

UNIVERSIDADE DE UBERABA  
ANNA LAURA BELLOCCHIO

**EFEITO DA *TURKESTERONA* NO METABOLISMO DE  
RATOS OBESOS**

Uberaba, MG  
2016

ANNA LAURA BELLOCCHIO

**EFEITO DA *TURKESTERONA* NO METABOLISMO DE  
RATOS OBESOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração: Biopatologia, do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade de Uberaba.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Thedei Jr

Uberaba, MG

2016

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

B417e Bellocchio, Anna Laura.  
Efeito da Turkesterona no metabolismo de ratos obesos / Anna  
Laura Bellocchio. – Uberaba, 2016.  
44 f.: il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa  
de Mestrado em Odontologia. Área de Biopatologia, 2016.  
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Thedei Junior.

1. Hormônios. 2. Obesidade. 3. Rato como animal de  
laboratório. 4. Odontologia. I. Thedei Junior, Geraldo. II.  
Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia.  
Área de Biopatologia. III. Título.

CDD 612.405

ANNA LAURA BELLOCCHIO

EFEITO DA *TURKESTERONA* NO METABOLISMO  
DE RATOS OBESOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração: Biopatologia, do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade de Uberaba.

Aprovada em: \_\_\_\_/11/2016

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr.  
Universidade de Uberaba

---

Prof. Dr.  
Universidade de Uberaba

---

Prof. Dr.  
Universidade

## **DEDICATÓRIA**

Agradeço a Deus por permitir que mais este sonho se realizasse na minha vida,

ao meu orientador e professor Dr. Geraldo Thedei, pela grande dedicação na elaboração dessa pesquisa,

aos alunos de iniciação científica Matheus e Victor,

ao Rodolpho pela sua disponibilidade de ajudar na prática laboratorial,

a minha amiga Isabela, a minha prima Barbara Bellocchio e aos anjos que são meus pais, que sempre me incentivaram com amor e carinho, em todos os meus projetos,

ao meu irmão e meus amigos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa minha nova conquista! Muito obrigada!

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Ao meu orientador Prof. Dr. Geraldo Thedei a quem devo agradecer por me orientar e pela confiança na realização desse trabalho.

Aos professores Dr. Cesar Penazzo Lepri e Dr. Marcelo Rodrigues Pinto pelos seus ensinamentos e conselhos durante o período de construção desse trabalho.

À Alessandra Scoda pela sua disponibilidade em me ajudar. Para sempre serei grata e cultivarei intenso respeito e admiração.

Muito obrigada!

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade de Uberaba, por meio do Reitor Prof. Dr. Marcelo Palmério.

À Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-graduação e Extensão por meio do Pró-Reitor Prof. Dr. André Luís Teixeira Fernandes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos Professores do Mestrado, a minha eterna gratidão pelo apoio e pelos ensinamentos.

Aos colegas do Mestrado pela convivência e as experiências trocadas.

A todos os funcionários da Universidade Uberaba agradeço pelo trabalho executado.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que esta dissertação pudesse ser realizada.

Enfim, a todos o meu muito obrigada!

BELLOCCHIO, A.L. **Efeito da *Turkesterona* no metabolismo de ratos obesos.** 2016. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade de Uberaba, Uberaba, 2016.

## RESUMO

A obesidade pode ser considerada uma doença crônica, devida ao aumento do armazenamento de tecido adiposo no organismo, relacionando-se com vários riscos para a saúde. Alguns estudos sugerem que o extrato da planta *Ajuga turkestanica* apresenta uma série de compostos bioativos denominados coletivamente “fitoecdisteróides”, associados à promoção da síntese de proteínas, manutenção do estado anabólico e intensificação de massa muscular magra, ao mesmo tempo, reduzindo tecido adiposo. O objetivo do presente trabalho foi determinar o efeito da administração de um extrato de Turkesterona no metabolismo de ratos obesos. Foram utilizados 25 animais, com peso médio de 140 gramas no início do experimento. Os animais foram induzidos à obesidade pelo consumo de uma dieta hiperlipídico-proteica. Em seguida, foram tratados por gavagem diariamente com Turkesterona (6mg/Kg PC/dia ou 36 mg/Kg PC/dia) ou solução salina estéril. O peso corporal foi monitorado semanalmente e ao final do experimento foram coletadas os órgãos e amostras de sangue para avaliação bioquímica. Os grupos que receberam Turkesterona tiveram uma redução do peso corporal, embora não significativa estatisticamente, quando comparada com o grupo controle. A Turkesterona, nas condições testadas não levou a alteração no peso corporal ou dos órgãos. O tratamento também não causou alteração nos parâmetros bioquímicos avaliados. Diante do exposto, podemos concluir que, nas condições testadas, a Turkesterona não tem efeito no metabolismo corporal e também não provoca alterações bioquímicas no organismo de ratos obesos.

**Palavras-chave:** Turkesterona, obesidade, ratos Wistar.



BELLOCCHIO, A.L. **Effect of turkesterone in metabolism of obese rats.** 2016. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade de Uberaba, Uberaba, 2016.

### ABSTRACT

Obesity can be considered a chronic disease, due to increased fat storage in the body, relating to various health hazards. Some studies suggest that the extract of *Ajuga turkestanica* plant exhibits a number of bioactive compounds collectively referred "fitoecdisteroids" associated with the promotion of protein synthesis, maintenance of the anabolic state and enhancement of lean muscle mass, while while lowering adipose tissue. The objective of this study was to determine the effect of administration of a Turkesterone extract in the metabolism of obese rats. 25 animals were used, with an average weight of 140 grams at the beginning of the experiment. The animals were induced to obesity by consumption a hyperlipidic and hyperproteic diet. Then, they were treated by gavage daily with Turkesterone (6 mg / kg BW / day or 36 mg / kg BW / day) or sterile saline. Body weight was monitored weekly and at the end of the experiment were collected organs and blood samples for biochemical evaluation. The groups that received Turkesterone had a body weight loss, although not statistically significant compared with the control group. Turkesterone, under the conditions tested, did not lead to changes in body weight or organs. The treatment also caused no change in the evaluated biochemical parameters. Given the above, we can conclude that, under the conditions tested, the Turkesterone has no effect on body metabolism and also does not cause biochemical changes in the obese rats.

**Keywords:** Turkesterona, obesity, Wistar rats.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fisiopatologia da Síndrome Metabólica.....	15
<b>Figura 2.</b> Estrutura da Turkesterona. Gracy, 2008.....	16
<b>Figura 3.</b> Estrutura da 20 – hidroxiecdisona, TÓTH et al., 2008. ....	17
<b>Figura 4.</b> Estrutura química da $\beta$ -Ecdisterona e da Turkesterona. R=OH. A seta dupla indica o sistema diol, o “A” indica a Hidroxila 11 e a “B” indica a Hidroxila 20. ....	19
<b>Figura 5.</b> Desenho experimental. ....	23
<b>Figura 6.</b> Procedimento de gavagem. ....	26
<b>Figura 7.</b> Determinação do comprimento do animal. ....	27
<b>Figura 8.</b> Evolução do peso corporal dos ratos durante o período de indução da obesidade (semanas 0 a 8) e após o início do tratamento com Turkesterona 6 mg/Kg de PC/dia ou 36 mg/Kg de PC/dia, em comparação com o grupo tratado com solução salina. A seta indica o início do tratamento com a Turkesterona. O símbolo “*” indica o momento em que o grupo de animais em dieta HLP adquiriu peso significativamente maior que o grupo controle ( $p < 0,0001$ ). ....	31
<b>Figura 9.</b> Variação no peso dos animais ao final do tratamento com Turkesterona 6 mg/Kg de PC/dia ou 36 mg/Kg de PC/dia, em comparação com o grupo tratado com solução salina. ....	32
<b>Figura 10.</b> Média do Índice de Lee dos animais após o tratamento com Turkesterona 6 mg/Kg de PC/dia e 36 mg/Kg de PC/dia, em comparação com o grupo tratado com solução salina. ....	33

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Peso relativo de órgãos e tecidos de ratos obesos tratados por 4 semanas com Turkesterona, em relação ao grupo placebo tratado com solução salina. Os dados são apresentados em média  $\pm$  desvio padrão (distribuição Normal) ou em Mediana (mínimo-máximo) (distribuição não Normal). ..... 34

**Tabela 2.** Análise bioquímica dos ratos obesos tratados por 4 semanas com Turkesterona, em relação ao grupo placebo tratado com solução salina. Os dados são apresentados em média  $\pm$  desvio padrão (distribuição Normal) e em Mediana (mínimo-máximo) (distribuição não Normal). ..... 34

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Nomenclatura dos animais de acordo com a dieta recebida.....	23
<b>Quadro 2.</b> Composição centesimal da dieta experimental.....	24
<b>Quadro 3.</b> Composição centesimal da dieta controle. ....	25

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.2 Atividade física e controle do peso .....	14
1.3 Turkesterona .....	16
<b>2 HIPOTESE</b> .....	<b>21</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
3.1 Geral .....	21
3.2 Específicos .....	21
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
4.1 Animais e divisão dos grupos .....	22
4.2 Manutenção dos animais .....	23
4.3 Dietas .....	24
4.3.1 Dieta experimental .....	24
4.3.2 Dieta controle .....	24
4.4 Preparo da Turkesterona e administração .....	25
4.5 Determinação do efeito da Turkesterona .....	26
4.5.1 No peso dos animais .....	26
4.5.2 No Índice de Lee .....	26
4.5.3 No peso dos órgãos e tecidos .....	27
4.5.4. Nas dosagens bioquímicas .....	27
4.5.4.1 Dosagem de Glicose .....	28
4.5.4.2 Dosagem de Colesterol .....	28
4.5.4.3 Dosagem de Triglicérides .....	28
4.5.4.4 Na dosagem de TGP e TGO .....	28
4.5.4.5 Na dosagem de Albumina plasmática .....	28
4.5.4.6 Na dosagem de Ureia e Creatinina, Proteínas totais .....	29
4.5.4.7 Na dosagem de CPK (Creatina Fosfoquinase) .....	29
4.6 Eutanásia .....	29
4.7 Análise Estatística .....	29
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
5.1 Peso corporal .....	31
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>39</b>
<b>NORMAS UTILIZADAS</b> .....	<b>42</b>
<b>ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal</b> .....	<b>43</b>
<b>ANEXO B – Laudo de análises da Turkesterona</b> .....	<b>44</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Rossum et al., (2015), citaram que a obesidade é uma doença crônica, complexa e epigenética que pode ser definida como o aumento do armazenamento de tecido adiposo no organismo, se associando a vários riscos para a saúde, correlacionadas a tal morbidade, cujo enfoque principal paira sobre as doenças de cunho cardiovascular e o diabetes.

Segundo Barbieri e Mello (2012), a obesidade está presente em nossa sociedade desde a história, simbolizando, por vezes, beleza e fertilidade. No Período Neolítico as “deusas” eram cultuadas e admiradas por seios, quadris e coxas volumosas. Hipócrates, na medicina greco-romana, já alertava, no entanto, sobre os malefícios da obesidade para a saúde humana ao afirmar que a morte súbita era mais comum em indivíduos com excesso de gordura corporal. No Império Romano, o corpo belo era o corpo magro e esbelto, o que obrigava as damas a fazerem prolongados jejuns. Essa mudança no padrão de beleza, também é possível ser verificada por meio da História da Arte, uma vez que, as obras do século XIII a XX retratam poucas figuras mitológicas ou pessoas obesas. Ao longo do tempo, por conta do surgimento de novas necessidades humanas, os padrões de beleza e a composição corporal dos homens foram se modificando.

Segundo Conde e Borges (2011) à medida que se intensificam os casos de obesidade entre a população mundial atingindo não apenas países desenvolvidos, mas como também subdesenvolvidos como é o caso do Brasil, maiores são as investigações relacionadas ao atual padrão nutricional utilizado pela sociedade contemporânea, sobretudo nas três últimas décadas. Assim, diversos são os estudos voltados para o exame das recorrentes alterações do comportamento de vida social que invariavelmente conduzem a inadequados hábitos de alimentação se estendendo não somente ao público adulto como, principalmente ao contingente infantil.

De acordo com Pinheiro et al (2004), a obesidade caracteriza-se por ser uma enfermidade crônica associada a uma miríade de complicações, assinalada pela acumulo excessivo e, não obstante, progressivo de gorduras em intensidade prejudiciais a tal ponto de comprometer a saúde do indivíduo. Ao passo que, inviabiliza a manutenção eutrófica de desenvolvimento do mesmo, isto é, uma

correta relação entre padrões de altura e peso devidamente coerente com o biótipo da pessoa.

Em contrapartida, não se pode desconsiderar desta problemática a questão decorrente do poder do marketing da indústria alimentícia representada pela intensa oferta de alimentos com elevados teores calóricos. Sem esquecer evidentemente o abusivo consumo de dietas ricas em gorduras (principalmente de origem animal), com alta densidade energética encontradas no vasto universo do *fast food*, além do consumo exagerado de salgadinhos e guloseimas com elevada quantidade de açúcares, inversamente proporcional à aquisição de fibras e vitaminas naturais (VIEIRA, 2005; BAMBA; RADER, 2007).

Tal situação, segundo Silva e Velardi (2008), condiciona a elevação dos triglicérides, colesterol que quando em quantidade exagerada causa ateromas, bem como complicações respiratórias, cada vez mais cedo manifestadas. Ademais, a gradativa queda de atividades físicas, fruto do sedentarismo representado por horas sentado à frente da televisão, computador e celulares que colabora ainda mais para o agravamento desse quadro nutricional.

Lamounier e Parizzi (2006) citam que a obesidade consiste em um fenômeno que atinge todas as faixas etárias da população contemporânea, sendo que sua prevalência cresce a cada ano levando a preocupantes consequências biopsicossociais. Até há algumas décadas este distúrbio nutricional era mais frequente em adultos, porém já atinge crianças e adolescentes.

Um dos motivos do avanço gradativo e dramático de obesidade entre crianças, levando ao desenvolvimento de diversas patologias como diabetes do tipo 1 (mellitus), hipertensão, dislipidemia, síndromes metabólicas, dentre outras enfermidades, ratificando a conotação de um problema de saúde pública tamanha é sua extensão na população, comumente desprovida de informação a respeito dos perigos de uma má alimentação (SILVA E VELARDI, 2008).

Destaca-se outro inconveniente comportamental observado ultimamente que, implica invariavelmente a baixa-estima do indivíduo obeso debilitando a performance profissional e relacionamentos entre os pares, o que resulta em consequências psicológicas, um reflexo da pertinência do eufemismo aplicado pela indústria da estética, que mascara a ditadura da beleza aliada a ostentação da imagem (OLIVEIRA E ANDRADE, 2013).

Para Gigante, et al. (2009), tais complicações, diabetes do tipo 1 (mellitus), hipertensão, dislipidemia, síndromes metabólicas, dentre outras enfermidades, estão diretamente associadas ao crescente aumento nos índices de obesidade entre a população, acarretando a prevalência das chamadas doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), agravadas pela inatividade física, adesão ao tabagismo, que invariavelmente são responsáveis por grande quantia repercutida nos gastos da saúde pública.

## **1.2 Atividade física e controle do peso**

Conforme Rosini *et al.* (2012), a elevação dos números de casos de sobrepeso e obesidade ocorre de maneira inversamente proporcional a energia gasta em atividades de trabalho, como por exemplo, redução do comprimento dos afazeres domésticos, como a utilização excessiva de máquinas e eletrodomésticos. Além do uso de veículos para transporte pode ter uma direta relação energia diária total gasta pela população.

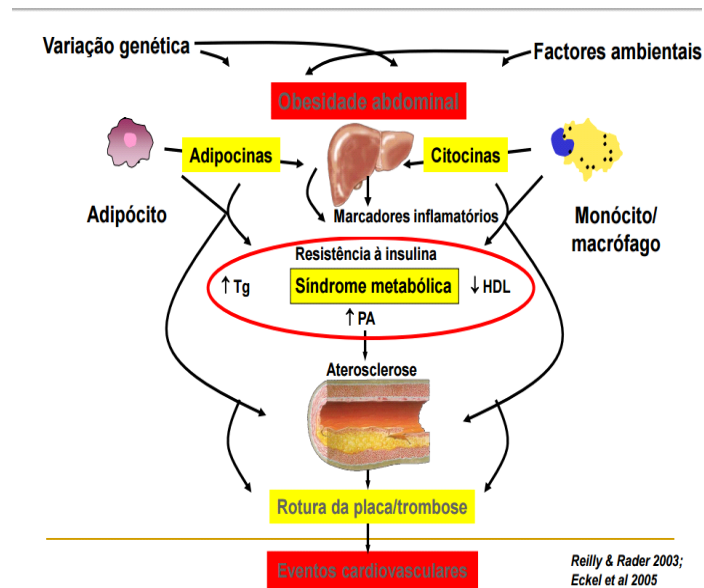
De acordo com Mello *et al.* (2004), a obesidade pode ser classificada em dois tipos, a de etiologia exógena, considerada a mais frequente e de origem endógena, esta última recomenda-se identificar a doença básica e tratá-la. A obesidade exógena é originada de um desequilíbrio entre ingestão e gasto calórico, requerendo uma adequação da ingestão, sobretudo, em relação às mudanças de hábitos e intensificação da atividade física.

Para Reis (2009), a atividade física quando bem orientada por profissionais capacitados, constitui um importante recurso focado na melhoria da qualidade de vida de indivíduos obesos, uma vez que auxilia na perda de gordura corporal, otimizando a capacidade muscular, bem como favorecendo uma melhora na resistência e no equilíbrio, viabilizando, ao mesmo tempo, a mobilidade articular, aumento da massa óssea, além de prevenir a osteoporose e beneficiar a coordenação motora de forma geral, desde que respeitando as condições fisiológicas e as necessidades específicas do indivíduo.

Reily e Rader (2003), relataram que a atividade física regular é fundamental para a manutenção da saúde, considerada o método mais eficaz empregado no tratamento não farmacológico em se tratando da obesidade, haja vista que o



sedentarismo consiste em um fator de risco para o desenvolvimento e instalação de síndromes metabólicas ocasionadas por esta doença (FIGURA 1).



**Figura 1.** Fisiopatologia da Síndrome Metabólica.  
Fonte: Reily & Rader (2003).

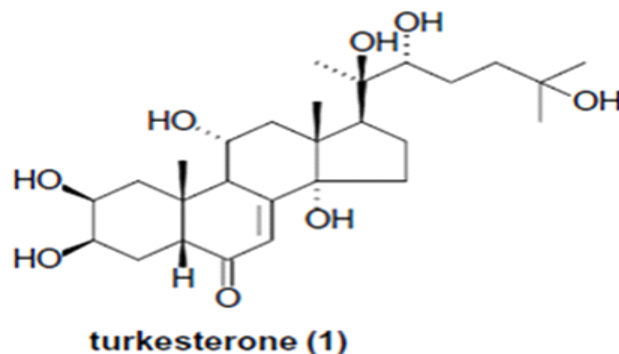
Carvalho *et al.* (2012), reportaram que distúrbios metabólicos associados à obesidade podem ser achados de exames clínicos ou laboratoriais isolados e a combinação entre circunferência da cintura, resistência à insulina, hiperglicemia, hipertensão arterial sistêmica, triglicérides elevados e diminuição do HDL constitui o diagnóstico de síndrome metabólica, com sérias repercussões para o desenvolvimento de problemas cardiovasculares na vida adulta. Neste sentido, os avanços científicos no tratamento e prevenção contra obesidade são fundamentais para que seja possível reduzir a incidência desta doença de origem metabólica. Para tanto, evitando os fatores de riscos inerentes, especialmente através de uma maior abrangência na atenção primária disponibilizada a esses indivíduos (NISSEN *et al.*, 2012).

Speretta *et al.* (2014), citam que o desequilíbrio metabólico está relacionado à instalação da obesidade, tratada como sendo uma síndrome metabólica (SM), tendo sua etiologia associada a fatores genéticos e ambientais. Dessa forma, os exercícios físicos, em especial, os aeróbios, são vistos como alicerce dos programas de reabilitação e uma importante alternativa de tratamento não farmacológico.

Evidências científicas comprovam a importância da atividade física como um recurso fundamental no processo preventivo de doenças, melhora dos níveis de aptidão física, diminuição nos percentuais de gordura corporal e manutenção das capacidades funcionais. (MATSUDO *et al.*, 2004; CAPODAGLIO *et al.*, 2006).

### 1.3 Turkesterona

*Ajuga turkestanica* é uma planta perene que cresce na Ásia Central, tratando-se de uma fonte de substâncias bioativas, entre as quais, um hormônio fitoesteroidal, ecdisteróide, representado na Figura 2, que apresentaria efeito positivo no metabolismo de lipídios, colaborando para o aumento da performance esportiva, muito utilizada, também, para o tratamento de doenças cardíacas, dores estomacais, síntese de proteínas, manutenção do metabolismo anabólico, aumento da massa muscular, enquanto diminui o tecido adiposo (WILBORN ET AL, 2006).



**Figura 2.** Estrutura da Turkesterona. Gracy, 2008.

Para Lafont e Dinan (2003), os Ecdisteróides são os hormônios de artrópodes, onde regulam a muda, metamorfose, reprodução e diapausa. Ecdisteróides também estão presentes em 5-6% das espécies de plantas, onde as concentrações geralmente são mais elevadas do que os normalmente encontrados em artrópodes, onde são consideradas medidas que contribuem para a dissuasão de predadores invertebrados.

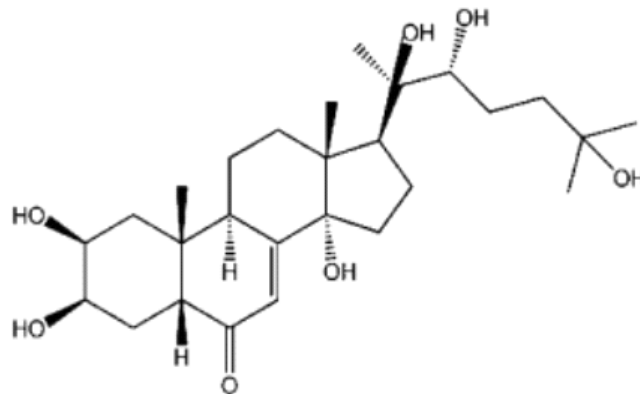
Segundo Zubeldia *et al.* (2012), inúmeros compostos bioativos têm sido isolados entre eles a Turkesterona, 20-hidroxicdisona (20-HE), ciasterona, ciasterona 22-acetato, ajugalactone, ajugasterone B,  $\alpha$ -ecdisona e ecdisona 2,3-monoacetone. Segundo os autores, ecdisteroides são poli-cetosteróides de longas

cadeias de carbono. Estes controlam a muda e reprodução em artrópodes, mas suas funções em plantas não são tão bem esclarecidas.

Syrov (2000), cita em seus estudos que a *Ajuga turkestanica* é indicado por apresentar propriedades tônicas, pois estimula o crescimento muscular, porém, desde que o fornecimento de proteínas seja o recomendado. Há resultados do aumento do efeito anabólico no desempenho físico, o que foi demonstrado por meio do teste de natação forçada em utilizando ratos. Os animais que receberam ecdisteróides no período de uma semana foram capazes de nadar tempos mais prolongados. Estes efeitos são similares aos de anabolizantes. A *Ajuga turkestanica* também é capaz de elevar o teor de ATP muscular em ratos privados de vitamina D.

Estudos *in vitro* relatam que o extrato de Turkesterona teria um efeito positivo na síntese proteica na linhagem celular C2C12 de camundongo (CHENG et al. 2008; ZUBELDIA et al. 2012).

Báthori et al. (2008), reportam que os ecdisteróides influenciam muitas funções fisiológicas e tem uma grande aplicação experimentalmente na farmacologia com largo emprego sobre os mamíferos, incluindo os seres humanos. Dentre os ecdisteróides, a 20-hidroxiecdisona vem sendo constantemente investigada com ênfase nos eventos metabólicos (FIGURA 3).



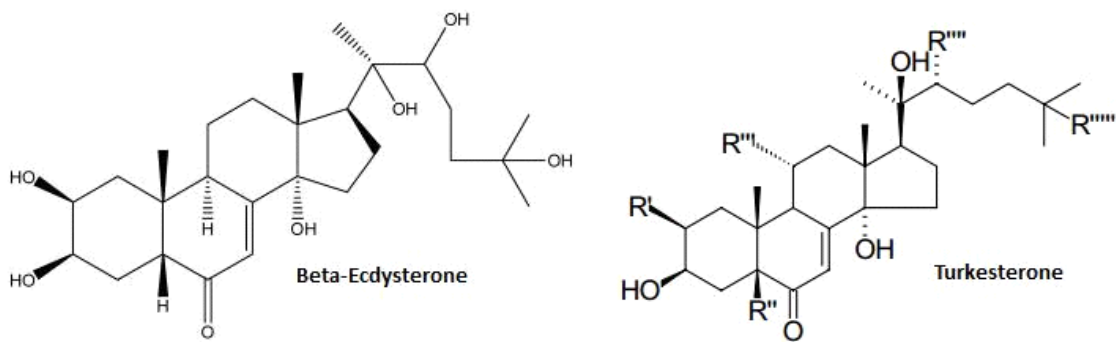
**Figura 3.** Estrutura da 20 – hidroxiecdisona, TÓTH et al., 2008.

Conforme Wilborn et al. (2006), 20-hidroxiecdisona tem sido associada a atividades metabólicas incluindo a promoção da síntese de proteínas, manutenção do estado anabólico e intensificação de massa muscular magra, ao mesmo tempo, reduzindo tecido adiposo. Alguns nomes comuns para ecdisteróides incluem ecdisten, ecdisona, isoinokosterone e  $\beta$ -ecdysterone.

Em estudos sobre o efeito da 20-hidroxiecdisona, Tóth et al. (2008), demonstraram que essa substância atua diferente nas fibras musculares. Isto sugere que este composto afeta o tamanho do tipo de fibra de uma forma específica do tecido muscular, agindo de forma análoga aos esteroides anabólicos androgênicos (EAA), alterando o processo da síntese proteica dessas células.

A 20-Hidroxiecdisona é um hormônio ecdisteóide dos insetos, onde regula a reprodução e também os fenômenos da muda e da metamorfose, sendo também encontrada em algumas espécies vegetais. Há indícios que esse composto tenha efeito anabólico em vertebrados (SLA´MA et al., 1996; STOPKA et al., 1999; SYROV, 2000; KRA´TKY et al., 1997 *apud* TÓTH et al., 2008). Seu mecanismo de ação seria independente dos receptores dos hormônios esteroides, sugerindo um mecanismo de ação alternativo para seus possíveis efeitos anabólicos, porém dependente da presença dos esteroides androgênicos uma vez que seu efeito se perde em animais castrados (SYROV, 2000).

Do ponto de vista estrutural, há uma aparente semelhança entre a Turkesterona e a  $\beta$ -Ecdisterona (FIGURA 4), uma vez que ambas apresentam a presença do núcleo esteroidal, 3 anéis de seis membros e 1 de cinco membros, e são compostos quirais, com vários centros assimétricos ou estereocentros. Além disso, os dois apresentam uma cetona insaturada (grupamento cetônico conjugado com uma dupla ligação) no segundo anel do núcleo esteroidal. No entanto, a  $\beta$ -Ecdysterone apresenta 10 estereocentros (centros quirais), já a Tukesterone apresenta 11 centros quirais, os quais pela regra de van'tof originam inúmeros estereoisômeros. A  $\beta$ -Ecdisterona apresenta na sua estrutura dois dióis (dois grupamentos OH em carbonos vizinhos) e mais outros 2 grupamentos OH (hidroxila), ou seja, é um poliol (6 grupamentos hidroxilas OH) o que lhe confere maior solubilidade em água através das interações de hidrogênio (pontes de hidrogênio). Já a Turkesterona apresenta somente 3 grupamentos OH distantes, o que lhe confere menor ou pouca solubilidade em água, com mais características hidrofóbicas do que a  $\beta$ -Ecdisterona. Além disso, esse composto apresenta vários radicais orgânicos (indicados pela representação "R" na FIGURA 4), descrevendo uma cadeia carbônica maior e, portanto, mais lipossolúvel. Diante dessas diferenças, esses compostos podem apresentar propriedade biológicas ou farmacológicas bastante diferentes.



( Image from: Gao L, Cai G, Shi X. Beta-ecdysterone induces osteogenic differentiation in mouse mesenchymal stem cells and relieves osteoporosis. Biol Pharm Bull. (2008) )

**Figura 4.** Estrutura química da  $\beta$ -Ecdisterona e da Turkesterona. R=OH. A seta dupla indica o sistema diol, o "A" indica a Hidroxila 11 e a "B" indica a Hidroxila 20.

A suplementação com 200 mg de em homens adultos jovens, durante 8 semanas, associada ao treinamento de resistência, não evidenciou diferença significativa em comparação ao grupo placebo quanto aos parâmetros, força muscular, muscular, capacidade anabólica, nível de testosterona livre, cortisol, relação TL/C, ureia e creatinina (WILBORN, 2006). No entanto, seu análogo 20-hidroxiecdisona induziu um acréscimo seletivo de massa no músculo tríceps braquial de ratos após 5 dias de infusão contínua através de bombas osmóticas implantadas subcutaneamente no músculo tríceps braquial (5mg/Kg/dia). Apesar da suplementação não ter afetado outros músculos nem outros parâmetros fisiológicos, foi observado alteração na expressão de 16 genes envolvidos com os sistemas muscular e esquelético no músculo tríceps braquial, permitindo concluir que apesar de não ter efeito sistêmico e geral no organismo dos animais estudados, a 20-hidroxiecdisona pode causar mudança na expressão gênica de um músculo específico (CHENG et al., 2013).

A 20-hidroxiecdisona modifica o tamanho da fibra muscular em músculos normais e regenerados após lesão induzida por veneno de cobra, mesmo depois de uma semana de administração numa dose ligeiramente maior do que os esteroides anabolizantes, de forma dose dependente (TÓTH et al., 2008). Os autores sugerem que a 20-hidroxiecdisona provavelmente atua juntamente com outros fatores de crescimento, porque o seu efeito sobre os músculos normais é modificado pela presença de um músculo em regeneração.

Diante do exposto, podemos assumir que os ecdisteróides podem oferecer uma alternativa promissora na substituição dos esteroides anabólicos androgênicos, inclusive como agente terapêutico mas devem como já ponderado anteriormente (BATHORI et al., 2008) ser mais estudados.

## **2 HIPOTESE**

A turkesterona melhora o metabolismo lipídico, aumento da musculatura e emagrecimento em ratos obesos.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Geral**

Analisar o efeito da Turkesterona no metabolismo de ratos obesos.

### **3.2 Específicos**

Testar o efeito do extrato de Turkesterona nos seguintes parâmetros de ratos obesos:

- evolução do peso corporal;
- índice de Lee;
- parâmetros anatômicos: peso de órgãos e tecidos;
- parâmetros bioquímicos: glicemia, triglicérides, colesterol total e frações, TGP, TGO, albumina, CPK, ureia, creatinina e proteínas totais.

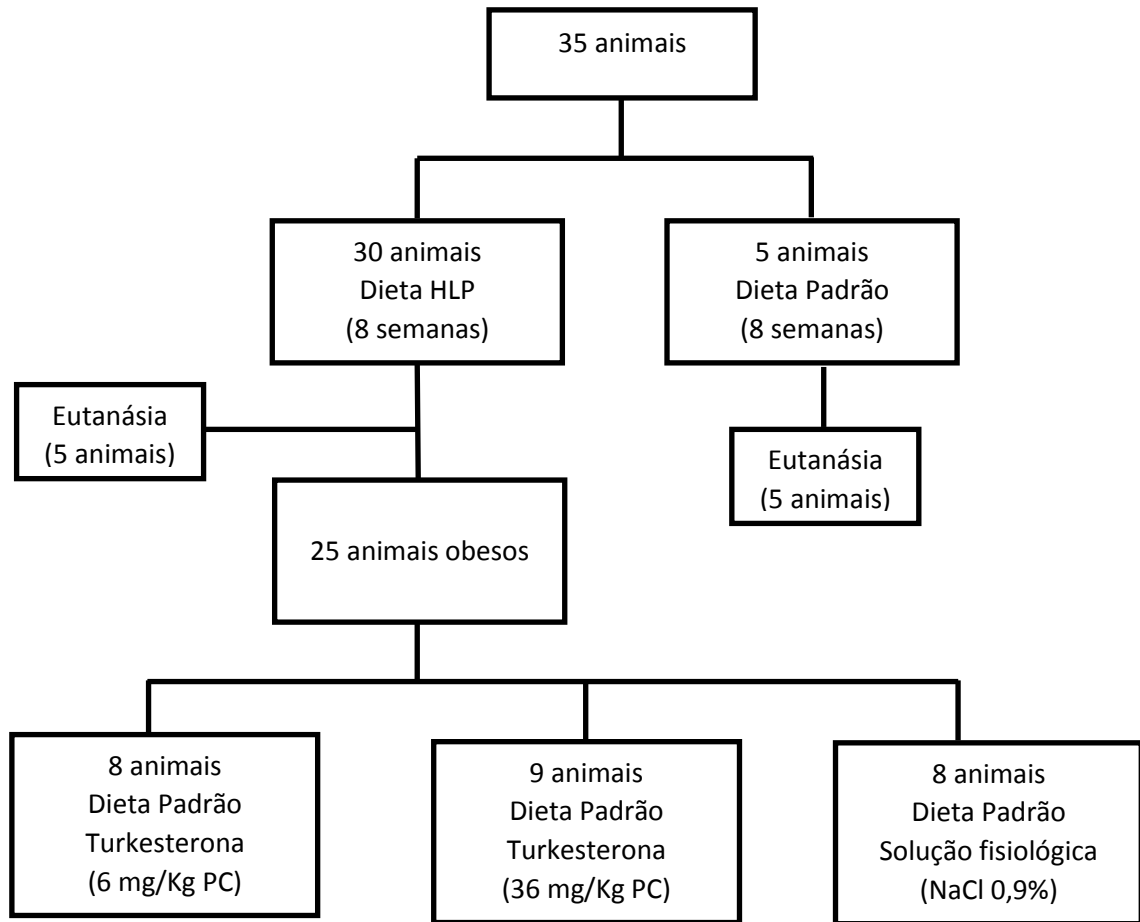
## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais e divisão dos grupos**

Todo o experimento foi conduzido de acordo com as normas do Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Uberaba (ANEXO A). Foram utilizados 35 (trinta e cinco) ratos Wistar machos adultos, com idade aproximada de 100 dias, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de Uberaba, com peso inicial de 140 gramas em média. Trinta animais foram alimentados durante 8 semanas com uma dieta hiperlipídico-proteica, aqui denominada HLP, para indução de obesidade, conforme descrito por Borba et al. (2011), enquanto 5 (cinco) animais foram alimentados com dieta padrão para ratos. Durante esse período, o peso dos animais foi monitorado semanalmente, com uma balança digital.

Após o período de indução de obesidade (8 semanas) os animais em dieta padrão e cinco animais alimentados com dieta HLP foram eutanasiados. Os vinte e cinco animais obesos restantes passaram a ser alimentados com dieta padrão para ratos e foram divididos aleatoriamente em 3 grupos, tratados por 4 semanas como se segue: um grupo que recebeu Turkesterona na concentração 6mg/Kg de peso corporal (PC), um grupo que recebeu Turkesterona na concentração 36mg/Kg/PC e um terceiro grupo que recebeu somente a solução fisiológica. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados (FIGURA 5 e QUADRO 1).





**Figura 5.** Desenho experimental.

<b>TK 6</b>	Ratos obesos que receberam Turkesterona na concentração 6 mg/Kg peso corporal, via gavagem, uma vez ao dia.
<b>TK 36</b>	Ratos obesos que receberam Turkesterona na concentração 36 mg/Kg peso corporal, via gavagem, uma vez ao dia.
<b>Placebo</b>	Ratos obesos que receberam apenas solução fisiológica por gavagem, uma vez ao dia.

**Quadro 1.** Nomenclatura dos animais de acordo com a dieta recebida.

## 4.2 Manutenção dos animais

Os animais foram mantidos no Biotério Central da Universidade de Uberaba, em caixas de polietileno com maravalha autoclavada, contendo de 3 a 4 animais, com fornecimento de água filtrada e dieta (HLP ou padrão) *ad libitum*. A temperatura foi mantida entre 22 e 26°C e a luminosidade foi programada para ciclos de claro e escuro com duração de 12 horas cada.

### 4.3 Dietas

#### 4.3.1 Dieta experimental

A dieta experimental conta com de alto teor de lipídeos e proteínas e com uma pequena quantidade de carboidratos (5% de carboidrato), sendo composta de caseína, banha de porco, açúcar, fibra, mix vitamínico, mix mineral, L cistina, bitartarato de colina e colesterol. No Quadro 2, se pode observar sua composição centesimal.

A dieta experimental foi preparada no Laboratório de Microbiologia da Universidade de Uberaba, com auxílio de uma batedeira industrial, com capacidade de 3 (três) kilogramas, e os ingredientes foram pesados em balança de precisão.

Primeiramente, a banha foi batida até se obter uma consistência macia. Aos poucos foi adicionada a caseína e o restante dos ingredientes até formar uma mistura homogênea, permanecendo na batedeira por 30 (trinta) minutos. Após o preparo, a dieta experimental foi acondicionada em sacos plásticos de 80 gramas cada, devidamente etiquetados e então congelados a -20°C.

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade (%)</b>
Caseína	45,00
Banha de Porco (comercial)	45,00
Açúcar	5,00
Fibra (celulose microcristalina)	0,16
Mix vitamina	1,00
Mix mineral para gestante	3,17
L – cistina	0,30
Bitartarato de colina	0,25
Colesterol	0,12
<b>Total</b>	<b>100,00</b>

**Quadro 2.** Composição centesimal da dieta experimental.

#### 4.3.2 Dieta controle

A dieta Padrão utilizada foi a dieta balanceada da marca Labina<sup>®</sup>, composta de carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix mineral vitamínico e aminoácidos, fornecendo 290 kcal/100g, conforme informações do fabricante. No Quadro 3, apresenta-se a composição centesimal dessa dieta.

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade (%)</b>
Proteína	22,93
Gordura	3,35
Fibra	7,60
Umidade	10,45
Carboidrato	55,67
<b>Total</b>	<b>100,00</b>

**Quadro 3.** Composição centesimal da dieta controle.

#### **4.4 Preparo da Turkesterona e administração.**

O extrato seco de Turkesterona, foi obtido pela distribuidora Ideal Farma, entregue pela farmácia Acquabella da cidade de Uberaba, com procedência da China (ANEXO B).

A solução foi preparada diariamente no momento da administração, pesando-se o extrato seco e dissolvendo-o em solução salina (NaCl 0,9%) estéril. Para a dosagem de 6 mg/Kg de peso corporal, foi pesado 25 miligramas de Turkesterona e dissolvido em 10 mL de solução salina estéril. Para a dosagem de 36 mg/Kg de peso corporal, foi pesado 150 miligramas de Turkesterona e dissolvido em 10 mL de solução salina estéril. Dessa forma, o volume a ser injetado era o mesmo para as duas dosagens.

A administração da Turkesterona foi feita diariamente, no período da tarde (entre 17horas e 19 horas). Após a preparação da solução, 1 mL da solução de Turkesterona foi aspirado para dentro de uma seringa plástica estéril adaptada em seguida a uma cânula de polietileno com aproximadamente 8 cm. O animal foi então contido por prensão dorsal, colocado em decúbito ventral e a cânula foi inserida no esôfago (Figura 6) O volume foi então injetado vagorosamente (15-20 segundos) para evitar distensão gástrica muito rápida.



**Figura 6.** Procedimento de gavagem.

## 4.5 Determinação do efeito da Turkesterona

### 4.5.1 No peso dos animais

Os ratos foram pesados semanalmente com uma balança digital com precisão de 0,5g. No momento da pesagem, foi colocado sobre a balança um pote de plástico e a balança foi tarada, desconsiderando-se dessa forma o peso do pote. Em seguida, os animais foram retirados das caixas, colocados dentro do pote um a um e o valor indicado no mostrador da balança foi então anotado.

### 4.5.2 No Índice de Lee

Após a eutanásia, mediu-se o comprimento naso-anal dos animais (cm) e determinou-se o peso (gramas). O Índice de Lee foi determinado pela seguinte fórmula conforme descrito por Bernardis e Patterson (1968).

$$\text{Índice de Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{peso em (g)}}}{\text{comprimento naso anal (cm)}} \times 1000$$



**Figura 7.** Determinação do comprimento do animal.

#### *4.5.3 No peso dos órgãos e tecidos*

Os animais foram eutanasiados conforme descrito no item 4.6. Imediatamente, foi colhido o sangue e órgãos (baço, cérebro, coração, fígado, rins, testículos), gordura visceral, periepididimal, peri-renal, além do músculo quadríceps femural direito. Esses órgãos e tecidos foram dissecados, pesados individualmente e fixados em formol tamponado. O peso de cada órgão foi expresso em g/100g de peso corporal do animal.

#### *4.5.4. Nas dosagens bioquímicas*

Todas as dosagens bioquímicas foram realizadas no laboratório de análises clínicas do Mário Palmério Hospital Universitário, utilizando-se kits comerciais e o aparelho Hitachi Roche 912.

#### 4.5.4.1 Dosagem de Glicose

A dosagem de glicose foi realizada com Kit diagnóstico laboratorial, empregando o método Enzimático da Glicose oxidase (Gold Analyza, São Paulo, Brasil), segundo as indicações do fabricante.

#### 4.5.4.2 Dosagem de Colesterol

A dosagem de colesterol foi realizada com Kit diagnóstico laboratorial, utilizando o sistema enzimático Colesterol oxidase/peroxidase (Gold Analyza, Minas Gerais, Brasil), segundo as indicações do fabricante.

#### 4.5.4.3 Dosagem de Triglicérides

A dosagem de triglicérides foi realizada com Kit diagnóstico laboratorial, utilizando-se o sistema lipase lipoproteica/glicerolquinase/glicerol-3-fosfato oxidase/peroxidase (Gold Analyza, Minas Gerais, Brasil), segundo as instruções do fabricante.

#### 4.5.4.4 Na dosagem de TGP e TGO

A dosagem de TGP e TGO foi realizada com Kit diagnóstico laboratorial, utilizando-se o método colorimétrico (Reitman-Frankel) (Gold Analisa, Minas Gerais, Brasil), segundo as instruções do fabricante.

#### 4.5.4.5 Na dosagem de Albumina plasmática

A dosagem de Albumina foi realizada com Kit diagnóstico laboratorial, utilizando-se o método colorimétrico (Verde Bromocresol) (Gold Analisa, Minas Gerais, Brasil), segundo as instruções do fabricante.

#### 4.5.4.6 Na dosagem de Ureia e Creatinina, Proteínas totais

A dosagens foram realizadas com Kit diagnóstico laboratorial, utilizando-se o método enzimático colorimétrico (Gold Analisa, Minas Gerais, Brasil), segundo as instruções do fabricante.

#### 4.5.4.7 Na dosagem de CPK (Creatina Fosfoquinase)

A dosagens foram realizadas com Kit diagnóstico laboratorial, utilizando-se o método cinético (Gold Analisa, Minas Gerais, Brasil), segundo as instruções do fabricante.

### 4.6 Eutanásia

Ao final do experimento, os animais foram mantidos por 12 horas em jejum e então anestesiados pela administração de 50 mg/Kg de Cetamina e 10 mg/Kg de Xilazina, administrados na mesma seringa por via intraperitoneal. Após a confirmação da anestesia (por meio da ausência de sinais como reflexo da cauda e reflexo palpebral), os animais foram colocados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica (tábua revestida com fórmica), os membros foram imobilizados e o animal foi submetido à laparotomia e exposição da cavidade abdominal. O sangue foi coletado pela veia cava caudal para as análises bioquímicas. O diafragma foi seccionado, provocando pneumotórax, que levara o animal à morte por hipóxia. Em seguida, foi feita a perfusão com solução salina (aproximadamente 20mL) para lavagem do sistema vascular e com formol tamponado (20mL aproximadamente) para fixação dos órgãos.

### 4.7 Análise Estatística

Os resultados individuais de todos os parâmetros de cada rato dos grupos experimentais e controles foram inseridos em planilha eletrônica para análise estatística. A análise dos valores foi feita utilizando o software estatístico *GraphPad Prism 5 for Windows*<sup>®</sup>. Inicialmente, foi testado se os dados apresentavam ou não distribuição normal (Teste de Komolgorov-Smirnov) e a variância foi testada por

teste de Barlett's (homogeneidade). Quando as suposições de normalidade e homogeneidade foram satisfeitas, utilizou-se para a comparação dos diferentes grupos análise de variância ANOVA com pós-teste de Bonferroni ou de Tukey para comparação das variáveis em relação aos grupos, e nesse caso, os resultados foram expressos em média±DP. Quando os resultados não passaram no teste de normalidade e/ou homogeneidade, utilizou-se análise de variância não paramétrica a partir do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn os resultados foram expressos em mediana (min e max), considerando-se significativas as diferenças com  $p < 0,05$ .

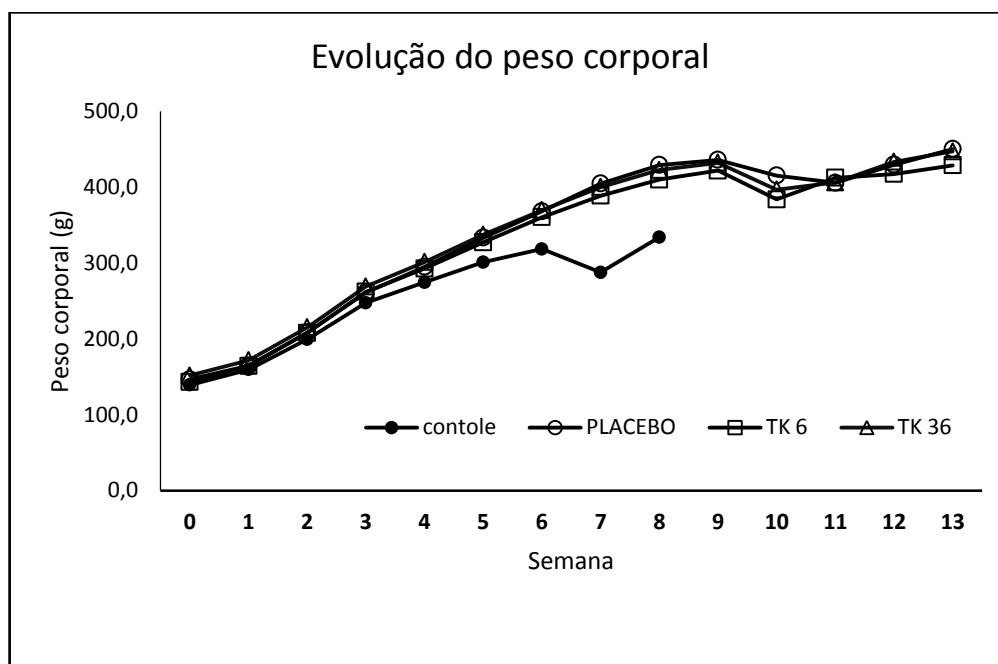


## 5. RESULTADOS

### 5.1 Peso corporal

Ao final das 8 semanas iniciais do experimento, os animais alimentados com a dieta HLP apresentaram peso significativamente maior ( $414 \pm 34\text{g}$ ) que os animais alimentados com dieta padrão ( $334 \pm 28\text{g}$ ) ( $p < 0,0001$ ).

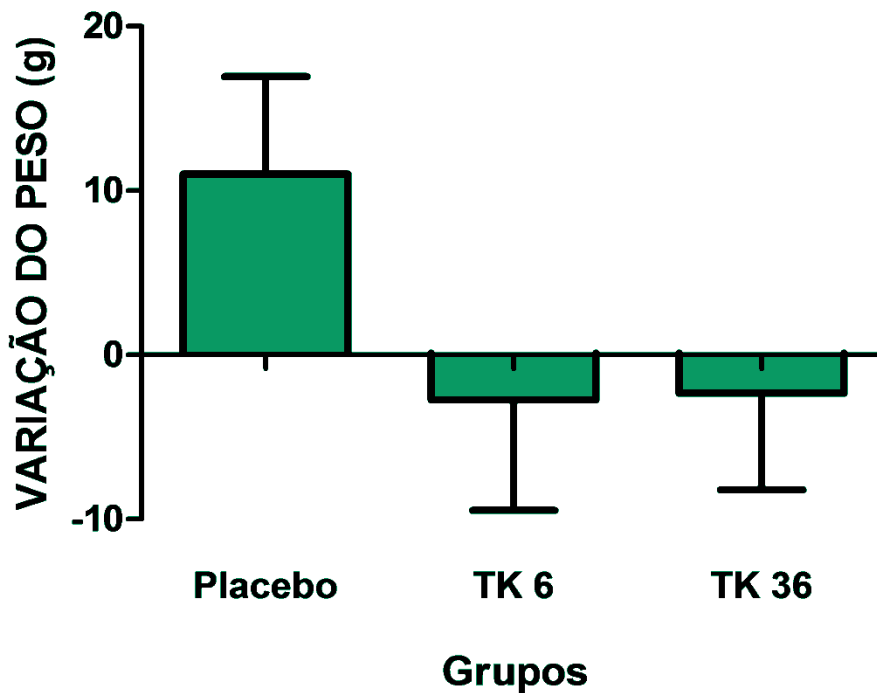
A evolução do peso corporal dos animais ao longo do período experimental está mostrada na Figura 8, onde se observa que o ganho de peso dos grupos que receberam a dieta experimental foi superior ao ganho de peso do grupo controle, tornando-se significativamente diferente na semana 7. Observa-se também na Figura 8 que o tratamento com a Turkesterona (6 mg/Kg de PC/dia ou 36 mg/Kg de PC/dia) não levou a alteração significativa no peso corporal dos animais, em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$ ), durante o período de acompanhamento (4 semanas).



**Figura 8.** Evolução do peso corporal dos ratos durante o período de indução da obesidade (semanas 0 a 8) e após o início do tratamento com Turkesterona 6 mg/Kg de PC/dia ou 36 mg/Kg de PC/dia, em comparação com o grupo tratado com solução salina. A seta indica o início do tratamento com a Turkesterona. O símbolo “\*” indica o momento em que o grupo de animais em dieta HLP adquiriu peso significativamente maior que o grupo controle ( $p < 0,0001$ ).

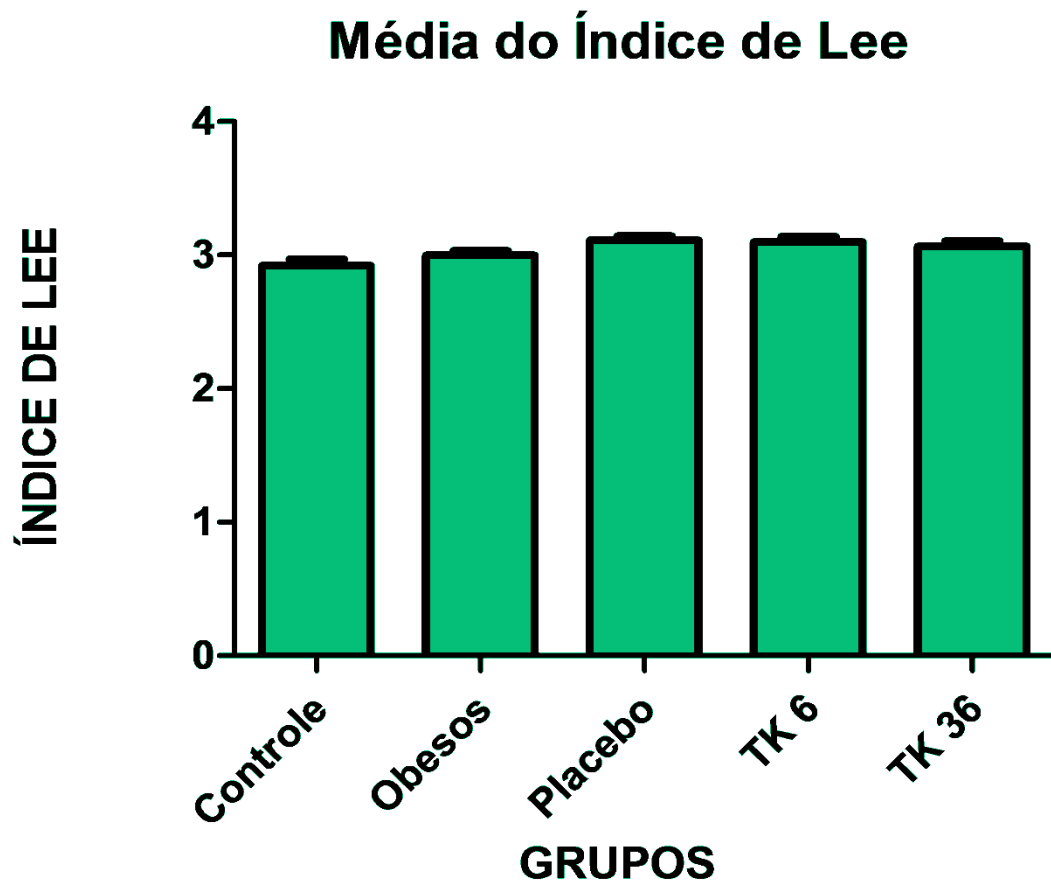
Ao final do período de tratamento com a Turkesterona, o peso do grupo que recebeu solução salina (placebo) apresentou um balanço positivo de 11 gramas em

média, enquanto os grupos que receberam Turkesterona 6mg/Kg PC e 36 mg/Kg de PC perderam, respectivamente, 2,8g e 2,3g, porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p>0,05$ ), como ilustra a Figura 9.



**Figura 9.** Variação no peso dos animais ao final do tratamento com Turkesterona 6 mg/Kg de PC/dia ou 36 mg/Kg de PC/dia, em comparação com o grupo tratado com solução salina.

Tendo em vista essa relativa estabilidade do peso corporal durante o período de tratamento com a Turkesterona, o Índice de Lee dos animais também não apresentou diferença estatisticamente significativa, como mostrado na Figura 10. Observou-se que o Índice de Lee dos animais dos grupos Placebo e TK6 foi significativamente maior ( $p$ ) que o dos animais do grupo controle, eutanasiados ao final das 8 semanas iniciais do experimento. Não se observou diferença significativa quando se comparou os demais grupos entre si.



**Figura 10.** Média do Índice de Lee dos animais após o tratamento com Turkesterona 6 mg/Kg de PC/dia e 36 mg/Kg de PC/dia, em comparação com o grupo tratado com solução salina.

A análise dos órgãos e tecidos após o tratamento com a Turkesterona 6mg/Kg PC e 36 mg/Kg de PC revelou que não houve diferença significativa quanto ao peso relativo dos depósitos de gordura (tecido adiposo peri renal e periepididimal), nem do tecido muscular (músculo quadríceps e músculo tibial anterior), como sumarizado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Peso relativo de órgãos e tecidos de ratos obesos tratados por 4 semanas com Turkesterona, em relação ao grupo placebo tratado com solução salina. Os dados são apresentados em média  $\pm$  desvio padrão (distribuição Normal) ou em Mediana (mínimo-máximo) (distribuição não Normal).

Órgãos/tecidos	Placebo	Tk6	TK36
Fígado	3,0 $\pm$ 0,1	4,0 $\pm$ 0,2	4,0 $\pm$ 0,3
Adiposo P. Renal	2,0 $\pm$ 0,7	3,0 $\pm$ 0,8	15,0 $\pm$ 5
Adiposo P. Epididimal	3,0 $\pm$ 0,4	2,0 $\pm$ 0,6	3,0 $\pm$ 0,6
Rins	0,5 $\pm$ 0,07	0,4 $\pm$ 0,07	0,4 $\pm$ 0,06
Testículo	0,4 (0,3-0,5)	0,4 (0,4-0,5)	0,4 (0,3-0,5)
Coração	0,5 (0,4-0,5)	0,5 (0,3-0,5)	0,5 (0,4-0,5)
Cérebro	0,5 $\pm$ 0,04	0,5 $\pm$ 0,07	0,5 $\pm$ 0,04
M. Tibial anterior	0,3 $\pm$ 0,06	0,3 $\pm$ 0,08	0,3 $\pm$ 0,03
M. Quadríceps	0,9 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,2
Baço	0,4 $\pm$ 0,05	0,4 $\pm$ 0,07	0,4 $\pm$ 0,05
Vesícula Seminal	0,4 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,09	0,4 $\pm$ 0,08

Finalmente, a análise bioquímica revelou que o tratamento com a Turkesterona na dosagem 6mg/Kg PC ou 36 mg/Kg de PC não levou a alteração significativa no padrão bioquímico dos animais, uma vez que não se observou diferença estatisticamente significativa na glicemia, no perfil lipídico (triglicérides, colesterol total e frações), função hepática (Proteína total, albumina, TGP, TGO, creatina fosfoquinase) e nem na função renal (ureia e creatinina) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Análise bioquímica dos ratos obesos tratados por 4 semanas com Turkesterona, em relação ao grupo placebo tratado com solução salina. Os dados são apresentados em média  $\pm$  desvio padrão (distribuição Normal) e em Mediana (mínimo-máximo) (distribuição não Normal).

Analito	Placebo	TK3	TK36
Glicose	81,6 $\pm$ 23,0	80,0 $\pm$ 37,8	87,0 $\pm$ 27,2
Triglicerídeos	36,2 $\pm$ 13,1	34,5 $\pm$ 15,8	31,6 $\pm$ 12,5
Colesterol	27,0 (19,0-63,0)	31,0 (11,0-48,0)	30,0 (8,0-51,0)
LDL	6,4 (4,2-24,8)	6,3 (0,8-22,8)	8,2 (2,0 -26,0)
HDL	12,5 (10,0-27,0)	15,0 (7,0-19,0)	14,0 (6,0-19,0)
VLDL	7,2 $\pm$ 2,6	6,9 $\pm$ 3,1	6,3 $\pm$ 2,5
Proteína total	1,7 (0,8-3,7)	2,0 (0,7-2,9)	1,9 (0,5-2,8)
Albumina	1,4 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,4
TGP	6,5 (3,0-19,0)	8,5 (3,0-13,0)	7,0 (3,0-11,0)
TGO	24,6 $\pm$ 11,3	23,6 $\pm$ 11,7	29,2 $\pm$ 14,8
Creatina fosfoquinase	95,5(69,0-300,0)	76,0(24,0-319,0)	163,0(52,0-291,0)
Ureia	31,2 $\pm$ 8,1	28,1 $\pm$ 4,7	31,5 $\pm$ 9,1
Creatinina CLCA	0,23 $\pm$ 0,06	0,27 $\pm$ 0,09	0,23 $\pm$ 0,08

## 6 DISCUSSÃO

Ecdisteróides são hormônios responsáveis pelo fenômeno da muda nos artrópodes, e análogos estruturais desses compostos foram encontrados em várias espécies vegetais (fitoecdisteróides) na segunda metade do século XX, permitindo a avaliação da sua atividade farmacológica nos mamíferos e a descoberta de ações desejadas tais como no controle do diabetes e da astenia, além de possível ação anabólica sobre a massa muscular. Atualmente são conhecidos mais de 300 tipos diferentes de ecdisteróides, tanto de fontes animais quanto vegetais (LAFONT; DINAN, 2003).

Nós não observamos efeito do extrato de Turkesterona no peso corporal e nem no tecido adiposo ou muscular de ratos obesos. Os estudos que testam a atividade do extrato de Turkesterona em mamíferos são escassos, mas há indicação, em ratos, de um efeito anabólico menos pronunciado do que o induzido por esteroides anabolizantes clássicos como o nerobol e metilandrostenediol (SYROV, 2000). Já em cultura de células, os efeitos anabólicos foram estudados ao nível molecular e parecem envolver a repressão dos genes da caspase 3 e da miostatina, genes cuja expressão reprimem o desenvolvimento da célula muscular (ZUBELDIA et al, 2012). Esses autores relatam ainda que os ecdisteróides não induzem a síntese de mRNA no núcleo, mas aparentemente melhoram o processo de translocação do mRNA para o citoplasma. Esses mesmos estudos sugerem que a Turkesterona também não atua mediante ativação dos receptores clássicos dos hormônios androgênicos como a testosterona, até mesmo devido a estrutura bastante distinta entre os fitoecdisteróides e os hormônios derivados do colesterol. De fato, Bathori et al. 2008 (*apud* ZUBELDIA, 2012) não identificaram ligação significativa de 11 ecdisteróides estudados (Turkesterona inclusive) a receptores de estrogênio, de glicocorticoide ou androgênicos.

Como o tratamento com o extrato de Turkesterona não levou a alteração no peso corporal, não se observou alteração no índice de Lee ao final do período de tratamento quando comparamos os grupos Placebo, TK6 e TK 36. O Índice de Lee maior apresentado pelos grupos Placebo e TK6 podem ser devidos ao crescimento natural dos animais, uma vez que entre a eutanásia desses grupos passou-se o tempo de 5 semanas, tempo suficiente para um significativo crescimento dos

animais. Segundo esse mesmo raciocínio, também seria esperado a observação de um Índice de Lee maior nos animais do grupo TK 36, o que não foi observado. No entanto, diante dos resultados dos pesos de tecidos e do próprio peso corporal, não podemos afirmar que o tratamento dado ao grupo TK 36 tenha sido eficaz na prevenção do ganho de peso. De fato, os animais tratados com o extrato de Turkesterona tiveram uma redução no peso corporal considerando o período total de tratamento (Figura 9), porém essa redução não foi estatisticamente significativa.

A farmacocinética da 20-Hidroxiecdisterona e Ecdisterona mostrou uma meia vida de 8,15 minutos em camundongos, com eliminação por via urinária e também fecal (HIKINO et al., 1972a,b *apud* LAFONT, 2003; DZUKHAROVA et al., 1987 *apud* LAFONT; DINAN, 2003) na forma não modificada e também estruturalmente alterada, supostamente por enzimas do metabolismo dos esteroides em mamíferos e da ação de bactérias intestinais que atuam sobre sais biliares (GIRAULT et al., 1988 *apud* LAFON; DINAN, 2003).

Além disso, não há consenso sobre o potencial ergogênico dos ecdisteróides. (WILBORN et al., 2006) demonstraram que a administração de 200 mg de 20-hidroxiecdisona a homens adultos jovens, mesmo associada a treinamento físico, não levou a alteração no percentual de gordura corporal, desempenho em atividade física, perfil de testosterona, cortisol, nem nos níveis de ureia e creatinina. Já a administração desse composto (5mg/Kg de peso corporal/dia) em ratos, por meio de bomba de infusão subcutânea durante 5 dias promoveu o incremento seletivo de massa no músculo tríceps braquial de ratos além de afetar a expressão de 16 genes nesse músculo, sugerindo potencial da 20-hidroxiecdisterona de afetar a expressão gênica (CHENG et al., 2013). Finalmente, a injeção subcutânea de 20-hidroxiecdisterona na dosagem de 5 mg/Kg PC/dia por 8 dias levou a um aumento significativo no peso corporal e no músculo soleus, porém esse aumento foi restrito ao local da aplicação do composto.

Conjuntamente, esses estudos parecem sugerir que os possíveis efeitos da 20-hidroxiecdisterona podem estar associados à forma de administração, provavelmente devido ao tempo de meia vida relativamente curto desse composto. Dessa forma, a administração contínua promoveria níveis constantes do composto no sangue, permitindo uma ação efetiva, enquanto a administração intermitente (1 ou 2 vezes ao dia) não promoveria níveis suficientemente altos e constantes para a indução dos efeitos. Esse raciocínio explicaria a falta de efeitos observáveis após a

administração de 6 ou 36 mg de extrato de *Ajuga turkestanica* a ratos obesos no presente estudo. Assumindo esse pressuposto, a falta de efeito anabólico observado poderia ser devido ao tempo de meia vida muito curto para que fosse possível induzir um efeito anabólico ou redutor da gordura corporal, mesmo se considerarmos que a Turkesterona é menos hidrossolúvel do que a ecdisterona, podendo assim ter uma meia vida ligeiramente maior.

Além disso, muitos dos estudos que observaram efeito anabólico em animais injetaram o composto purificado, como e o caso da 20-hidroxiecdisona (hormônio ecdisteróide) (TÓTH et al., 2008, CHENG et al., 2013), nos permitido inferir mais uma vez que a forma de administração por injeção é mais eficaz na indução dos efeitos anabólicos, bem como a utilização do produto isolado ao invés de um extrato da planta, que seria mais efetivo em culturas celulares, como demonstrado por Zubeldia et al., 2012 e Cheng et al., 2008.

Estruturalmente, os ecdisteróides são bastante diferentes dos hormônios esteroides dos mamíferos, tais como a testosterona, sugerindo que seu possível efeito anabólico não esteja relacionado com a ativação dos receptores dessa classe hormonal. Os fitoecdisteróides são estruturas mais hidrofílicas do que os esteroides, de modo que seu efeito provavelmente não envolve o mecanismo de ação típico dos hormônios como a testosterona e o cortisol.

A Turkesterona, por sua vez, é bem menos estudada do que outros ecdisteróides. Sua estrutura química revela uma maior hidrofobicidade do que a ecdisterona, uma vez que possui menos hidroxilas (3) do que a beta ecdisterona (6 hidroxilas). Mesmo com essa diferença na estrutura, é provável que seu mecanismo de ação se assemelhe ao dos demais fitoecdisteróides, bem como possua propriedades fisiológicas tais como a meia vida plasmática, similares. Syrov, 2000 relata que a hidroxila ligada ao C11 presente na estrutura de inúmeros fitoecdisteróides, incluindo a Turkesterona, é essencial para a sua função biológica. Nossos resultados indicam que, se por um lado a Turkesterona não melhora o perfil lipídico dos animais com relação à glicemia e lipidemia, também não causa significativa lesão hepática ou renal, visto que os marcadores de lesão nesses órgãos (TGP, TGO, ureia, creatinina, etc.) não foram alterados.

## **7 CONCLUSÃO**

Nossos dados nos permitem concluir que a Turkesterona, administrada nas dosagens de 6 ou 36mg/Kg de peso corporal/dia não tem eficácia na redução do tecido adiposo, no aumento da massa muscular ou em parâmetros bioquímicos de ratos Wistar obesos, levando-nos a rejeitar a hipótese levantada inicialmente, por não ter resultados estatisticamente mas podemos dizer que houve resultados biologicamente positivo, devido os ratos terem perdido peso no decorrer da pesquisa.



## REFERÊNCIAS

- BAMBA, V.; RADER, D.J. Obesity and atherogenic dyslipidemia. *Gastroenterology*, v. 132, n. 6, p. 2181-2190, 2007.
- BARBIERI, A.F.; MELLO, R.A. As causas da obesidade: uma análise sob a perspectiva materialista histórica. *Conexões: revista da Faculdade de Educação Física da UNICAMP*, Campinas, v. 10, n. 1, p. 133-153, 2012.
- BÁTHORI, M.; TÓTH, N.; HUNYADI, A.; MÁRKI, A.; ZÁDOR, E. Phytoecdysteroids and anabolic-androgenic steroids-structure and effects on human. *Curr. Med. Chem.* v. 15, p. 75-91, 2008 *apud* ZUBELDIA, J.M.; HERNÁNDEZ-SANTANA, A.; JIMÉNEZ-DEL-RIO, M.; PÉREZ-LOPES, V.; PÉREZ-MACHÍN, R.; GARCÍA-CASTELLANO, J. *In vitro* characterization of the efficacy and safety profile of a proprietary *Ajuga turkestanica* extract. *Chin. Med.*, v. 3, p. 215-222, 2012.
- BERNARDIS, L.L.; PATTERSON, B.D. Correlation between "Lee index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J. Endocrinol.*, v. 40, p. 527-528, 1968.
- BORBA, A.J.; ROCHA, M.G.M.; SILVA, M.F.; TIBURCIO, D.T.S.; PEREIRA, S.A.L.; REIS, L.C.; THEDEJR., G. Dieta hiperlipídico-proteica utilizada para emagrecimento induz obesidade em ratos *Rev. Nutr.*, Campinas, 24(4):519-528, jul./ago., 2011
- CAPODAGLIO, P.; CAPODAGLIO EDDA, M.; FACIOLI, M.; SAIBENE, F. Long-term strength training for communitydwelling people over 75: impact on muscle function, functional ability and life style. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v. 100, p. 535-542, 2006.
- CHENG, D.M.; KUTZLER, L.W.; BOLER, D.D.; DRNEVICH, J.; KILLEFER, J.; LILA, M.A. Continuous infusion of 20-Hydroxyecdysone increased mass of triceps Brachii in C57BL/6 mice. *Phytoth. Res.*, v. 27, p. 107-111, 2013.
- CHENG, D.M.; YOUSEF, G.G.; GRACE, M.H.; ROGERS, R.B.; GORELICK-FELDMAN, J.; RASKIN, I.; LILA, M.A. *In vitro* production of metabolism-enhancing phytoecdysteroids from *Ajuga turkestanica*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, p. 93:73-83, 2008.
- CONDE, W.L.; BORGES, C. The risk of incidence and persistence of obesity among Brazilian adults according to their nutritional status at the end of adolescence. *Rev Bras Epidemiol.*, v. 14, n. 3, p. 71-79, 2011.
- DZUKHAROVA, M.K.H.; SAKHIBOV, A.D.; KASYMOV, B.; SYROV, V.N.; TAKANAEV, A.A.; SAATOV, Z. Pharmacokinetic experiments with ecdysterone. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal.*, v. 21, p. 1163-1167, 1987 *apud* LAFONT, R.; DINAN, L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *J. Insect. Sci.* 3:7, 2003, available online: [insectscience.org/3.7](http://insectscience.org/3.7).
- GIGANTE, D.P.; MOURA, E.C.; SARDINHA, L.M.V. Prevalência de excesso de peso e obesidade e fatores associados, Brasil, 2006. *Rev Saúde Pública*, v. 43, Supl 2, p. 83-89, 2009.

GIRAULT, J.P.; LAFONT, R.; KERB, U. Ecdysone catabolism in the White mouse. *Drug. Metabol. Dispos.*, v. 16, p. 716-720, 1988 *apud* LAFONT, R.; DINAN, L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *J. Insect. Sci.*, v. 3, p. 7, 2003, available online: [insectscience.org/3.7](http://insectscience.org/3.7).

HIKINO, H.; OHIZUMI, Y.; TAKEMOTO, T. 1972a. Absorption, distribution, metabolismo and excretion of insect-metamorphosing hormone ecdysterone in mice. I. *Yakugaku Zasshi.*, v. 92, p. 945-950 *apud* LAFONT, R.; DINAN, L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *J. Insect. Sci.*, v. 3, p. 7, 2003, available online: [insectscience.org/3.7](http://insectscience.org/3.7).

HIKINO, H.; OHIZUMI, Y.; TAKEMOTO, T. Absorption, distribution, metabolismo and excretion of insect-metamorphosing hormone ecdysterone in mice. II. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 20, p. 2454-2458, 1972b *apud* LAFONT, R.; DINAN, L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *J. Insect. Sci.*, v. 3, p. 7, 2003 available online: [insectscience.org/3.7](http://insectscience.org/3.7).

LAFONT, R.; DINAN, L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *J. Insect. Sci.*, v. 3, p. 7, 2003, available online: [insectscience.org/3.7](http://insectscience.org/3.7).

LAMOUNIER, J.A.; PARIZZI, M.R. *Cad. Saúde Pública*, v. 23, n. 6, p. 1495-1500, 2007. Resenha de: ANJOS, L.A. **Obesidade e saúde pública**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2006. 100 pp. ISBN: 85-7541-082-2

MATSUDO, S. M.; MARIN, R. V.; FERREIRA, M. T.; ARAÚJO, T. L. MATSUDO, V. Estudo longitudinal-tracking de 4 anos – da aptidão física de mulheres da maioria fisicamente ativas. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*. v.12, n. 3, p. 47-52, 2004.

MELLO, E.D.; LUFT, V. Resposta da autora. In: PALHARES, D. Obesidade infantil - Como podemos ser eficazes? *Jornal de Pediatria*, v. 80, n, 5, p. 432, 2004.

NISSEN, L.P.; VIEIRA, L.H.; BOZZA, L.F., VEIGA, L.T.; BISCAIA, B.F.L.; PEREIRA, J.H.; FURLAN, L.H.P. Intervenções para o tratamento da obesidade: revisão sistemática. *Ver. Bras. Med. Fam. Comum*. Jul.-Set.; 7(24):184-90, 2012.

OLIVEIRA, A.P.; ANDRADE, D.R. Influência da prática de atividade física nos Programas de Promoção da Saúde nas empresas privadas: uma revisão bibliográfica. *O Mundo da Saúde*, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 192-200, 2013.

PINHEIRO, A.R.O.; FREITAS, S.F.T.; CORSO, A.C.T. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. *Rev. Nutr.*, v. 17, n. 4, p. 523-533, 2004.

REILLY, M.P.; RADER, D.J. The metabolic syndrome more than the sum of its parts? *Circulation*, v. 108, p.1546-1551, 2003.

REIS, C. Obesidade e atividade física. *Revista Digital*, Buenos Aires, año 13, nº 130, 2009. Disponível em: <<http://www.efdeportes.com/>>.

ROSINI, T.C.; SILVA, A.R.S.; MORAES, C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. *Rev Assoc Med Bras*, v. 58, n. 3, p. 383-387, 2012.

ROSSUM, J.F. VAN; SILVA, V.Y.N.E.; RODRIGUES, R.O.; ASSUNÇÃO, R.D.L. Uma abordagem atual da obesidade. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, v. 9, n.1, p.54-59, 2015.

SILVA Júnior, A.P.; VELARDI, M. Os benefícios da prática regular de atividade física no processo de envelhecimento. *Cad. Educ. Fís.*, v.7, n.13, p.63-69, 2008.

SILVA, P.V.C.; COSTA Jr, A.L. Efeitos da atividade física para a saúde de crianças e adolescentes. *Psicol. Argum.*, v. 29, n. 64, p. 41-50, 2011.

SPERETTA, G.F.F.; LEITE, R.D.; DUARTE, A.C.G.O. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF-alfa e IL-10. *Revista HUPE*, v. 13, p. 61-69, 2014.

SYROV, V.N. Comparative experimental investigation of the anabolic activity of phytoecdysteroids and steranabols. *Pharmac. Chem. J.*, v. 34, p. 193-194, 2000.

TÓTH, N.; SZABÓ, A.; KACSALA, P.; HÉGER, J.; ZÁDOR, E. 20-Hydroxyecdysone increases fiber in a muscle-specific fashion in rat. *Phytomed.*, v. 15, p. 691-698, 2008.

VIEIRA, F.R.; LACERDA, Y.; DANTAS, E.H.M.; NOVAES, J.S. Efeitos das atividades físicas em academias na imagem corporal dos obesos. *Fitness & Performance Journal*, v. 4, n. 1, p. 19-26, 2005.

WILBORN, C.D.; TAYLOR, L.W.; CAMPBELL, B.I.; KERKSICK, C.; RASMUSSEN, C.J.; GREENWOOD, M.; KREIDER, R.B. Effects of methoxyisoflavone, ecdysterone and Sulfo-polysaccharide supplementation on training adaptations in resistance-trained males. *J. Int. Soc. Sports Nutr.*, p. 3, v. 19-27, 2006.

ZUBELDIA, J.M.; HERNÁNDEZ-SANTANA, A.; JIMÉNEZ-DeI-RIO, M.; PÉREZ-LOPES, V.; PÉREZ-MACHÍN, R.; GARCÍA-CASTELLANO, J. *In vitro* characterization of the efficacy and safety profile os a proprietary *Ajuga turkestanica* extract. *Chin. Med.*, v. 3, p. 215-222, 2012.

## **NORMAS UTILIZADAS**

NBR 14724/2011 - Apresentação de trabalhos acadêmicos.

NBR 6023/2002 – Referências.

NBR 6028/2003 – Resumo.

# ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal



## Comitê de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA-041/2016

Uberaba, 30 de junho de 2016.

### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 015/2015 relativo ao projeto intitulado "***Efeito da turkesterona no metabolismo de ratos induzidos à obesidade por uma dieta hiperlipídico-proteica***" que tem como responsável **Prof. Geraldo Thedei Júnior**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei nº 11.794/08.

### CERTIFICATE

We hereby certify that the protocol nº 015/2015 related to the project entitled "***Effect of the turkesterona in the metabolism of mice induced to the obesity for a hiperlipídico-proteinic diet***", under the supervision of Prof. Geraldo Thedei Junior, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEA/UNIUBE) according to the law nº 11.794/08.

Atenciosamente,

**Prof. Joely Ferreira Figueiredo Bittar**  
Coordenadora do CEEA-UNIUBE

## ANEXO B – Laudo de análises da Turkesterona



### LAUDO DE ANÁLISES

#### TURKESTERONA

Data de Fabricação - 02/03/2016  
 Data de Validade - 01/03/2018  
 Lote Interno - AUTO065420

Lote do Fornecedor - 20160302  
 Procedência - CHINA

Nome Químico/ou Botânico - AJUGA L. / PARTE UTILIZADA: ERVAS  
 Classe Terapêutica - SUPLEMENTAÇÃO ESPORTIVA  
 Peso Molecular - N/A  
 DCB - NA

Fórmula Molecular - N/A  
 CAS - N/A

ARMAZENAR EM TEMPERATURA ENTRE 15°C E 30°C E UMIDADE RELATIVA DO AR ENTRE 40% E 75%  
 ACONDICIONAR EM RECIPIENTE HERMETICAMENTE FECHADO AO ABRIGO DA LUZ DIRETA EM LOCAL SECO E AREJADO

(*)	Análise / Componentes	Especificações	Resultados das Análises
<b>PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS</b>			
	*APARÊNCIA	PÓ FINO MARROM	CONFORME
	*PERDA POR DESSECAÇÃO	< OU = 5.0%	3.4%
	*CINZAS	< OU = 5.0%	3.2%
	*TAMANHO DA PARTICULA	100% PASSA 80 MESH	CONFORME
	*SOLUBILIDADE	SOLÚVEL EM ETANOL	CONFORME
	*METAIS PESADOS	< OU = 10 PPM	CONFORME
	*ARSÊNIO	< OU = 2 PPM	CONFORME
	*CHUMBO	< OU = 2 PPM	CONFORME
	*BHC	< OU = 0.2 PPM	CONFORME
	*DDT	< OU = 0.2 PPM	CONFORME
	*PCNB	< OU = 0.1 PPM	CONFORME
	*SOLVENTE RESIDUAL	< OU = 5000 PPM	CONFORME
	*AFLOTOXINA	< OU = 0.5 PPM	CONFORME
	*TEOR DE TURKESTERONES (HPLC)	> OU = 2.0%	2.02%
	*CONTAGEM TOTAL DE MICROBACTERIA	< OU = 10000 UFC/G	CONFORME
	*FUNGOS E LEVEDURAS	< OU = 1000 UFC/G	CONFORME
	*PRESENÇA DE E. COLI	NEGATIVO	NEGATIVO
	*STAPHYLOCOCCUS AUREUS	NEGATIVO	NEGATIVO
	*SALMONELLA SP	NEGATIVO	NEGATIVO

#### Especificações e resultados de acordo com o Fabricante/Fornecedor

\*ESPECIFICAÇÕES E RESULTADOS DE ACORDO COM O LAUDO DO FABRICANTE

#### CONCLUSÃO(X) APROVADO

Informação Técnica : (\*) Os ensaios assinalados foram realizados pelo controle de qualidade do Fabricante/Fornecedor.

LUCILENE RODRIGUES SILVEIRA  
 Responsável Técnica  
 CRF-GO 7625

Documento assinado eletronicamente.

IDEALFARMA IND. E COM. PROD. FARM. LTDA

RUA 09, QD 13-C MODULO 7 E 8-DAIA-ANAPOLIS - GO - 75132065 - Fone (62)3316-1288 - Fax (62) 3937-8658