

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JANETE MACHOZEKI

EFEITO DO USO PRECOCE DA METFORMINA OU DO ORLISTAT NA
PREVENÇÃO DA DISFUNÇÃO DE ADIPÓCITOS EM RATOS WISTAR
SUBMETIDOS À DIETA HIPERGLICÍDICA-HIPERLIPÍDICA

PONTA GROSSA-PR

2018

JANETE MACHOZEKI

EFEITO DO USO PRECOCE DA METFORMINA OU DO ORLISTAT NA
PREVENÇÃO DA DISFUNÇÃO DE ADIPÓCITOS EM RATOS WISTAR
SUBMETIDOS À DIETA HIPERGLICÍDICA-HIPERLIPÍDICA

Dissertação apresentada para a obtenção de título
de Mestre em Ciências de Saúde na Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Professor Dr. Mário Augusto Cray da
Costa

Co-orientadora: Professora Dra. Fabiana
Postiglione Mansani

PONTA GROSSA

2018

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

M151 Machozeki, Janete
Efeito do uso precoce da metformina ou do orlistat na prevenção da disfunção de adipócitos em ratos wistar submetidos à dieta hiperglicídica-hiperlipídica/ Janete Machozeki. Ponta Grossa, 2018.
69f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Atenção Interdisciplinar em Saúde), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Mário Augusto Cray da Costa.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Fabiana Postiglione Mansani.

1. Adipócito. 2. Metformina. 3. Obesidade. 4. Orlistat. 5. Síndrome metabólica. I. Costa, Mário Augusto Cray da. II. Mansani, Fabiana Postiglione. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências da Saúde. IV. T.

CDD: 616.4

JANETE MACHOZEKI

O EFEITO DO USO PRECOCE DA METFORMINA OU DO ORLISTAT NA
PREVENÇÃO DA DISFUNÇÃO DE ADIPÓCITOS EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS À
DIETA HIPERGLICÍDICA-HIPERLIPÍDICA


Dissertação apresentada para a obtenção de título de Mestre em Ciências de Saúde,
área de concentração em Atenção Interdisciplinar em Saúde, na Universidade Estadual de
Ponta Grossa.

Ponta Grossa, 28 de março de 2018.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Mário Augusto Cray da Costa (UEPG) - Presidente



Profa. Dra. Cibele Pereira Kopruszynski (UFPR) - Titular



Prof. Dr. Ricardo Zanetti Gomes (UEPG) - Titular

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me proporcionado saúde e paz de espírito para percorrer toda a trajetória do mestrado, desde as aulas, pesquisa, até a elaboração da dissertação.

A toda minha família que além do apoio, conviveram com minha constante ausência, mas sempre compreenderam meu objetivo.

Ao Prof. Dr. Mario Augusto Cray da Costa pela contribuição de seus conhecimentos na orientação desta pesquisa e dissertação.

A Prof. Dra. Fabiana Postiglione Mansani que além de orientar, sempre esteve presente com seu apoio, incentivo e amizade.

A todos os coautores da pesquisa que efetivamente contribuíram, e muito para que se concluísse o trabalho.

Ao prof. Dr Eduardo Baumi Campagnoli pela colaboração de informações que auxiliaram a concretização desta pesquisa.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pois de certa maneira todos colaboraram para o término deste estudo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para conclusão desta pesquisa e dissertação.

RESUMO

A obesidade é uma doença multifatorial, com fisiopatologia complexa e atua como fator de risco para outras doenças, principalmente diabetes mellitus tipo 2 e doença cardiovascular. Quando a resistência insulínica está presente, caracteriza a síndrome metabólica, constituída por inflamação crônica de baixo grau, estresse oxidativo e disfunção de adipócitos. Esta pesquisa interdisciplinar avalia o efeito do uso precoce da metformina ou do orlistat na prevenção da disfunção de adipócitos em ratos wistar machos, adultos, submetidos à dieta hiperglicídica e hiperlipídica. Neste estudo foram avaliados quatro grupos de 10 animais, sendo que o grupo controle recebeu ração padrão balanceada. Outros 3 grupos receberam ração de cafeteria modificada, sendo que em 2 grupos houve intervenção farmacológica, 1 com metformina (40mg/dia) e outro com orlistat (10 mg/dia). As doses foram calculadas fundamentadas na taxa metabólica basal. Foram comparados evolução ponderal, parâmetros bioquímicos, e avaliação histomorfométrica da gordura visceral. Não houve diferença estatisticamente significativa na média de peso e nem nos parâmetros bioquímicos na comparação entre os grupos ($p > 0,05$). Na avaliação histomorfométrica evidenciou-se hiperplasia de adipócitos em todos os grupos, porém foi mais significativo no grupo que usou a dieta padrão comparado aos que usaram dieta de cafeteria modificada, com ou sem intervenção terapêutica ($p < 0,001$). Ocorreu maior hipertrofia de adipócitos no grupo que utilizou a dieta de cafeteria modificada ($p < 0,001$). Os grupos com intervenção terapêutica não apresentaram diferença estatística quando em relação ao grupo de dieta balanceada ($p > 0,05$). Este estudo demonstrou que doses pequenas de metformina ou orlistat preveniram a hipertrofia de adipócitos na gordura visceral, que é a etapa determinante para o desenvolvimento da síndrome metabólica. Esta pesquisa demonstrou que pode ser possível a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis relacionadas à disfunção de adipócitos.

Palavras – chave: adipócito, metformina, obesidade, orlistat, síndrome metabólica.

ABSTRACT

Obesity is a disease with a complex multifactorial pathophysiology and acts as a risk factor for other diseases, particularly type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. When insulin resistance is present, the metabolic syndrome, consisting of chronic low-grade inflammation, oxidative stress and dysfunction of adipocytes. This interdisciplinary research evaluates the effect of early use of metformin or orlistat in preventing dysfunction of adipocytes in male wistar rats, adults, submitted to hiperglicídica and hiperlipídica diet. In this study we evaluated four groups of 10 animals, and the control group received standard balanced ration. Other 3 groups received cafeteria modified ration, and in 2 groups there was drug intervention, 1 with metformin (40 mg/day) and another with orlistat (10 mg/day). The doses were calculated based on basal metabolic rate. Were compared weight, biochemical parameter, and histomorphometry evaluation of visceral fat. There was no statistically significant difference in weight and nor in biochemical parameters in comparison between the groups ($p > 0.05$). Histomorphometry evaluation showed hyperplasia of adipocytes in all groups but was most significant in the group that used the standard diet compared to that used modified cafeteria diet, with or without therapeutic intervention ($p < 0.001$). Occurred more in the adipocytes of hypertrophy group that used the cafeteria diet modified $p < 0.001$). The therapeutic intervention groups showed no statistical difference when compared to the balanced diet Group ($p > 0.05$). This study has shown that small doses of metformin or orlistat prevented the hypertrophy of adipocytes in visceral fat, which is the decisive step for the development of the metabolic syndrome. This research demonstrated that it may be possible to the prevention of non-communicable chronic diseases related to dysfunction of adipocytes.

Keywords: Adipocyte, metformin, obesity, orlistat, metabolic syndrome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Hiperplasia e hipertrofia de adipócitos.....	19
Figura 2 –	Infiltração de macrófagos, liberação de citocinas e fibrose resultando em resistência insulínica.....	20
Gráfico 1 –	Teste Anova da amostra.....	27
Quadro 1 –	Randomização grupo/tempo.....	28
Figura 3 –	<i>Pellets</i> DCM pré secagem.....	29
Figura 4 –	DCM.....	29
Figura 5 –	Diluição.....	30
Figura 6 –	Gavagem.....	30
Figura 7 –	Incisão em U para exposição da cavidade abdominal.....	31
Figura 8 –	Ressecção do omento.....	32
Figura 9 –	Gordura retroperitoneal.....	32
Figura 10 –	Limites da gordura retroperitoneal.....	33
Figura 11 –	Exposição dos vasos ilíacos após remoção da gordura retroperitoneal.....	33
Figura 12 –	Exposição da musculatura retroperitoneal após remoção da gordura.....	33
Figura 13 –	Ressecção da gordura epididimal.....	34
Figura 14 –	Grupo MM – macroscopia.....	35
Figura 15 –	Grupo DCM – macroscopia.....	35
Figura 16 –	Fluxograma – avaliações das gorduras.....	37
Figura 17 –	Processamento e análise de imagem em JAVA.....	38
Figura 18 –	Contagem de adipócitos por campo (ImageJ®).....	38
Figura 19 –	Grade escalométrica para auxiliar o uso do critério para medida da área do adipócito.....	39
Gráfico 2 –	Evolução da média de peso dos grupos.....	41
Gráfico 3 –	Média das glicemias capilares por semana.....	41
Tabela 1 –	Médias do aumento do consumo de ração.....	42
Tabela 2 –	Parâmetros bioquímicos no final do experimento.....	42

Gráfico 4 – Gordura omental: média do número de adipócitos (comparação entre os grupos).....	43
Gráfico 5 – Gordura omental: média das áreas dos adipócitos (comparação entre os grupos).....	44
Gráfico 6 – Gordura retroperitoneal: média do número de adipócitos (comparação entre os grupos).....	45
Gráfico 7 – Gordura retroperitoneal: média das áreas dos adipócitos (comparação entre os grupos).....	46
Gráfico 8 – Gordura epididimal: média do número de adipócitos (comparação entre os grupos).....	47
Gráfico 9 – Gordura epididimal: média das áreas dos adipócitos (comparação entre os grupos).....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AACE	<i>American Association on Clinical Endocrinologists</i>
AMPK	Proteína quinase dependente de monofosfato adenosina
DACV	Doença aterosclerótica cardiovascular
DCM	Dieta de cafeteria modificada
DCV	Doença cardiovascular
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DP	Dieta padrão
FNT-α	Fator de necrose tumoral - α
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corporal
MEC	Matriz extracelular
MM	Dieta modificada com metformina
MO	Dieta modificada com orlistat
NAEVI	Núcleo avançado de estudos da vida
NCEP/ATP	<i>National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel</i>
OMS	Organização mundial da saúde
PIXEL	<i>Picture element</i>
SM	Síndrome metabólica
TA	Tecido adiposo
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3	REVISÃO DE ITERATURA	14
3.1	OBESIDADE.....	14
3.2	SÍNDROME METABÓLICA.....	15
3.3	DISFUNÇÃO DE ADIPÓCITOS NO TECIDO ADIPOSEO BRANCO.....	17
3.4	INTERVENÇÃO NA SÍNDROME METABÓLICA.....	23
3.5	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	AMOSTRA.....	26
4.1.1	DEFINIÇÃO ESTATÍSTICA DA AMOSTRA.....	26
4.1.2	RANDOMIZAÇÃO.....	27
4.2	CUIDADOS COM OS ANIMAIS.....	28
4.3	DIETA E INTERVENÇÕES TERAPÊUTICAS.....	28
4.3.1	DIETA DE CAFETERIA MODIFICADA.....	28
4.3.2	DOSES.....	29
4.3.3	DILUIÇÕES.....	30
4.4	ATO OPERATÓRIO, COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO E EUTANÁSIA.....	30
4.5	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	34
4.6	MACROSCOPIA.....	34
4.7	MICROSCOPIA.....	35
4.7.1	PREPARO DO MATERIAL.....	35
4.8	HISTOMORFOMETRIA.....	36
4.9	VARIÁVEIS ANALISADAS.....	39
4.9.1	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	40
5	RESULTADOS	41
6	DISCUSSÃO	49
7	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIA	
	ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

O aumento da obesidade vem sendo motivo de preocupação devido ao grande impacto exercido como fator de risco para outras doenças que comprometem a qualidade de vida e a sobrevivência dos indivíduos. A obesidade é uma doença multifatorial e sua fisiopatologia é complexa. Inúmeros fatores genéticos, ambientais e comportamentais influenciam os componentes do balanço energético e, conseqüentemente, o aumento da gordura corporal (MANCINI et al., 2014).

O impacto de duas das principais conseqüências da obesidade, o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e a doença cardiovascular (DCV), em termos de custo, morbidade e mortalidade demonstra a necessidade da compreensão detalhada de sua patogênese para que pessoas de risco sejam motivadas à sua prevenção. Embora a fisiopatologia de ambas as doenças seja complexa, estão interligadas a um processo relacionado à inflamação sistêmica, estresse oxidativo e disfunção de adipócitos. O processo resulta em um grupo de fatores de risco referido como síndrome metabólica (SM). Anormalidades como obesidade central, hipertensão arterial sistêmica, hipertrigliceridemia e alteração glicêmica estão entre os fatores do processo e ainda precisam ser totalmente elucidados (DEBOER e GURKA, 2017).

O diabetes mellitus tipo 2 está associado a sérias complicações em indivíduos cada vez mais jovens. Sua prevalência vem aumentando mundialmente, paralelamente a obesidade. A redução de peso é um importante componente para prevenção do DM2, entretanto estratégias não invasivas para se conseguir perda ponderal sustentável permanecem pobres. Somente a modificação no estilo de vida é insuficiente para maioria dos indivíduos. Uma estratégia pragmática inclui considerar opções farmacoterapêuticas (GARBER, 2015).

Alterações no metabolismo do adipócito são as bases para muitos aspectos da fisiopatologia associadas à síndrome metabólica. A disfunção no adipócito e alterações nas secreções de suas adipocinas, bem como expansão ou redução do tecido adiposo (TA) e a remodelagem do mesmo, podem alterar o perfil metabólico com potenciais efeitos deletérios ou benéficos sistemicamente (RUTKOWSKI et al.; 2015).

A resistência insulínica, chave da síndrome metabólica, tem estreita relação com a disfunção adipocitária. Múltiplas anormalidades patofisiológicas ocorrem na alteração metabólica do DM2. A resistência insulínica no fígado e no músculo e a

falência da célula β são as principais. A falência de células β ocorre muito precocemente na história natural do DM2, e é mais grave do que se supunha. Quando a intolerância à glicose se instala, a resistência insulínica já é máxima ou submáxima e há uma perda de 80% de função das células β . No músculo e no fígado diminui a captação de glicose, e aumenta a neoglicogênese. Adipócitos disfuncionais associados às alterações no trato gastrointestinal levam a um defeito incretínico. No rim, ocorre aumento de reabsorção de glicose e no cérebro a resistência insulínica desregula neurotransmissores e hormônios que desempenham um papel importante no desenvolvimento do distúrbio metabólico. Com a compreensão destas alterações patofisiológicas do DM2, a terapia deve ser o mais precoce possível para prevenir ou retardar a progressão para falência da célula β , ou estabilizar indivíduos já com intolerância à glicose (DEFRONZO, 2013).

Com uma dieta hipercalórica vai ocorrer certamente uma remodelagem do TA, e fármacos como a metformina e orlistat podem ser opções terapêuticas. A metformina é uma biguanida, um fármaco antihiperlicemiante, que atua primariamente no fígado, inibindo a neoglicogênese. Também age no músculo esquelético, estimulando a utilização da glicose periférica. A metformina atua promovendo a ativação da proteína quinase dependente da monofosfato de adenosina (AMPK), um sensor energético celular mitocondrial. Outros mecanismos celulares também ocorrem, levando a modulação miocárdica, proteção endotelial, mecanismos moleculares no metabolismo dos lipídeos, propriedades antioxidantes entre outros (VIOLLET et al.; 2012). E o orlistat é um derivado hidrogenado do lipostatin, um fármaco anti-obesidade, um inibidor irreversível das lipases gástrica e pancreática, diminuindo a absorção de lipídeos provenientes da dieta (WESSELS et al., 2014).

Esses fármacos já mostraram ter um efeito positivo no manejo da redução ponderal e na evolução da SM, quando combinados com um controle dietético apropriado, em várias pesquisas (THAMER, 2014). Este trabalho analisou se o uso precoce destes fármacos é capaz de evitar ou atenuar a disfunção adipocitária, avaliada através de análise histomorfométrica do tecido adiposo visceral, em animais submetidos à uma dieta hiperglicídica-hiperlipídica, que é a que mais se aproxima dos costumes da sociedade moderna.

Além disso, os dados de literatura sobre o tratamento farmacológico preventivo do desenvolvimento da síndrome metabólica são restritos. E para isto, a

interdisciplinaridade é necessária e imperativa, pois necessita do envolvimento de áreas da medicina, da farmacologia, das análises clínicas, da engenharia de alimentos e da medicina veterinária, destinada à resolução de um problema de saúde pública.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar e comparar, por meio da pesquisa interdisciplinar, o potencial do uso precoce da metformina ou do orlistat, na prevenção de disfunção dos adipócitos da gordura visceral em ratos wistar, com dieta hiperglicídica hiperlipídica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1- Avaliar e comparar a evolução ponderal de quatro grupos de animais, sendo um controle com dieta padrão, comparado com três grupos com ingestão de dieta de cafeteria modificada, sendo um grupo sem intervenção farmacológica, um grupo usando metformina e o terceiro grupo usando orlistat;

2- Comparar os parâmetros bioquímicos: glicemias capilares semanais e triglicerídeos, colesterol total e HDL-colesterol no final do experimento entre os grupos;

3- Quantificar o número de adipócitos e as médias de áreas dos adipócitos, através da histomorfometria, no tecido adiposo visceral (gordura omental, retroperitoneal e epididimal) dos animais de cada grupo experimental.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Obesidade

Os efeitos da obesidade na morbidade e mortalidade são conhecidos há mais de 2000 anos. Hipócrates reconheceu que “a morte súbita é mais comum naqueles que são gordos do que nos magros”, e Malcon Flemyng em 1760 observou que a gordura corporal quando em um grau extremo, pode ser reconhecida como doença e leva a uma vida mais curta (BRAY, 2004).

A obesidade é uma doença crônica onde é comum hipertensão arterial e aterosclerose. A etiologia é um desequilíbrio entre a ingesta de alimentos e o gasto de energia. O excesso de energia é estocado em células de gordura que aumentam em tamanho e/ou em número. Assim, a lesão patológica da obesidade é a hipertrofia e a hiperplasia dos adipócitos. O crescimento das células de gordura leva aos problemas clínicos associados com a obesidade devido ou ao efeito ponderal propriamente dito, ou ao aumento da secreção de ácidos graxos livres, ou aos numerosos peptídeos produzidos. As consequências destes mecanismos são outras doenças como diabetes mellitus, doenças calculosas, osteoartrite, doenças cardíacas e algumas formas de câncer (BRAY, 2004).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica a obesidade baseando-se no índice de massa corporal (IMC) definido pelo cálculo do peso corporal, em quilogramas, dividido pelo quadrado da altura, em metros; e também, pelo risco de mortalidade associada. A obesidade é definida quando o IMC se encontra acima de 30 kg/m². A OMS caracteriza a gravidade da obesidade em: grau I (moderado excesso de peso), quando o IMC se situa entre 30 e 34,9 kg/m²; grau II (obesidade grave), com IMC entre 35 e 39,9 kg/m² e grau III (obesidade mórbida), quando IMC é maior que 40 kg/m² (KOLOTKIN et al., 2001).

Uma vez que as consequências para a saúde são muitas e variam do risco aumentado de morte prematura a graves doenças não letais, mas debilitantes, que afetam diretamente a qualidade de vida, a obesidade tornou-se um problema de saúde pública. Integra o grupo de doenças crônicas não transmissíveis, com múltiplos fatores de risco, história natural prolongada, longo curso assintomático, com períodos de remissão e de exacerbação, lesões celulares irreversíveis e evolução para diferentes graus de incapacidade (TAVARES et al., 2010).

3.2 Síndrome metabólica

Na obesidade, quando há também aumento da adiposidade visceral, está presente o principal critério para a chamada síndrome metabólica (SM). A SM é mais um conceito do que um diagnóstico (SHAW et al., 2003).

A SM foi originalmente notada em 1920 quando Kylin, um médico sueco, demonstrou a associação entre hipertensão arterial, hiperglicemia e gota. Depois, em 1947, Vague descreveu que a obesidade visceral estava comumente associada com as anormalidades metabólicas encontradas em doenças cardiovasculares e diabetes mellitus tipo 2 (KYLIN, 1920; VAGUE, 1947).

Em 1965, foi apresentada no Encontro Anual da Associação Europeia de Estudos de Diabetes, uma síndrome que associava dislipidemia, hiperglicemia e obesidade, por Avogaro e Grepaldi. O termo síndrome metabólica foi usado pela primeira vez em 1977, por Herman Haller, que estudava os fatores de risco associados à aterosclerose, dislipidemia e esteatose hepática (AVOGARO e GREPALDI, 1965; HERMAN HALLER, 1977).

Em 1988, Reaven forneceu pesquisas com banco de dados significativos. Ele descreveu um conjunto de fatores de risco para diabetes e doença cardiovascular e nominou de “Síndrome X”. Isto foi uma forte contribuição para introdução do conceito de resistência insulínica. Kaplan, em 1989, chamou a síndrome de “Quarteto da Morte” pela combinação de obesidade na parte superior do corpo, intolerância à glicose, hipertrigliceridemia e hipertensão e, mais tarde, renominou de “A Síndrome da Resistência Insulínica” em 1992 (REAVEN, 1988; KAPLAN, 1989, 1992).

A síndrome metabólica (SM) é definida como um conjunto de fatores fisiológicos, bioquímicos, clínicos e metabólicos interconectados que aumentam diretamente o risco de DCV, DM2 e outras causas de mortalidade. Resistência insulínica, adiposidade visceral, dislipidemia aterogênica, disfunção endotelial, susceptibilidade genética, hipertensão arterial sistêmica e estado de hipercoabilidade são alguns componentes da síndrome (KAUR, 2014).

Vários grupos têm tentado desenvolver critérios diagnósticos para a SM. O primeiro foi a OMS em 1998. Em resposta, o Grupo Europeu de Resistência Insulínica, modificou a definição da OMS em 1999. Em 2001, A *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel* (NCEP/ATP) divulgou a sua definição. A *American Association on Clinical Endocrinologists* (AACE), em 2003, ofereceu uma revisão da definição da síndrome. Desta proliferação de definições sugeriu a

necessidade de uma unificação. Em abril de 2005, a *International Diabetes Federation* (IDF) propôs uma nova definição para a síndrome metabólica (KAUR, 2014).

A síndrome metabólica aumenta diretamente o risco de doença aterosclerótica cardiovascular (DACV), DM2 e tem alto índice de mortalidade. No conjunto de alterações corporais silenciosas, estão os resultados de testes laboratoriais anormais, incluindo dislipidemia aterogênica, intolerância à glicose, estado pró-inflamatório, estado pró-trombótico e hipertensão arterial. O critério que por definição deve estar presente é a resistência insulínica determinada laboratorialmente pelo teste oral de tolerância à glicose ou pelo *clamp* hiperinsulinêmico-euglicêmico (RITCHIE et al., 2007).

Os critérios do NCEP-ATP III colocam como necessária a presença de três entre cinco fatores para estabelecer o diagnóstico de SM, sendo esses a obesidade abdominal (circunferência abdominal > 88 cm para mulheres ou > 102 cm para homens), o aumento de triglicerídeos ($TG \geq 150$ mg/dL), a redução do HDL-col (HDL-col < 50 mg/dL para mulheres ou < 40 mg/dL para homens), a pressão arterial elevada ($PA \geq 130/85$ mmHg) e a glicemia de jejum elevada (≥ 100 mg/dL). A IDF publicou novos critérios que se assemelham aos do NCEP-ATP III, entretanto, a IDF prevê a obrigatoriedade da presença do critério circunferência abdominal, conforme as raças. Essa considerou a obesidade abdominal mais fortemente correlacionada com a resistência à insulina do que os outros critérios. O IDF identificou as dificuldades, reorganizou e uniformizou os critérios para SM, e propôs novos cortes para diferentes populações, etnias e nacionalidades (RITCHIE et al., 2007).

Nos últimos anos, tem-se percebido que os critérios tradicionais para SM estão limitados a identificar o risco de DM2 e DACV quando as anormalidades já estão presentes e também impossibilita o seguimento futuro. As limitações dos critérios tradicionais da SM estimularam estudos de pesquisas com maior força estatística. Técnicas para generalizar sistemas de escores têm sido revisados atualmente. Em geral, estes sistemas de escores utilizam os componentes da SM para os critérios NCEP ATP-III, com algumas variações quanto a estimativa de adiposidade, idade, sexo e raça/etnia específica, geralmente utilizando escore-Z específico para cada componente. Também se associam escores contínuos clínicos para a SM para aumentar capacidade de estimar o risco cardiovascular. Múltiplos estudos demonstram que os escores clínicos contínuos para SM correlacionam-se

positivamente com melhora de fatores de estilo de vida e respondem aos exercícios físicos. Os escores clínicos contínuos para SM são: o método HOMA (*Homeostasis Model Assessment*) de modelo de homeostase de resistência insulínica (glicemia de jejum – mMol/L X insulinemia de jejum – ui/mL ÷ 22,5), a proteína C reativa de alta sensibilidade, o ácido úrico sérico e a adiponectina sérica. Para análise dos escores se utiliza plataformas online de calculadoras para SM (DEBOER, 2017).

As implicações práticas do uso destes escores são determinar o risco atual e futuro de DACV e DM2, o seguimento da evolução para estas doenças ao longo do tempo e a tomada de conduta apropriada. Além de confirmar as pesquisas que evidenciam a eficácia de terapias, tais como a metformina, que diminui a produção hepática de glicose, ou de estatinas, que diminuem o risco cardiovascular, em retardar a evolução da SM. Os escores podem monitorar o tratamento, confirmar a eficácia na modificação do estilo de vida e motivar os pacientes, diminuindo efetivamente o risco de DM2 e DACV (DEBOER, 2017).

3.3 Disfunção de adipócitos no tecido adiposo branco

O tecido adiposo branco (TAB) é dinâmico e modificável, único componente que pode variar entre 3 a 70% do peso corporal total; desenvolve-se entre a décima quarta e vigésima quarta semana de gestação em humanos, e em roedores somente no estágio pós-natal. É o único tecido com potencial para crescimento contínuo quando em estado de oferta energética supérflua persistente (PARLEE, 2014).

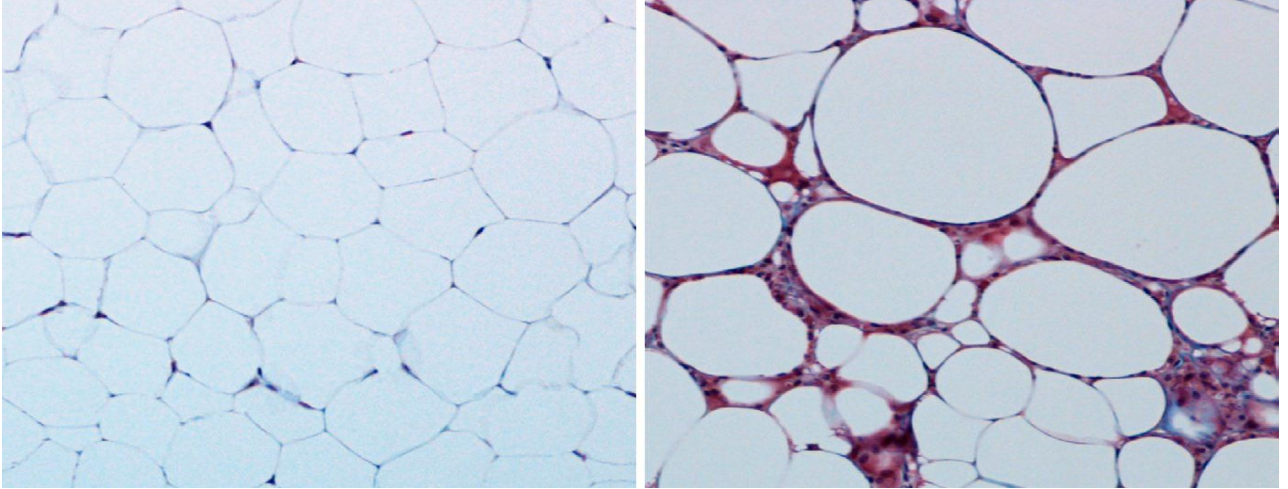
A SM é um processo relacionado à inflamação sistêmica, estresse oxidativo e disfunção do adipócito. A obesidade está fortemente associada à SM, sendo que o tecido adiposo branco (TAB) desempenha um papel importante na homeostasia. O TA não pode mais ser considerado um mero sítio de estocagem de excesso de energia ou um isolante térmico, como há 20 anos. Hoje, é visto como um órgão altamente ativo, envolvendo numerosos processos metabólicos, hormonais e imunes, cujos produtos e reações são capazes de atuar não somente no local, mas também influenciar outros órgãos e sistemas. Vários mecanismos podem levar aos processos deletérios no TA, incluindo disfunção endócrina, hipóxia local, diminuição da capacidade de estocagem de lipídeos, levando ao acúmulo ectópico e inflamação crônica de baixo grau, local e sistêmica, caracterizada por infiltração de células imunes no TA e aumento na produção e secreção de fatores pró-inflamatórios para circulação (MRAZ; HALUZIK, 2014).

A obesidade está associada a um tipo diferente de inflamação crônica de baixo grau estéril ou metainflamação (inflamação de tecidos metabólicos) e caracterizada por somente um discreto aumento nos fatores pró-inflamatórios circulantes e ausência de sinais clínicos de inflamação (inflamação subclínica). Apesar da baixa intensidade, a inflamação obesidade-induzida exerce profundos efeitos na via metabólica, e tem um papel central da resistência insulínica (MRAZ; HALUZIK, 2014).

O tecido adiposo responde rápida e dinamicamente as alterações nutricionais, tanto por privação como por excesso, através de um processo de remodelagem, por infiltração de células inflamatórias, alterações vasculares e de matriz extracelular (MEC). Muitos processos fisiologicamente relevantes, da remodelagem do TA, para o ser humano, podem ser estudados em modelos de roedores, com a vantagem de que tanto o processo de extensão, como o de redução ocorrem em uma velocidade extremamente rápida nestes animais. Um jejum de 24 horas em um rato está associado a uma perda dramática do TA, e 24 a 48 horas de exposição a dieta rica em gorduras aumenta o tamanho dos adipócitos e envolve rápida infiltração de macrófagos. Sendo assim, este é o modelo ideal para o estudo da expansão e redução do TA, bem como de adaptação a uma suplementação nutricional diferenciada (SUN, 2011).

O tecido adiposo branco (TAB) tem função metabólica, endócrina e reguladora da homeostasia energética e da sensibilidade insulínica. É caracterizado por sua capacidade de adaptação e expansão em resposta a energia supérflua, através do processo de hipertrofia de adipócitos e/ou recrutamento e proliferação de células precursoras, a chamada hiperplasia, recrutamento de células inflamatórias, remodelagem vascular e da matriz extracelular (MEC) para adequada oxigenação e mobilização de nutrientes (Figura 1). Quando a obesidade e a inflamação são sustentadas, os mecanismos adaptativos homeostáticos falham e o TAB disfuncional aumenta a secreção de adipocinas, faz estocagem anormal de lipídeos e adipogênese, assim como deposição exacerbada de fibrose e resistência insulínica.

Figura1—Hiperplasia de adipócitos e hipertrofia com hiperplasia de adipócitos.



Fonte: RUTKOWSKI; STERN; SCHERER (2015).

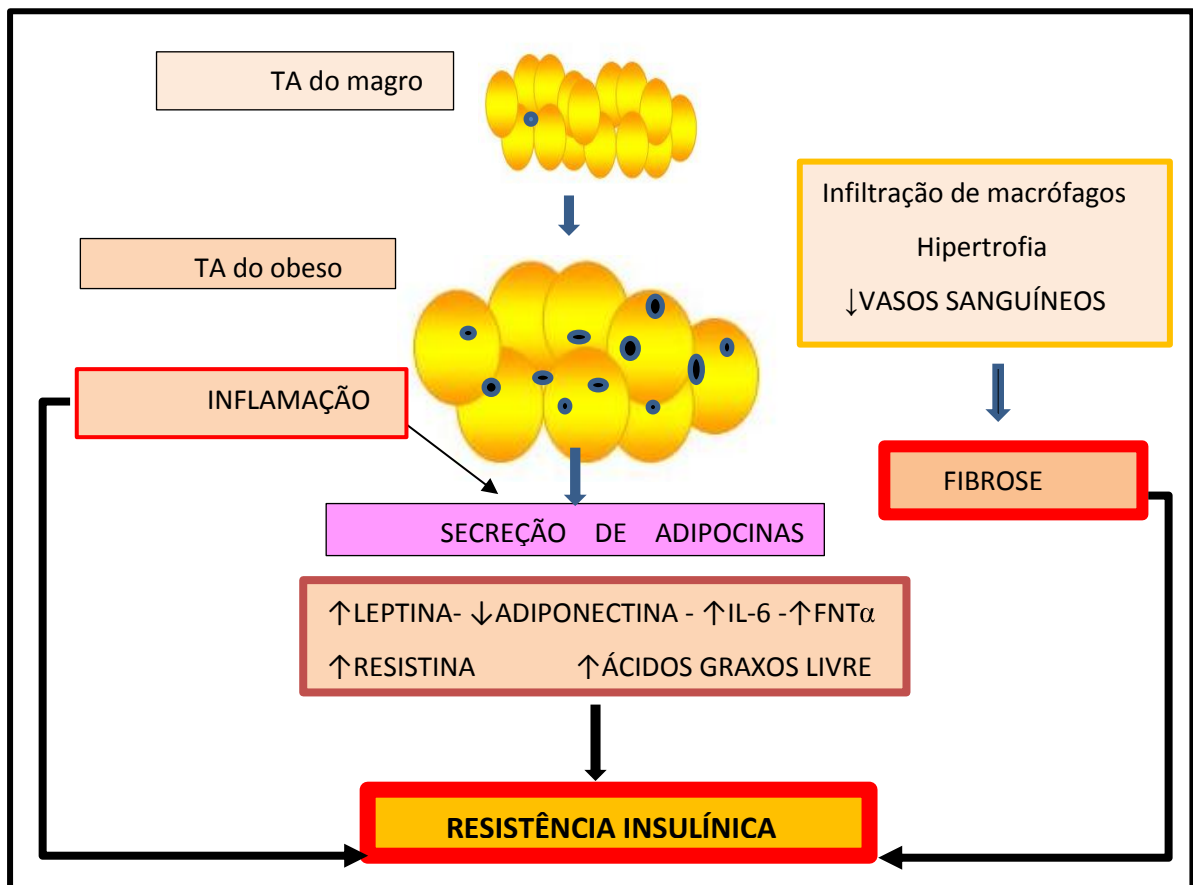
O TAB anatomicamente é dividido em tecido adiposo subcutâneo e tecido adiposo visceral, o local da expansão do tecido adiposo está relacionada com as complicações da obesidade. A expansibilidade do TA tem uma capacidade limitada o que leva a disfunção do TAB. A não expansão do TAB e a necessidade de acomodação para o excesso de energia, são determinantes para o início e progressão da obesidade associada com doenças metabólicas, resultando em deposição ectópica de espécies tóxicas de lipídeos em órgãos metabólicos, como por exemplo, no músculo ou fígado, conhecido como insulto lipotóxico (PELLEGRINELLI, 2016).

Os macrófagos são os maiores constituintes e mediadores da remodelagem do TA, orquestram a resposta inflamatória coexistente com a resistência insulínica obesidade-induzida. A infiltração macrocitária no TA se dá por quatro diferentes mecanismos: hipertrofia e hiperplasia adipocitária, morte do adipócito, hipóxia e fluxo de ácidos graxos (SUN,2011).

Os mecanismos fisiopatológicos moleculares e celulares que regulam o tamanho dos adipócitos, o número e a expansão dependente de depósito lipídico, estão sujeitos a uma série de eventos complexos, envolvendo substâncias biologicamente ativas como a leptina, interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral α T- α), resistina, vaspina, vinfastina entre muitas outras citocinas que atuam como reguladores metabólicos dos carboidratos e lipídeos, gerenciadores da fome e da saciedade, e da sensibilidade insulínica (PROENÇA et al., 2014).

Uma importante distinção precisa ser estabelecida entre a expansão “saudável” e expansão patológica da gordura. Na expansão saudável, um recrutamento de precursores de adipócitos que se diferenciam em células pequenas, estroma e outros tipos de células apropriadas para o TA, com subsequente vascularização, indução mínima de matriz extracelular (MEC) e pouca reação inflamatória. Já na expansão patológica, ocorre um crescimento rápido dos adipócitos, células grandes hipertróficas, alto grau de infiltração de macrófagos, desenvolvimento limitado de vasos sanguíneos e fibrose maciça, levando a inflamação crônica que resulta em resistência insulínica, como ilustrado na Figura 2.

Figura 2: Infiltração de macrófagos, liberação de citocinas e fibrose resultando em resistência insulínica



Fonte: Modificado de COELHO, M.; OLIVEIRA, T.; FERNANDES, R.

Cinti e cols. (2005) levantaram a hipótese de que a hipertrofia dos adipócitos acelerada, que ocorre na obesidade, leva à necrose, que é outro forte estímulo fagocitário e fundamental para mediar a infiltração do TA por macrófagos. Esses macrófagos se agregam ao redor desses adipócitos necróticos, formando estrutura tipo coroa (*crown-like*), visto na obesidade grave. Nesse estado, eles se fundem

para fagocitar grandes quantidades de lipídeos, formando sincícios multinucleares, que são típicos de inflamação crônica. Não se pode afirmar se ocorre necrose ou apoptose dos adipócitos, porém resulta em acúmulo de lipídeos inertes, desprovidos de camada proteica e que não sofrem ação das lipases, como ocorre na hidrólise dos triglicerídeos. A remoção desses lipídeos acumulados é uma etapa fundamental na remodelagem do TA.

Os adipócitos hipertrofiados criam áreas de micro hipóxia local no TA nos estágios iniciais da expansão, levando a diminuição do aporte de oxigênio. Nessas áreas, algumas adipocinas são liberadas como o fator inibitório de migração de macrófagos (MIF), matriz de metaloproteinase 2 (MMP2) e matriz de metaloproteinase 9 (MMP9), interleucina-6 (IL-6), inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1), angioplasminogênio 4, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e leptina. A liberação destas substâncias e fatores de crescimento promovem resposta fibrótica local na MEC (CINTI et al., 2005).

Os ácidos graxos estocados nos adipócitos hipertróficos são liberados através da lipólise durante o jejum. Alguns destes ácidos graxos vão para o fígado onde são estocados; outros são oxidados em outros órgãos, principalmente no músculo. Uma menor proporção de ácidos graxos é reesterificada localmente nos adipócitos. Aqueles ácidos graxos que não são reesterificados exercem um papel crítico, em vários órgãos, como fornecedor primário de energia durante o jejum prolongado. Também podem atuar como ligantes para complexos de linfócitos T (*toll-like receptors* - TLR4) ativando a clássica resposta inflamatória crônica. Um aumento local da concentração de lipídeos extracelulares termina por também elevar o acúmulo de macrófagos no TA (CILDIR; TERGAONKAR, 2013).

Estes quatro mecanismos de recrutamento de macrófagos para infiltração do TA (hipertrofia/hiperplasia, hipóxia, regulação quimiotática e fluxo de ácidos graxos) atuam de forma independente, entretanto, as vias inflamatórias e metabólicas são estreitamente interconectadas e ocorrem num processo extremamente dinâmico (SUM, 2011).

O TA é um órgão muito heterogêneo, não somente pelos diferentes tipos de TA, isto é, tecido adiposo branco, tecido adiposo marrom (TAM) e tecido adiposo bege, mas também por sua distribuição em multi-depósitos. Tanto o TAB como o TAM coexistem em várias localizações. Por sua alta heterogeneidade, os depósitos

de TA devem ser considerados como mini órgãos com características e funcionalidades autônomas (BADIMON; CUBEDO, 2017).

Baseado nessa heterogeneidade, o TA é capaz de alterar suas características estruturais, celulares e moleculares, dependendo das condições fisiológicas ou patológicas que impacta diretamente sua funcionalidade, este conceito é tido como plasticidade (BADIMON; CUBEDO, 2017).

Uma alteração fisiológica observada no TA é uma progressiva diminuição no TAM e aumento dos adipócitos brancos com a idade. É interessante que o efeito inverso é observado em roedores expostos ao frio e com a prática de exercícios regulares em humanos. A plasticidade do tecido adiposo também é observada em muitas situações patológicas com fatores de risco cardiovascular, quando o TA é disfuncional. Especialmente, indivíduos obesos apresentam atrofia do TAM associado com hipertrofia adipocitária e aumento de TAB visceral e hiperglicemia frequente (BADIMON; CUBEDO, 2017).

Em obesos com SM, ocorre estocagem ectópica de gordura em órgãos e tecidos que normalmente não estariam envolvidos, como nos músculos e nos vasos sanguíneos. Os adipócitos hipertrofiados repletos de gordura, assim como outras células de órgãos com gordura ectópica, são resistentes aos efeitos sinalizadores da insulina. O acúmulo de lipídeos e triglicérides ocorre em vários órgãos, incluindo o pâncreas e o fígado. A presença de gordura saturada no fígado causa resistência insulínica neste órgão e doença hepática gordurosa não alcoólica (AUBERVAL et al., 2014).

A perda de peso, independente do tratamento, leva a um declínio nos depósitos de gordura ectópica, sendo capaz de restaurar, pelo menos parcialmente, a homeostase metabólica do TA. Um recente estudo mostrou que além dos efeitos benéficos na qualidade de vida, a redução de peso diminui a hipertrofia dos adipócitos em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica. Porém não houve diminuição no número das células de gordura. Importante lembrar que o tamanho do adipócito está correlacionado com a sensibilidade insulínica. O mecanismo que leva a redução no diâmetro dos adipócitos permanece desconhecido (ANDERSSON et al.; 2014).

O aumento da incidência desta doença crônica não transmissível deve-se ao estilo de vida da sociedade moderna, como sedentarismo e hábitos alimentares inadequados. Estudos apontam que nos últimos vinte anos, um acentuado aumento

na obesidade e na presença da SM, têm sido associados a um aumento de 30% da ingestão de frutose nos EUA. A frequente realização das refeições em *fast-foods* também tem sido relacionada com o aparecimento da SM. Para avaliar este impacto no metabolismo aplica-se, em modelo animal, a chamada dieta de cafeteria, também conhecida na literatura como hiperlipidêmica, “ocidentalizada” ou de *fast-foods* (BADIMON; CUBEDO, 2017).

Ela contém alimentos carregados em energia, com grande aporte calórico, rica em sódio e gorduras saturadas e pobres em fibras. Esta dieta, administrada em ratos, promove um padrão alimentar hiperfágico e hipercalórico, um rápido ganho de peso, aumento da massa de tecido adiposo, intolerância à glicose, resistência insulínica e hiperinsulinemia (BALLESTERI et al., 2015).

As vantagens do uso de dieta rica em gorduras e em carboidratos é o tempo menor para induzir SM em ratos Wistar de 16 para 8 semanas. Os resultados de estudos também mostraram acúmulo significativo de lipídeos no miocárdio, hipertrofia ventricular esquerda, aumento de gordura visceral e alterações morfológicas hepáticas (ANGELOVA, 2013).

3.4 Intervenção na SM

A identificação clínica e o manejo adequado de indivíduos com SM deve ser precoce para reduzir os riscos de doenças subsequentes. A prevenção efetiva inclui alterações no estilo de vida, inicialmente com perda de peso, dieta e exercícios. O tratamento farmacológico deve ser considerado para aqueles que não alteram fatores de risco com as medidas iniciais. A intervenção deve ser multidisciplinar, baseada em uma modificação do estilo de vida, benefícios psicológicos e em uma educação voltada para saúde, para contribuir com redução de todos os riscos metabólicos (Kauer, 2014).

O *China Da Qing Diabetes Prevention Study*, com seguimento de 20 anos, de intervenção intensiva no estilo de vida, mostrou redução de 43% (95% CI 19-59) da progressão para DM2, e 47% (95% CI 1-71) da retinopatia. Porém, não identificou redução de risco para nefropatia, neuropatia, eventos cardiovasculares e mortalidade (GUANGWEI, 2008).

Vários estudos já foram publicados, referente ao uso de farmacoterapia para prevenção de DM em indivíduos com SM, tanto com medicamentos anti-obesidade, quanto com medicamentos sensibilizadores da insulina com potencial

antihiperlipidêmico. Os que apresentam maior número de estudos na literatura são a metformina e o orlistat (GARBER, 2015).

O cloridrato de metformina é uma biguanida com ação antihiperlipidemiante, usada há mais de sessenta anos e com mecanismo de ação ainda não totalmente elucidado. O sítio principal de ação da metformina é na mitocôndria inibindo o complexo I, reduzindo o consumo de oxigênio no músculo e diminuindo a gliconeogênese pelos hepatócitos. Outra ação da metformina é ativar a proteína quinase dependente de monofosfato de adenosina (AMPK), o sensor celular crítico regulador da homeostase energética. A AMPK ativada promove captação de glicose e oxidação de ácidos graxos pelo músculo, e no fígado também diminui gliconeogênese e lipogênese. Existe uma ação AMPK-independente da metformina que age no receptor de glucagon, por fosforilação oxidativa, cujo mecanismo não está claro e parece ter influência racial (RENA, 2013).

O EMPOWIR (*Enhance the Metabolic Profile of Women With Insulin Resistance*) foi um estudo clínico randomizado, duplo-cego, placebo controlado, conduzido por duas universidades de New York, de fevereiro de 2008 a janeiro de 2011. Consistia de 3 braços: dieta com carboidratos modificados, dieta em combinação com metformina 2g/dia e metformina mais baixa dose de rosiglitazona (4mg/dia). Em mulheres com discreto ganho de peso, teste de tolerância à glicose normal e hiperinsulinemia documentada. Intervenção nas mais diversas populações, visando melhora do perfil metabólico com redução do peso e diminuição de risco de DM2 e comorbidades. O estudo mostrou que a resistência insulínica pode preceder obesidade, e que dieta com metformina sustentada por 12 meses leva a redução de peso e diminuição de gordura visceral em mulheres com sobrepeso, normoglicêmicas e com hiperinsulinemia documentada (área sob a curva de insulina ≥ 100 $\mu\text{U/mL}$ (calculado por aproximação trapezoidal), ou uma resposta de insulina ≥ 60 Mu/mL no teste oral de tolerância à glicose com 75g, entre o tempo zero e 120 minutos (MOGUL, 2016).

O orlistat é um derivado hidrogenado do lipostatin (tetrahidrolipostatin), uma droga anti-obesidade, inibe a ação do tri e do di-acilglicerol lipase intestinal, diminuindo a absorção de lipídeos provenientes da dieta (WESSELS et al., 2014). Resultados de uma meta-análise que avaliou 16 estudos clínicos placebo-controlados com orlistat mostrou redução de peso de 2,9% (95%IC- 2,3 a 3,4%) a mais que o placebo. No estudo XENDOS (*Xenical in the Prevention of Diabetes in*

Obese Subjects), New Jersey, publicado em 2004, que teve duração de 4 anos, o orlistat mais alteração no estilo de vida, em pacientes obesos, reduziu risco de progressão para DM2 em 37% (GABER, 2015). Estes benefícios podem estar associados não só a absorção limitada de lipídeos e redução de ácidos graxos livres plasmáticos, mas também a um aumento na produção de incretinas e modulação de secreção de citocinas pelos adipócitos (DEROSA, 2016).

3.5 Análise histomorfométrica

A morfometria é o estudo matemático de formas pertencentes a uma mesma população estatística (DRYDEN; MARDIA, 1988). Nas ciências biomédicas a quantificação tem por meta estabelecer as medidas para se ter objetividade em diagnósticos, e até mesmo em prognósticos. Nesta área a morfometria é a atividade de medir estruturas anatômicas para se obter dados quantitativos (TEIXEIRA et al., 2005).

Para se realizar a histomorfometria (morfometria de tecidos) é utilizada a unidade micrômetro ou micron, cujo símbolo é μm , que equivale à milésima parte do milímetro. Quando se utiliza microscopia óptica de luz e o método de inclusão em parafina, a espessura do corte é de extrema importância. Esta técnica é amplamente utilizada para análise de tecido ósseo. (PARDINI; ASSIS, 2005). O diâmetro e o perímetro de adipócitos podem ser medidos em micrômetros (μm) e a área em micrômetros quadrados (μm^2) a partir de imagens obtidas de TA corado pelo método da hematoxilina-eosina (FOX; BARRIS, 2004).

O *Image-J*® é um *software* de processamento e análise de imagens digitais, semi-automatizado, de domínio público, em linguagem em JAVA, desenvolvido por Wayne Rasband no *National Institutes of Health*. O cálculo das áreas é feito pela contagem de *pixels* (*picture element*) das regiões selecionadas. Para fazer as medições é preciso calibrar a foto, informando ao programa qual é o tamanho em μm de cada *pixel*. Este *software* é muito útil e prático para medidas de microestruturas na imagem, como o número de microestruturas no campo e a áreas dos microelementos estruturais. No caso do TA para avaliar hiperplasia e hipertrofia (DIAS, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho consistiu em uma pesquisa pré-clínica, interdisciplinar, realizada no NAEVI (Núcleo Avançado de Estudos da Vida), Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental e Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) e no Laboratório de Anatomia Patológica de Ponta Grossa. Aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pró-reitora de Pesquisa e Pós-graduação da UEPG – processo 037/2016.

A padronização teve como base as Normas Bibliográficas para Trabalhos Científicos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (2014).

4.1 AMOSTRA

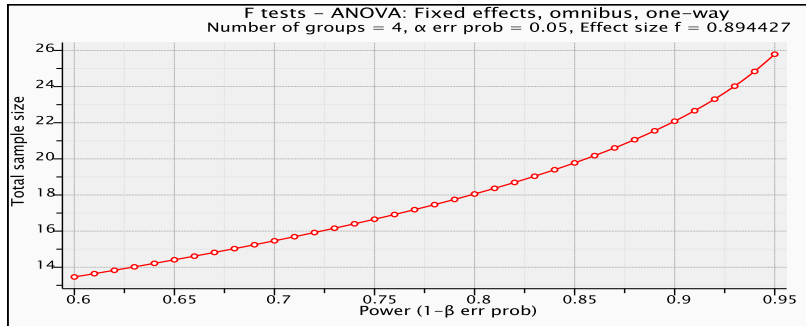
Foram utilizados 40 ratos albinos da raça wistar (*Rattus norvegicus*), machos, adultos com três meses, com peso variando de 300 a 350 gramas, no início do experimento.

4.1.1 DEFINIÇÃO ESTATÍSTICA DA AMOSTRA

O tamanho da amostra foi calculado, no programa G. POWER 3.1.9.2, (Dusseldorf, Germany) para uma força de 95%. Utilizou-se os valores de glicose encontrados por Ballestreri et al., (2015), para calcular o N amostral. Observa-se que com um N de 7 animais por grupo será obtido uma força acima de 95%, contudo foi acrescido em 30%, com objetivo de se ter um N maior na eventualidade de perdas durante a fase experimental, para que essas não interferissem nos resultados.

Para as variáveis com resultados definidos através de score foi usado o teste Kruskal-Wallis. Para a análise das variáveis contínuas utilizado o teste ANOVA, com o pós-teste de Tukey para um valor do $p < 0,05$. Foram definidas como estatisticamente significativas aquelas amostras que, quando comparadas apresentarem um $p < 0,05$ para medida de magnitude das diferenças. (Gráfico 1)

Gráfico 1: Teste ANOVA da amostra



4.1.2 RANDOMIZAÇÃO

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, conforme descritos abaixo e organizados no quadro 1.

O grupo dieta padrão (DP) foi composto por 10 animais que foram submetidos à eutanásia com 84 dias de dieta padrão, comercial, normocalórica, para se determinar os valores médios das variáveis estudadas, com os animais recebendo dieta balanceada. Este grupo foi o controle para os padrões fisiológicos para idade dos animais.

O grupo dieta de cafeteria modificada (DCM) foi composto por 10 animais que receberam a dieta hiperglicídica-hiperlipídica por 84 dias e foram submetidos à eutanásia ao final do experimento, para avaliações das variáveis. Este grupo foi o controle da DCM em 84 dias.

O grupo dieta modificada com metformina (MM) foi composto por 10 animais que receberam a dieta de cafeteria modificada por 14 dias e a partir dessa data, intervenção por gavagem, de 40 mg de cloridrato de metformina diariamente. Este grupo recebeu metformina por 70 dias e ao final foi submetido à eutanásia para coleta das amostras.

O grupo dieta modificada com orlistat (MO) foi composto por 10 animais que receberam a dieta de cafeteria modificada por 14 dias e a partir dessa data, intervenção por gavagem, 10 mg de orlistat diariamente. Este grupo recebeu orlistat por 70 dias e ao final do experimento foi submetido à eutanásia para coleta das amostras. Quadro 1

Quadro 1: Randomização grupos/tempo

Grupos	DP n=10 Dieta padrão	DCM n=10 Dieta de cafeteria modificada	MM n=10 DCM metformina	MO n=10 DCM + orlistat
Tempos e Atividades				
Após adaptação Início da dieta de cafeteria (2 semanas)	Dieta Padrão	Início da dieta Cafeteria modificada	Início da dieta Cafeteria modificada	Início da dieta Cafeteria modificada
Início dos fármacos (10 semanas)	Dieta Padrão	Manutenção da dieta Cafeteria modificada	Metformina 40mg/dia + dieta Cafeteria modificada	Orlistat 10mg/dia + dieta Cafeteria modificada
(12 semanas)	Eutanásia	Eutanásia	Eutanásia	Eutanásia

4.2 CUIDADOS COM OS ANIMAIS

Para o início do experimento, os animais foram alojados em uma sala do NAEVI da UEPG, sendo acondicionados em gaiolas-padrão, 5 animais/gaiola, forradas com serragem, com acesso a água tratada e ração comercial, Labina Purina® (Paraná, Brasil), *ad libitum*, por 15 dias, para ambientação. Os animais permaneceram mantidos sob condições constantes de luz e temperatura, com doze horas de claridade e doze horas de escuridão, a uma temperatura de $20 \pm 2^\circ \text{C}$, em sala isenta de ruídos e iluminada com lâmpadas fluorescentes.

4.3 DIETA E INTERVENÇÕES TERAPÊUTICAS

4.3.1 DIETA DE CAFETERIA MODIFICADA:

A dieta de cafeteria modificada, hiperglicídica-hiperlipídica, foi composta na seguinte proporção: ração comercial padrão (355g), amendoim torrado (176g),

caseína micelar (123g), óleo de milho (82g), achocolatado (88g) e bolacha maisena (176g). Os ingredientes foram triturados, formado *pellets* e secados em temperatura média de 180°C por 40 minutos (Figuras 3 e 4).

Figura 3: *pellets* DCM, pré secagem



Fonte: A autora

Figura 4: DCM



Fonte: A autora

O produto final embalado e mantido em geladeira para sua conservação. Esta composição apresenta 27% de proteínas, 43% de carboidratos, 20% de lipídeos e 10% de outras substâncias, perfazendo 4,6kcal/g (MARQUES et al., 2015).

Esta dieta leva a uma maior sobrecarga de lipídios e maior formação de triacilgliceróis. Conseqüentemente, há maior aumento da gordura visceral, triglicerídeos e diminuição do HDL em menor tempo em relação à dieta de cafeteria convencional (NASCIMENTO et al., 2008).

4.3.2 DOSES

As doses dos fármacos foram calculadas pelo método de extrapolação alométrica interespecífica, segundo Pachaly e Brito (2000), que se baseia na dose e na taxa metabólica basal (TMB) do animal modelo (homem) e taxa metabólica basal do animal alvo (rato wistar).

$$DD \text{ RATO} = (DD \text{ no } \text{HOMEM} \times TMB \text{ RATO}) \div TMB \text{ HOMEM}$$

(Dose diária (DD) no Modelo ÷ TMB do Modelo) X TMB do animal Alvo = Dose diária (DD) do animal alvo.

O cálculo foi feito com base na dose máxima diária para um homem de 80Kg. A dose calculada para o rato wistar, de 300g, foi de 33,48mg/dia de metformina e de 7,09mg/dia de orlistat (arredondado para 40 e 10mg/dia, respectivamente).

4.3.3 DILUIÇÕES

Cloridrato de metformina, comprimidos de 500mg, 10 comprimidos foram triturados e dissolvidos em água purificada (q.s.p.125ml) perfazendo uma concentração de 40 mg/mL, empregando o medicamento Glifage®500, Merck, (Rio de Janeiro, Brasil).

Orlistat, 10 cápsulas de 120mg foram abertas e o conteúdo disperso em 10ml de etanol PA e, em seguida em água purificada (q,s.p.120ml) perfazendo uma concentração de 10mg/mL, empregando o medicamento Orlipid®120, EMS Sigma Pharma, (São Paulo, Brasil).

Tanto a metformina quanto o orlistat foram diluídos semanalmente e armazenados sob refrigeração. (Figura 5)

A intervenção farmacológica foi administrada por agulha de gavagem 18GA, diâmetro 1,2mm, esfera 2,25mm, comprimento 38mm, Ciencor®, (São Paulo, Brasil), no volume de 1mL/dose única diária às 16 horas. (Figura 6)

Durante o experimento os animais receberam água tratada e ração, *ad libitum*.

Figura 5: Diluição



Fonte: A autora

Figura 6: Gavagem



Fonte: A autora

4.4 ATO OPERATÓRIO, COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO E EUTANÁSIA

No 84º. dia do experimento os 40 animais foram pesados, marcados e submetidos a cirurgia para coleta de sangue e órgãos. As cirurgias realizadas no laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UEPG pela equipe constituída por um cirurgião, auxiliar 1 e auxiliar 2. Auxiliar 2 para peso, acondicionamento e identificação das peças cirúrgicas.

O protocolo cirúrgico seguiu as seguintes etapas:

1-Anestesia intraperitoneal, utilizando Xilazina 2% (10mg/Kg de peso corporal) associada à Quetamina (40mg/Kg de peso corporal);

2-O animal em decúbito dorsal, fixado pelas patas na mesa cirúrgica;

3-Antissepsia com PVPI (iodopolvidine) e colocação de campo cirúrgico fenestrado;

4-Incisão cirúrgica paraesternal esquerda e abertura por planos até a cavidade pleural;

5-Exposição do coração.

6-Punção cardíaca com agulha n^o30x0,8mm e aspiração de aproximadamente 20ml de sangue;

7-Em seguida realizada eutanásia com injeção intraperitoneal de sobredose anestésica (quatro vezes a dose anestésica);

8-Incisão abdominal em “U”, sendo a base suprapúbica, e as laterais, seguindo pela parede anterolateral do abdome até rebordos costais para exposição da cavidade abdominal; (Figura 7)

Figura 7: Incisão em U para exposição da cavidade abdominal.



Fonte: A autora

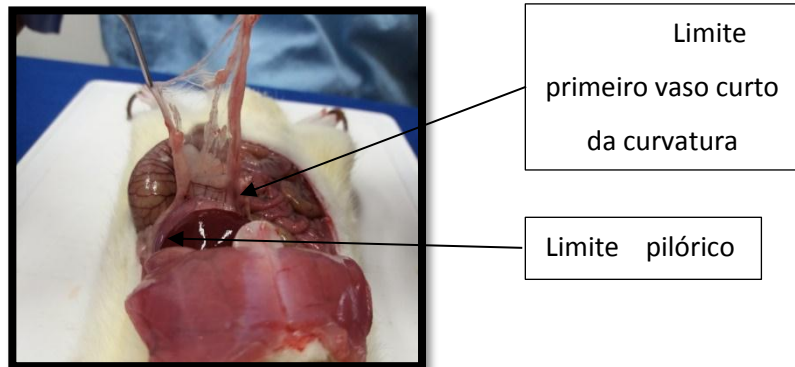
9-Secção dos arcos costais envolvidos, com ampla exposição das cavidades abdominal e torácica;

10-Registro fotográfico (câmera Sony dsc-w320, 14.1 megapixels, Okinauawa, Japan);

11-Dissecção e ressecção das gorduras: visceral omental, retroperitoneal e epididimal, seguido de pesagem em balança de precisão Shimadzu BL320 H (Kioto, Japão) e imediato acondicionamento em recipiente contendo solução de formol a 10% e identificados individualmente.

12-Ressecção do omento: A margem de ressecção foi delimitada com início no piloro terminando no primeiro vaso curto da grande curvatura gástrica. A ressecção foi realizada junto à grande curvatura gástrica; (Figura 8)

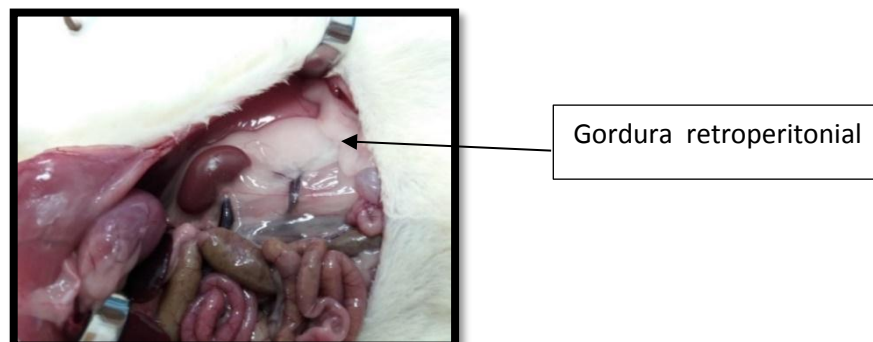
Figura 8: Ressecção do omento.



Fonte: A autora

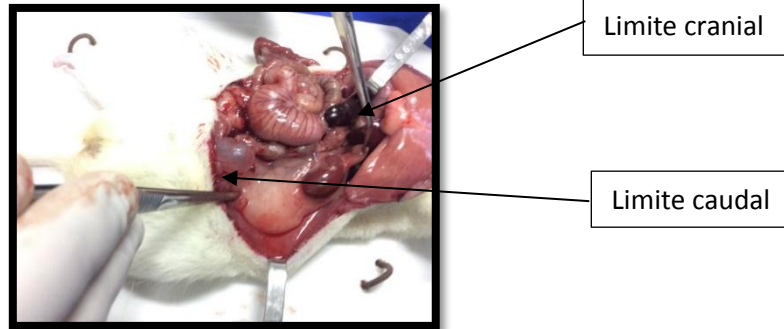
13-Ressecção da gordura retroperitoneal: A gordura retroperitoneal foi retirada tendo como limite cranial o polo cranial do rim e limite caudal a bifurcação dos vasos ilíacos. Retirada a gordura, ficaram expostos a bifurcação dos vasos ilíacos e a musculatura retroperitoneal; (Figuras 9, 10, 11 e 12)

Figura 9: Gordura retroperitoneal



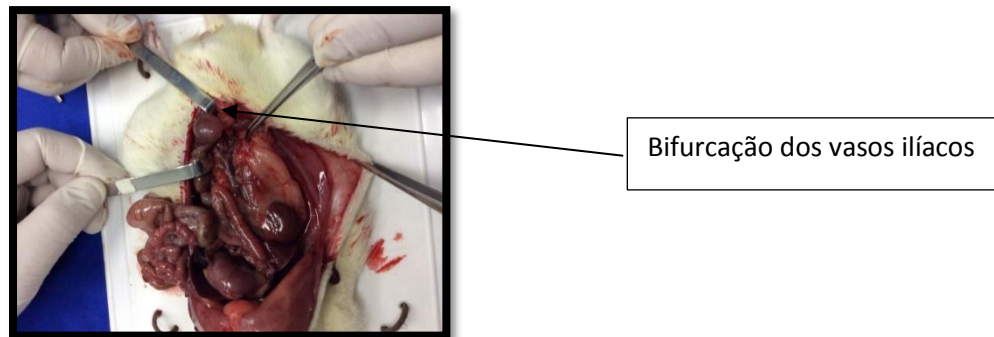
Fonte: A autora

Figura 10: Limites da gordura retroperitoneal



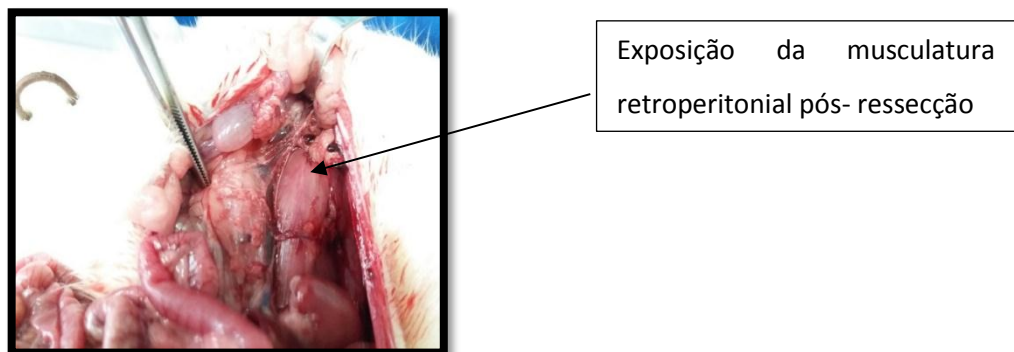
Fonte: A autora

Figura 11: exposição dos vasos ilíacos após remoção da gordura retroperitoneal



Fonte: A autora

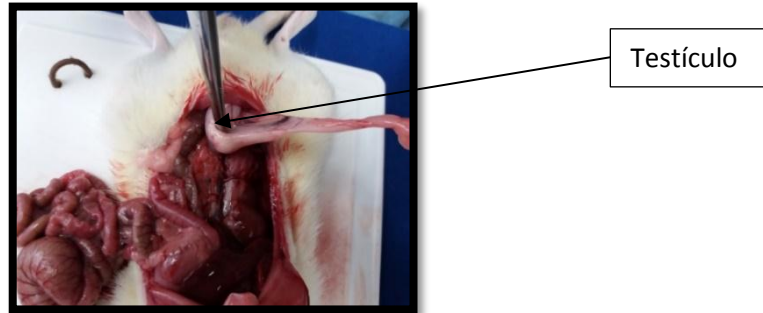
Figura 12: Exposição da musculatura retroperitoneal pós remoção da gordura



Fonte: A autora

14-Ressecção da gordura epididimal: A gordura epididimal é retirada tendo como limite o canal epididimal junto ao testículo. (Figura 13)

Figura 13: Ressecção da gordura epididimal



Fonte: A autora

4.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Todos os animais tiveram a glicemia capilar avaliada no primeiro dia do experimento, e após, semanalmente. Realizadas via caudal, empregando fitas reagentes do glicosímetro Freestyle® (Abbot laboratório, Alameda, Ca, USA).

O sangue coletado no 84^o dia (cerca de 10mL), por punção cardíaca, destinado a exames laboratoriais, realizados no Laboratório de Análises Clínicas da UEPG. Para dosagem de glicemia, triglicerídeos, colesterol total e HDL-colesterol foram usados tubos de ensaio sem aditivos e métodos enzimáticos automatizados.

4.6 MACROSCOPIA

Foi observado o acúmulo de gordura tanto subcutânea, quanto visceral, em cada grupo experimental. Embora a avaliação seja subjetiva, foi comparado os grupos e realizado registro fotográfico com câmera Sony, dsc-W320, (Okinauawa, Japan). (Figuras14 e 15)

Figura 14: grupo MM -
macroscopia



Fonte: A autora

Figura15: grupo DCM -
macroscopia



Fonte: A autora

4.7 MICROSCOPIA

4.7.1 PREPARO DO MATERIAL

As gorduras epididimal, retroperitoneal e omental, retiradas na totalidade viável, foram conservados em solução de formalina a 10% e encaminhados para o Laboratório de Anatomia Patológica de Ponta Grossa para exame anatomopatológico.

Os fragmentos para estudo escolhidos pelo patologista responsável pela análise, considerando aqueles de melhor integridade. Para a preparação das lâminas foi realizada a desidratação dos tecidos com álcool etílico, tratamento pelo xilol, impregnação e inclusão em blocos de parafina. A microtomia feita em cortes de seis micrômetros de espessura.

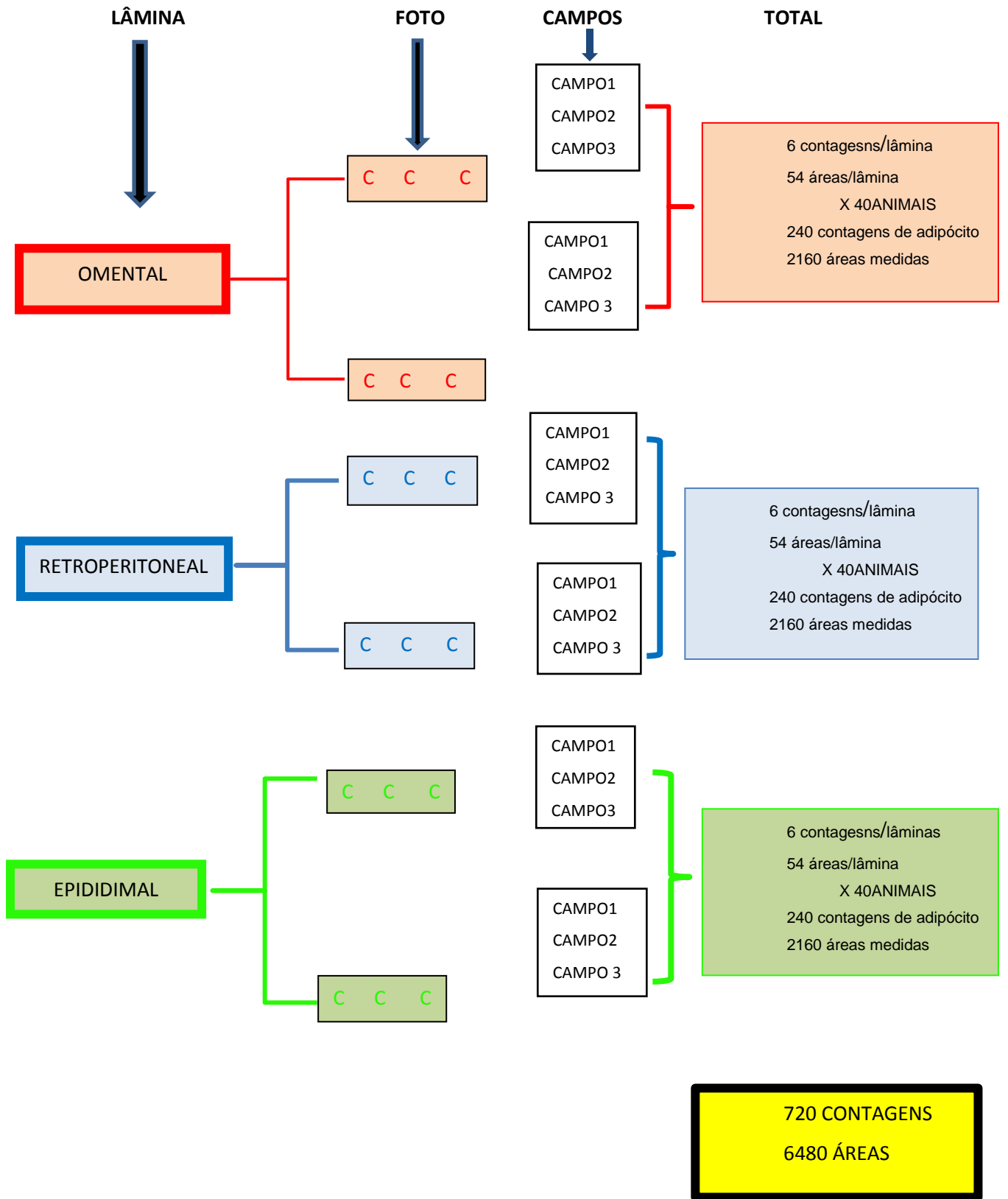
As secções foram estendidas em banho-maria e coladas em lâminas de vidro. A coloração utilizada foi pelo método hematoxilina-eosina.

4.8 HISTOMORFOMETRIA

O patologista selecionou lâminas para a documentação microfotográfica. Foram realizadas 2 microfotografias de cada lâmina, os campos foram selecionados quando estavam completos por adipócitos intactos na sua maior parte, foi usado intensidade de luz 3, a objetiva 4 foi usada para escolha do campo, e a objetiva 20 para a captura da imagem, o tempo de exposição de captura foi 500 μ s, *white balance*.

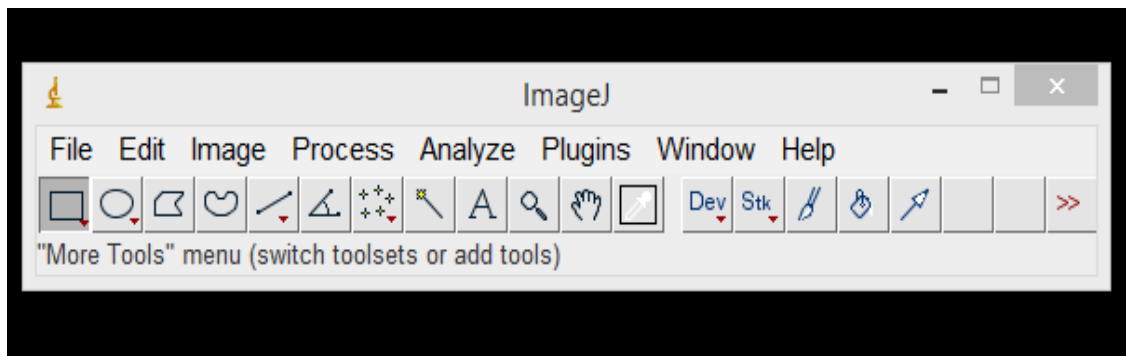
Foi analisado o número total de adipócitos por campo microfotográfico e a área de 9 células por campo. Em cada microfotografia foi escolhido 3 campos. Portanto em cada animal foi avaliado 6 vezes o número total de adipócitos omental, retroperitoneal e epididimal. E foi medido a área de 54 adipócitos da gordura omental, 54 adipócitos da gordura retroperitoneal e a área de 54 adipócitos da gordura epididimal, de cada animal. Perfazendo um total de 18 análises/animal do número de adipócitos e 162 análises/animal de área celular.

Figura 16: Fluxograma das avaliações das gorduras



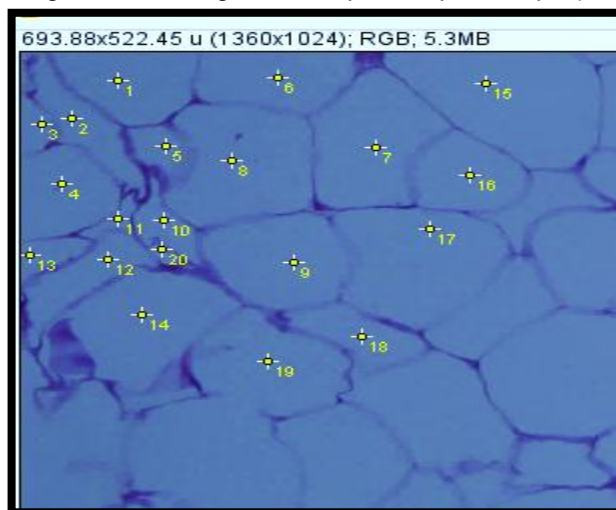
A histomorfometria foi realizada pelo programa ImageJ®, acesso livre (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), por um único pesquisador, sendo avaliado o número total de células adiposas por campo escolhido. Para a análise da área do adipócito, foi usado como critério, 9 células íntegras, 3 da primeira coluna a direita do campo, 3 da coluna central e 3 células íntegras da coluna a esquerda do campo fotográfico, foi usado o recurso de sobreposição de grade escalométrica, para que não houvesse escolha do pesquisador. Segundo Parlee et al., (2014) não existe diferença significativa da média de área de adipócitos quando se usa 3, 10, 100, 500 ou 1000 células para análise. (Figuras 17, 18 e 19)

Figura 17: Processamento e análise de imagens em JAVA



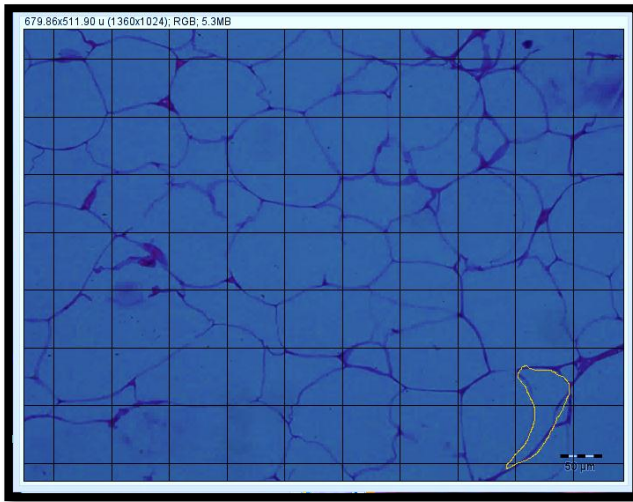
Fonte: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>

Figura 18: contagem de adipócitos por campo (ImageJ)



Fonte: A autora

Figura 19: Grade escalométrica para auxiliar o uso do critério para medida da área do adipócito



Fonte: A autora

Em cada lâmina de tecido adiposo foram feitas 2 imagens com o fotomicroscópio (Olympus AX-70) disponível no laboratório de histologia, do departamento de odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, 3 campos foram selecionados de cada foto para análise, sendo que cada animal teve as 3 amostras de tecido adiposo (epididimal, omental e retroperitoneal), perfazendo um total de 54 áreas de adipócitos/animal/gordura e 6 contagens de número de adipócitos/animal/gordura. A análise final resultou da avaliação de 6480 áreas de adipócitos e 720 campos com contagem do número total de adipócitos.

A histomorfometria foi realizada por um único pesquisador. Outro participante do trabalho fez o mascaramento das fotografias, para a avaliação cega, visando minimizar ou afastar comportamentos tendenciosos do pesquisador. Após análise histomorfométrica dos campos, foi feita a decodificação do mascaramento.

4.9 VARIÁVEIS ANALISADAS

As variáveis avaliadas foram: peso, glicemias capilares semanais, exames bioquímicos no final do experimento (triglicérides, colesterol total e colesterol- HDL) e os tecidos adiposos retroperitoneal, omental e epididimal, (morfometria e contagem de adipócitos).

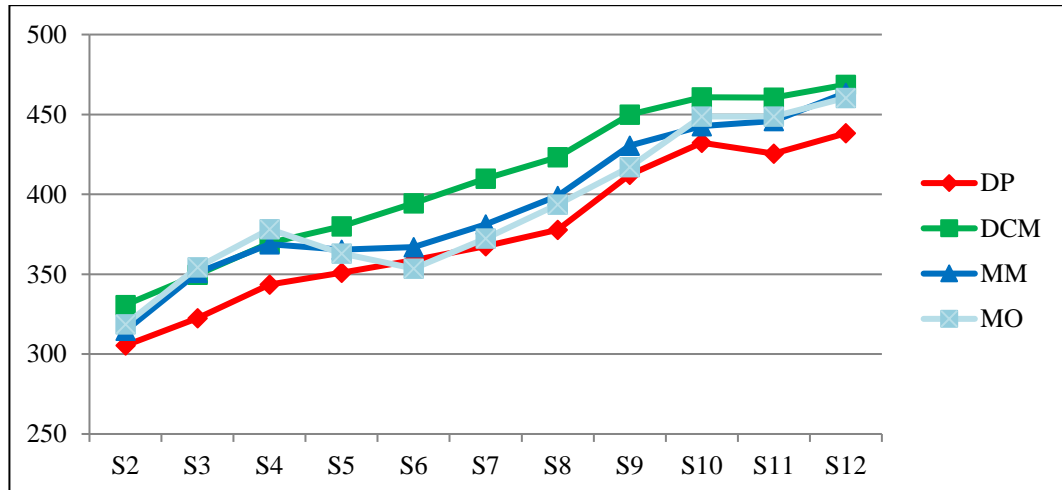
4.9.1 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para análise deste estudo analítico intervencionista, foi usado o programa IBM *SPSS statistics* 20 ®. Após a avaliação da normalidade dos dados, com variáveis quantitativas contínuas foi utilizado o teste ANOVA. Para análises comparativas das variáveis foi feito o teste de comparação múltipla de Dunnett. Foi definido como estatisticamente significativo um $p < 0,05$. As variáveis foram apresentadas por média e desvio-padrão.

5 RESULTADOS

Na análise estatística dos pesos, os animais do grupo DCM tiveram média de peso superior aos demais grupos nas semanas 6, 7 e 8 ($p=0,036$), nas demais semanas todos os grupos mantiveram pesos sem diferença estatística ($p=0,06$). O gráfico 2 apresenta a evolução das médias de peso durante o experimento.

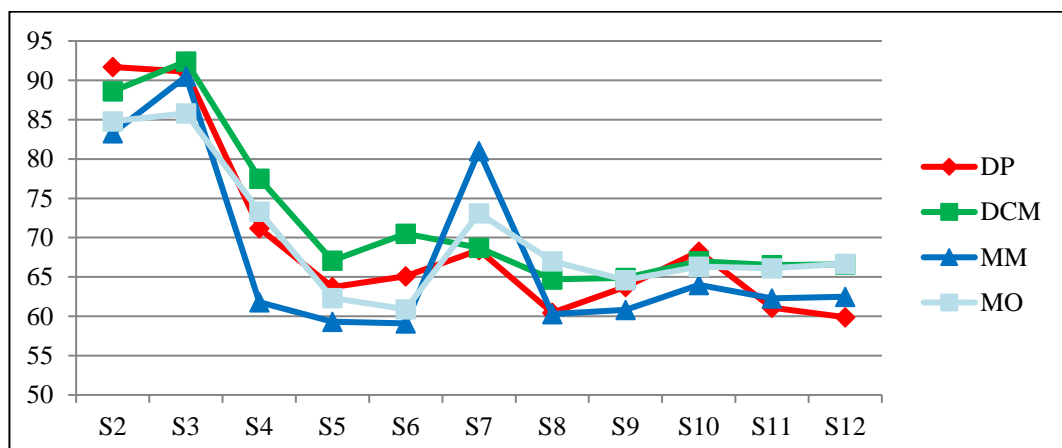
Gráfico 2: Evolução das médias de peso dos grupos



Peso em gramas; S=Semana; $p=0,06$

As médias de glicemias capilares mantiveram-se semelhantes durante toda a avaliação ($p>0,05$), exceto na semana 7 que o grupo MM apresentou uma glicemia maior que os demais ($p<0,05$). Observou-se redução na média das glicemias capilares, em todos os grupos de animais da terceira à quinta semana, após este período ocorreu um discreto aumento, não estatisticamente significativo, que se manteve até o final do experimento.

Gráfico 3: Média das glicemias capilares por semana



. (média de glicemias capilares em mg/dl; S=Semana; $p=0,26$).

O consumo de ração foi avaliado a cada semana e comparado entre os grupos. A tabela 1 mostra a média do aumento no consumo de ração por semana. O grupo DP apresentou aumento de consumo de ração estatisticamente significativo ($p > 0,001$) quando comparado aos grupos que receberam dieta de cafeteria modificada.

Tabela 1: Médias do aumento do consumo de ração.

Grupo	Consumo em Gramas ($p < 0,001$)
DP	23,67 ^a
DCM	17,11 ^b
MM	16,56 ^b
MO	16,56 ^b

Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística ($P < 0,01$).

Quanto aos parâmetros bioquímicos, obtidos no final do experimento, a tabela 2 mostra que não houve diferença entre os grupos.

Tabela 2: Parâmetros bioquímicos no final do experimento.

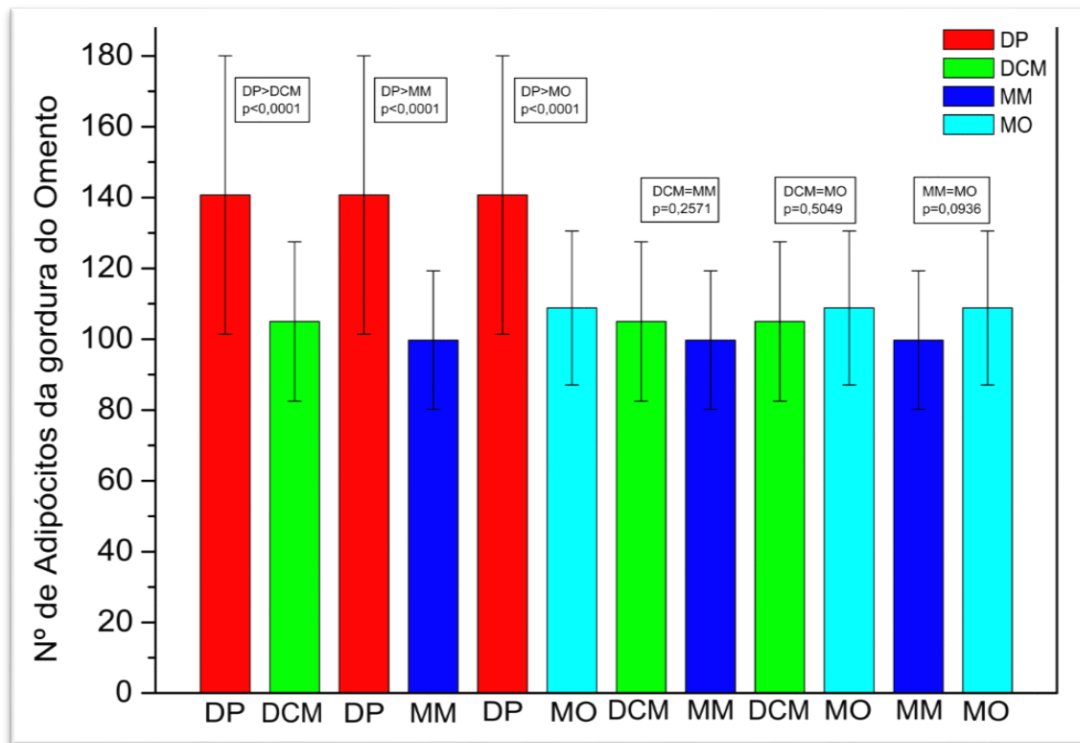
Grupo	Triglicerídeos (mg/dl) $p=0,082$	Colesterol total (mg/dl) $p=0,193$	HDL-colesterol (mg/dl) $p=0,127$
DP	160 ± (76,823)	108,22 ± (30,634)	59,111 ± (18,805)
DCM	125,2 ± (42,536)	120,4 ± (36,987)	62,6 ± (15,82)
MM	157,2 ± (60,545)	95,3 ± (34,242)	50,2 ± (16,811)
MO	137,8 ± (55,763)	100,2 ± (20,794)	51,6 ± (13,591)

Quanto a gordura visceral, a análise da média do número de adipócitos indica se ocorreu hiperplasia, enquanto a média das áreas mostra se houve hipertrofia adipocitária.

Na gordura omental, os resultados obtidos tanto para média de número, quanto para média das áreas, foram estatisticamente significativos com um $p < 0,001$.

O grupo DP foi o que apresentou maior média do número de adipócitos comparado aos outros grupos. O grupo DCM teve a média do número de adipócitos semelhante aos dois grupos com intervenção terapêutica (MM e MO). O grupo com dieta padrão foi o que teve maior hiperplasia na gordura omental (Gráfico 4).

Gráfico 4: Gordura omental - média do número de adipócitos (comparação entre os grupos).

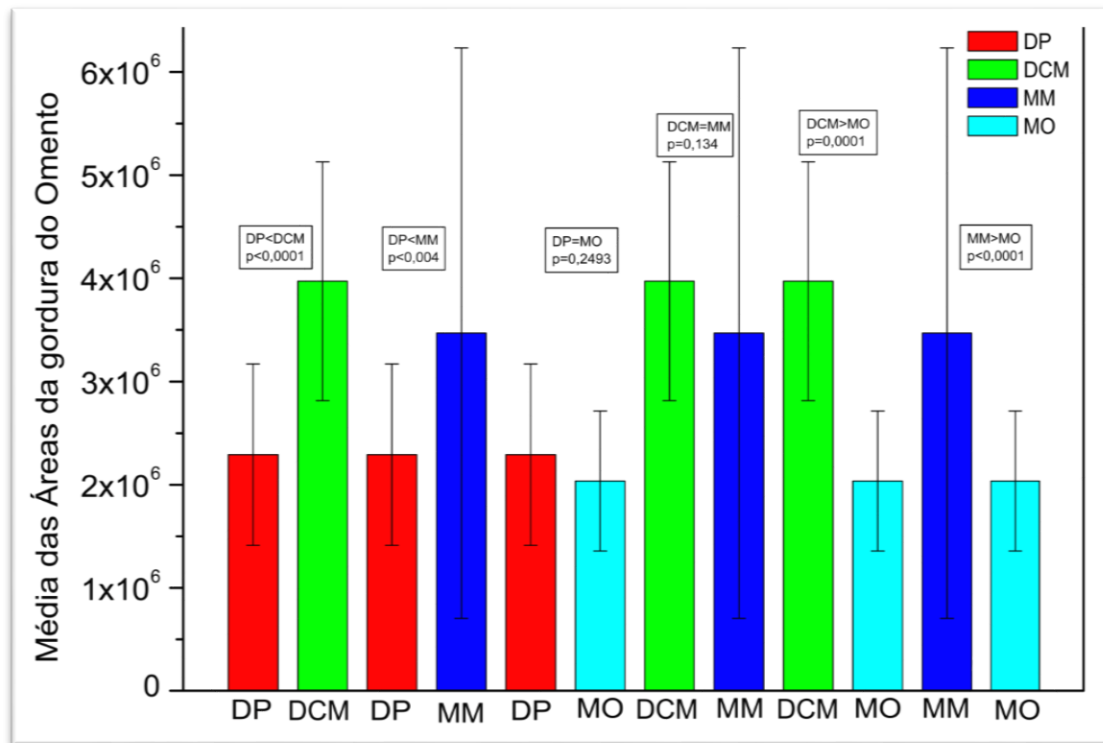


Número de adipócitos/campo microscópico. DP(dieta padrão); DCM(dieta de cafeteria modificada); MM(DCM+metformina); MO(DCM+orlistat).

Na gordura omental, a análise das médias das áreas revelou que o grupo DP foi semelhante ao grupo MO, e ambos foram menores que os grupos DCM e MM. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos DP e MO, nem entre os grupos DCM e MM.

Houve aumento da média das áreas nos grupos DCM e MM. A metformina não preveniu hipertrofia na gordura omental. O orlistat preveniu a hipertrofia na gordura omental (Gráfico 5).

Gráfico 5: Gordura omental – média das áreas dos adipócitos (comparação entre os grupos)

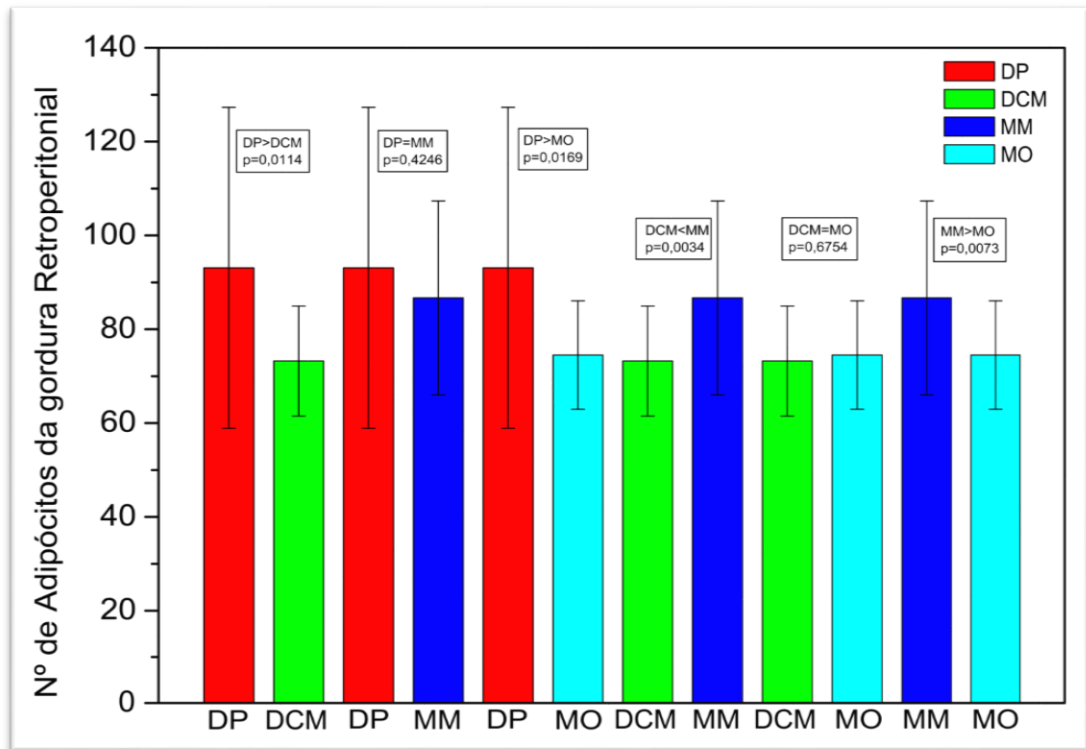


Média das áreas dos adipócitos em μm^2 . DP(dieta padrão); DCM(dieta de cafeteria modificada); MM(DCM+metformina); MO(DCM+orlistat).

Na avaliação da gordura retroperitoneal houve maior diferença estatisticamente significativa na análise das médias de áreas ($p < 0,001$) do que na média do número de adipócitos ($p < 0,05$).

Observa-se que a média do número de adipócitos foi semelhante nos grupos DP e MM e nos grupos DCM e MO, e que nos dois primeiros ocorreu maior hiperplasia da gordura retroperitoneal (Gráfico 6).

Gráfico 6: gordura retroperitoneal – média do numero de adipócitos (comparação entre os grupos)

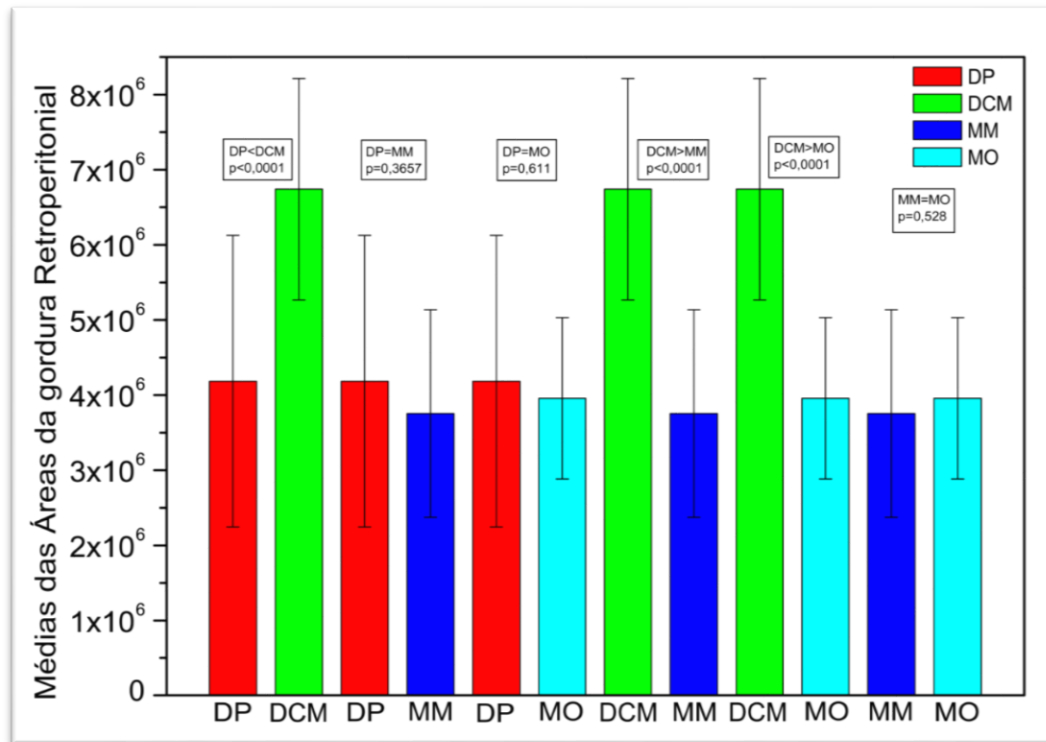


Número de adipócitos/campo microscópico. DP(dieta padrão); DCM(dieta de cafeteria modificada); MM(DCM+metformina); MO(DCM+orlistat)

Quando a média das áreas da gordura retroperitoneal são analisadas observa-se claramente que no grupo da dieta de cafeteria modificada (DCM) ocorreu hipertrofia estatisticamente significativa ($p < 0,001$), quando comparada com os outros três grupos.

Verifica-se que os grupos com intervenção terapêutica tiveram prevenção de hipertrofia de adipócitos na gordura retroperitoneal, DP=MM=MO (Gráfico 7).

Gráfico 7: gordura retroperitoneal – média das áreas dos adipócitos (comparação entre os grupos)

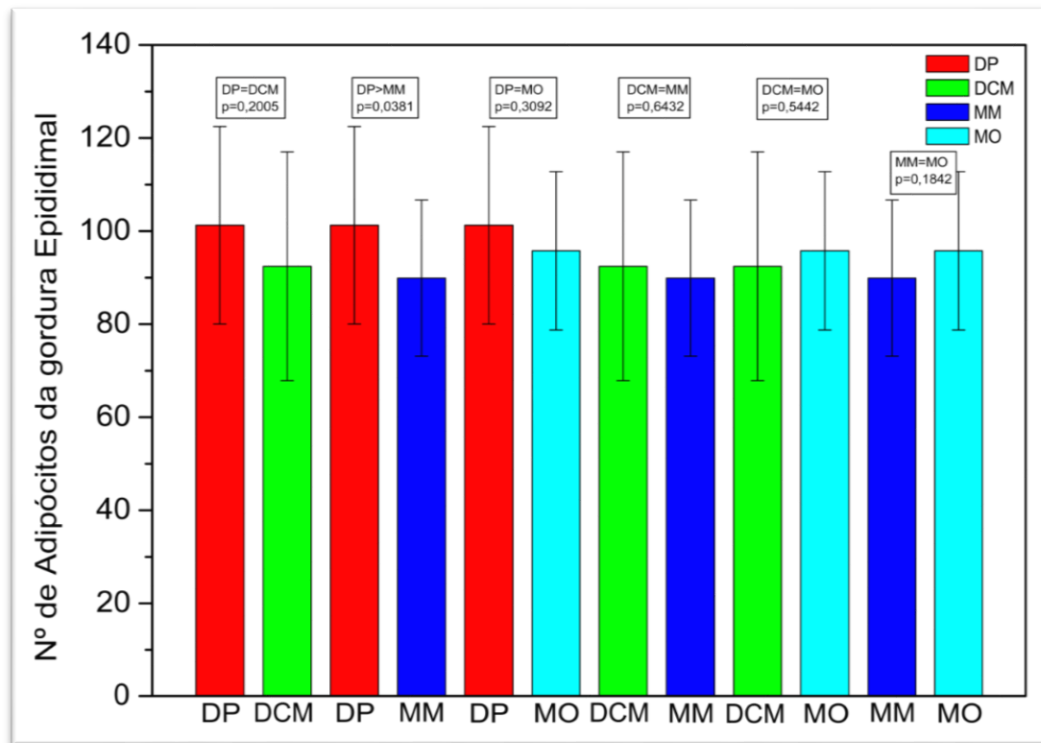


Média das áreas dos adipócitos em μm^2 . DP(dieta padrão); DCM(dieta de cafeteria modificada); MM(DCM+metformina); MO(DCM+orlistat).

A gordura epididimal foi a que teve os maiores valores de p ($p>0,05$), tanto para a média do número, quanto para a média de áreas de adipócitos, mostrando que esta não é a melhor escolha para avaliar a efetividade de intervenção precoce.

Quanto à análise de hiperplasia de adipócitos, esta ocorreu em todos os grupos. Na comparação entre os grupos ocorreu significância estatística apenas entre DP e MM (Gráfico 8).

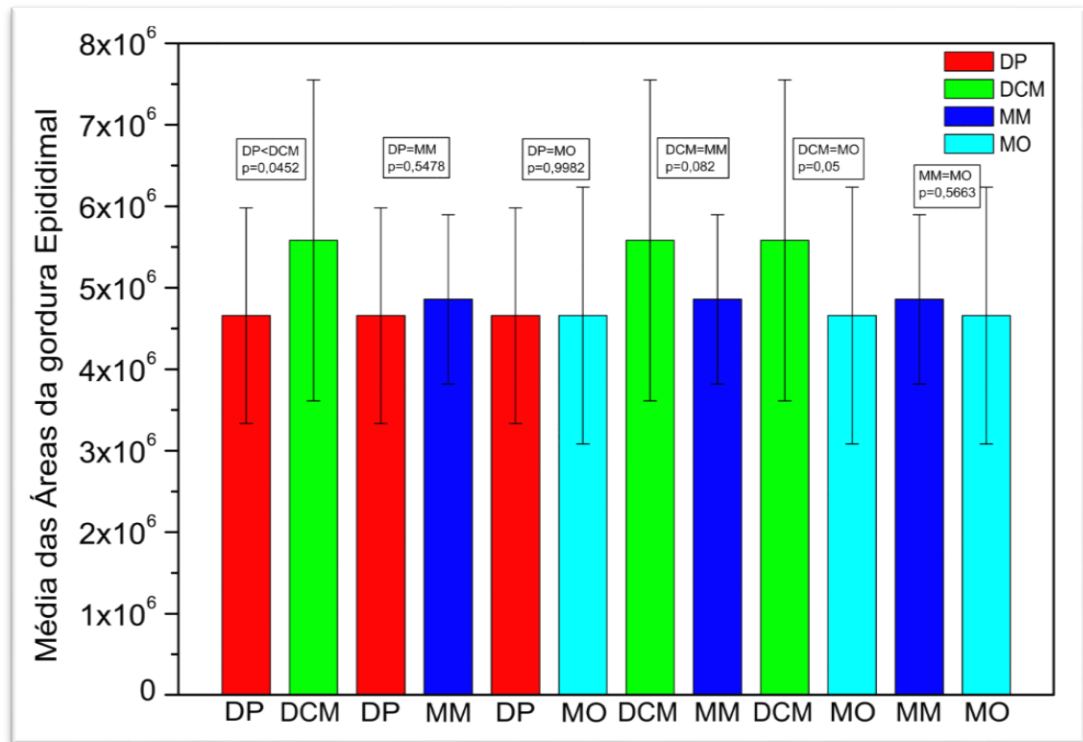
Gráfico 8: gordura epididimal – média do número de adipócitos (comparação entre os grupos)



Número de adipócitos/campo microscópico. DP(dieta padrão); DCM(dieta de cafeteria modificada); MM(DCM+metformina); MO(DCM+orlistat).

Em relação à média das áreas na gordura epididimal o grupo DCM, sem intervenção terapêutica, apresentou maior hipertrofia ($p < 0,05$) que os outros grupos, a gordura epididimal foi a que mostrou a menor diferença entre os grupos, porém sua análise colaborou para afirmar que a terapia medicamentosa previne a hipertrofia de adipócitos (Gráfico 9).

Gráfico 9: Gordura epididimal – média das áreas dos adipócitos (comparação entre os grupos)



Média das áreas dos adipócitos em μm^2 . DP(dieta padrão); DCM(dieta de cafeteria modificada); MM(DCM+metformina); MO(DCM+orlistat).

6 DISCUSSÃO

O efeito do uso precoce da metformina ou orlistat na prevenção de disfunção de adipócitos em ratos wistar submetidos à dieta hiperglicídica-hiperlipídica, é uma pesquisa experimental, desenvolvida com base na interlocução interdisciplinar, voltada para prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, relacionadas à fisiologia alterada das células adiposas.

Muitos processos fisiologicamente relevantes de remodelagem do tecido adiposo no ser humano podem ser estudados em modelos de roedores, com a vantagem de que tanto para o processo de expansão como de redução do tecido adiposo, os fenômenos ocorrem extremamente rápido. Um dia de jejum em um rato está associado com uma grande perda de tecido adiposo por um processo de remodelagem agudo, que envolve uma infiltração rápida de macrófagos. Por outro lado, a exposição a uma dieta rica em gorduras por dois dias pode causar um aumento imediato no tamanho dos adipócitos. Sendo assim, este é o modelo ideal para o estudo da expansão e redução do tecido adiposo (SUN et al., 2011).

A pesquisa consistiu de 40 ratos, albinos, da raça wistar, adultos que foram randomizados em quatro grupos experimentais: DP (animais que receberam ração comercial balanceada normocalórica), DCM (animais com a dieta de cafeteria modificada), MM (dieta de cafeteria modificada com metformina) e MO (ração modificada e orlistat), e teve duração de doze semanas.

A definição do tamanho da amostra foi calculada para uma força de 95% e resultou em N=7 animais. Foi acrescido de 30% para eventualidade de perdas de animais durante a pesquisa, como no exemplo de Ballaestri et al., (2015). Ocorreu o óbito de 2 animais, um do grupo DP na quarta semana, e um do grupo MO na oitava semana, atribuídas ao acaso, e que não alteraram os resultados obtidos.

Na randomização, onde todos os animais participantes do estudo, tanto do grupo controle, quanto dos grupos de intervenções, têm chances iguais de serem alocados, pois isto evita viés de seleção, já que todos os grupos iniciam a pesquisa em condições equivalentes (Ferreira, 2016). Nesta pesquisa todos os animais, ratos wistar, eram machos adultos e iniciaram o experimento pesando entre 300 e 350g.

Os animais foram alocados em quatro grupos, compostos por 10 animais, sendo 1 grupo controle para os padrões fisiológicos para idade, que receberam dieta padrão comercial (DP), *ab libitum*, por 84 dias; o grupo DCM foi o grupo controle para idade dos animais submetidos à dieta de cafeteria modificada; e dois grupos

receberam intervenção terapêutica a partir do décimo quinto dia, que além da ração modificada receberam a metformina ou o orlistat, MM e MO, respectivamente.

A dieta de cafeteria convencional é hiperglicídica e hipercalórica, altamente palatável e oferecida por ciclos semanais de alimentos ricos em carboidratos e lipídeos, processados e ultra processados (PINTO JUNIOR, 2012). Entre os alimentos que podem compor este tipo de dieta estão: chocolates, bolacha maisena, bolachas recheadas, leite condensado, refrigerantes, *bacon*, salchicha, queijos, entre outros (VANEZELA et al., 2010). Com estas dietas ocorre um aumento da gordura visceral e diminuição da sensibilidade insulínica, e ainda promovem hiperfagia. Estas alterações começam a ocorrer em um prazo, que varia na literatura, de 14 a 20 semanas (SAMPLEY et al., 2011).

Neste experimento usamos a dieta, chamada por Nascimento (2006), de *Plus*, que é composta por dieta padrão comercial normocalórica, associada com amendoim torrado, óleo de milho, achocolatado, bolacha maisena e caseína. Foi mostrado um aumento visível na quantidade de gordura visceral em apenas 30 dias de uso maior do que em 60 dias do uso de dieta de cafeteria convencional (TOMAZI, 2008). Segundo Marques et al., (2015) a dieta *plus*, que foi denominada de dieta de cafeteria modificada nesta pesquisa, promove a síndrome metabólica em 8 a 9 semanas.

A intenção foi avaliar se a intervenção terapêutica precoce seria capaz de evitar ou atenuar o desenvolvimento de alguns dos eventos da SM, principalmente o ganho de peso e a disfunção adipocitária, em indivíduos de risco. Como com a DCM a SM é induzida em 8 a 10 semanas (THAMER, 2014), os fármacos foram adicionados no décimo quinto dia do início da dieta.

A metformina e o orlistat foram escolhidos por já apresentarem trabalhos mostrando suas eficácias na evolução da SM (ZHON GHUA et al., 2011; GOLDBERG et al., 2013; MONGUL, 2016). As doses dos medicamentos foram calculadas pelo método da extrapolação alométrica interespecífica, que é baseada na taxa metabólica basal do animal alvo (rato wistar) e na taxa metabólica basal do animal modelo (homem de 80Kg). A qual vem sendo usada por alguns pesquisadores, como Davanço (2013) e Garber (2015). As doses calculadas e usadas foram de 40mg/dia de metformina e de 10mg/dia de orlistat, em dose única diária.

Para a metformina, na maioria dos trabalhos, as doses variam de 50 a 500mg/Kg. Os efeitos na ativação da AMPK são dose-dependente, e doses menores que 100mg/Kg já atuam nos efeitos vinculados a AMPK (HOWEL et al., 2016). Neste experimento foi usado 125mg/Kg de metformina, que equivale a 39mg/mL para um animal de 300g (na diluição 1mL=40mg).

Para o orlistat a dose usual na literatura é 400mg/Kg (AZADBA KHT; GOJANI; HEIRAD-BENI, 2015). Em uma pesquisa realizada por Garcia et al., (2006) se obteve resultados positivos com uma dosagem de 200mg/Kg. E em 2017, Munazza Murtaza et al., relatou que com 50mg/Kg, conseguiu melhora metabólica em animais com SM e intolerância à glicose. Esta pesquisa usou 33,3mg/Kg, que equivale a 10mg/mL.

A dieta de cafeteria usada (DCM), resultou em um padrão de alimentação divergente do encontrado na literatura. A dieta de cafeteria americana clássica, assim como outras dietas hiperglicídica-hiperlipídicas apresentam um efeito hiperfágico, com aumento do consumo de ração (BALLAESTRI et al., 2015). Ocorreu redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no consumo de ração pelos grupos submetidos a DCM quando comparado com o grupo que consumiu dieta padrão, independentemente de ter ou não intervenção farmacológica.

Alguns tipos de dieta para induzir SM em ratos usam caseína em sua composição, por ser uma proteína de alta qualidade e com estabilidade térmica, que garante adequadas condições de processamento e armazenamento (NASCIMENTO, 2008; SILVA et al., 2010). A caseína é rica em cálcio, fósforo e aminoácidos essenciais, histidina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, tirosina e valina, com grande importância metabólica e imunológica. Existe dois tipos de caseínas com fins dietéticos, a forma hidrolisada e a forma micelar. Na DCM foi usado caseína micelar. Quando em contato com o ambiente ácido do estômago, a caseína micelar coagula, formando uma espécie de gel, isto faz com que os aminoácidos sejam liberados mais lentamente para a circulação sanguínea e promove uma sensação de saciedade. Estes efeitos da caseína micelar resultam em uma menor elevação da insulina pós-prandial, redução dos níveis de triacilglicerol pós-prandial, além de que está associada com inibição da dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV) e da α -glucosidade, aumentando o efeito incretínico pelo GLP-1 (peptídeo glucagon *like*-1) e pelo GIP (peptídeo inibitório gástrico), respectivamente (FEKETE;

GIVENS; LOVEGROVE, 2016). O efeito sacietógeno da DCM, que foi demonstrado pelo menor consumo de ração, provavelmente se dá por este mecanismo.

Nesta pesquisa, a análise estatística das médias de peso dos animais por grupos, mostrou que o grupo DCM teve média superior aos demais, somente na sexta, sétima e oitava semana ($p < 0,05$), e no restante do tempo os grupos mantiveram pesos estatisticamente iguais. O mesmo resultado foi obtido nos trabalhos de Pastori, (2010) e de Marques et al., (2015), que relataram aumento visível da gordura visceral dos animais alimentados com esta dieta, em poucas semanas, sem diferença significativa de peso, em relação aos animais que usaram a dieta padrão.

Quanto à média das glicemias capilares não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos durante toda avaliação, exceto na sétima semana que o grupo MM apresentou médias glicêmicas maiores ($p < 0,05$), porém foi um achado isolado, que não se repetiu durante todo o estudo, e atribuída a uma eventual condição estressante neste grupo, não percebida pelos pesquisadores. Quanto aos parâmetros bioquímicos, o estudo também não apresentou diferenças estatisticamente significativa entre os grupos, também podendo ser atribuído aos efeitos protetores da caseína. Os resultados são semelhantes aos estudos de Marques e de Pastori, porém divergem do estudo de Nascimento (2006), que em 14 semanas de tratamento com a dieta acarretou elevação da glicemia, dos triglicerídeos e diminuição do HDL-colesterol. No estudo de Thomazi, (2008) também não houve diferença significativa de triglicerídeos com 30 dias de dieta de cafeteria com caseína.

A contagem do número de adipócitos nas gorduras revelou que ocorreu hiperplasia em todos os grupos ($p < 0,001$). O grupo que recebeu DP foi o que apresentou maior índice de hiperplasia de adipócitos, o que foi extremamente significativo nas gorduras omental e retroperitoneal, quando comparado com DCM, ($p = 0,00071$ e $p = 0,00119$, respectivamente). Na gordura epididimal não houve diferença estatisticamente significativa, quando comparados os números de adipócitos nos quatro grupos ($p = 0,2005$). Este resultado é o esperado no processo natural de envelhecimento, quando ocorre uma diminuição progressiva do tecido adiposo marrom e aumento do tecido adiposo branco, processo conhecido como plasticidade do tecido adiposo (BADIMON; CUBEDO, 2017). O fato da hiperplasia

ser maior no grupo DP, deve-se ao efeito sacietógeno da DCM, que é comprovado quando se compara o consumo de ração ao longo do experimento.

Quanto à média das áreas houve aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no grupo que recebeu DCM, em todas as gorduras analisadas, porém foi extremamente significativo na gordura omental e na retroperitoneal ($p < 0,001$), quando comparado aos outros grupos. Na gordura omental o aumento da média das áreas dos adipócitos foi maior nos grupos DCM e MM. Quando comparado o grupo de DP com os grupos DCM, MM e MO foi obtido $p < 0,0001$, $p = 0,0004$ e $p = 0,2493$, respectivamente. Quando comparado DCM e MM obteve-se $p = 0,134$. Portanto a intervenção com metformina não preveniu hiperplasia de adipócitos na gordura omental, mas na intervenção com orlistat teve efeito benéfico. Já nas gorduras retroperitoneal e epididimal, ambos os fármacos se mostraram eficazes, com maior significância estatística na primeira ($p < 0,0001$). Não houve diferença na média das áreas entre os grupos DP, MM e MO ($P > 0,05$) nas duas gorduras. Quando se compara a dieta padrão com a dieta de cafeteria modificada, $p = 0,0113$ na gordura retroperitoneal e $p < 0,001$ na gordura epididimal.

Os resultados mostraram que todos os grupos apresentaram hiperplasia, que seria a “gordura saudável”, porém a hipertrofia de adipócitos, que é associada com resistência insulínica, ocorreu no grupo da dieta de cafeteria modificada em todas as gorduras analisadas, sendo mais evidente na omental e na retroperitoneal. No grupo que recebeu metformina houve prevenção da hipertrofia nas gorduras retroperitoneal e epididimal, porém não preveniu na gordura omental. Já no grupo que recebeu orlistat, ocorreu prevenção de hipertrofia adipocitária nas três gorduras analisadas. A avaliação morfométrica das gorduras retroperitoneal e epididimal foi semelhante nos grupos DP, MM e MO.

Esta pesquisa mostrou que a intervenção precoce, mesmo com doses baixas de metformina e orlistat, em dose única diária, pode prevenir a disfunção adipocitária em indivíduos de risco para desenvolver a SM.

É interessante considerar que o efeito destes fármacos é dose-dependente, e dependendo do momento da intervenção na história natural da síndrome metabólica, as doses devem ser modificadas. Quando a metformina e o Orlistat são usados para tratar diabetes mellitus e obesidade, respectivamente, as doses efetivas são altas. Quando estes fármacos são utilizados para prevenção destas doenças, em indivíduos com SM, as doses são empíricas, com grande variação na literatura, mas

grande parte dos estudos usam doses semelhantes às usadas para tratamento. E esta pesquisa mostrou que para prevenção de resistência insulínica, doses baixas e utilizadas uma vez ao dia, são eficazes.

Segundo Howel et al., (2016), a metformina em doses menores que 100mg/Kg é capaz de inibir o complexo 1 mitocondrial, ativar a AMPK, e consequentemente levar a efeitos metabólicos e respostas terapêuticas ligadas a esta via.

Quanto ao orlistat, a maior parte da dose usada não é absorvida e age inibindo a lipase intestinal, porém a pequena quantidade absorvida inibe a ação da ácido graxo sintetase, pela acetil coenzima A e malonil coenzima A, resultando em uma diminuição da concentração da glutatona e da serotonina. Mesmo em pequenas doses, pode levar a redução da atividade do sistema de defesa pelo estresse oxidativo. Estas alterações levam a um enfraquecimento do sistema imune (AZADBAKTH, GOJANI, HEIRADI-BENI, 2015).

Optou-se por dose única diária, uma vez que os indivíduos eram saudáveis, e que o objetivo era avaliar a prevenção da SM, e extrapolando para a utilização em seres humanos, esta facilidade posológica seria de importância na adesão à medicação. O uso destes fármacos em indivíduos suscetíveis a desenvolver SM, doses menores que as habituais podem intervir positivamente na prevenção da disfunção de adipócitos, que é a etapa inicial e determinante das doenças crônicas não transmissíveis relacionadas à resistência insulínica. Os indivíduos com risco de desenvolver SM são aqueles que tem história familiar de DM2, obesidade, DACV, hipertrigliceridemia, macrossomia fetal ou síndrome dos ovários policísticos, e também aqueles indivíduos sedentários e com hábitos alimentares inadequados.

Este estudo demonstrou que pode ser possível a prevenção da SM, porém são necessárias mais pesquisas quanto as doses dos fármacos a serem utilizados e o momento de início da intervenção.

7 CONCLUSÃO

Esta pesquisa interdisciplinar mostrou que o uso precoce de baixas doses de metformina e de orlistat é capaz de prevenir a disfunção de adipócitos na gordura visceral de ratos wistar, submetidos a condições de excesso energético. O uso destes fármacos não alterou o peso, os parâmetros bioquímicos e nem foi capaz de evitar hiperplasia adipocitária dos animais, mas mostrou um efeito positivo na prevenção de hipertrofia dos adipócitos.

REFERÊNCIAS

- ANDRESSON, D.P.; HOGGLING, E.D. THORELL, A.; QVISTH, V. ET AL. Changes in subcutaneous fat cell volume and insulin sensitivity after weight loss. **Diabetes Care**, vol. 37, p.1831-1836, 2014.
- ANGELOVA, P.; BOYADYEEV, N. A. Review on The Models of Obesity and Metabolic Syndrome in rats. **Trakia Journal of Sciences**, n. 1, p. 5-12, 2013.
- AUBERVAL, N.; DAL, S.; DIETIGER, W.; JEANDIDIER, N.; PEDRACINI, E.M.; KERTH, V.S.; SIGRIST, S. Metabolic and Oxidative Stress Markers in Wistar Rats After 2 Months on a High-Fat Diet. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, DOI10.1186/1758-5996-6-130,2014. <http://www.dmsjournal.com/content/6/1/130>,>acessado em 08/10/2015.
- AVOGARO, P.; CREPALDI, G.; Essential Hyperlipidemia, Obesity and Diabetes. **Diabetologia**, vol. 1, p.137, 1965.
- AZADBAKHT, L.; JAMALI-GOJANI, Z.; HEIDDARI-BENI, M. Anti-Obesity drug orlistat (Xenical) is a novel antitumor medication. **Shiraz E-Medical Journal**, v. 16 (1), 2015. DOI:10.17795/semj26242, <http://dx.doi.org/10.17795/semj26242> >acessado em 11/12/2017.
- BADIMON, L.; CUBEDO, J. Adipose tissue depots and inflammation: effects on plasticity and resident mesenchymal stem cell function. **Cardiovascular Research**, vol.113, p.1064-1073, 2017.
- BALLESTERI, E.; MARCON, I. F.; TAVARES, R. G. Comparação de Modelos de Indução da Síndrome Metabólica: Dieta com Excesso de Frutose e Dieta Hiperlipidêmica. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, vol. 9 p. 96-104, 2015.
- BRAY, G. A.; Medical Consequences of Obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89: p. 2583-9, jun., 2004.
- CILDIR, G.; AKINCILAR, S.C.; TERGAONKAR, V. Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. **Trends in Molecular Medicine**, vol.19, p.487-500, 2013.
- CINTI,S.; MITCHELL,G.; BARBATELLI,G.; MURANO,I.; CERESI,E. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **The Journal of Lipid Research**, vol.46, p. 2347-2355,2005
- COELHO, M.; OLIVEIRA, T.; FERNANDES, R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. **Archives Medical Science**, vol. 9, p. 191-200, 2013.

DAVANÇO, M. G. Farmacocinética pré-clínica e hematoxicidade de Phe-Ala-PQ – pró-fármaco de primaquina. 2013. 87 f., 2013. Em <http://hdl.handle.net/114449/118847> >acessado em 15/10/2017.

DEBOER, D. M.; GURKA, M. J. Clinical utility of metabolic syndrome severity scores: considerations for practitioners. **Diabetes Metabolism Syndrome Obesity**, vol.10, p. 65-72, 2017.

DEFRONZO, R. A.; ELTON, R.; GHANI, M. A. Pathophysiologic Approach to Therapy in Patients with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, vol. 36, p. 127-138, 2013.

DEROSA, G.; MAFFIOLI, P.; SAHEBKAR, A. Improvement of plasma adiponectin, leptin and C-reactive protein concentrations by orlistat: a systematic review and meta-analysis. **British Journal Clinical Pharmacology**, vol.81, p.819-834. (2016).

DIAS,F.C. uso de software ImageJ para análise quantitativa de imagens de microestruturas de materias. **Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais**, 2008. Em: <http://urlibr.nrt/sid.inpe.br/mtc-m17@80/2008/04.30.20.23> >acessado em 10/02/18.

DRYDEN,I.; MARDIA,K.V. The statistical analylis of shape data. **Biometrika**, vol.76, p.271-281, 1988.

FOX,S.B.; HARRIS,A.L. Histological quantitation of tumour angiogenesis. **APMIS**, vol.112, p.413-430, 2004.

FEKETE, Á. A.; GIVENS, D. I.; LOVEGROVE, J. A. Can milk proteins be a useful tool in the management of cardiometabolic health? An updated review of human intervention trials. **Proceedings of the Nutrition Society**, vol. 75, p. 328-341, 2016.

FERREIRA, J. C.; PATINO C. M. Randomização: mais do que o lançamento de uma moeda. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, vol. 42(5), p. 310–310, 2016, <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-37562016000000296> > acessado em 13/01/2018.

GARBER, A. J. Anti-obesity Pharmacotherapy and the Potential for Preventing Progression From Prediabetes to Type 2 Diabetes. **Endocrine Practice**, vol. 21, p. 634-644, 2015.

GOLDBERG, R.; TEMPROSA, M.; OTVOS, J. et al. Lifestyle and metformin treatment favorably influence lipoprotein subfraction distribution in the diabetes prevention program. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, <http://press.endocrine.org/doi/full/10.1210/jc.2013-1452> >acessado em 01/10/2015.

GUANGWEI,L.I.; PRINGZHANG, D.P.; WANG,J.; WGREGG,E. et al. The long-term effect of lifestyle interventions to prevent diabetes in the China Da Qing Diabetes Prevention Study: a 20-year follow-up study. **The Lancet**, vol.371, p.1783-1789, 2008.

HALLER, H. Epidemiology and Associated Risk Factors of Hyperlipoproteinemia. **Zgesamte Inn Med. Germant**, vol. 32, p. 124-128, 1977.

HOWELL, J. J.; HELBERG, K.; TURNER, M.; TALBOTT, G.; KOLAR, M. J.; ROSS, D. S.; HOXHAJ, G.; SAGHTELIAN, A.; SHAW, R.J.; MANNING, B. D. Metformin inhibits Hepatic MTORC1 Signaling via Dose-Dependent Mechanisms involving AMPK and the TSC Complex. **Cell Metabolism**. Em <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.009> >acessado em 04/04/2016.

KAPLAN, M.N. The deadly quartet upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. **Arch Intern Med**. Vol.149, p.1514-1520, 1989. Doi: 10.1001/archinte.1989.00390070054005

KAUR, J; A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. **Cardiology Research and Practice**, vol. 2014, Article ID 943162, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/943162> >acessado em 13/05/2016.

KOLOTKIN, R. L.; CROSBY, R.D.; KOSLOSKI, K.D.; WILIANS, G.R. Development of a Brief Measure to Assess Quality of Life in Obesity. **Obesity Research & Clinical Practice**, vol. 9, p. 102-111, 2001.

KYLIN, E. Studien Ueber das Hypertonie-Hyperglycämie-Hyperurica Miesyndrom. **Zentralblatt fuer Innere Medizin**, vol. 44, p. 105-127, 1923.

LILLEFOSSE, H. H.; TASTESSEN, S. H.; DU, Z.; DITLEV, B. D.; THORSEN, M. L.; KRISTIANSEN, K; LIASER, B. Hydrolyzed casein reduces diet-induced obesity in male C57BL/6J mice. **The journal of nutrition**, vol. 7, p. 1367-1374, 2013.

MANCINI, M. C.; MELO M. E.; ANGELUCCIA, A. P. Fisiologia e Tratamento Clínico da Obesidade in **Wajchenberg, Tratado de Endocrinologia Clínica**, 4ª edição, cap. 29, 2014.

MARQUES, A. C. R.; GABBIATTIG. C.; GRAVENA A. A. F.; AMARAL V. Influência das Dietas Hipercalóricas sobre os Parâmetros de Obesidade, Dislipidemia e Hiperglicemia em Ratos. **Revista Saúde e Pesquisa**, vol. 8, p. 55-62, 2015.

MICHAELES, F. **Manual de normatização bibliográfica para trabalhos científicos – Universidade Estadual de Ponta Grossa**, 3ª edição revisada, 2014.

MOGUL, H.; FREEMAN, R., NGUYEN, K. Metformin sustained weight loss and reduced android fat tissue at 12 months in EMPOWIR. **Endocrinology Practice**, vol. 22, p. 575-586, 2016.

MRAZ, M.; HALUZIK, M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. **Journal of Endocrinology**, vol. 222, p. 113-127, 2014. Doi:10.1530/JOE-14-0283.

MURTAZA, M. et al. Cucurbitacin E reduces obesity and related metabolic dysfunction in mice by targeting JAK-STAT5 signaling pathway. **PLoS One**. doi: [10.1371/journal.pone.0178910](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178910) > acessado em 06/12/2017.

NASCIMENTO, A. F. Influência das dietas padrão e hipercalórica sobre o comportamento corporal e bioquímico de ratos wistar. 2006. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu.

NASCIMENTO, A. F.; SUGIZAKI, M. M.; LEOPOL, A. S. et al. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and comorbidities in wistar rats. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, vol. 52, n. 6, p. 52-56, 2008.

PACHALY, J. R.; BRITO H. F. V.; Emprego do método de extrapolação alométrica no cálculo de protocolos posológicos para animais selvagens. **A Hora Veterinária**, v. 118, p. 59-65, 2000.

PARDINI, L.C.; ASSIS, G.F. Metodologia básica: Morfometria e Estereologia. **Rev. Bras.Teleodonto**, vol.1,p.17-24, 2005.

PARLEE, S. D.; LENTZ, S. I.; MORI, H.; MACDOUGALD, O. A. Quantifying Size and number of adipocytes in adipose tissue. **Methods Enzymology**, vol. 537, p. 93-122, 2014.

PASTORE, A. P.; CESARETTI, M. L. R.; GINOZA, M. Efeito da associação entre obesidade neuroendócrina e exócrina experimental sobre a pressão arterial de cauda e o metabolism de glicose de ratos wistar. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, vol. 32, n. 2. P. 195-200, 2010.

PELLEGRINELLI, V.; CAROBIP, S.; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. **Diabetologia**, vol. 59, p. 1075-1088, 2016.

PINTO JÚNIOR, D. A. C.; SERAPHIM, P. M. Cafeteria diet intake for fourteen weeks can cause obesity and insulin resistance in Wistar rats. **Revista de Nutrição**. Campinas, vol. 25, n.3, p. 313-319, 2012.

PROENÇA RANSOM, M. D. T.; GOLDENBERG, R.; MIKALACHKI, A. R. N. Reducing the Risk of Developing Diabetes. **Canadian Journal of Diabetes**, vol. 37, p. 516-519, 2013.

REAVEN,G.M.; Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, vol.37, p.1595-1607, 1988.

RENA, G.; PEARSON, E. R.; SAKAMOTO, K. Molecular mechanism of action of metformin old our new insights? **Diabetologia**, vol. 56, p.1898-1906, 2013.

RITCHIE, S.A.; CONNEL, M.C. The Link Between Abdominal Obesity, Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, vol. 17, p. 319-326, 2007.

RUTKOWSKI, J. M., STERN, J. H., SCHERER, P. E. The Cell Biology of Fat Expansion. **The Journal of Cell Biology**, vol. 203, p. 501-512, 2015.

SAMPLEY, B. P.; VANHOOSE, A. M.; WINFIELD, H. M.; FREEMERMAN A. J.; MUEHLBAUER, M. J.; FUEGER, P. T. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity**, vol. 19, n. 6, p. 1109-1117, 2011.

SHAW, J. E.; CHISHOLM, D. J.; Epidemiology and Prevention of Type 2 Diabetes and the Metabolic Syndrome. **Medical Journal of Australia**, vol. 179, p. 379-883, 2003.

SILVA, A. S.; PAULI, R.; OLIVEIRA, A. G. Exercise intensity, inflammatory signaling and insulin resistance in obese rats. **Medical Science Sports Exercises**. vol. 12 n. 452 p. 2180-2188, 2010.

SUN, K.; KUSMINSKI, C. M.; ECHERER, P. E. Adipose Tissue Remodeling and Obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, vol. 121, p. 2094-20101, 2011.

TAVARES, T. B.; NUNES, S. M.; SANTOS, M. O. Obesidade e Qualidade de Vida: Revisão da Literatura. **Revista Médica de Minas Gerais**, vol. 20, p. 359-366, março, 2010.

TEIXEIRA,V.P.A.; PEREIRA,S.A.L.; RODRIGUES, D.B.R.; LINO JUNIOR,R.S.. Princípios básicos e aplicações da morfometria. **Universidade Federal de Goiás**, Uberaba, 2005. Em <http://www.fmtm.br/instpub/fmtm/patge/morfometria01.htm> >acessado em 15/01/18.

THAMER, S. J. The Effect of Orlistat and Metformin on Body Weight, Liver Steatosis, Leptin and Insulin Sensitivity in Obese Rats Fed High Fat Diet. **Journal of American Science**, vol 10, p. 107-114, 2014.

THOMAZI, F.; RIBAS, A.; SERPA, E. Avaliação dos componentes séricos e do ganho de peso de ratos submetidos à dieta com sacarose e à dieta com aspartame. **RUBS**, Curitiba, vol.1, n.3, p. 37-43, 2008.

TRAYHURN, P.; WOOD, I.S. Adipokines: Inflammation and the Pleotropic Role of White Adipose Tissue. **British Journal of Nutrition**, vol. 92, p.347-355, 2004.

VAGUE, J. Sexual Differentiation. A Factor Affecting the Forms of Obesity. **Presse Medicale**, vol. 30, p. S39-S40, 1947.

VANZELA, E. C.; RIBEIRO. R. A.; OLIVEIRA, C. A. M.; RODRIGUES, F. B.; BONFLEUR, M. L.; CARNEIRO, E. M.; SOUZA, K. L. A.; BOSCHERO, A. C. Pregnancy restores insulin secretion from pancreatic islets in cafeteria diet-induced obese rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, vol. 298, n. 2, p. 320-328, 2010.

VERREIJEN, A. M.; ENGBERINK, M. F.; MEMELINK,R. G.; PLAS VAN DER, S. E.; VISSER, M.; WEIJS, P. J. M. Effect of a high protein diet and/or resistance exercise on the preservation of fat free mass during weight loss in overweight and obese older adults: a randomized controlled trial. **Nutrition Journal**, 16:10, 2017. DOI:10.1186/s12937-017-0229-6 >Acessado em 06/12/2017.

VIOLLET, B.; GUIGAS, B.; GARCIA, N.; LECLERC, j. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin: an Overview. **Clinical Science**, vol. 122, p. 253-270, 2012.

WESSELS, B.; CIAPAITE, J.; BROEK, N. W. A.; NICOLAY, K.; PROMPERS, J. J. Metformin Impairs Mitochondrial Function in Skeletal Muscle of Both Lean and Diabetic Rats in a Dose-Dependent Manner. **PLoS One Journal**, Article ID10.1371, junho, 2014, <http://journals.plos.org/plosone/0100525/101371> Acessado em 06/12/2017.

ANEXOS

CARTA DE APROVAÇÃO NA CEUA – processo 037/2016

TABELAS COM VALORES DE p.

CARTAS DE ACEITE

The logo of the Universidade Estadual do Paraná (UEPG) is displayed in a bold, black, sans-serif font.

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 037/2016

Protocolo UEPG – 7903/2016

Título – Projeto de pesquisa “*Intervenção precoce com uso de metformina ou orlistat na prevenção de alterações metabólicas, inflamatórias e morfo-histológicas em ratos Wistar induzidos à síndrome metabólica por dieta*”.

Interessado: Prof. Dr. Mário Augusto Cray da Costa

Data de Entrada – 17/05/2016

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – 12/08/2016 a 12/08/2018

Considerações

Prezado Professor Mário Augusto Cray da Costa

Em relação à utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, a utilização de aprovada a utilização de 40 (quarenta) ratos machos Wistar de 90 (noventa) dias de peso de 250-300 g.

Ponta Grossa, 12 de agosto de 2016.

Atenciosamente,


Prof. Dra. Dionizia Xavier Scarpain
COORDENADORA

VALORES DE "p" – COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS, NAS GORDURAS VISCERAIS:

Quadro 2: Gordura omental (valores de p e comparação entre os grupos).

			DP	DCM	MM	MO
Nº Adipocitos	<0,0001	DP		0,0004	0,0001	0,0011
		DCM			0,3375	0,5049
		MM				0,0936
		MO				
Área média	<0,0001	DP		0,0001	0,0004	0,2493
		DCM			0,134	< 0,0001
		MM				< 0,0001
		MO				

Quadro 3: Gordura omental (comparação da média do número de adipócitos entre os grupos).

Nº Adipocitos omento							
Teste	Grupo Contr		Relação		Grupo Exper	p-valor	
Anova e Dunnett	DP		>		DCM	<0,0001	
			>		MM		
			>		MO		
	DCM		=			MM	0,2571
			=			MO	
T		DP	>	DCM		0,0004	
		DP	>	MM		0,0001	
		DP	>	MO		0,0011	
		DCM	=	MM		0,3375	
		DCM	=	MO		0,5049	
		MM	=	MO		0,0936	

Quadro 4: Gordura omental (comparação da média de áreas de adipócitos entre os grupos)

Área média omento							
Teste	Grupo Contr		Relação		Grupo Exper	p-valor	
Anova e Dunnett	DP		<		DCM	<0,0001	
			<		MM		
			=		MO		
	DCM		=			MM	<0,0001
			>			MO	
T		DP	<	DCM		<0,0001	
		DP	<	MM		0,0004	
		DP	=	MO		0,2493	
		DCM	=	MM		0,134	
		DCM	>	MO		< 0,0001	
		DCM	>	MO		< 0,0001	

Quadro 5: Gordura retroperitoneal (valores de p e comparação entre os grupos).

			DP	DCM	MM	MO
Nº Adipocitos	0,001	DP		0,0114	0,4246	0,0169
		DCM			0,0034	0,6754
		MM				0,0073
		MO				
Área média	<0,0001	DP		<0,0001	0,3657	0,611
		DCM			<0,0001	<0,0001
		MM				0,528
		MO				

Quadro 6: Gordura retroperitoneal (comparação da média do número de adipócitos entre os grupos).

Nº Adipocitos retroperitoneal							
Teste	Grupo Controle	Relação			Grupo Experimental	p-valor	
Anova e Dunnett	DP	>			DCM	0,001	
		=			MM		
		>			MO		
	DCM	<				MM	0,0014
		=				MO	
T		DP	>	DCM		0,0114	
		DP	=	MM		0,4246	
		DP	>	MO		0,0169	
		DCM	<	MM		0,0034	
		DCM	=	MO		0,6754	
		MM	>	MO		0,0073	

Quadro 7: Gordura retroperitoneal (comparação da média de áreas de adipócitos na gordura entre os grupos).

Área média retroperitoneal							
Teste	Grupo Controle	Relação			Grupo Experimental	p-valor	
Anova e Dunnett	DP	<			DCM	<0,0001	
		=			MM		
		=			MO		
	DCM	>				MM	<0,0001
		>				MO	
T		DP	<	DCM		<0,0001	
		DP	=	MM		0,3657	
		DP	=	MO		0,611	
		DCM	>	MM		<0,0001	
		DCM	>	MO		<0,0001	
		MM	=	MO		0,528	

Quadro 8: Gordura epididimal (valores de p e comparação entre os grupos).

			DP	DCM	MM	MO
Nº Adipocitos	0,2005	DP		0,1636	0,0381	0,3092
		DCM			0,6432	0,5442
		MM				0,1842
		MO				
Área média	0,071	DP		0,0452	0,5478	0,9982
		DCM			0,082	0,05
		MM				0,5663
		MO				

Quadro 9: Gordura epididimal (comparação da média do número de adipócitos).

Nº Adipocitos epidid						
Teste	Grupo Controle		Relação		Grupo Experi	p-valor
Anova e Dunnett	DP		=		DCM	0,2005
			=		MM	
			=		MO	
	DCM		=		MM	0,5181
			=		MO	
T		DP	=	DCM		0,1636
		DP	>	MM		0,0381
		DP	=	MO		0,3092
		DCM	=	MM		0,6432
		DCM	=	MO		0,5442
		MM	=	MO		0,1842

Quadro 10: Gordura epididimal (comparação da média de áreas de adipócitos entre os grupos).

Área média epidid						
Teste	Grupo Controle		Relação		Grupo Experi	p-valor
Anova e Dunnett	DP		=		DCM	0,071
			=		MM	
			=		MO	
	DCM		=		MM	0,0631
			=		MO	
T		DP	<	DCM		0,0452
		DP	=	MM		0,5478
		DP	=	MO		0,9982
		DCM	=	MM		0,082
		DCM	=	MO		0,05
		MM	=	MO		0,5663



Ponta Grossa, 25 de Abril de 2016.

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Ana Cláudia Garabeli Cavalli Kluthcovsky

M.D. Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Informo que, após ter analisado a proposta, os motivos e o projeto de pesquisa, intitulado "**Intervenção precoce de Metformina ou Orlistat na prevenção de alterações metabólicas, inflamatórias e Morfo-histológicas em ratos Wistar induzidos à Síndrome Metabólica por dieta**", da mestranda Dra. Janete Machozeki, aceito disponibilizar os laboratórios da Disciplina Técnica Operatória e cirurgia Experimental, para a realização dos procedimentos para a coleta de materiais de acordo com a metodologia proposta.

Atenciosamente

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carlos Alberto Lima Utrabo', is written over a faint circular stamp.

Prof. Carlos Alberto Lima Utrabo

Professor Assistente de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental



Ponta Grossa, 25 de Abril de 2016.

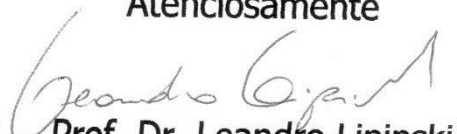
Ilma. Sra.

Profa. Ana Cláudia Garabeli Cavalli Kluthcovsky

M.D. Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Informo que, após ter analisado a proposta, os motivos e o projeto de pesquisa, intitulado "**Intervenção precoce de Metformina ou Orlistat na prevenção de alterações metabólicas, inflamatórias e Morfo-histológicas em ratos Wistar induzidos à Síndrome Metabólica por dieta**", da mestrandia Dra. Janete Machozeki, aceito disponibilizar o Biotério Central da UEPG, para a utilização e alojamento de animais de acordo com a metodologia proposta.

Atenciosamente


Prof. Dr. Leandro Lipinski

Prof. Dr. Leandro C. Lipinski
Universidade Estadual de Ponta Grossa
Médico Veterinário
CRMV-PR 6728

Responsável Técnico do Biotério Central da UEPG



Ponta Grossa, 25 de Abril de 2016.

Ilma. Sra.

Profa. Ana Cláudia Garabeli Cavalli Kluthcovsky

M.D. Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Informo que, após ter analisado a proposta, os motivos e o projeto de pesquisa, intitulado "**Intervenção precoce de Metformina ou Orlistat na prevenção de alterações metabólicas, inflamatórias e Morfo-histológicas em ratos Wistar induzidos à Síndrome Metabólica por dieta**", da mestrandia Dra. Janete Machozeki, aceito participar do projeto, realizando os exames histopatológicos no Laboratório de Patologia Médica de Ponta Grossa de acordo metodologia proposta.

Atenciosamente



Prof. Mário Montemor Netto.

Professor da Disciplina de Anatomia Patológica da UEPG