



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA LÚCIA YOSHIDA DA SILVA YAMADA

**EFEITOS DA ISOFLAVONA SOBRE A INGESTÃO
CALÓRICA, SACIEDADE E COMPOSIÇÃO CORPORAL EM
GATOS CASTRADOS**

Londrina
2019

ANA LÚCIA YOSHIDA DA SILVA YAMADA

**EFEITOS DA ISOFLAVONA SOBRE A INGESTÃO
CALÓRICA, SACIEDADE E COMPOSIÇÃO CORPORAL EM
GATOS CASTRADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias, departamento de Clínicas Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Clínicas Veterinárias.

Orientadora: Profa. Dra. Nilva Maria Freres Mascarenhas

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Yamada, Ana Lúcia.

Efeitos da isoflavona sobre a ingestão calórica, saciedade e composição corporal em gatos castrados / Ana Lúcia Yamada. - Londrina, 2019.
33 f. : il.

Orientador: Nilva Maria Mascarenhas.

Coorientador: Ricardo Vasconcellos.

Dissertação (Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Clínicas Veterinárias, 2019.

Inclui bibliografia.

1. 1. Efeitos da isoflavona - Tese. 2. 2. Ingestão calória e saciedade - Tese. 3. 3. Composição corporal - Tese. 4. 4. Gatos castrados - Tese. I. Mascarenhas, Nilva Maria. II. Vasconcellos, Ricardo. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Clínicas Veterinárias. IV. Título.

ANA LÚCIA YOSHIDA DA SILVA YAMADA

**EFEITOS DA ISOFLAVONA SOBRE A INGESTÃO
CALÓRICA, SACIEDADE E COMPOSIÇÃO CORPORAL EM
GATOS CASTRADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias, departamento de Clínicas Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Clínicas Veterinárias.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nilva Maria Freres Mascarenhas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Mauro José Lahm Cardoso
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Ricardo Souza Vasconcellos
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Londrina, 23 de janeiro de 2019.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus e a Meishu-Sama pela permissão de aprimorar meus conhecimentos através desse estudo e por colocar em meu caminho pessoas tão especiais.

Agradeço aos meus pais JB e Leiko e irmãos Vergínia e Fernando por todo amor, carinho e incentivo. Vocês são meu alicerce!

Ao meu marido Marcel pelo amor e companheirismo. Por me apoiar em todos os momentos e tornar nossos dias mais leves.

À professora Nilva Mascarenhas pela orientação e carinho.

Ao professor Ricardo Vanconcellos por me acolher e me inspirar. Pela oportunidade de realizar esse trabalho, me direcionando em cada etapa. Obrigada pela paciência, cuidado e zelo.

Ao professor Mauro Cardoso pelas contribuições antes mesmo da execução do projeto, através de ligações. Ao professor leverton que nos auxiliou na avaliação das imagens e determinação da composição corporal.

À Nayara Dalgallo por toda dedicação, organização e amor aos animais. Sem o seu esforço, esse trabalho não poderia ser concluído.

À equipe de anestesia: Eduardo Watanabe, Guilherme Coelho, Flavia Tubino e Marcela Luz por toda a dedicação nos dias de tomografia. Pelo bom humor apesar das mordidas e arranhaduras.

À Layne Pereira e à Isabela Martins por todo apoio e por permanecerem conosco até que o último animal estivesse com cateter.

Ao técnico de Imagem Jeferson Godoy pela ajuda e por nos ceder o espaço no centro diagnóstico para que fosse possível à avaliação da composição corporal.

Ao professor Vanderly Janeiro pela análise estatística e pela disposição, mesmo durante as festas de fim de ano.

À cunhada Fabiana Yamada pela tradução nos últimos minutos do segundo tempo.

Às amigas do mestrado profissional Gabriela Vasques e Flávia Maria pela parceria e ajuda nos momentos mais difíceis do programa.

A toda equipe NAV pelo apoio e companheirismo.

YAMADA, Ana Lúcia Yoshida da Silva. **Efeitos da isoflavona sobre a ingestão calórica, saciedade e composição corporal em gatos castrados.** 2019. 33 fl. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Clínicas Veterinárias – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Atualmente o sobrepeso ou a obesidade atingem aproximadamente metade da população de gatos. Dentre os fatores que favorecem o ganho de peso, a castração é um deles, pois reduz as necessidades energéticas dos animais sem a concomitante redução na ingestão voluntária de alimentos. Estudos têm sido realizados a fim de identificar nutrientes que possam interferir na saciedade ou no metabolismo do animal, auxiliando na manutenção ou na perda de peso. A isoflavona é um fitoestrógeno com estrutura química semelhante ao estrogênio endógeno que tem ação na redução do tecido adiposo, na ingestão de alimentos e aumento na massa magra corporal. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi determinar os efeitos da inclusão de isoflavona na dieta de gatos castrados no controle da ingestão calórica, nas concentrações sanguíneas de substâncias, com ação hormonal, relacionadas à saciedade e na composição corporal. Dezesesseis gatos adultos castrados foram divididos em dois grupos, denominados Controle (n=8) e Isoflavona (n=8), os quais foram alimentados respectivamente com ração para gatos castrados ou a mesma ração com a adição de 1% de isoflavona por um período de 99 dias. Durante todo o período experimental os gatos foram pesados e a quantidade de ração calculada para que não houvesse alteração no peso. O consumo energético foi monitorado diariamente. Em dois momentos ao longo do experimento (dias 19 e 44) todos os animais foram desafiados com um alimento altamente palatável 4 horas após a ingestão do respectivo tratamento, visando mensurar o efeito da dieta experimental sobre a saciedade. Tomografia computadorizada foi utilizada na mensuração da composição corporal dos animais no início e término do estudo. Para isto foram determinadas as porcentagens de gordura total, gordura intra-abdominal e subcutânea em cortes realizados em região de segunda vértebra lombar. No último dia do experimento coletaram-se amostras de sangue para dosagens de insulina, grelina, leptina, peptídeo YY e GLP-1 nos momentos basal e após 1, 2, 4 e 6 horas após a ingestão das dietas experimentais. Para todas as variáveis estudadas determinaram-se os efeitos de tratamento e período, em um esquema de parcelas subdivididas, considerando-se 5% de probabilidade. O peso dos animais foi mantido ao longo do estudo ($p=0.967$). O consumo calórico foi semelhante entre os grupos ao longo do estudo ($p=0.187$), sem efeito verificado para o consumo de isoflavona, a qual também não afetou o consumo de alimento durante o desafio de saciedade nos dias 19 ($p=0.5345$) e 44 ($p=0.2146$). Da mesma forma, a composição corporal não foi modificada pelo consumo de isoflavona ($P>0,05$). Conclui-se que na concentração de 1% da dieta a isoflavona não modifica a ingestão calórica, indicadores séricos de saciedade e composição corporal em gatos castrados.

Palavras-chave: felinos, fitoestrógeno, hormônios, nutrição, tomografia.

YAMADA, Ana Lúcia Yoshida da Silva. **The effects of isoflavone on caloric intake, satiety and body composition in neutered cats.** 2019. 33 pg. Dissertation. Postgraduate Program in Veterinary Clinics – State University of Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Nowadays, approximately half of the cats' population is affected by overweight or obesity. Among the factors that lead to the weight gain, castration is one of them, because it reduces the energy level required from these animals without associating a voluntary reduction in food ingestion. Studies on the subject have been performed aiming to identify which nutrients can interfere in the satiation or in the metabolism of the animal, so that weight control or weight loss can be assisted. The isoflavone is a phytoestrogen with similar chemical structure of the endogenous estrogen which acts on the reduction of adipose tissue, in the food ingestion and in the lean body mass gain. Therefore, the aim of this study was to determine the effects of the isoflavone inclusion in the diet of neutered cats in the caloric intake, in the blood concentrations of substances with hormonal action, related to satiety and body composition. Sixteen neutered adult cats were divided into two groups, named Control (n = 8) and Isoflavone (n = 8), both were fed respectively with food for neutered cats or the same food added 1% of isoflavone for a period of 99 days. During the whole experiment period, the cats were weighted and their food quantities were calculated to prevent them from any weight change. The energy intake was monitored daily. There were two moments along the experiment (days 19th and 44th) when all of the animals were challenged with a highly palatable food 4 hours after the ingestion of food from their respective treatment, aiming to measure the effects of the experimental diet over satiety. A CT scan were performed to measure the body composition of the animals in the beginning and at the end of the study. In this regard, it were determined the percentages of total fat, intra-abdominal fat and subcutaneous fat from cuts performed in the area around the second vertebra of the lumbar region. In the last day of the experiment, blood samples were collected to check the dosage of insulin, ghrelin, leptin, YY peptide and GLP-1 in the baseline and 1, 2, 4 and 6 hours after the food ingestion from the experimental diets. For all of the studied variables it were determined the effects of treatment and period, in a scheme of subdivided portions, considering 5% of probability. The animals weight were preserved along the study (p=0.967). The caloric intake was similar for each group along the study (p=0.187), without any verified effect for the group that consumed the isoflavone, which has not affected the food intake during the satiety challenge in the 19th (p=0.5345) and 44th (p=0.2146) days either. Accordingly, the body composition did not change by the isoflavone intake (P>0,05). As a conclusion, the isoflavone in a concentration of 1% in the diet does not modify the caloric intake, the serum indicators of satiety and the body composition in neutered cats.

Key Words: felines, phytoestrogen, hormones, nutrition, tomography.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------------|--|----|
| Figura 1 | Cronograma de atividades..... | 17 |
| Figura 2 | Imagem do equipamento utilizado para a realização das tomografias computadorizadas. Os animais foram posicionados em decúbito ventral e as projeções feitas em sentido crânio-caudal..... | 19 |
| Figura 3 | Imagem obtida por meio de tomografia computadorizada em região de segunda vértebra lombar, utilizando histograma com limites de HU (Hounsfield Units) entre -135 e -105, para identificação do volume de gordura total..... | 20 |
| Figura 4 | Consumo energético no período por animal (linha tracejada) e consumo médio por tratamento (linha contínua grossa). Onde os períodos são identificados: 1 (média entre os dias 1 a 24); 2 (média entre os dias 25 a 48); 3 (média entre os dias 49 a 72) e 4 (média entre os dias 73 a 96). | 23 |
| Figura 5 | Desafio de Saciedade: Consumo energético no período por animal (linha tracejada) e consumo médio por tratamento (linha contínua grossa)..... | 24 |
| Figura 6 | Desafio de Saciedade: Consumo energético no período por animal (linha tracejada) e consumo médio por dia - 19 ou 44 (linha contínua grossa)..... | 26 |
| Figura 7 | Dosagens sanguíneas hormonais pré e pós-prandiais (1, 2, 4 e 6 horas) dos gatos dos tratamentos Controle e Isoflavona..... | 28 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------------|--|----|
| Tabela 1 | Peso dos animais recebendo as dietas Controle ou Isoflavona (1%) nos diferentes períodos experimentais..... | 22 |
| Tabela 2 | Consumo calórico dos animais recebendo as dietas Controle ou Isoflavona (1%) nos diferentes períodos experimentais..... | 23 |
| Tabela 3 | Probabilidade de significância do teste de esfericidade de Mauchly, teste de normalidade de Shapiro-Wilk, para tratamento e tempo obtidos com ajuste do modelo de parcelas subdivididas..... | 24 |
| Tabela 4 | Composição corporal dos gatos dos tratamentos Controle ou Isoflavona nos períodos inicial e após 99 dias de consumo das dietas experimentais..... | 26 |
| Tabela 5 | Probabilidade de significância do teste de esfericidade de Mauchly, teste de normalidade de Shapiro-Wilk, e para tratamento e tempo obtidos para as análises das curvas hormonais pós-prandiais..... | 27 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|--|
| DEXA | Absorciometria com raios-x de dupla energia |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| CONCEA | Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal |
| DICOM | Digital Imaging and Communications in Medicine |
| DPP-IV | Dipeptidyl peptidase IV |
| FEI | Fazenda Experimental de Iguatemi |
| GLP-1 | Peptídeo-1 semelhante ao glucagon |
| rpm | Rotações por minuto |
| HU | Unidades Hounsfield |
| UEM | Universidade Estadual de Maringá |
| L2 | Vértebra lombar 2 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 11 |
| 3 OBJETIVOS..... | 15 |
| 3.1 OBJETIVOS GERAIS..... | 15 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 15 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 16 |
| 4.1 ANIMAIS | 16 |
| 4.2 DIETAS EXPERIMENTAIS..... | 16 |
| 4.3 MANEJO DOS ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 17 |
| 4.4 TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA..... | 18 |
| 4.5 DESAFIOS DE SACIEDADE | 20 |
| 4.6 DOSAGENS HORMONAIS..... | 21 |
| 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 22 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 22 |
| 6. CONCLUSÃO | 30 |
| REFERÊNCIAS..... | 31 |
| ANEXOS | 34 |
| ANEXO A: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ (CEUA/UEM)..... | 34 |

1 INTRODUÇÃO

A população de animais obesos tem aumentado gradualmente nas últimas duas décadas, a qual é resultante de múltiplos fatores como sedentarismo, nutrição inadequada, fatores genéticos, idade, castração, dentre outros.

A esterilização cirúrgica é um procedimento frequentemente utilizado para controle populacional e como prevenção de doenças relacionadas ao trato reprodutivo como infecções uterinas e tumores mamários. Após a realização desse procedimento, é comum que os animais ganhem peso. Animais castrados apresentam menor atividade física, reduzindo o gasto energético. Além disso, ocorre um aumento na ingestão alimentar, aumentando consideravelmente o risco de desenvolvimento da obesidade.

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo de gordura no organismo animal com prejuízo das funções fisiológicas. Desta forma, animais obesos são mais susceptíveis ao desenvolvimento de outras enfermidades como doenças articulares, alterações cardiovasculares, respiratórias, resistência insulínica e *diabetes mellitus*.

Considerando que os gatos castrados são predispostos ao ganho de peso e que este ganho de peso é implicado em prejuízos a saúde dos animais, reduzindo a qualidade de vida, é papel da pesquisa buscar intervenções nutricionais para auxiliar no controle de peso nesta espécie após a castração, uma vez que esta intervenção se faz necessária no controle populacional de gatos. Com isto, neste estudo formulou-se a hipótese de que a isoflavona incluída como ingrediente na dieta de gatos é capaz de reduzir o percentual de gordura dos animais e promover melhor estímulo de saciedade, minimizando assim os efeitos negativos da castração.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Há mais de duas décadas, tem-se relatado que a castração pode contribuir para um aumento na ingestão diária de alimentos e diminuição da taxa metabólica basal de gatos, ocasionando um ganho de peso nesses animais (FETTMAN et al., 1997).

Um estudo realizado por Corbee (2014) avaliou o escore de condição corporal (ECC) utilizando uma escala de nove pontos por inspeção e palpação de 268 gatos de 22 raças diferentes com o objetivo de identificar se a obesidade ocorre de forma mais frequente em determinadas raças. Praticamente metade (45,5%) dos gatos apresentaram sobrepeso e 4,5% dos gatos apresentaram-se obesos. Foi possível observar nesse trabalho ainda, que a maioria dos gatos nestas condições eram castrados. Desta forma, o autor concluiu que a castração predispõe os gatos à obesidade e sugere que intervenções nutricionais sejam feitas de forma precoce para prevenir o ganho de peso em tais animais.

Um dos principais motivos do ganho de peso em animais castrados é o aumento significativo que ocorre na ingestão alimentar. Embora as causas ainda não sejam totalmente esclarecidas, Wei et al. (2014) verificaram aumento nas concentrações de grelina circulante em gatos machos até 9 dias pós esterilização cirúrgica. Tais autores concluíram que o ganho de peso inicial que ocorre em gatos machos após a castração resulta do aumento da ingestão calórica, sendo de fundamental importância que o controle da ingestão de alimentos seja estabelecido logo após a castração para evitar que tais animais desenvolvam sobrepeso ou obesidade no futuro.

Em outro estudo realizado com o objetivo de identificar os fatores de risco para o desenvolvimento da obesidade em gatos castrados, Höenig & Ferguson (2002) verificaram que entre 8 e 16 semanas após a castração de fêmeas, a necessidade energética foi reduzida em mais de 20%. Além disso, fêmeas também demonstraram um aumento significativo na área sob a curva para insulina 4 e 8 semanas após a castração, com possíveis impactos no desenvolvimento do Diabetes tipo II, muito comum nesta espécie

Embora a castração seja um fator de risco para a obesidade e os impactos negativos da obesidade já sejam bem conhecidos em gatos, castrar os animais ainda é mais importante visando manter as populações desta espécie sob controle. Frente a esta problemática, têm-se buscado alternativas visando minimizar os efeitos da

castração sobre o desenvolvimento da obesidade, por meio da utilização de ingredientes e nutrientes que tenham efeito inibitório na ingestão calórica e que reduzam a deposição de gordura corporal nos animais. Estudos mostram que a composição de macronutrientes pode influenciar no consumo total de energia, na saciedade intra e entre refeições. A diminuição da quantidade de proteína associada à utilização de fibras, especialmente as que apresentam maior capacidade de ligação à água, podem diminuir a ingestão voluntária de alimentos em gatos (SERVET et al., 2008).

A suplementação com alguns componentes dietéticos pode auxiliar na perda de peso e melhora na composição corporal, como o ácido linoleico conjugado (CLA) e a L-carnitina, os quais ajudam a manter a quantidade de massa magra e dietas ricas em fibras (21%), que diluem a energia do alimento e também promovem um efeito de saciedade (GERMAN, 2006).

Os ingredientes vegetais também têm sido estudados, uma vez que estes apresentam além dos macronutrientes, muitos compostos bioativos, os quais podem conter antioxidantes, prebióticos, imunomoduladores e fitoestrógenos, tais como as lignanas e as isoflavonas. Esses últimos são considerados não-nutrientes bioativos encontrados em altas concentrações em sementes de linhaça e na soja, e estudos têm demonstrado diversos efeitos benéficos à saúde (SETCHELL & CASSIDY, 1999). Bhatena & Velasquez (2002) descreveram que a ingestão de tais alimentos ricos em lignanas e isoflavonas melhora o controle glicêmico e a resistência à insulina, reduzindo as concentrações séricas de insulina e de triglicérides, além da diminuição do peso corporal, contribuindo especialmente nos casos de obesidade e diabetes.

A genisteína é uma isoflavona contida na soja que apresenta atividade estrogênica. Atualmente ela é muito utilizada como substituto natural na terapia de reposição hormonal em mulheres na pós-menopausa (KIM et al., 2006).

O efeito da isoflavona tem sido muito estudado em mulheres e em animais de laboratório (ratas castradas), pois a deficiência de estrogênio que ocorre após a menopausa / castração ocasiona maior acúmulo de gordura corporal e perda de massa óssea. Em um estudo realizado por Wu et al. (2004), o efeito da suplementação de isoflavona foi investigado. Estes autores utilizaram 0,4% de um composto comercial na dieta de ratas castradas (Fujiflavone P40, contendo daidzina - 20,4%, genistina - 4,6% e glicetina mais gliciteína - 13%), associada a exercícios moderados

sobre a composição corporal e massa óssea e verificaram que os animais alimentados com isoflavona, mesmo sem a associação com exercício físico, apresentaram redução na gordura corporal e melhor preservação da massa óssea em relação aos animais não tratados. Quando associada ao exercício físico, a utilização de isoflavona melhorou ainda mais estas respostas pelos animais.

Estudos realizados por Kurrat et al. (2015), mostraram que a exposição a longo prazo de dietas ricas em isoflavona (467mg/kg de dieta) promoveram redução do peso corporal e da gordura visceral em ratas. Além disso, a exposição em curto prazo demonstrou uma redução na perda de massa muscular esquelética que ocorre após a esterilização cirúrgica. Outro trabalho recente, utilizando ratas, também demonstrou redução significativa da gordura visceral e do ganho de peso induzido pela esterilização cirúrgica após administração oral de extrato aquoso de folhas de soja com concentração final de isoflavona de 500µg/mL (XIE et al., 2018). No mesmo estudo ainda identificou-se melhora nos quadros de esteatose hepática pela diminuição do acúmulo de triglicerídeos no fígado e das concentrações séricas das enzimas hepáticas (alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase).

Kim et al. (2006) também observaram diminuição da ingestão alimentar e do peso corporal em ratas ovariectomizadas que foram submetidas à administração oral de genisteína à concentração de 1.500mg/kg de dieta por 21 dias. Resultados *in vitro* e *in vivo* também demonstram que a genisteína é capaz de induzir a apoptose de adipócitos, reforçando os benefícios da utilização de isoflavona nos casos de aumento de adiposidade após a menopausa.

Atualmente, a soja vem sendo indicada como parte do tratamento nos casos de obesidade ou de doenças associadas ao excessivo ganho de peso. Os fitoestrógenos atuam na promoção da saúde e no controle da obesidade, melhorando o metabolismo lipídico nos adipócitos e hepatócitos (PEIXOTO et al., 2011).

Contrariamente ao que se acreditava anteriormente, que o tecido adiposo seria apenas um sítio de armazenamento de triglicérides, estudos têm demonstrado que os adipócitos são capazes de sintetizar diversas substâncias como a adiponectina, a angiotensina e a leptina; sendo considerado, desta forma, um órgão endócrino (ROMERO & ZANESCO, 2006).

A leptina é um peptídeo que está envolvido no controle da ingestão de alimentos e no gasto energético, diminuindo a ingestão alimentar e contribuindo para

a queima de energia (ROMERO & ZANESCO, 2006). A concentração plasmática de leptina está diretamente relacionada com a porcentagem de gordura em gatos, da mesma forma como ocorre em humanos (BACKUS et al., 2000; APPLETON et al., 2000; VASCONCELLOS et al., 2009). APPLETON et al. (2000) verificaram que as concentrações plasmáticas de leptina aumentaram em três vezes nos gatos após ganho de peso. Tal estudo também revelou que, apesar dos níveis elevados de leptina, os gatos continuaram a comer e ganhar peso, sugerindo uma diminuição da sensibilidade à leptina nesses animais. Um estudo posterior realizado por APPLETON et al. (2002) esclareceu que, quanto maior a concentração de leptina, maior é a resistência à insulina, independente do grau de adiposidade.

Além dos hormônios sintetizados pelos adipócitos, hormônios produzidos no trato digestivo também podem interferir na ingestão alimentar, atuando como neurotransmissores no núcleo arqueado do hipotálamo, onde duas populações neuronais podem estimular ou inibir a ingestão de alimentos, desempenhando desta forma, um papel importante na regulação do apetite. O peptídeo YY, o polipeptídeo pancreático, o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e a oxintomodulina suprimem o apetite, enquanto a grelina aumenta o apetite através das fibras vagais aferentes para o tronco cerebral caudal ou diretamente para o hipotálamo. (SUZUKI, 2010).

Quanto às medidas de adiposidade, estas envolvem a determinação da composição corporal ou das quantidades relativas dos componentes biológicos do corpo: massa magra e massa gorda. Existem várias técnicas para determinação da composição corporal como: análise química, biometria, diluição de isótopos (óxido de deutério), absorciometria com raios-x de dupla energia (DEXA), ultrassonografia, bioimpedância elétrica e técnicas avançadas de imagem como tomografia computadorizada e ressonância magnética (GERMAN, 2006).

Estudos estão sendo realizados para validar a tomografia computadorizada como método de avaliação da composição corporal em animais. Para humanos a faixa de atenuação do tecido adiposo é de aproximadamente -190 a -30 unidades Hounsfield (HU). Um estudo realizado por Ishioka et al. (2005) avaliando diferentes faixas de atenuação, determinou que a faixa compreendida entre -135 e -105 HU é a que apresenta melhor correlação com o conteúdo de gordura corporal em Beagles, quando comparado ao método de diluição do óxido deutério.

Buelund et al. (2011) avaliaram diferentes abordagens para determinação da porcentagem de tecido adiposo em gatos por meio da tomografia computadorizada e compararam os resultados obtidos pela absorciometria com raios-x de dupla energia (DEXA). Observaram que faixas de valores de HU fixas podem ser utilizadas para obtenção da estimativa da porcentagem de gordura e acompanhamento de mudanças na composição corporal de populações. Nesse trabalho, o método com valores fixos utilizou faixas de HU entre -250 e 0 para tecidos adiposos e faixas entre 0 e +250 para tecidos não adiposos, selecionando-se o ponto médio (HU = 0) com base na informação que a densidade do tecido adiposo é inferior a densidade da água (HU = 0).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos da suplementação com isoflavona (1%) em gatos castrados sobre o consumo calórico, saciedade e composição corporal.

3.2 Objetivos Específicos

Determinar os efeitos da ingestão de isoflavona sobre a necessidade energética de manutenção em gatos castrados.

Determinar o efeito da ingestão de isoflavona sobre a saciedade de gatos castrados.

Mensurar os efeitos da isoflavona sobre as respostas sanguíneas pós-prandiais de substâncias relacionadas à saciedade (insulina, grelina, leptina, peptídeo YY e GLP-1).

Determinar o efeito da ingestão de isoflavona sobre a composição corporal de gatos castrados submetidos a ingestão de calorias para a manutenção do peso.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá - Paraná (UEM-PR).

4.1 Animais

Foram utilizados dezesseis gatos esterilizados cirurgicamente, com 4 anos de idade, de ambos os sexos, pertencentes ao laboratório de nutrição e metabolismo de felinos domésticos da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), situada no distrito de Iguatemi, Maringá-PR, da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os gatos selecionados apresentaram-se hígidos à avaliação clínica e os exames de sangue (hemograma e exames bioquímicos) foram realizados no início do experimento.

4.2 Dietas experimentais

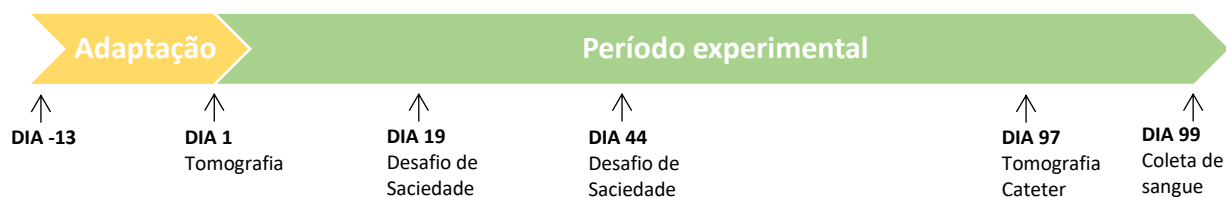
Um alimento comercial para gatos adultos castrados foi empregado como Controle (Matisse gatos castrados – Farmina Pet Foods® - Bragança Paulista – SP – Brasil). Este alimento apresentou os seguintes níveis de garantia no rótulo: Proteína Bruta mínima - 360g/Kg; Extrato Etéreo mínimo - 100g/Kg; Fibra Bruta máxima - 55g/Kg; Matéria Mineral máxima - 75g/Kg; Umidade máxima - 80g/Kg; Energia Metabolizável - 3.600 kcal/kg. Para compor o alimento com isoflavona, adicionou-se, ao alimento Controle, 1% de isoflavona por cobertura. Desta forma foram compostos dois tratamentos para o estudo, denominados Controle e isoflavona. Para garantir que a isoflavona fosse incorporada à dieta Controle, em ambos os tratamentos adicionou-se 3% de óleo de frango e 1% de palatilizante líquido para gatos. Amido foi utilizado como placebo no alimento Controle em substituição à isoflavona.

A isoflavona utilizada no estudo foi adquirida comercialmente em farmácia de manipulação da região (Galena, Campinas-SP, Brasil). Os níveis de garantia deste ingrediente para os compostos bioativos eram: Genisteína 0,55%, Daidzeína 37,62%.

4.3 Manejo dos animais e delineamento experimental

Cinco gatas fêmeas castradas e três machos castrados compuseram cada tratamento experimental (Controle ou Isoflavona), totalizando oito animais por tratamento e dezesseis no estudo. Os gatos de cada grupo foram distribuídos de acordo com o sexo e o escore de condição corporal em escala de 1 a 9, sendo 1 caquético e 9 obeso (LAFLAMME, 1997). Inicialmente, todos os animais receberam a dieta controle por um período de treze dias (adaptação). Após este período cada gato passou a receber o respectivo tratamento (período experimental). No dia 1, foram realizadas as tomografias computadorizadas. Nos dias 19 e 44 foram realizados desafios para avaliação da saciedade. No dia 97 foram realizadas as tomografias computadorizadas novamente e colocados cateteres intravenosos centrais para a coleta de amostras sanguíneas e determinação das concentrações plasmáticas de hormônios e proteínas relacionadas à saciedade. No dia 99 foram coletadas amostras de sangue antes e 1, 2, 4 e 6 horas após a ingestão alimentar. Do dia 1 ao dia 96 foi avaliado o consumo diário de cada animal. O cronograma de atividades encontra-se ilustrado na figura 1, a seguir.

Figura 1: Cronograma de atividades



A quantidade de ração fornecida foi calculada de acordo com a faixa etária considerando o peso metabólico (kg^{0,67}) de cada animal, segundo as equações de exigências energéticas preconizadas pelo National Research Council (NRC, 2006). Durante toda a fase experimental os animais foram pesados semanalmente e ajustes na quantidade de alimento fornecido foram feitos para que não ocorresse variação no peso corporal maior que 5%.

Para controle do fornecimento da dieta adequada e da quantidade de ração ingerida individualmente, o alimento foi fornecido somente com os animais distribuídos

em gaiolas individuais. A quantidade de ração calculada para cada gato foi dividida em duas refeições diárias (8h00 e 15h00), ficando disponíveis por um período de 40 minutos. Durante todo o tempo restante os gatos permaneciam soltos em gatil coletivo com água disponível ad libitum.

4.4 Tomografia Computadorizada

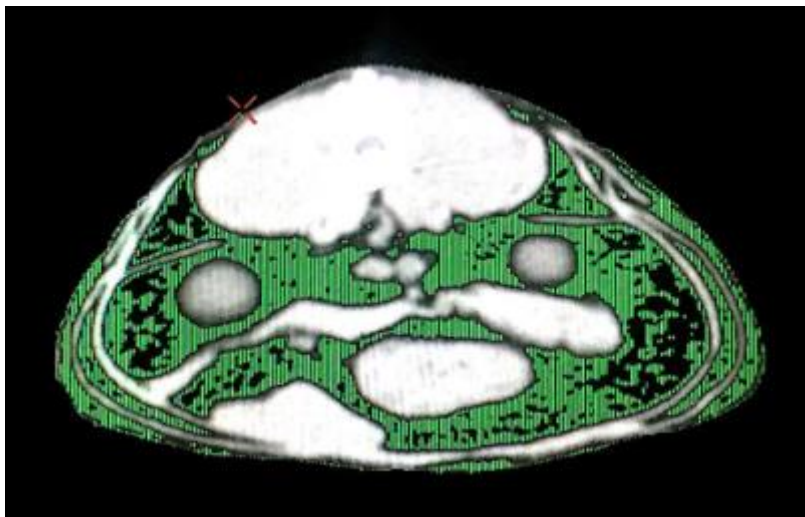
As tomografias computadorizadas foram realizadas nos dias 1 e 97 em tomógrafo helicoidal GE Hi Speed (figura 2). Os animais foram posicionados em decúbito ventral e as projeções realizadas em direção crânio-caudal abrangendo o corpo inteiro, com espessura de cortes de 7 mm (120 kV, 140 mA) e abdomen (entre as vértebras lombares 1 e 7) com espessura de cortes de 2 mm (120 kV, 115 mA). Para o procedimento, os animais foram devidamente sedados e analgesiados utilizando-se 20 µg/Kg de Dexmedetomidina e 0,5 mg/Kg de Morfina via intramuscular. Após a realização da tomografia computadorizada os animais foram antagonizados com reversor Cloridrato de Atipamezole (Antisedan) na dose de 20µg/Kg intramuscular.

Figura 2: Imagem do equipamento utilizado para a realização das tomografias computadorizadas. Os animais foram posicionados em decúbito ventral e as projeções feitas em sentido crânio-caudal.



As imagens obtidas pela tomografia foram salvas em padrão de imagens DICOM e analisadas em uma estação de trabalho de revisão, comparação e pós-processamento multimodalidade (AW VolumeShare 5 – Workstation Z800 - GE Healthcare Brasil). Para avaliação da composição corporal foram avaliados cortes em vértebra lombar 2 (L2). Inicialmente foi determinado o volume total excluindo-se o ar contido ao redor da imagem formada. Posteriormente definiu-se um histograma utilizando limites de HU (Hounsfield Units) entre -135 e -105, para identificação do volume de gordura total (figura 3). Em seguida, excluiu-se a área representada pela gordura subcutânea, aplicou-se o histograma com limites de HU entre -135 e -105 novamente para identificação do volume de gordura intra-abdominal. Desta forma, foi possível determinar as porcentagens de gordura total, gordura intra-abdominal e gordura subcutânea (volume de gordura total - volume de gordura intra-abdominal) em região de L2.

Figura 3: Imagem obtida por meio de tomografia computadorizada em região de segunda vértebra lombar, utilizando histograma com limites de HU (Hounsfield Units) entre -135 e -105, para identificação do volume de gordura total.



4.5 Desafios de Saciedade

Foram realizados desafios de consumo nos dias 19 e 44, quatro horas após o fornecimento da ração experimental aos grupos (Controle e Isoflavona) as 8h00. Todos os gatos foram desafiados com a oferta de um alimento com boa palatabilidade, conhecido e apreciado pelos animais pertencentes ao laboratório (N&D grain free – Farmina Pet Foods® - Bragança Paulista – SP – Brasil). Este alimento apresentava a seguinte composição: Proteína Bruta mínima - 400g/Kg; Extrato Etéreo mínimo - 200g/Kg; Fibra Bruta máxima - 22g/Kg; Matéria Mineral máxima - 85g/Kg; Umidade máxima - 90g/Kg; Energia metabolizável - 4.200 kcal/kg. A quantidade ofertada (70 gramas) foi calculada baseada no consumo médio diário ($\cong 57$ gramas) para que o alimento não fosse consumido em sua totalidade. O alimento permaneceu disponível ad libitum durante o período subsequente, as sobras foram pesadas e o consumo calculado após 1, 2, 3, 4 e 5 horas. O objetivo desse teste foi mensurar o efeito inibitório das dietas experimentais e avaliar se dietas contendo 1% de isoflavona podem promover maior sensação de saciedade.

Vale a pena ressaltar que não existe um protocolo de saciedade validado para gatos e neste estudo adotamos um modelo de oferta de um alimento altamente palatável aos animais quatro horas após a ingestão dos tratamentos, como forma de

desafio, visando verificar o quanto os animais conseguem controlar a ingestão calórica, mesmo desafiados com dietas de elevada palatabilidade.

4.6 Dosagens Hormonais

Para reduzir o número de punções e estresse nas coletas seriadas de sangue, no dia 97 foram implantados cateteres centrais de duplo lúmen 4 Fr x 5 cm – KFF S.A. Os cateteres foram inseridos na veia jugular e fixados por meio de dois pontos simples na pele, atadura estéril e esparadrapo. Para a manutenção dos cateteres e prevenção da formação de coágulos, foram feitas lavagens com solução de heparina (0,5%). Para a colocação dos cateteres, os animais foram anestesiados, as medicações pré-anestésicas e a indução foram feitas por via intravenosa: Fentanil (3µg/Kg), Midazolam (0,2 mg/Kg), Cetamina (2 mg/Kg) e Propofol (4 mg/Kg). A manutenção da anestesia foi feita com Isoflurano com vaporizador universal e fluxo de oxigênio a 2 litros/Kg/hora e os parâmetros foram monitorados com monitor multiparamétrico MEC-1200 Mindray®. No dia 99 foram coletadas amostras de sangue através do cateter no tempo 0 (jejum) e 1, 2, 4 e 6 horas após a alimentação. As amostras de sangue pós-prandiais foram coletadas apenas dos animais que consumiram ao menos 1/3 da quantidade calculada para o consumo total diário. Depois de retirada a heparina contida no cateter, 2 mL de sangue foram coletados e transferidos para tubos contendo anticoagulante EDTA. Imediatamente a seguir, foram adicionados a cada amostra 20 µL de Pefablock® SC PLUS (Roche) e 20 µL de DPP-IV Inhibitor (Millipore) para possibilitar as dosagens de grelina e GLP-1, respectivamente. Logo após, o sangue foi homogeneizado por inversão de 8 a 10 vezes. As amostras foram centrifugadas em até 30 minutos após a coleta, à rotação de 3.000 rpm por 10 minutos em centrífuga de tubos. As amostras de plasma foram acondicionadas em tubos tipo eppendorf e congeladas à temperatura de -20°C para análise posterior.

Foram realizadas as determinações das concentrações plasmáticas de hormônios e proteínas relacionadas à saciedade (insulina, grelina, leptina, peptídeo YY e GLP-1). Tais dosagens foram realizadas em laboratório especializado em análises científicas (LEAC, Santana-SP), utilizando kits Milliplex / Millipore pela tecnologia Luminex® xMAP® padronizada para a espécie felina.

4.7 Análise Estatística

Na análise dos resultados de dos testes de saciedade, composição corporal e dosagens hormonais (grelina, GLP-1, insulina, leptina e peptídeo YY), verificou-se a condição de esfericidade pelo teste de Mauchly. Desta forma utilizou-se da análise usual de parcelas subdivididas no tempo, em que foram testadas as hipóteses de não existência do efeito da interação Tratamento x Tempo, efeito de Tempo e efeito de Tratamento. Para essa análise, foi utilizado o pacote ExpDes (FERREIRA, 2018) e Car (FOX E WEISBERG, 2011). Para a análise do consumo energético utilizou-se modelos de efeitos mistos considerando o efeito de animal, o qual foi ajustado por meio do pacote nlme (Pinheiro, et al. 2018). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software livre R (R Core Team, 2018).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O controle semanal do peso dos animais foi efetivo, não sendo verificada diferença do peso do início ao final do experimento (tabela 1, $p > 0.05$). Este controle foi importante para que o efeito da isoflavona fosse estudado de forma isolada sobre a necessidade energética de manutenção dos animais e também sobre a composição corporal.

Tabela 1: Peso dos animais recebendo as dietas Controle ou Isoflavona (1%) nos diferentes períodos experimentais.

| Tratamento | Períodos (dias) | | | | P valor | | | |
|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------|-------|-------|
| | 1 a 24 | 25-48 | 49-72 | 73-96 | Média | DP | Trat | Per |
| Peso (Kg) | | | | | | | | |
| Controle | 3,726 | 3,783 | 3,819 | 3,833 | 3,790 ^a | 0,1085 | 0.477 | 0.967 |
| Isoflavona | 3,610 | 3,717 | 3,705 | 3,689 | 3,680 ^a | | | |
| Média | 3,668 ^a | 3,750 ^a | 3,762 ^a | 3,761 ^a | | 0,1534 | | |

Médias seguidas por uma letra em comum não diferem pelo teste Tukey ($P > 0,05$).

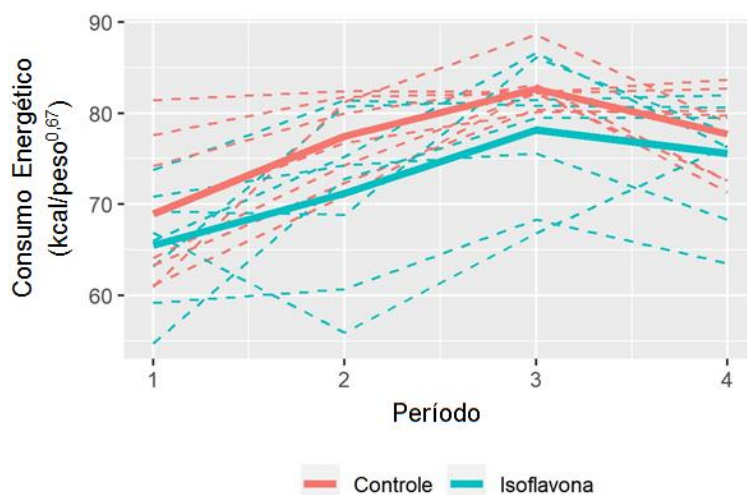
Apesar de o peso ter sido mantido ao longo do estudo, o consumo calórico dos gatos foi modificado, havendo efeito de período para esta variável ao longo do estudo (tabela 2, $p=0.0014$ e figura 4). Este efeito provavelmente ocorreu em função da época do ano, uma vez que o estudo teve início no final do verão e término no início do inverno, sendo maior o consumo calórico dos animais em função da maior necessidade para manter a temperatura corporal (termogênese adaptativa) nas espécies homeotérmicas como o gato. Diferente do efeito verificado no consumo calórico por período, o uso de isoflavona e o sexo dos animais não acarretaram efeito sobre o consumo energético, com níveis de significância (valor de P) de 0.1871 e 0.9942 respectivamente.

Tabela 2: Consumo calórico dos animais recebendo as dietas Controle ou Isoflavona (1%) nos diferentes períodos experimentais.

| Tratamento | Períodos (dias) | | | | Média | DP | P valor | |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------|---------|--------|
| | 1 a 24 | 25-48 | 49-72 | 73-96 | | | Trat | Per |
| Consumo (kcal/peso^{0,67}) | | | | | | | | |
| Controle | 68,96 | 77,45 | 82,688 | 77,73 | 76,71 ^a | 1,1370 | 0.187 | 0.0014 |
| Isoflavona | 65,48 | 71,23 | 78,14 | 75,56 | 72,6 ^a | | | |
| Média | 67,22 ^c | 74,34 ^b | 80,41 ^a | 76,64 ^{ab} | | 1,6080 | | |

Médias seguidas por uma letra em comum não diferem pelo teste Tukey ($P>0,05$).

Figura 4: Consumo energético no período por animal (linha tracejada) e consumo médio por tratamento (linha contínua grossa). Onde os períodos são identificados: 1 (média entre os dias 1 a 24); 2 (média entre os dias 25 a 48); 3 (média entre os dias 49 a 72) e 4 (média entre os dias 73 a 96).



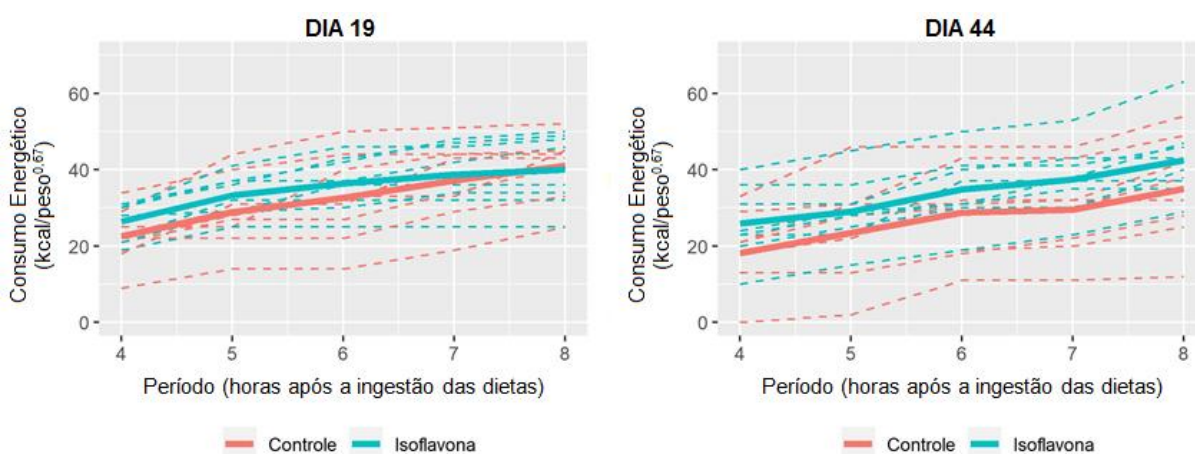
Não houve efeito significativo entre os tratamentos em relação à saciedade dos animais, com probabilidade de significância 0.5345 e 0.2146 para os testes de desafio realizados nos dias 19 e 44, respectivamente. Desta forma, pode-se inferir que a isoflavona não provocou efeito de saciedade nos gatos.

O consumo da dieta desafio aumentou com o passar do tempo em ambos os testes (valor-p<0,00001). O que pode ser observado na tabela 3 e também na figura 5. Esse aumento pode estar relacionado com o maior período pós-fornecimento da ração habitual e conseqüentemente, maior sensação de fome. Fica claro também o hábito dos gatos de se alimentarem com várias refeições ao longo do dia, uma vez que houve consumo da dieta desafio em todos os momentos de oferta.

Tabela 3: Probabilidade de significância do teste de esfericidade de Mauchly, teste de normalidade de Shapiro-Wilk, para tratamento e tempo obtidos com ajuste do modelo de parcelas subdivididas.

| Dia | Mauchly Tests | Shapiro-Wilk | Trat | Tempo | Trat*Tempo |
|-----|---------------|--------------|--------|----------|------------|
| 19 | 0.5191 | 0.9494 | 0.5345 | <0,00001 | 0.1163 |
| 44 | 0.0635 | 0.3992 | 0.2146 | <0,00001 | 0.5914 |

Figura 5: Desafio de Saciedade: Consumo energético no período por animal (linha tracejada) e consumo médio por tratamento (linha contínua grossa).



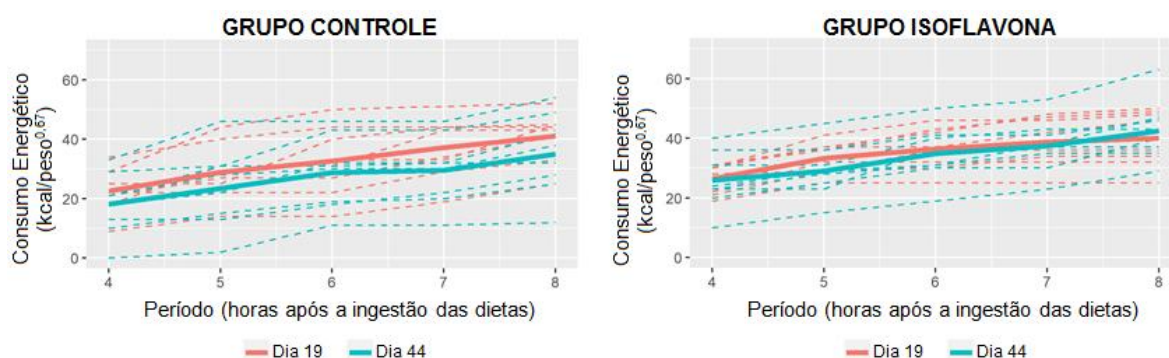
É importante ressaltar que nos dias em que foram realizados os desafios de saciedade os animais aumentaram consideravelmente a quantidade de energia consumida, em ambos os tratamentos. Os animais do grupo Controle que consumiram em média 76,7 kcal/kg^{0,67} ao longo do experimento para manter o peso, neste dia de desafio passaram a consumir 98,93 kcal/kg^{0,67}, 28,9% maior quantidade de energia em relação às necessidades energéticas de manutenção. Para os animais do grupo Isoflavona que consumiram em média 72,9 kcal/kg^{0,67} ao longo do experimento para manter o peso, neste dia de desafio passaram a consumir 96,22 kcal/kg^{0,67}, 31,2% a mais em relação às suas necessidades calóricas.

Este é um ponto importante, pois reforça a dificuldade dos animais em controlar a ingestão calórica quando submetidos à ingestão de alimentos mais palatáveis, a qual foi próxima do calculado para animais não castrados, cerca de 30% superior à necessidade energética real dos animais. Desta forma, torna-se primordial que a oferta de alimentos para gatos castrados seja feita baseando-se nas suas necessidades energéticas, evitando assim o ganho de peso.

O NRC (2006) recomenda uma ingestão calórica para gatos adultos jovens de 100 quilocalorias por unidade de peso metabólico (kg^{0,67}). Os gatos empregados no estudo apresentam uma necessidade cerca de 25% inferior a este valor, conforme mostrado nos resultados de ingestão para a manutenção do peso. O consumo elevado de calorias quando os gatos foram desafiados no teste de saciedade expõe um problema relatado na literatura com a castração, de que apesar da necessidade calórica dos animais reduzir, esta não é acompanhada pelo menor estímulo de ingestão alimentar. Frente a isto, a ingestão de isoflavona não foi eficiente em controlar a ingestão alimentar.

Os testes de saciedade foram realizados em dois momentos do estudo para se ter uma repetição dos achados. Na figura a seguir, pode ser observado que o comportamento de ingestão de alimento nos grupos Controle ou Isoflavona permanece semelhante tanto no dia 19 quanto no dia 44.

Figura 6: Desafio de Saciidade: Consumo energético no período por animal (linha tracejada) e consumo médio por dia - 19 ou 44 (linha contínua grossa).



Com relação à avaliação da composição corporal, não foram observadas diferenças estatísticas entre o período inicial e final dos tratamentos (tabela 4). Sendo assim, podemos inferir que a isoflavona não contribuiu para mudanças na composição corporal em gatos. Esse resultado difere de trabalhos realizados em ratas, nos quais se observou redução no peso (XIE et al., 2018; KIM et al., 2006) e na quantidade de gordura visceral (KURRAT et al., 2015; XIE et al., 2018; KIM et al., 2006) e aumento da quantidade de massa magra (KURRAT et al., 2015).

Tabela 4: Composição corporal dos gatos dos tratamentos Controle ou Isoflavona nos períodos inicial e após 99 dias de consumo das dietas experimentais.

| Período | Tratamentos | | | | P valor ¹ | | |
|------------------------------------|-------------|------------|-------------------|------|----------------------|--------|----------|
| | Controle | Isoflavona | Média | EPM | Trat | Per | TratxPer |
| Gordura Total (%) | | | | | | | |
| Inicial | 24.81 | 20.16 | 22.49 | 2.73 | 0.10 | 0.46 | 0.57 |
| Final | 22.88 | 22.38 | 22.63 | 1.40 | | | |
| Média | 23.85 | 21.27 | | | | | |
| Gordura Intra-abdominal (%) | | | | | | | |
| Inicial | 22.51 | 17.64 | 20.08 | 2.49 | 0.09 | 0.17 | 0.82 |
| Final | 18.84 | 18.34 | 18.59 | 1.05 | | | |
| Média | 20.68 | 17.99 | | | | | |
| Gordura subcutânea (%) | | | | | | | |
| Inicial | 2.30 | 2.52 | 2.41 ^b | 0.30 | 0.44 | 0.0001 | 0.43 |
| Final | 4.04 | 4.04 | 4.04 ^a | 0.55 | | | |
| Média | 3.17 | 3.28 | | | | | |

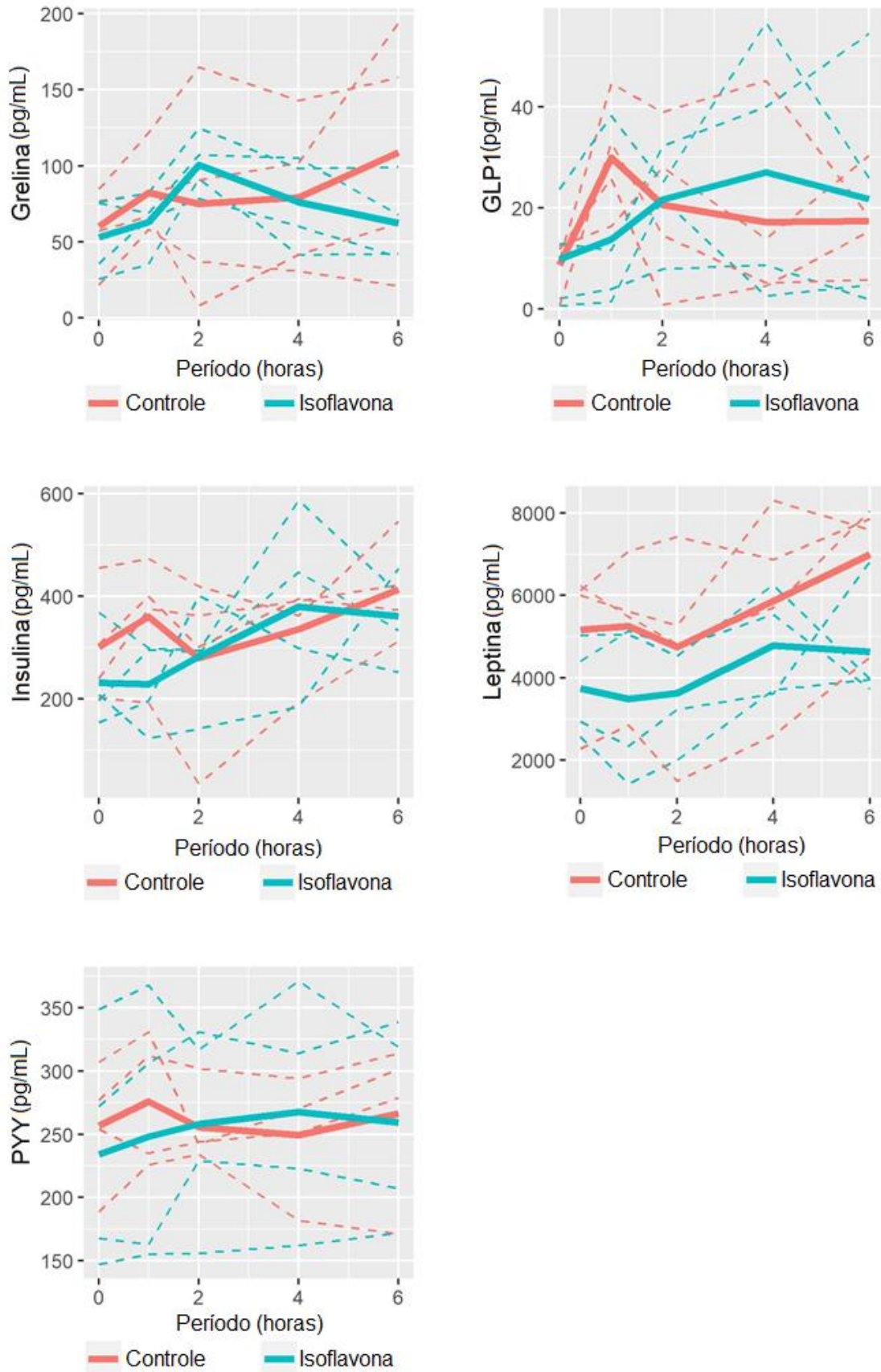
Médias seguidas por uma letra em comum não diferem pelo teste Tukey (P>0,05).

Na análise das dosagens hormonais (grelina, GLP-1, insulina, leptina, peptídeo YY), nenhum dos hormônios apresentou alteração significativa na presença do tratamento (valor- $p > 0,05$ para todos). Na figura 7, a Leptina, é o único que apresenta concentrações médias separadas para os grupos Controle e Isoflavona. Entretanto os perfis, por animal, aparecem entrelaçados explicando o valor- $p = 0.2073$, não significativo. Apesar de não ter sido verificado efeito de tratamento para as dosagens hormonais, os hormônios insulina e leptina apresentaram efeito de período, aumentando suas concentrações até o período de seis horas após a ingestão alimentar. Esta resposta pode estar relacionada com o processo longo de digestão e absorção de nutrientes, as quais podem levar até 9 horas e estimulam as secreções destes dois hormônios.

Tabela 5: Probabilidade de significância do teste de esfericidade de Mauchly, teste de normalidade de Shapiro-Wilk, e para tratamento e tempo obtidos para as análises das curvas hormonais pós-prandiais.

| Hormônio | Mauchly Tests | Shapiro-Wilk | Trat | Tempo | Trat*Tempo |
|----------|---------------|--------------|--------|--------|------------|
| Grelina | 0.1568 | 0.0556 | 0.7187 | 0.0943 | 0.0722 |
| GLP.1 | 0.6621 | 0.4628 | 0.9944 | 0.1632 | 0.2527 |
| Insulina | 0.2657 | 0.2291 | 0.5554 | 0.0276 | 0.2752 |
| Leptina | 0.2145 | 0.1460 | 0.2073 | 0.0118 | 0.6773 |
| PYY | 0.4591 | 0.3337 | 0.8880 | 0.6511 | 0.3646 |

Figura 7: Dosagens sanguíneas hormonais pré e pós-prandiais (1, 2, 4 e 6 horas) dos gatos dos tratamentos Controle e Isoflavona.



Zhang et al. (2009) avaliaram os efeitos de diferentes concentrações de isoflavona na dieta de ratas castradas. A preparação continha 29,99% de genistina, 1,93% de genisteína, 10,46% de daidzina e 0,25% de daidzeína. Durante um período de quatro semanas os animais tiveram livre acesso à dieta rica em gordura e água. Os animais que consumiram dietas contendo concentrações 1.200 mg/Kg (média) e 3.600 mg/Kg (alta) apresentaram redução no peso corporal, na gordura abdominal total e na ingestão de alimentos, quando comparados ao grupo controle. Os resultados também evidenciaram que a isoflavona pode diminuir os níveis de grelina e neuropeptídeo Y e aumentar as concentrações de colecistocinina e peptídeo YY. Analisando os dados de tal estudo, podemos observar que apesar de as concentrações de isoflavona (0,12% e 0,36%) utilizadas serem inferiores à utilizada no presente trabalho (1%) os resultados obtidos podem estar relacionados com o livre acesso às dietas. É importante ressaltar que os protocolos experimentais diferenciados podem afetar os resultados obtidos. Neste estudo em gatos, os animais não foram desafiados a consumir calorias em excesso, mas sim para avaliar o efeito isolado da isoflavona sobre os indicadores avaliados.

Em outro trabalho realizado com o objetivo de avaliar a propriedade estrogênica da isoflavona também teve como resultado a redução da ingestão alimentar em ratas castradas, mas não em ratos machos, com livre acesso a uma dieta contendo 100 a 300 mg de isoflavona total / kg de ração (0,1% a 0,3%). O composto utilizado continha 15,5% de genisteína e 12,7% de daidzeína (KISHIDA et al, 2008). Da mesma forma que no caso anterior, esse estudo não controlou a quantidade de alimento fornecido. Desta maneira, não é possível identificar se a isoflavona exerce influência na necessidade energética para manutenção do peso dos animais. Outro ponto importante está relacionados ao sexo dos animais, uma vez que grande parte dos estudos utilizou-se ratas e neste estudo em gatos foram utilizados animais de ambos os sexos.

Em contrapartida aos resultados anteriores, um estudo realizado com mulheres saudáveis na pós-menopausa não obteve redução na ingestão energética e no peso corporal, apesar do aumento da concentração de peptídeo YY observado do grupo suplementado com isoflavona. Para o estudo foram utilizadas barras de cereais enriquecidas com isoflavona (50 mg/dia, sendo a relação genisteína:daidzeína de 2:1) (WEICKERT, 2006).

Um estudo avaliou os efeitos do uso diário de isoflavona confrontando com a proteína do leite (placebo) na dieta de 202 mulheres na pós-menopausa, por um período de 12 meses. A porção diária consistia em 36,5 g de proteína de soja contendo 0,20% de genisteína, 0,16% de daidzeína e 0,02% de glicina, totalizando 0,38%. Sob tais condições, não houve diferenças estatísticas no índice de massa corporal, na relação cintura-quadril ou no desempenho físico entre os grupos (KOK et al, 2005). Tais resultados assemelham-se aos dados de composição corporal avaliados neste estudo em gatos, o qual também não demonstrou diferença entre os tratamentos.

Os estudos em humanos têm falhado em demonstrar efeitos significativos da isoflavona sobre os indicadores hormonais e composição corporal, conforme verificado por Orsatti et al. (2010) com mulheres no período pós-menopausa. Estes autores avaliaram os efeitos ocasionados pela suplementação de 250 mg de extrato padronizado de Soja (contendo 100 mg de isoflavona com aproximadamente 50% de genisteína e 35% de daidzeína) aliado ou não a treinos de resistência por um período de nove meses. Os resultados indicaram que a isoflavona, nessa determinada concentração, não alterou a composição corporal (gordura e massa muscular), nem mostrou efeitos aditivos ou sinérgicos quando utilizada em associação com exercícios de resistência. Os três trabalhos supracitados realizados com mulheres não obtiveram efeitos significativos no uso da isoflavona.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que a isoflavona suplementada a 1% da dieta não apresenta qualquer influência sobre a necessidade energética, saciedade, composição corporal e respostas sanguíneas pós-prandiais de substâncias relacionadas à saciedade em gatos castrados.

REFERÊNCIAS

APPLETON, D. J.; RAND, J. S.; SUNVOLD, G. D. **Plasma leptin concentrations in cats: reference range, effect of weight gain and relationship with adiposity as measured by dual energy x-ray absorptiometry.** *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.2, p.191-199, 2000.

APPLETON, D. J.; RAND, J. S.; SUNVOLD, G. D. **Plasma leptin concentrations are independently associated with insulin sensitivity in lean and overweight cats.** *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 4, p.83-93, 2002.

BHATHENA, S. J.; VELASQUEZ, M. T. **Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes.** *The American Journal of Clinical Nutrition* 76, 1191-1201. 2002.

BACKUS, R. C.; HAVEL, P. J.; GINGERICH, R. I.; ROGERS, Q. R. **Relation between serum leptin immunoreactivity and body fat mass as estimated by use of a novel gas-phase. Fourier transform infrared spectroscopy deuterium dilution method in cats.** *American Journal Veterinary Research*, v.61, p.796-801, 2000.

BUELUND, L.E.; NIELSEN, D.H.; MCEVOY, F.J.; SVALASTOGA, E.L.; BJORNVAD, C.R. **Measurement of body composition in cats using computed tomography and dual energy x-ray absorptiometry.** *Veterinary Radiology & Ultrasound*, Vol. 52, No. 2, p 179–184. 2011.

CORBEE, R. J. **Obesity in show cats.** *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 98, p. 1075-1080. 2014.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A (2018). **ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portuguese).** R package version 1.2.0. <https://CRAN.R-project.org/package=ExpDes.pt>

FETTMAN, M. J.; STANTON, C. A.; BANKS, L. L.; HAMAR D. W.; JOHNSON, D. E.; HEGSTAD, R. L.; JOHNSTON, S. **Effects of neutering on bodyweight, metabolic rate and glucose tolerance of domestic cats.** *Research in Veterinary Science*, v.62, p.131-136. 1997.

FOX, J.; WEISBERG, S (2011). **An {R} Companion to Applied Regression.** Second Edition. Thousand Oaks CA: Sage. URL: <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>

GERMAN, A. J. **The growing problem of obesity in dogs and cats.** *The Journal of Nutrition* 7, 1940-1946. 2006.

HOENIG, M. & FERGUSON, D. C. **Effects of neutering on hormonal concentrations and energy requirements in male and female cats.** *AJVR*. v.63, n.5, p. 634-639. 2002.

ISHIOKA, K.; OKUMURA, M.; SAGAWA, M.; NAKADOMO, F.; KIMURA, K.; SAITO, M. **Computed tomographic assessment of body fat in beagles.** *Veterinary Radiology & Ultrasound*, Vol. 46, No. 1, pp 49–53. 2005.

KIM, H. K.; NELSON, C. D.; DELLA-FERA, M. A.; YANG, J. Y.; ZHANG, W.; DUAN, J.; HARTZELL, D.L.; HAMRICK, M.W. ; BAILE, C. A. **Genistein decreases food intake, body weight, and fat pad weight and causes adipose tissue apoptosis in ovariectomized female mice.** *The Journal of Nutrition* 136, 409–414. 2006.

KOK, L.; KREIJKAMP-KASPERS, S.; GROBBEE, D. E.; LAMPE, J. W.; SCHOUW, Y. T. **Soy isoflavones, body composition, and physical performance.** *Maturitas* 52, p.102–110. 2005.

KISHIDA, T.; MIZUSHIGUE, T.; OHTSU, Y.; ISHIKAWA, S.; NAGAMOTO, M.; IZUMI, T.; OBATA, A.; EBIHARA, K. **Dietary Soy Isoflavone-Aglycone Lowers Food Intake in Female Rats With and Without Ovariectomy.** *Obesity Journal*, v. 16, n.2, p.290-297. 2008.

KURRAT, A.; BLEI, T.; KLUXEN, F. M.; MUELLER, D. R.; PIECHOTTA, M.; SOUKUP, S.T.; KULLING, S.E.; DIEL, P. **Lifelong exposure to dietary isoflavones reduces risk of obesity in ovariectomized Wistar rats.** *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 2407–2418. 2015.

NRC - National Research Council. **Nutrient Requirements of Dogs and Cats.** *The National Academy Press*, Washington, USA. 2006.

ORSATTI, F. L.; NAHAS, E. A. P.; NAHAS-NETO, J.; MAESTA, N.; ORSATTI, C. L.; FERNANDES, C. E. **Effects of Resistance Training and Soy Isoflavone on Body Composition in Postmenopausal Women.** *Obstetrics and Gynecology International*, p. 1-8. 2010.

PEIXOTO, J. C.; FEIJÓ, Â. P.; TEIXEIRA, A. B. S.; LOUZADA, S. R. N. **Benefícios da soja no controle da obesidade.** *Revista Eletrônica Novo Enfoque* 12, 47 – 67. 2011.

PINHEIRO J.; BATES D.; DEBROY S.; SARKAR D. R. Core Team (2018). **_nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models_.** R package version 3.1-137, URL <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>>.

R Core Team (2018). **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

ROMERO, C. E. M; ZANESCO, A. **O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade.** *Revista de Nutrição* 19(1):85-91. 2006.

SERVET, E.; SOULARD, Y.; VENET, C.; BIOURGE, V. **Evaluation of Diets for Their Ability to Generate "Satiety" in Cats.** *ACVIM*. 2008.

SUZUKI, K.; SIMPSON, K.A.; MINNION, J.S.; SHILLITO, J.C.; BLOOM, S.R. **The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation.** *Endocr J*. 57(5):359–372. 2010.

SETCHELL, K.D.R.; CASSIDY, A. **Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health.** *J. Nutr*. 129: 758S–767S. 1999.

VASCONCELOS, R. S.; BORGES, N. C.; GONÇALVES, K. N. V.; CANOLA, J. C.; PAULA F. J. A.; MALHEIROS, E. B.; BRUNETTO, M. A.; CARCIOFI, A. C. **Protein intake during weight loss influences the energy required for weight loss and maintenance in cats.** *Journal of Nutrition*, p.855-860, 2009. WILDING, J. P. Neuropeptides and appetite control. *Diabetes Metabolism*, v.19, p.619–627, 2002.

XIE, C.; KANG, S.S.; CHO, K.; PARK, K.H.; LEE, D.H. **Isoflavone-enriched soybean (Glycine max) leaves prevents ovariectomy-induced obesity by enhancing fatty acid oxidatio.** *Journal of Functional Foods*. 43, 165–172. 2018.

WEI, A.; FASCETTI, A. J.; KIM, K.; LEE, A.; GRAHAM, J. L.; HAVEL, P.J.; RAMSEY, J. J. **Early Effects of Neutering on Energy Expenditure in Adult Male Cats.** *PLOS ONE*, v.9. 2014.

WEICKERT, M. O.; REIMANN, M.; OTTO, B.; HALL, W. L.; VAFEIADOU, K.; HALLUND, J.; FERRARI, M.; TALBOT, D.; BRANCA, F.; BÜGEL, S.; WILLIAMS, C. M.; ZUNFT, H.; KOEBNICK, C. **Soy isoflavones increase preprandial peptide YY (PYY), but have no effect on ghrelin and body weight in healthy postmenopausal women.** *Journal of Negative Results in BioMedicine*. 5:11, p1-6. 2006.

WU, J.; WANG, X.; CHIBA, H.; HIGUCHI, M.; NAKATANI, T.; EZAKI, O.; CUI, H.; YAMADA, K.; ISHIMI, Y. **Combined intervention of soy isoflavone and moderate exercise prevents body fat elevation and bone loss in ovariectomized mice.** *Metabolism* 7, 942-948. 2004.

ZHANG, Y.; NA, X.; ZHANG, Y.; LI, L.; ZHAO, X.; CUI, H. **Isoflavone Reduces Body Weight by Decreasing Food Intake in Ovariectomized Rats.** *Ann Nutr Metab*. 54, p.163–170. 2009.

ANEXOS

Anexo A: Certificado de aprovação pela comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM).



Comissão de Ética no Uso de Animais

da Universidade Estadual de Maringá

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ISOFLAVONA SOBRE A SACIEDADE, NECESSIDADES ENERGÉTICAS, COMPOSIÇÃO CORPORAL E RESPOSTAS HORMONAIAS EM GATOS CASTRADOS", protocolada sob o CEUA nº 1757010419 (ID 002170), sob a responsabilidade de **Ricardo Souza Vasconcellos e equipe; MONICA ESTELA ZAMBON MERENDA** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 15/05/2019.

We certify that the proposal "ISOFLAVONE ON SATIETY, ENERGY REQUIREMENTS, BODY COMPOSITION AND HORMONE RESPONSES IN CASTRATED CATS", utilizing 16 Cats (6 males and 10 females), protocol number CEUA 1757010419 (ID 002170), under the responsibility of **Ricardo Souza Vasconcellos and team; MONICA ESTELA ZAMBON MERENDA** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 05/15/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2019** a **04/2020** Área: **Dzo-Zootecnia**

Origem: **Fazenda Experimental de Iguatemi**

Espécie: **Gatos**

sexo: **Machos**

idade: **4 a 6 anos**

N: **6**

Linhagem: **SRD**

Peso: **3 a 6 kg**

Origem: **Fazenda Experimental de Iguatemi**

Espécie: **Gatos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **4 a 6 anos**

N: **10**

Linhagem: **SRD**

Peso: **3 a 6 kg**

Local do experimento: O referido laboratório encontra-se na Fazenda Experimental Iguatemi, pertencente à Universidade Estadual de Maringá. Este local é distante pelo menos 200 m de outras criações de animais e possui barreiras naturais. Conta com um laboratório para a manipulação de amostras e processamento, uma sala de armazenamento de alimentos e quarentena de animais, uma sala de gaiolas metabólicas e um galil coletivo. Os pisos e paredes são revestidos em piso cerâmico branco para facilitar a higienização e a área coletiva de manutenção dos animais conta com enriquecimento ambiental.

Maringá, 15 de maio de 2019

Profa. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos
Coordenadora da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá

Dr. Claudemir Martins Soares
Coordenador Adjunto da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá