions of calorie restriction ⁽⁵⁶⁾.

The adiponectin levels are inversely proportional to the degree of adiposity ^(57, 58) while weight loss increases the endogenous production of adiponectin ^(59, 60). Experimental studies suggest that adiponectin augments the sensitivity to insulin and can present anti-atherogenic and anti-inflammatory properties ^(61, 62). Whereas a prior experimental study of rats with hyperthyroidism found an important increase in the serum adiponectin concentration ⁽⁶³⁾, our data show that the administration of T_3 led to diminution in the adiponectin concentration only in the RS1 group. In humans, hyperthyroidism has been associated with both similar ^(21, 64) and elevated adiponectin concentrations ^(65, 66). One study showed that therapy to normalize hyperthyroidism significantly reduced circulating adiponectin levels ⁽⁶⁶⁾, while another did not present any alteration ⁽²¹⁾, thus revealing a divergence in the data on the interaction between thyroid hormones and adiponectin concentration. The administration of T_3 diminished adiponectin expression at both doses utilized in this study. To the best of our knowledge, our findings are the first to show that thyroid hormone, at the doses of 5 and 25 $\mu\text{g } T_3/100 \text{ g BW}$ diminishes adiponectin gene expression, suggesting that thyroid hormone modulates adiponectin expression in calorie restricted obese rats.

Few studies have evaluated serum concentrations of resistin in hyperthyroidism^(20, 21, 65). Our data show that T₃ administration at 25 µg/100 g BW significantly diminishes serum resistin levels. In concordance, the first such study accomplished in humans showed that patients with hyperthyroidism exhibited lower serum resistin than subjects with euthyroidism⁽²¹⁾. However, these initial findings are in contrast with subsequent studies that report elevated resistin in patients with hyperthyroidism^(20, 65). Furthermore, it was reported that resistin levels are correlated positively with free T₃ and free T₄, and negatively with TSH⁽⁶⁵⁾. The scarce data on resistin expression and hyperthyroidism reveal that resistin expression is almost undetectable in rats with hyperthyroidism⁽¹⁹⁾. On the other hand, the administration of T₃, in the present study, did not alter the resistin expression in the treated groups, suggesting that resistin gene expression is not affected by thyroid hormone.

In summary, the administration of T₃ promotes weight loss in a dose-dependent manner during calorie restriction, while adiposity is affected only by the higher dose administered. The administration of 25 µg of T₃/100g BW diminished the serum concentration of leptin by diminishing its expression. The serum resistin levels are diminished by the dose of 25 µg T₃/100g BW, without altering the gene expression. The serum concentration of adiponectin was reduced at the dose of 5 µg T₃/100g BW, in relation to the saline group. The T₃ administration diminishes adiponectin expression during the process of calorie restriction, independent of the dose utilized. Our findings indicate that T₃, directly or indirectly, inhibits the expressions of leptin and adiponectin in calorie restricted obese animals, but do not alter resistin gene expression.

References

1. Flier JS, Harris M, Hollenberg AN. Leptin, nutrition, and the thyroid: the why, the wherefore, and the wiring. *J Clin Invest*. 2000; 105:859-61.
2. Feldt-Rasmussen U. Thyroid and leptin. *Thyroid*. 2007; 17(5):413-9.
3. Reinerh T, Andler W. Thyroid hormones before and after weight loss in obesity. *Archives of Disease in Childhood*. 2002; 87:320-6.
4. Douyon L, Schteingart DE. Effect of obesity and starvation on thyroid hormone, growth hormone, and cortisol secretion. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2002; 31(1):173-89.
5. Ahima RS. Leptin and neuroendocrinology of fasting. *Front Horm Res*. 2000; 26:42-56.
6. Krotkiewski M. Thyroid hormones and treatment of obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000; 24:S116-9.
7. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev*. 2002; 23(1):38-89.
8. Pinkney JH, Goodrick SJ, Katz J, Johnson AB, Lightman SL, Copack SW, *et al*. Leptin and the pituitary – thyroid axis: a comparative study in lean, obese, hypothyroid and hyperthyroid subjects. *Clin Endocrinol*. 1998; 49:583-8.
9. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation, and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6:772-83.
10. Ahima RS, Qi Y, Singhal NS, Jackson MB, Scherer PE. Brain adipocytokine action and metabolic regulation. *Diabetes*. 2006; 55(Suppl.2):S145-54.

11. Viguier N, Vidal H, Arner P, Holst C, Verdich C, Avizou S, *et al.* Adipose tissue gene expression in obese subjects during low-fat and high-fat hypocaloric diets. *Diabetologia*. 2005; 48:123-31.
12. Giacobino JP. Uncoupling proteins, leptin and obesity: an update review. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 967:398-402.
13. Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinol*. 1997; 138:2569-76.
14. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, *et al.* Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 1996; 382:250-2.
15. Menendez C, Baldelli R, Camina JP, Escudero B, Peino R, Dieguez C, *et al.* TSH stimulates leptin secretion by a direct effect on adipocytes. *J Endocrinol*. 2003; 176(1):7-12.
16. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001; 409:307-12.
17. Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W, *et al.* FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J*. 2000;19:4046-55.
18. Meier U, Gressner AM. Endocrine Regulation of Energy Metabolism: Review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem*. 2004; 50:1511-25.

19. Nogueiras R, Gualillo O, Caminos JE, Casanueva FF, Diéguez C. Regulation of resistin by gonadal, thyroid hormone, and nutritional status. *Obes Res.* 2003;11:408-14.
20. Krassas GE, Pontikides N, Loustis K, Koliakos G, Constantinidis T, Panidis D. Resistin levels in hyperthyroid patients before and after restoration of thyroid function: relationship with body weight and body composition. *Eur J Endocrinol.* 2005; 153:217-21.
21. Iglesias P, Alvarez FP, Codoceo R, Díez JJ. Serum concentrations of adipocytokines in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism before and after control of thyroid function. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003; 59:621-9.
22. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med.* 2001; 7:947-53.
23. Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nogueira CR, Novelli EL, et al. Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. *Biol Res.* 2008; 41:253-9.
24. Silva FG, Giannocco G, Santos MF, Nunes MT. Thyroid hormone induction of actin polymerization in somatotrophs of hypothyroid rats: potential repercussions in growth hormone synthesis and secretion. *Endocrinology.* 2006; 147:5777–85.
25. Giannocco G, Santos RA, Nunes MT. Thyroid hormone stimulates myoglobin gene expression in rat cardiac muscle. *Mol Cell Endocrinol.* 2004; 226:19-26.
26. Fernández-Galaz C, Fernández-Agulló T, Pérez C, Peralta S, Arribas C, Andrés A, et al. Long-term food restriction prevents ageing-associated central leptin resistance in wistar rats. *Diabetologia.* 2002; 45:997-1003.
27. Minatoya Y, Ito K, Kagaya Y, Asaumi Y, Takeda, M, Nakayama M. Depressed contractile reserve and impaired calcium handling of cardiac myocytes from

- chronically unloaded hearts are ameliorated with the administration of physiological treatment dose of T3 in rats. *Acta Physiol.* 2007; 189:221–31.
28. Kokkinos A, Mourouzis I, Kyriaki D, Pantos C, Katsilambros N, Cokkinos DV. Possible implications of leptin, adiponectin and ghrelin in the regulation of energy homeostasis by thyroid hormone. *Endocrine.* 2007; 32(1):30-2.
29. Levin BE, Dunn-Meynell AA. Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283:R941-R948.
30. Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287:R943-R949.
31. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 2001; 25:402–8.
32. Alonso A, Fernández Y, Fernández R, Ordóñez P, Moreno M, Díaz F, *et al.* Effect of food restriction on the insulin signalling pathway in rat skeletal muscle and adipose tissue. *J Nutr Biochem.* 2005; 16:602-9.
33. Spindler SR. Rapid and reversible induction of the longevity, anticancer and genomic effects of caloric restriction. *Mechanisms of Ageing and Development.* 2005; 126:960-6.
34. Moore R, Grant AM, Howard AN, Mills IH. Treatment of obesity with triiodothyronine and a very-low-calorie liquid formula diet. *Lancet.* 1980; 1:223-6.
35. Moreira-Andrés MN, Del Cañizo-Gómez FJ, Black EG, Hoffenberg R. Long-term evaluation of thyroidal response to partial calorie restriction in obesity. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1981;15:621-6.

36. Biondi B, Palmieri EA, Fazio S, Cosco C, Nocera M, Saccà L, et al. Endogenous subclinical hyperthyroidism affects quality of life and cardiac morphology and function in young and middle-aged patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:4701-5.
37. Brennam MD, Powell C, Kaufman KR, Sun PC, Bahn RS, Nair KS. The impact of overt and subclinical hyperthyroidism on skeletal muscle. *Thyroid.* 2006; 16:375-80.
38. Magsino Junior C, Hamouda W, Ghanim H, Browne R, Aljada A, Dandona P. Effect of triiodothyronine on reactive oxygen species generation by leukocytes, indices of oxidative damage, and antioxidant reserve. *Metabolism.* 2000; 49(6):799-803.
39. Zabrocka L, Klimek J, Swierczynski J. Evidence that triiodothyronine decreases rat serum leptin concentration by down-regulation of leptin gene expression in white adipose tissue. *Life Sciences.* 2006; 79:1114-20.
40. Krotkiewski M. Thyroid hormones in the pathogenesis and treatment of obesity. *Eur J Pharmacol.* 2002; 440:85-98.
41. Dimitriadis GD, Raptis SA. Thyroid hormone excess and glucose intolerance. *Exp Clin Endocrinol Diab.* 2001; 109:S225-39.
42. Setia S, Sridhar MG, Koner BC, Bobby Z, Bhat V, Chaturvedula L. Increased insulin sensitivity in intrauterine growth retarded newborns – Do thyroid hormones play a role? *Clinica Chimica Acta.* 2006; 4p.
43. Kung A, Pang R, Lander I, Lam k, Janus E. Changes in serum lipoprotein (a) and lipids during treatment of hyperthyroidism. *Clin Chem.* 1995; 41:226-31.
44. Duntas LH. Thyroid disease and lipids. *Thyroid.* 2002; 12(4): 287-93.

45. Riis ALD, Gravholt CH, Djurhuus CB, Norrelund H, Jorgensen JOL, Weeke J, et al. Elevated regional lipolysis in hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(10):4747-53.
46. Holmes, JH, Lambourne LJ. The relation between plasma free fatty acid concentration and the digestible intake cattle. *Rev Vet Sci.* 1970; 11(1):27-36.
47. Birnbaum MJ. Lipolysis: more than just a lipase. *J Cell Biol.* 2003; 161(6):1011-2.
48. Kristensen K, Pedersen SB, Langdahl BL, Richelsen B. Regulation of leptin by thyroid hormone in humans: studies in vivo and in vitro. *Metabolism.* 1999; 48:1603-7.
49. Escobar-Morreale HF, Rey FE, Escobar GM. Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat. *Endocrinol.* 1997; 138:4485-8.
50. Näslund E, Andersson I, Degerblad M, Kogner P, Kral JG, Rössner S, et al. Associations of leptin, insulin resistance and thyroid function with long-term weight loss in dieting obese men. *J Int Med.* 2000; 248:299-308.
51. Syed MA, Thompson MP, Pachucki J, Burmeister LA. The effect of thyroid hormone on size of fat depots accounts for most of the changes in leptin mRNA and serum levels in the rat. *Thyroid.* 1999; 9:503-12.
52. Wolfe BE, Jimerson DC, Orlova C, Mantozoros CS. Effect of dieting on plasma leptin, soluble leptin receptor, adiponectin and resistin levels in healthy volunteers. *Clin Endocrinol.* 2004; 61:332-8.
53. Johnstone AM, Murison SD, Duncan JS, Rance KA, Speskman JR. Factors influencing in basal metabolic rate include fat-free mass, fat mass, age, and circulating thyroxine but not sex, circulating leptin, or triiodothyronine. *Am J Clin Nutr.* 2005; 82:941-8.

54. Frederich RC, Löllmann B, Hamann A, Napolitano-Rosen A, Kahn BB, Lowell BB, *et al.* Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents – impact of nutrition and obesity. *J Clin Invest.* 1995; 96:1658-63.
55. Yoshida T, Monkawa T, Hayashi M, Saruta T. Regulation of expression of leptin mRNA and secretion of leptin by thyroid hormone in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 232:822-6.
56. Luvizotto RAM, Conde SJ, Sibio MT, Nascimento AF, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, *et al.* Administration of physiological levels of triiodothyronine increases leptin expression in calorie-restricted obese rats, but does not influence weight loss. *Metabolism.* 2010; 59:1-6.
57. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, *et al.* Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 257:79-83.
58. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, *et al.* Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20:1595-9.
59. Yang WS, Jeng CY, Wu TJ, Tanaka S, Funahashi T, Matsuzawa Y, *et al.* Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, rosiglitazone, increases plasma levels of adiponectin in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2002; 25:376-80.
60. Hirose H, Kawai T, Yamamoto Y, Taniyama M, Tomita M, Matsubara K, *et al.* Effects of pioglitazone on metabolic parameters, body fat distribution, and serum adiponectin levels in Japanese male patients with type 2 diabetes. *Metabolism.* 2002; 51:314-7.

61. Goldstein BJ, Scalia R. Adipokines and vascular disease in diabetes. *Curr Diab Rep.* 2007; 7:25-33.
62. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, et al. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation.* 2000; 102:1296-301.
63. Aragao CN, Souza LL, Cabanelas A, Oliveira KJ, Pazos-Moura CC. Effect of experimental hypo- and hyperthyroidism on serum adiponectin. *Metabolism.* 2007; 56:6-11.
64. Santini F, Marsili A, Mammoli C, Valeriano R, Scartabelli G, Pelosini C, et al. Serum concentrations of adiponectin and leptin in patients with thyroid dysfunctions. *J Endocrinol Invest.* 2004; 27:RC5-7.
65. Yaturu S, Prado S, Grimes SR. Changes in adipocyte hormones leptin, resistin, and adiponectin in thyroid dysfunction. *J Cell Biochem.* 2004; 93:491-6.
66. Saito T, Kawano T, Saito T, Ikoma A, Namai k, Tamemoto H, et al. Elevations of serum adiponectin levels in Basedow disease. *Metabolism.* 2005; 54:1461-6.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)