

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UNICENTRO e a UEPG)

O EXERCÍCIO FÍSICO E O CONTROLE SECRETOR DE INSULINA NA
OBESIDADE INDUZIDA POR MARCAÇÃO METABÓLICA

STEFANI VALERIA FISCHER

PONTA GROSSA

2014

STEFANI VALERIA FISCHER

O EXERCÍCIO FÍSICO E O CONTROLE SECRETOR DE INSULINA NA
OBESIDADE INDUZIDA POR MARCAÇÃO METABÓLICA

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas Área de Biologia Celular e do Desenvolvimento em Biologia Evolutiva.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Sabrina Grassioli

PONTA GROSSA

2014

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

F536 Fischer, Stefani Valeria
 O exercício físico e o controle
 secretor de insulina na obesidade induzida
 por marcação metabólica/ Stefani Valeria
 Fischer. Ponta Grossa, 2014.
 107f.

 Dissertação (Mestrado em Ciências
 Biológicas - Área de Concentração:
 Biologia Evolutiva), Universidade Estadual
 de Ponta Grossa.

 Orientadora: Prof^a Dr^a Sabrina
 Grassioli.

 1.Obesidade. 2.Lactação. 3.Programação
 metabólica e exercício. I.Grassioli,
 Sabrina. II. Universidade Estadual de
 Ponta Grossa. Mestrado em Ciências
 Biológicas. III. T.

CDD: 616.39

UEPG



PARANÁ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta
Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e
Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste
(Departamento de Ciências Biológicas).



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 05/2014

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **STEFANI VALERIA FISCHER**.

Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro de dois mil e quatorze, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência da Dr^a Sabrina Grassioli em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **STEFANI VALERIA FISCHER**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr^a Sabrina Grassioli (Orientadora UEPG), Dr^a Dionizia Xavier Scomparin (UEPG) e Dr^a Daniela Cristina Ceccatto Gerardin (UEL). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: **"O Exercício Físico e o Controle Secretor de Insulina na Obesidade Induzida por Marcação Metabólica"**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de trinta dias; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) até o prazo máximo de 60 dias após a defesa; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Ponta Grossa, 27 de fevereiro de dois mil e quatorze

Prof^a Dr^a Sabrina Grassioli

Prof^a Dr^a Dionizia Xavier Scomparin

Prof^a Dr^a Daniela Cristina Ceccatto Gerardin

Dedico esta Tese a meus pais, Valério e Agnes pelo apoio e carinho.

Em especial, ao amor de minha vida, Robson, pela compreensão e por sua presença em todos os momentos. É pra você e por você que estou aqui hoje.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelos caminhos em que tem me guiado.

À Professora Sabrina Grassioli, por me orientar e me acolher, estando sempre presente e disposta a me ensinar com toda paciência e atenção. Serei sempre grata por tudo!

À minha família de laboratório, companheiras de mestrado (Cláudia e Elisângela) e aos demais companheiros (Kelly, Emily, Letícia, Renata, Cleide, Gabi, Marcos e Nayara), amigos que sempre estiveram presente! Foram anos maravilhosos, nos quais vocês contribuíram muito para meu aprendizado! Amandinha companheira de RIE sou muito grata por tudo!

À minha família. Meus pais sou-lhes grata por compreenderem a importância da distância para meu crescimento profissional. Meus irmãos Rafaela e Guilherme, pelo carinho, apoio e amor que me fortaleceram nestes anos.

A meu noivo, por estar ao meu lado, por seu apoio e incentivo. Você me levou a acreditar que nossos objetivos são possíveis de serem alcançados.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Janelas de programação são períodos críticos do desenvolvimento de um organismo, intervenções hormonais ou nutricionais nestas fases podem pré-dispor o organismo a doenças na idade adulta. Estes eventos são denominados de *imprinting* ou programação metabólica. O período lactacional é considerado uma das janelas de programação, alterações nesta etapa podem promover obesidade e diabetes tipo 2 na idade adulta. O presente trabalho investigou os efeitos do exercício físico regular sobre a obesidade induzida por hiperalimentação lactacional e o controle secretor de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas. Ninhadas de ratos Wistar machos foram padronizadas em 10 filhotes por ninhada até o 3º dia de vida, posteriormente as ninhadas foram reajustadas em Ninhadas Normais (NN), 9 filhotes e Ninhadas Reduzidas (NR), 3 filhotes por ninhada. Aos 21 dias os animais foram desmamados e subdivididos em grupos sedentários (SED) e exercitados (EXE), formando 4 grupos experimentais: NNSD; NNEXE; NRSD e NREXE. O protocolo de exercício físico consistiu em natação 3x/semana/30min. Aos 90 dias amostras de tecido adiposo e pâncreas foram retirados para análise histológica. Amostras de sangue foram coletadas para análises bioquímicas plasmáticas (glicose, triglicerídeos e colesterol). As ilhotas foram isoladas e incubadas em diferentes concentrações de glicose (8,3; 16,7; 20,0 e 28,0 mM) na presença ou ausência de acetilcolina (ACh: 0,1; 1; 10; 100 e 1000 µM). A expressão protéica do receptor muscarínico M3 e da PLCβ foram realizadas em ilhotas pancreáticas isoladas. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média, com análise de variância ANOVA (pós teste Bonferroni entre pares selecionados) e Teste t de Student's ($p < 0,05$). Animais NRSD desenvolveram obesidade, com aumento de aproximadamente 25% nos depósitos de gordura visceral. A glicemia de jejum aumentou 16,7% neste grupo; sem entretanto, afetar os demais parâmetros plasmáticos (colesterol, triglicerídeos e insulina). Adipócitos brancos e ilhotas pancreáticas apresentaram hipertrofia nos animais NRSD. A natação reduziu os depósitos adiposos viscerais em 20% (NNEXE) e 12% (NREXE) e aumentou os depósitos de gordura marrom em 106,8% (NNEXE) e 63,9% (NREXE). Adicionalmente, a natação restabeleceu a glicemia e evitou a hipertrofia dos adipócitos brancos e das ilhotas pancreáticas nos animais NREXE. Ilhotas pancreáticas de ratos NRSD apresentam redução da secreção de insulina estimulada por glicose (~33%) e ACh (~104%). Ilhotas de animais NREXE restabeleceram a resposta a glicose sem corrigir a ação da ACh. Os efeitos secretores foram independentes da expressão protéica. Todavia, em ilhotas do grupo NNEXE a menor resposta à ACh foi acompanhada de redução (44,8%) na expressão do M3. O maior aporte calórico promovido pela redução de ninhada no período lactacional favorece a instalação da obesidade, além de induzir alterações no tecido adiposo e pâncreas endócrino. O exercício físico é capaz de atenuar a obesidade e restabelecer a secreção de insulina frente a alguns estímulos.

Palavras-chave: obesidade, lactação, programação metabólica e exercício.

ABSTRACT

Developmental Windows are critical periods during the development of an organism, hormonal and nutritional interventions in this phase might predispose the organism to certain diseases in adulthood. These events are called imprinting or metabolic programming. The lactation period is considered one of the developmental Windows and changes in this phase might promote obesity and type 2 diabetes in adulthood. This study investigated the effects of regular physical activity on obesity induced by overnutrition in the lactation period and the insulin secretion control in isolated pancreatic islets. Litters of male Wistar rats were standardized to 10 offsprings per litter up to 3-day old, later the litters were readjusted to NN (normal litters) with 9 rats and NR (reduced litters) with 3 rats per litter. When the rats were 21 days old they were weaned and subdivided into sedentary (SED) and exercised (EXE) groups, forming 4 experimental groups: NNSSED; NNEXE; NRSED and NREXE. The physical exercise program consisted of 3x/week/30 min. swimming. On the 90th day samples of fat tissue and pancreas were collected for histological analysis. Blood samples were collected for plasmatic biochemical analysis (glucose, triglycerides and cholesterol). The islets were isolated in different incubated glucose concentrations (8.3; 16.7; 20.0 and 28.0 mM) in the presence or absence of acetylcholine (Ach: 0.1; 1; 10; 100 and 1000 μ M). The muscarinic receptor M3 and the PLC β protein expressions were carried out in isolated pancreas islets. Data was expressed as average $\pm$ average standard error, with variance analysis ANOVA (post Bonferroni test between the selected pairs) and Student's Test t ($p < 0,05$). NRSED animals developed obesity, with an increase of about 25% in visceral fat deposits. The fasting glucose increased 16.7% in this group without, however, affecting the remaining plasmatic parameters (cholesterol, triglycerides and insulin). White adipocytes and pancreas islets presented hypertrophy in the NRSED animals. Swimming reduced visceral fat deposits in 20% (NNEXE) and 12% (NREXE) and increased brown fat deposits in 106,8% (NN-EXE) and 63,9% (NR-EXE). Additionally, swimming reestablished the glycemia and prevented hypertrophy of white adipocytes and pancreas islets in NR-EXE animals. The pancreas islets of NR-SED rats presented reduction in the insulin secretion stimulated by glucose (~33%) and Ach (~104%). Islets of NR-EXE animals reestablished the glucose response without correcting the Ach action. The secretor effects were independent from the protein expression. However, in islets of NN-EXE group the lowest response to Ach was followed by the reduction (44.8%) in the M3 expression. Higher caloric intake promoted by the litter reduction during lactation favored obesity, besides leading to changes in the fat tissue and endocrine pancreas. Physical exercise can reduce obesity and reestablish insulin secretion following some stimuli.

Key-words: obesity, lactation, metabolic programming and exercise.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de Sinalização da insulina em células musculares e adiposas:	28
Figura 2. Secreção de insulina estimulada por glicose e potencializadores.....	35
Figura 3. Evolução do Peso Corporal durante o período Lactacional	63
Figura 4. Influência da Natação sobre o Crescimento Corporal e o Consumo Alimentar.	67
Figura 5. Análise histomorfológica dos diferentes depósitos de tecido adiposo.....	69
Figura 6. Curva dose-resposta a Glicose em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos superalimentados submetidos à natação. Dados representam a média $\pm$ epm.	70
Figura 7. Histomorfometria das ilhotas pancreáticas de ratos superalimentados submetidos à natação.	71
Figura 8. Curva dose-resposta à Ach em ilhotas pancreáticas isoladas e Western Blotting M3 e PLC β de ratos superalimentados submetidos à Natação.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros biométricos e obesidade aos 90 dias: efeito da redução do número de filhotes por ninhada e aplicação do exercício físico.	65
Tabela 2. Parâmetros bioquímicos: efeito da redução do número de filhotes por ninhada e aplicação do exercício físico. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média	66

LISTA DE SIGLAS

AC	Adenilato ciclase
ACC	Acetil CoA carboxilase
ADP	Adenosina difosfato
Ach	Acetilcolina
AGL	Ácidos graxos livres
AgRP	Peptídeo relacionado ao agouti
Akt	Quinase serina-treonina
AMPKK	AMPK quinase
AMPK	proteína quinase ativada por AMP
AP	Área postrema
ARQ	Núcleo arqueado
ASC	Área sobre a curva
ATP	Adenosina trifosfato
Ca ²⁺	Íon cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CaMKK	Calmodulina quinase b
cAMP	AMP cíclico
CAP	Proteína associada a Cbl
CART	Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina
Cbl	Proteína adaptadora Cas-Br-murino
CCK	Colecistocinina
CNA	Comprimento naso anal
CrkII	Ciclina relacionada a cinase II
C3G	Proteína trocadora de nucleótidos guanina
CVD	Complexo vagal dorsal

DAG	Diacilglicerol
DCV	Doenças Cardiovasculares
DM1	<i>Diabetes mellitus</i> do tipo 1
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> do tipo 2
DMV	Núcleo dorsomedial
FADH ₂	Dinucleotídeo flavina adenina
GDP	Guanosina difosfato
GIP	Polipeptídeo insulíntrópico
GK	Glicoquinase
GLP1	Peptídeo semelhante ao glucagon
GLUTs	Transportadores de glicose
GLUT ₂	Transportador de glicose do subtipo 2
GLUT ₄	Transportador de glicose do subtipo 4
GTP	Guanosina trifosfato
G-6-P	Glicose-6-fosfato
H ⁺	Íon hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPA	Eixo hipotálamo hipófise adrenal
HSL	Lípase hormônio sensível
H&E	Hematoxilina e eosina
HMIT	transportador de H ⁺ ligado ao mioinositol
IKK	Serina quinase
IL	Índice de Lee
IL6	Interleucina 6
IL1	Interleucina 1
IMC	Índice de Massa Corporal
IP ₃	Inositol 1,4,5 trifosfato

IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato para receptor de insulina
JAK	Janus quinase
K ⁺	Íon potássio
K ⁺ _{ATP}	Canal de K ⁺ sensíveis ao ATP
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio Monobásico
KCL	Cloreto de potássio
LH	Núcleo lateral do hipotálamo
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
MSG	Glutamato monossódico
M3	Receptor muscarínico subtipo 3
NaCl	Cloreto de Sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio monobásico
NN	Ninhada Normal
NNEXE	Ninhada normal exercitada
NNSED	Ninhada normal sedentária
NDMV	Núcleo motor dorsal do vago
NR	Ninhada Reduzida
NREXE	Ninhada reduzida exercitada
NRSED	Ninhada reduzida sedentária
NSO	Núcleo supraóptico
NTS	Núcleo do trato solitário
NPY	Neuropeptídeo Y
ObR	Receptor para leptina

Ob Rb	Isoforma longa do receptor para leptina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDK	Fosfatidilinositol dependente de quinase
PDH	Piruvato desidrogenase
PI3K	PI3 quinase
PIP ₂	Fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato
PIP ₃	Fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato
PKA	Proteína quinase A
PKB	Proteína quinase B
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
PLC β	Fosfolipase C isoforma β
POMC	Pró ópio melanocortina
PP	Poli-peptídeo pancreático
PPAR γ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PVN	Núcleo paraventricular
PYY	Peptídeo YY
RI	Resistência a Insulina
RIE	Radioimunoensaio
Shc	Proteína semelhante ao colágeno com homologia Src
SH2	Domínio de homologia Src
SM	Síndrome Metabólica
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema nervoso simpático
SNP	Sistema nervoso parassimpático
HSPA	Eixo simpato adrenal

STAT3	Fator de transdução e ativação de transcrição 3
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TAG	Triacilglicerol
TC10	Proteína GTPase
TGI	Trato gastrointestinal
TNF α	Fator de necrose tumoral
UCP1	Proteína mitocondrial desacopladora subtipo 1
UCP2	Proteína mitocondrial desacopladora subtipo 2
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade
VMN	Hipotálamo ventromedial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 OBESIDADE	16
1.2 FISIOPATOLOGIA DO TECIDO ADIPOSE BRANCO (TAB)	18
1.3 SISTEMA NERVOSO CENTRAL E O CONTROLE DA INGESTA ALIMENTAR	20
1.4 NÚCLEO ARQUEADO (ARQ) E O CONTROLE DO APETITE	22
1.5 SECREÇÃO E AÇÃO DA INSULINA	24
1.5.1 <i>Secreção de Insulina Estimulada por Glicose</i>	29
1.5.2 <i>Secreção de Insulina e Potencializador Acetilcolina (Ach)</i>	31
1.6 OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA	35
1.7 EXERCÍCIO FÍSICO X OBESIDADE/DM2	38
1.8 IMPRINTING METABÓLICO OU PROGRAMAÇÃO METABÓLICA	42
1.8.1 <i>Períodos Gestacionais e Janelas de Programação</i>	42
1.9 IMPRINTING DURANTE A LACTAÇÃO OU PÓS-NATAL	47
1.10 IMPRINTING METABÓLICO, DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E DO PÂNCREAS ENDÓCRINO	49
1.11 MODELO DE OBESIDADE POR SUPERNUTRIÇÃO	52
2. OBJETIVOS	56
2.1 OBJETIVO GERAL	56
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
3. MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1 ANIMAIS	57
3.2 MODELO EXPERIMENTAL	57
3.3 AVALIAÇÃO DA OBESIDADE	58
3.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO	58
3.5 ISOLAMENTO ILHOTAS PANCREÁTICAS	59
3.6 PRÉ-INCUBAÇÃO	59
3.7 INCUBAÇÃO	60
3.8 DOSAGEM INSULINA: RIE	60
3.9 CURVA CRESCIMENTO E CONSUMO ALIMENTAR	60
3.10 DOSAGENS BIOQUÍMICAS	61
3.11 ANÁLISE HISTOLÓGICA	61
3.12 WESTERN BLOTTING	62
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
4. RESULTADOS	63
4.1 EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL DURANTE A LACTAÇÃO	63
4.2 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, OBESIDADE E DADOS BIOQUÍMICOS	64
4.3 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA	67
4.4 CURVA DOSE-RESPOSTA A GLICOSE EM ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS	70
4.5 CURVA DOSE-RESPOSTA A Ach EM ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS	72
5. DISCUSSÃO	73
5.1 OBESIDADE INDUZIDA POR HIPERALIMENTAÇÃO E EXERCÍCIO FÍSICO	73
5.2 EFEITOS HIPERALIMENTAÇÃO DURANTE A LACTAÇÃO E DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O PÂNCREAS ENDÓCRINO	82

6. CONCLUSÃO	89
7. REFERÊNCIAS.....	90
8. APÊNDICE.....	106
9. ANEXOS	107

1. INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE

A alimentação é uma condição básica e essencial à sobrevivência dos indivíduos, sendo um processo fisiológico complexo que integra o controle do desejo de comer, o armazenamento e o gasto energético. No entanto, o desajuste homeostático da ingesta alimentar e gasto energético levam à instalação de distúrbios nutricionais e fisiopatológicos como desnutrição ou obesidade (LEITE; NETO, 2009). A obesidade é tida como um estado crônico em que o excesso de energia ingerida excede o gasto energético (SUZUKI; JAYASENA; BLOOM, 2012).

A crescente taxa de obesidade na população se tornou um problema de ordem social, econômico e de saúde, a qual afeta países desenvolvidos, bem como aqueles em desenvolvimento. Para a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade é considerada uma epidemia mundial, sendo esta uma doença de causas multifatoriais. O acúmulo de tecido adiposo está estreitamente relacionado ao aparecimento de desordens como resistência à insulina (RI), hipertensão arterial, intolerância à glicose e dislipidemia. Este conjunto de anormalidades é tido como síndrome metabólica (SM), a qual está intimamente relacionada a várias adversidades clínicas, como doenças cardiovasculares (DCV), hipertensão arterial, *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) e dislipidemia (COTTRELL; OZANNE, 2007; WAJCHENBERG, 2000).

A hipótese evolutiva para o aumento da população obesa defende que os seres humanos possuem um genótipo econômico persistente de seus antepassados, os quais frequentemente enfrentavam oscilantes períodos de fome e disponibilidade de alimento. Deste modo, para superar os longos períodos de jejum estes indivíduos deveriam possuir alta capacidade de armazenamento energético, o que provavelmente levou ao desenvolvimento do tecido adiposo (DAMIANI; DAMIANI; DE MENEZES FILHO, 2010). Um tecido cujo subtipo celular – o adipócito – é altamente especializado em converter excesso de nutrientes em lipídios (LEITE; NETO, 2009). Os lipídios por sua vez, além de formarem uma excelente fonte de energia, podem ser armazenados em elevadas quantidades. Todavia, o que há milhões de anos foi uma vantagem evolutiva nas sociedades modernas, industrializadas e sedentárias, tornou-se um problema. O estilo de vida atual

favorece o consumo de alimentos ricos em gorduras e carboidratos, promove o baixo gasto energético, culminando com excesso de substratos energéticos armazenados no tecido adiposo, situação que se tornou indesejável diante da pandemia da obesidade (SUZUKI; JAYASENA; BLOOM, 2012; YANG; SMITH, 2007).

Considerando que milhões de pessoas sofrem com o excesso de tecido adiposo, diferentes métodos são utilizados para avaliar o acúmulo de gordura corporal e indicar o nível de obesidade dos indivíduos. Dentre os métodos de avaliação, estão as avaliações das dobras cutâneas, circunferências e diâmetros corporais, bioimpedância elétrica e as técnicas de imagem, como tomografia computadorizada e ressonância magnética (QUEIROGA, 1998). No entanto, o Índice de Massa Corporal (IMC) é o parâmetro mais utilizado por sua praticidade.

O IMC indica o grau de obesidade através do cálculo que leva em consideração o peso corporal (Kg) dividido pela altura (m^2). Indivíduos normais apresentam o IMC entre 18,5 - 24,9, resultados de IMC entre 25 a 29,9 indicam excesso de peso, sendo considerados obesos aqueles que têm o $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$ (WAJCHENBERG, 2000). Indivíduos obesos possuem maior probabilidade de desenvolvimento de doenças crônicas devido às anormalidades metabólicas derivadas da instalação da obesidade, dentre estas doenças estão o diabetes, doenças cardíacas e maior incidência de alguns tipos de câncer (GUILHERME et al., 2008; MARIATH et al., 2007; WAJCHENBERG, 2000; YANG; SMITH, 2007).

A precoce instalação da obesidade é observada pelo aumento do sobrepeso durante a infância. Neste período muitas mudanças fisiológicas ainda ocorrem, elevando os riscos do início da instalação de desordens metabólicas, que, quando não tratadas, levam indivíduos a se tornarem adultos obesos (BERTHOUD, 2012).

Em indivíduos obesos os depósitos de tecido adiposo visceral e subcutâneo encontram-se distribuídos desproporcionalmente pelo organismo, havendo, dessa forma, prevalência dos depósitos de gordura visceral, os quais se localizam, principalmente, na região abdominal. A deposição da gordura abdominal pode situar-se subcutaneamente ou ainda intra-abdominal, ou seja, em contato direto com as vísceras, sendo esta a gordura mais prejudicial (MOURA VI; RI, 2010; WAJCHENBERG, 2000; YANG; SMITH, 2007).

A diferença entre a localização dos dois depósitos de gordura também reflete diferenças funcionais, a níveis de mobilização lipídica, maturação, produção de

adipocitocinas e a nível morfológico. Conforme demonstrado pela primeira vez pelo médico francês Jean Vague, a disposição da massa adiposa no organismo está diretamente associada à predisposição de determinadas doenças (VAGUE, 1956).

Indivíduos com maior acúmulo de gordura abdominal, ou seja, com aumento de gordura visceral, têm maiores chances de desenvolver DCV e diabetes. Além de influenciar no decréscimo da sensibilidade à insulina, a gordura abdominal está relacionada à alterações lipídicas, tais como: aumento nos níveis dos triglicérides e das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e redução das lipoproteínas de alta densidade (HDL) (WAJCHENBERG, 2000; YANG; SMITH, 2007).

Dessa forma, considerando o excesso de tecido adiposo como elemento central para o desenvolvimento de quadros patológicos, compreender seu desenvolvimento e funcionamento é fundamental para possíveis intervenções preventivas e de tratamentos.

1.2 FISIOPATOLOGIA DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO (TAB)

Antigamente acreditava-se que o TAB estava relacionado apenas ao papel de armazenamento do excesso de energia. No entanto, hoje o tecido adiposo é tido como um importante órgão endócrino-metabólico responsável por auxiliar no metabolismo energético. Este recebe sinais neuroendócrinos, autócrinos, parácrinos, e produz substâncias sinalizadoras que agem em grupos neuronais hipotalâmicos envolvidos na regulação da ingestão alimentar, armazenamento energético e saciedade (BOGUSZEWSKI; PAZ-FILHO; VELLOSO, 2010; LEITE; NETO, 2009).

Os diversos sinalizadores produzidos e liberados pelos adipócitos recebem o nome de adipocinas, as quais são uma série de hormônios peptídicos e citocinas que exercem efeitos metabólicos e endócrinos generalizados, afetando o funcionamento dos demais tecidos, tais como sistema nervoso central (SNC), músculo e fígado (LEITE; NETO, 2009; YANG; SMITH, 2007).

Durante a formação do TAB as células ainda em desenvolvimento apresentam diversas gotículas de gordura, as quais se juntam formando uma única gota lipídica no interior do adipócito quando estes se tornam maduros (DE QUEIROZ et al., 2009). Os adipócitos armazenam os lipídeos em seu interior na forma de triacilglicerol (TAG).

A expansão do tecido adiposo na obesidade é determinada pelo aumento no tamanho dos adipócitos (hipertrofia) e/ou pelo aumento do número de adipócitos (hiperplasia). A hipertrofia dos adipócitos está relacionada à ativação de vias metabólicas que promovem acúmulo de TAG via lipogênese. Os adipócitos passam então a armazenar mais TAG em seu interior até atingir sua capacidade máxima (YANG; SMITH, 2007). Por outro lado, a hiperplasia ocorre por adipogênese, derivando de células-tronco mesenquimais multipotentes. Dentre os dois processos responsáveis pela expansão do tecido adiposo a hipertrofia é mais prejudicial ao organismo (DE QUEIROZ et al., 2009), pois, após atingir sua capacidade máxima de estocagem, os adipócitos hipertrofiados entram em disfunção e tornam-se mais lipolíticos. Passam ainda a produzir de maneira desequilibrada mais citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1(IL-1) e interleucina-6 (IL-6), entre outros gerando processos inflamatórios locais e posteriormente sistêmicos (RAMALHO; GUIMARÃES, 2008).

Além das citocinas inflamatórias o TAB produz outras adipocinas, como leptina e adiponectina, as quais são benéficas ao organismo. O processo inflamatório gerado pelo excesso de tecido adiposo promove a diminuição na produção das leptina e adiponectina, além de interferir na ação da insulina nos órgãos periféricos (RAMALHO; GUIMARÃES, 2008; YANG; SMITH, 2007).

Além do processo inflamatório, outro fator que contribui para o desenvolvimento de comorbidades associados à obesidade está ligado ao excesso de ácidos graxos livres (AGL), derivados especialmente do tecido adiposo visceral, o qual se apresenta menos sensível ao efeito antilipolítico da insulina (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006).

A obesidade está relacionada ao desajuste do sistema nervoso autônomo (SNA). Assim como outros órgãos endócrinos, o TAB recebe inervações de ambas as divisões autonômicas, as quais exercem efeitos opostos no metabolismo deste tecido (SCHEURINK; STEFFENS, 1990). Tanto em humanos, como em modelos de obesidade animal, evidências demonstram que há prevalência do sistema nervoso parassimpático (SNP) sobre o sistema nervoso simpático (SNS) (DE COURTEN et al., 2004). Em condições prevalentes o SNP potencializa a liberação de insulina pelo pâncreas endócrino, sendo assim, a insulina tem ação lipogênica no tecido adiposo, promovendo o acúmulo de gordura corporal (BENOIT et al., 2004; PROENÇA, 2010; SCHEURINK et al., 1989).

Mecanismos neuroendócrinos estão envolvidos na manutenção da homeostase energética, dispondo de infinita rede de comunicação entre os diferentes sistemas, onde sensores e receptores promovem a sinalização entre os tecidos periféricos e o SNC (LEITE; NETO, 2009). Diferentes estudos em humanos e roedores sugerem que as raízes da obesidade podem surgir durante fases críticas do desenvolvimento. Fases em que a formação sistêmica encontra-se mais suscetível a interferências externas, as quais podem interferir na formação da complexa rede de sinalização do controle do peso corporal. A este fenômeno, em que eventos podem intervir em fases específicas do desenvolvimento do organismo e promover mudanças, às quais persistem até a vida adulta, predispondo o indivíduo a certas doenças, é chamado de *imprinting* metabólico ou programação metabólica (COTTRELL; OZANNE, 2007; HANLEY et al., 2010).

1.3 SISTEMA NERVOSO CENTRAL E O CONTROLE DA INGESTA ALIMENTAR

O monitoramento do estado nutricional, consumo e o gasto energético são mantidos por uma série de sinalizadores periféricos, dentre os quais se destacam aqueles oriundos do trato gastrointestinal, fígado, glândulas endócrinas e tecido adiposo. Estes sinalizadores aferentes interagem com diferentes tipos de receptores distribuídos em regiões específicas do SNC determinando a ativação de vias neurais eferentes que são encaminhadas via ativação do eixo hipotálamo-hipófise-glândulas e/ou através dos ramos do SNA para manter a homeostase energética (BOGUSZEWSKI; PAZ-FILHO; VELLOSO, 2010; SUZUKI; JAYASENA; BLOOM, 2012).

Dentre os diversos sinalizadores do balanço energético os hormônios insulina e leptina produzidos no pâncreas endócrino e tecido adiposo, respectivamente, exercem os mais marcantes efeitos sobre o controle alimentar e o gasto energético, atuando sobre núcleos hipotalâmicos do SNC. Adicionalmente, metabólitos como glicose, AGL e aminoácidos também atuam a nível central para modular o metabolismo (LEITE; NETO, 2009). Completando estas redes neurais e endócrinas de comunicação integram-se as influências sensoriais, comportamentais e ambientais (COTTRELL; OZANNE, 2007; MARKUS, 2005).

Considerando o SNC como sede dos diversos sinais moduladores da homeostase energética, compreender a integração e a ativação de redes neurais

aferentes e eferentes é fundamental para entender como o organismo preserva o ponto de ajuste do peso corporal (SUZUKI; JAYASENA; BLOOM, 2012).

O hipotálamo, considerado o centro regulador da ingesta alimentar, é a primeira região encefálica envolvida na homeostase energética. Situado ao redor do terceiro ventrículo cerebral, esta região é formada por complexos conjuntos de neurônios – os denominados núcleos hipotalâmicos - os quais são sinapticamente interligados e coordenados pelos sinais periféricos que flutuam de acordo com estado alimentar ou de jejum (BOURET, 2009; DAMIANI; DAMIANI; DE MENEZES FILHO, 2010).

Neuralmente e funcionalmente o hipotálamo é dividido em duas regiões, uma anterior, a qual abrange o núcleo paraventricular (PVN) e núcleo supraóptico (NSO), e uma região posterior, composta pelo núcleo arqueado (ARQ), núcleo ventromedial (VMH), núcleo dorsomedial (DMV) e lateral (LH) (BOURET, 2009; SAWCHENKO, 1998).

Inicialmente, estudos do SNC em modelos experimentais animais, sugeriram a hipótese “dual”. Esta hipótese considerava que o VMH era o “centro da saciedade” e o núcleo lateral do hipotálamo “centro da fome”. No entanto, avanços demonstraram que vários centros cerebrais como hipotálamo (formado por diversos núcleos, inclusive os citados pela hipótese dual), tronco cerebral e centros da recompensa estão intimamente interrelacionados por meio de circuitos neuronais para regular a homeostase energética. Mesmo que diversos núcleos hipotalâmicos e cerebrais estejam envolvidos no controle do peso corporal, o ARQ é uma região específica, com o papel central na integração entre todos os sinais envolvidos no controle do apetite (WYNNE et al., 2005).

Outro componente do SNC é o tronco encefálico, que também desempenha papel importante na regulação da homeostase energética. Nesta região também há a integração de sinais neurais hipotâmicos e dos centros corticais que também refletem o estado metabólico do organismo (SUZUKI; JAYASENA; BLOOM, 2012). O tronco encefálico mantém projeções aos centros corticais superiores, além de possuir recíprocas conexões com o hipotálamo através de uma região especial, denominada núcleo do trato solitário (NTS). Para o NTS também convergem sinais periféricos oriundos do trato gastrointestinal (TGI) (DAMIANI; DAMIANI; DE MENEZES FILHO, 2010).

As aferências vagais providas do trato gastrointestinal são de extrema importância, pois informam o encéfalo sobre a quantidade de nutriente presente no trato, sendo ativas pelo estiramento do estômago pelo depósito de alimento (DAMIANI; DAMIANI; DE MENEZES FILHO, 2010). Adicionalmente, no tronco encefálico há uma região denominada complexo vagal dorsal (CVD), sendo esta região o principal local de terminação de fibras nervosas vagais aferentes. O CVD é formado pelo núcleo motor dorsal do vago (DVN) juntamente com a área postrema (AP), região com barreira hemato encefálica incompleta e o NTS. O conjunto de sinais que aferem o tronco encefálico são considerados sinais de saciedade, os quais estão envolvidos a curto prazo no controle do peso corporal (LEITE; NETO, 2009; SUZUKI; JAYASENA; BLOOM, 2012; WYNNE et al., 2005).

1.4 NÚCLEO ARQUEADO (ARQ) E O CONTROLE DO APETITE

Dentre os núcleos hipotalâmicos o ARQ, situado na base da eminência mediana, recebe e integra com facilidade os sinais hormonais vindos da periferia, informando a disponibilidade de nutrientes do ambiente ao SNC, visto apresentar uma barreira hematoencefálica deficiente (BOURET, 2009; LEITE; NETO, 2009).

O ARQ possui uma gama de neurônios que dispõem de receptores altamente sensíveis e especializados em captar sinais periféricos. Esta massa de neurônios pode ser dividida de acordo com as funções que desempenham, sendo uma subpopulação denominada orexígenos e outra subpopulação denominada de anorexígenos (WYNNE et al., 2005).

Os neurônios orexígenos quando estimulados coexpressam neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo relacionado ao agouti (AgRP), os quais ativam o aumento da ingesta alimentar e redução do gasto energético por meio do acionamento do SNP. Por outro lado, a subpopulação de neurônios anorexígenos produzem os neuropeptídeos pró-ópio-melanocortina (POMC) e transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), de ação contrária aos orexígenos, os quais ativam o SNS, havendo maior gasto energético e pausa da ingesta alimentar (BOURET, 2009; LEITE; NETO, 2009; SUZUKI; JAYASENA; BLOOM, 2012). Os grupos neurais orexígenos e anorexígenos estão interligados por vários pontos ao SNC, sendo que a atividade de um grupo inibe o outro (BOGUSZEWSKI; PAZ-FILHO; VELLOSO, 2010).

A ação antagônica entre neurônios orexígenos e anorexígenos proporciona em condições saudáveis o dinâmico mecanismo de anabolismo e catabolismo, de acordo com as necessidades do organismo (BOURET, 2009). A modulação da atividade dos núcleos hipotalâmicos é regida por sinais periféricos como níveis séricos de leptina, insulina e peptídeos gastrointestinais. Os diversos sinais moduladores do metabolismo energético podem ser agrupados em sinais de curta e longa duração (COTTRELL; OZANNE, 2007).

Os sinais de curta duração, chamados “sinais de saciedade”, de ação rápida, são responsáveis por determinar as sensações de fome e saciedade, estes, em sua maioria, ativam diretamente o nervo vago, o qual converge às informações ao NTS, representados pelos hormônios gastrointestinais (DAMIANI; DAMIANI; DE MENEZES FILHO, 2010). Os fatores gastrointestinais podem modular diretamente o SNA, principalmente através do nervo vago, alcançando o NTS, para auxiliar no controle da fome/saciedade. Entre estes estão os que potencializam a fome, estimulando a produção de neuropeptídeos orexígenos, sendo a grelina e as orexinas.

Os que têm efeito anorexígeno são colecistocinina (CCK) incretinas como o peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1), peptídeo YY (PYY) e peptídeo inibidor de gastrina (GIP) (COTTRELL; OZANNE, 2007; LEITE; NETO, 2009). Assim como os fatores gastrointestinais, outros hormônios produzidos no pâncreas, como glucagon e peptídeo pancreático (PP), têm ação através do nervo vago promovendo a redução alimentar.

O armazenamento de energia excedente é controlado em longo prazo por fatores denominados de “sinais de adiposidade”, representados pela insulina e leptina. Sua ação é mais lenta devido à necessidade do transporte através da corrente sanguínea, sendo assim, há que se atravessar a barreira hematoencefálica para efetivar sua ação no hipotálamo (BOGUSZEWSKI; PAZ-FILHO; VELLOSO, 2010; SUZUKI; JAYASENA; BLOOM, 2012).

Produto do gene *ob*, a leptina é um hormônio produzido principalmente pelo tecido adiposo branco, tendo papel chave na regulação do peso corporal. Os receptores para leptina (Ob-R) possuem três diferentes isoformas que se encontram espalhados por diversos tecidos periféricos e no SNC, principalmente na região do ARQ. A leptina se liga a isoforma longa do receptor para leptina (Ob-Rb), predominante no ARQ, e estimula os neurônios anorexígenos, o que desencadeia

uma cascata de sinalizações envolvendo a via JAK/STAT3 (Janus quinase/ fator de transdução e ativação de transcrição 3) (WYNNE et al., 2005).

Nos tecidos periféricos a leptina tem ação direta ou indireta, aumenta a atividade do sistema nervoso simpático suprimindo a lipogênese e promovendo a oxidação de lipídeos, evitando a deposição ectópica de gordura em tecidos como músculo e pâncreas, mantendo as condições ideais para a ação da insulina em tais tecidos (COTTRELL; OZANNE, 2007; RODRIGUES; SUPLICY; RADOMINSKI, 2003; SUZUKI; JAYASENA; BLOOM, 2012; WYNNE et al., 2005).

A insulina tem ação central e periférica, assim como a leptina. Após a passagem pela barreira hematoencefálica, age como um sinal anorexígeno, liga-se aos seus receptores (IR), os quais estão largamente distribuídos em regiões como o bulbo olfatório e o ARQ. A estimulação dos neurônios anorexígenos pela insulina leva ao aumento da produção de POMC e CART (WYNNE et al., 2005).

Embora por vias distintas, ambos os hormônios, leptina e insulina, agem no ARQ promovendo a pausa da ingesta alimentar, reduzindo o apetite e aumentando o gasto energético por meio da estimulação simpática. Os dois hormônios também possuem ação periférica similar. A insulina promove o aumento da captação periférica de glicose e de seu estoque em forma de glicogênio através da glicogênese, além de aumentar a lipogênese e a síntese protéica no músculo esquelético e no músculo cardíaco (CARVALHEIRA et al., 2005). A leptina estimula a oxidação de ácidos gráxos e aumenta a absorção de glicose, e impede o acúmulo ectópico de lipídios nos tecidos periféricos (BOGUSZEWSKI; PAZ-FILHO; VELLOSO, 2010; MOHAMED MAHMOUD EID, 2010; SUZUKI; JAYASENA; BLOOM, 2012).

Considerando a importância da insulina para o controle da homeostase energética, em especial para a manutenção da glicemia, faz-se necessário compreender o controle da secreção e ação da insulina e sua relação às comorbidades associadas às disfunções de sua ação no organismo.

1.5 SECREÇÃO E AÇÃO DA INSULINA

O pâncreas é um órgão misto, dotado de uma porção exócrina, formada por células acinares, e uma porção endócrina, formada pelas Ilhotas de Langerhans, as quais representam de 1 a 2% do volume pancreático (LEIBIGER; LEIBIGER;

BERGGREN, 2008). As ilhotas pancreáticas consistem em diferentes linhagens celulares, as quais possuem proporções distintas, sendo aproximadamente 50% células β (insulina), 40% células α (glucagon), 10% células δ (somatostatina), poucas células PP (peptídeo-pancreático) (STEINER et al., 2010).

As células β pancreáticas têm papel vital e único na produção e secreção da insulina, hormônio responsável por manter a homeostase glicêmica. Disfunções na secreção, ação ou captação deste hormônio são características do *Diabetes mellitus*. Podemos classificar o diabetes em dois principais tipos. O *Diabetes mellitus* do tipo 1 (DM1), doença auto-imune que promove a falência das células β pancreáticas e o *Diabetes mellitus* do tipo 2 (DM2), característico pelo quadro de RI e posterior disfunção das células β . O DM2 é a mais comum desordem metabólica humana (GROSS et al., 2002; LEIBIGER; LEIBIGER; BERGGREN, 2008).

A insulina é um hormônio anabólico que promove o aumento da captação periférica de glicose pelo tecido muscular e adiposo, diminuição da gliconeogênese e da glicogenólise no fígado, aumento da síntese proteica, redução da lipólise e estímulo da lipogênese no fígado e tecido adiposo. Tais ações sistêmicas promovem a manutenção dos níveis de glicose dentro de seus estreitos limites (CARDOSO et al., 2007; CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; LEIBIGER; LEIBIGER; BERGGREN, 2002).

A eficiência do controle glicêmico pode ser avaliada após sobrecarga de glicose (endovenosa ou oral), método que promove uma rápida elevação da glicemia plasmática e que simula as oscilações glicêmicas características do estado alimentado. Nesta situação, o retorno da glicemia a condição basal (5,6 mM ou 100 mg/dL) é primariamente dependente da captação de glicose pelos tecidos muscular esquelético e adiposo, estimulada pelo hormônio insulina (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). A entrada de glicose nestes tecidos é denominada insulino-dependente, uma vez que, depende do acionamento de cascatas de sinalizações que promovem a translocação de proteínas transportadoras de glicose (GLUTs) até a membrana plasmática das células destes tecidos (HUANG; CZECH, 2007).

São conhecidas 13 proteínas responsáveis pelo transporte da glicose através da membrana plasmática celular nos diferentes tecidos (GLUT₁-GLUT₁₂ e HMIT), no entanto, cada uma possui particularidades quanto aos seus substratos. Várias isoformas estão presentes no músculo esquelético e no tecido adiposo, sendo o

GLUT₄ presente em concentração mais expressiva (HUANG; CZECH, 2007; SALTIEL; KAHN, 2001).

O GLUT₄ apresenta uma característica única, este se encontra preso a vesículas intracelulares, as quais se translocam e fusionam com a membrana plasmática após a ativação promovida pela insulina, enquanto que os outros transportadores de glicose são permanentemente fixos na membrana plasmática (BRYANT; GOVERS; JAMES, 2002). Uma vez inserido na membrana celular, o transportador GLUT₄ permite a passagem por difusão facilitada da glicose do sangue para o líquido intracelular. Considerando a glicose uma molécula polar e hidrofílica, este mecanismo de translocação do GLUT₄ cria uma via rápida de passagem pela membrana plasmática sustentando o aporte energético necessário a estes tecidos (HUANG; CZECH, 2007). Finalmente, o tecido muscular esquelético e o tecido adiposo branco juntos representam as maiores massas de tecido corporal responsáveis por mais de 80% da captação de glicose (BRYANT; GOVERS; JAMES, 2002; SALTIEL; KAHN, 2001).

A ação da insulina sobre a homeostase glicêmica é dependente de sua ligação a receptores de membrana específicos, os quais estão presentes em vários tecidos (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; HABER et al., 2001). Estruturalmente os receptores de insulina (IR) são proteínas heterotetraméricas, formadas por duas subunidades α extracelulares, as quais contêm o sítio de ligação específico para insulina e são ligadas por pontes de dissulfeto a duas subunidades β transmembrana, estas apresentam atividade tirosina quinase na porção intracelular (SALTIEL; KAHN, 2001). Na ausência da insulina as subunidades α inibem a atividade quinase das cadeias β , no entanto, a ligação da insulina ao receptor remove o efeito inibitório e permite que as subunidades β mudem de conformação e manifestem atividade de autofosforilação. Após sua ativação, o IR passa a fosforilar vários substratos proteicos intracelulares (ver figura 1) em resíduos de tirosina desencadeando diferentes cascatas de sinalizações. Embora diversas vias intracelulares possam ser acionadas pelos IR, duas vias estão intimamente relacionadas à translocação dos GLUT₄ para a membrana, as quais são ativas em paralelo (BRYANT; GOVERS; JAMES, 2002; CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; HABER et al., 2001).

As duas vias ativadas para translocação do GLUT₄ estão representadas na Figura 1, com uma breve descrição feita a seguir. A primeira via consiste na ativação

dos substratos para o receptor de insulina (IRS), os quais são subdivididos em IRS1 – 4. Os subtipos IRS-1 e 2 desempenham papel fundamental na transmissão de sinais insulínicos nos diversos subtipos celulares. A fosforilação de tais substratos cria sítios de ligação SH2 (domínio de homologia Src), permitindo a ligação de diversas proteínas com ação enzimáticas ou adaptadoras (HABER et al., 2001).

Uma enzima importante ativada pelos IRS é a PI3-quinase (inositol-3 fosfato-PI3K), essencial para o transporte da glicose, a qual ativa a proteína fosfatidilinositol dependente de quinase (PDK) e proteína quinase C (PKC ζ). A PDK promove a ativação da proteína Akt/ proteína quinase B (homóloga celular ao oncogene viral v-AKT - Akt ou PKB) está junto com a PKC promovem a fosforilação e a translocação dos GLUT₄ (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

A segunda via ativada pelo IR envolve a ativação da proto-oncoproteína (c-Cbl), a qual se encontra associada à outra proteína adaptadora (CAP), formando o complexo dimérico CAP/Cbl. A atividade tirosina quinase do IR fosforila a Cbl, ativando o complexo proteico CAP/Cbl, o qual migra para jangadas lipídicas presentes na face interna da membrana celular. O complexo CAP/Cbl recruta a proteína CrkII (ciclina relacionada a cinase II) e proteína trocadora de nucleótidos guanina (C3G). A C3G, por sua vez, ativa a proteína TC10 (proteína GTPase) por meio da troca de uma guanosina difosfato (GDP) para uma guanosina trifosfato (GTP). Assim, TC10 tem ação sobre proteínas que reorganizam os filamentos de actina do citoesqueleto, promovendo a translocação do transportador de glicose. A insulina promove estímulos intracelulares através da ativação do IR, iniciando cascatas de sinalizações, as quais culminam com a ativação de proteínas específicas, responsáveis pela proliferação celular (BOGAN, 2012; BRYANT; GOVERS; JAMES, 2002; CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

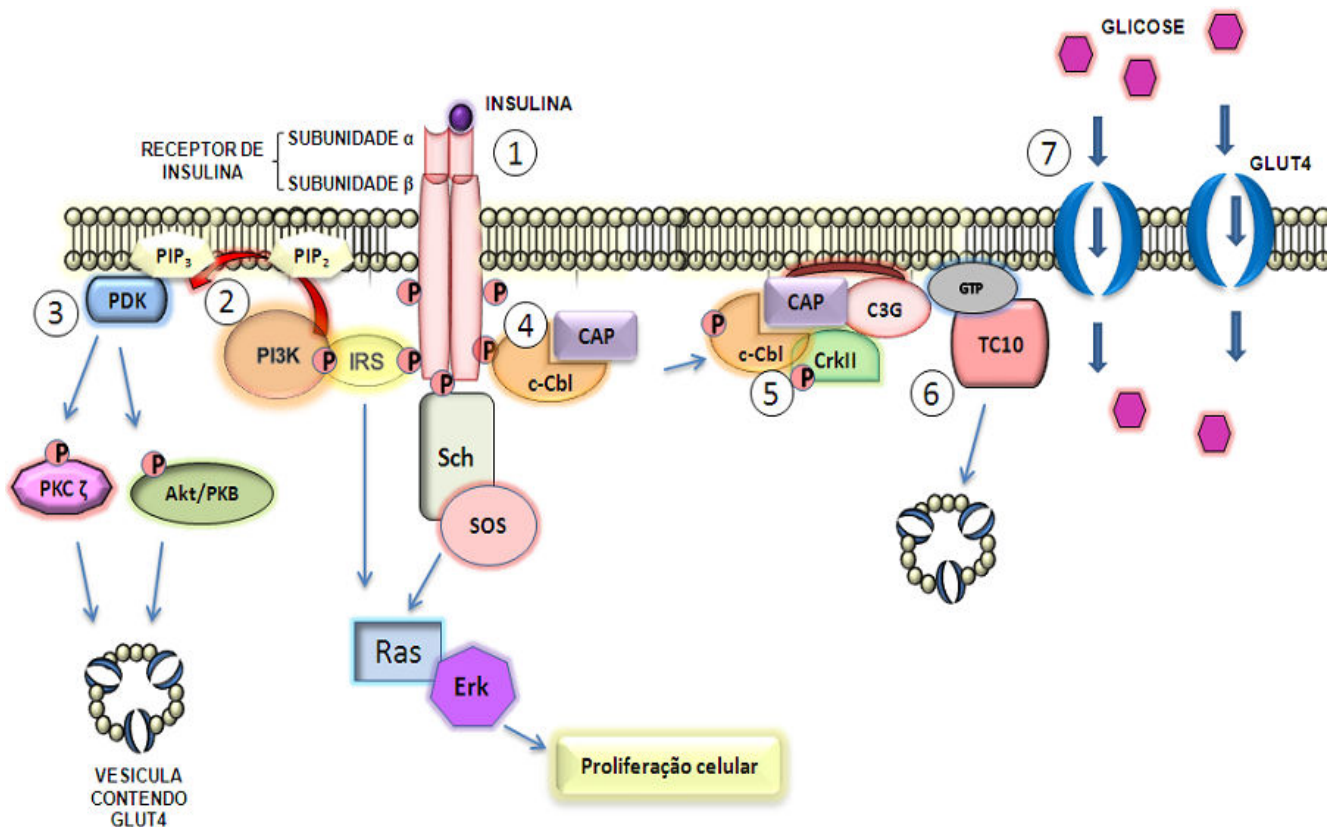


Figura 1 - Vias de Sinalização da insulina em células musculares e adiposas: 1) Insulina se liga ao IR na célula-alvo, promovendo auto fosforilação do receptor, o qual fosforila diversas proteínas ativando vias de sinalização distintas. 2) IR fosforila as proteínas IRS, as quais passam a ativar a PI3K que converte fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) em PIP2. 3) A proteína PDK ativada pela PIP3, fosforila outra duas enzimas a PKC e Akt/PKB, as quais tem ação promovendo o transporte das vesículas contendo GLUT₄ para a membrana plasmática. 4) IR fosforila o complexo proteico c-Cbl/CAP, o qual se desloca para jangadas lipídicas na face interna da membrana celular. 5) As proteínas CrkII e C3G são recrutadas e ativadas. 6) C3G ativa a proteína TC10 através da troca de um GDP para um GTP, a TC10 ativa age sobre os filamentos de actina e promove translocação dos GLUT4 para a membrana. 7) GLUT₄ presente na membrana promove a difusão facilitada das moléculas de glicose para o interior da célula. Adaptado de (BRYANT; GOVERS; JAMES, 2002; SALTIEL; KAHN, 2001).

Além de promover o aumento da captação periférica de glicose, a insulina também promove a síntese de glicogênio nos tecidos periféricos, ativando genes que codificam enzimas que promovem a glicogênese (glicogênio sintetase), além de ativar a PI3K e Akt, as quais inibem as enzimas proteína quinase A (PKA) ou glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3) que boqueiam a ação da enzima glicogênio sintase, aumentando assim, sua taxa de atividade (SALTIEL; KAHN, 2001).

Especificamente no fígado a insulina reduz a expressão de genes que codificam as enzimas hepáticas de gliconeogênese e glicólise. Este hormônio também tem ação lipogênica nos tecidos, inibindo as enzimas lipases e ativando

enzimas de síntese lipídica, como a acetil-CoA carboxilase (ACC). Sua ação no tecido adiposo, onde a glicose é convertida e armazenada sob a forma de lipídeos, é ativar as enzimas lipogênicas como piruvato desidrogenase e ACC (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). A insulina inibe a atividade das lipases principalmente através de reduções dos níveis de AMP cíclico (cAMP). A cascata de sinalização promovida pela insulina também ativa algumas proteínas que estão envolvidas no processo de proliferação e diferenciação celular (SALTIEL; KAHN, 2001).

Nos últimos anos pesquisas vem demonstrando que no tecido muscular há uma via independente de insulina para translocação das proteínas GLUT₄, em que o íon cálcio (Ca²⁺) tem papel fundamental. Esta via será descrita no item exercício físico, descrito a seguir (HAWLEY; LESSARD, 2008).

1.5.1 Secreção de Insulina Estimulada por Glicose

A porção endócrina é formada por 4 tipos de células altamente especializadas, as quais estão compactadas em aglomerados denominados Ilhotas de Langerhans. Dentre os tipos celulares destacamos as células β , as quais são responsáveis pela produção do hormônio insulina (BARDEESY; DEPINHO, 2002).

Após atingir a corrente sanguínea, a glicose é transportada rapidamente para o interior das células β de acordo com o aumento de sua concentração sanguínea (normalmente pós-refeição). A glicose é transportada para dentro da célula β através de uma proteína integral de membrana denominada GLUT₂. No interior da célula β a molécula de glicose sofre ação de duas enzimas, a glicoquinase (GK), de papel principal, e a hexoquinase I, as quais convertem a glicose em glicose-6-fosfato (G-6-P). (LEIBIGER; LEIBIGER; BERGGREN, 2002).

Na via glicolítica (anaeróbia) para cada molécula de glicose há a formação de duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP), duas moléculas de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADH) e duas moléculas de piruvato, como produto final. As moléculas de piruvato seguem para o interior das mitocôndrias onde imediatamente são convertidas em acetil-coA pela enzima piruvato desidrogenase (PDH).

As moléculas de acetil-coA são metabolizadas pelo ciclo de Krebs, originando 3NADH, um dinucleotídeo flavina-adenina (FADH₂), uma GTP, e gás carbônico (CO₂). O NADH e FADH₂ transportam e doam elétrons para a cadeia transportadora de elétrons presente na membrana mitocondrial interna (via aeróbia). A passagem

dos elétrons através dos complexos que formam a cadeia transportadora de elétrons promove o transporte de íons hidrogênio (H^+) da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. O gradiente eletroquímico criado pelo acúmulo dos íons H^+ é a força motriz que impulsiona a síntese de ATP, quando os H^+ retornam para a matriz mitocondrial através da ATP-sintetase (MACDONALD; JOSEPH; RORSMAN, 2005). As moléculas de ATP se movem para o espaço citosólico promovendo o aumento da proporção ATP/ADP (adenosina difosfato) citoplasmático. Os canais de potássio sensíveis ao ATP (K^+_{ATP}) são formados por duas subunidades protéicas, a Kir 6.2 e a SUR. O ATP se liga a subunidade Kir 6.2 inibindo sua atividade, assim, os canais K^+_{ATP} se fecham, promovendo o acúmulo de íons potássio (K^+) intracelular e subsequente despolarização da membrana plasmática (HABER et al., 2001; LEIBIGER; LEIBIGER; BERGGREN, 2008).

As oscilações do potencial de membrana culminam com a abertura de canais de cálcio voltagem-dependente presentes na membrana, proporcionando o influxo de íons Ca^{2+} . O aumento do Ca^{2+} intracelular mobiliza os grânulos de insulina para serem exocitados. Adicionalmente, o Ca^{2+} também promove a ativação da proteína PKC, a qual por eventos de fosforilação auxilia a mobilização dos grânulos de insulina (vias de sinalização representadas na figura 2) (HABER et al., 2001; NAKANO K et al., 2002).

A secreção de insulina possui duas fases, ambas dependentes da presença da glicose e de estoques diferenciados de grânulos secretores de insulina. Estes estoques secretores encontram-se distribuídos em três locais na célula β , sendo um reservatório pronto para ser exocitado (pré-ancorado), um próximo à membrana e outro localizado mais internamente (BRATANOVA-TOCHKOVA et al., 2002). Durante a primeira fase de secreção de insulina ocorre um pico de liberação dos grânulos de insulina diretamente relacionado aos efeitos despolarizantes propiciados pelo metabolismo da glicose. Esta rápida liberação é dependente da mobilização dos estoques que estão ancorados e/ou próximos à membrana e representa aproximadamente 10% das reservas de insulina. A segunda fase caracteriza-se por um aumento gradual na secreção de insulina até atingir um platô. Esta fase é desencadeada por uma via metabólica de amplificação (via independente dos canais K^+_{ATP}), liberando os grânulos mais internos, os quais tomam o lugar dos grânulos liberados na primeira fase, sendo secretados gradualmente (BRATANOVA-TOCHKOVA et al., 2002; STRAUB; SHARP, 2002). O DM2 promove a perda da

primeira fase e uma redução da segunda fase secretória. A resistência à ação da insulina e a falha no processo de secreção são as principais características do DM2 (SEINO, 2012).

1.5.2 Secreção de Insulina e Potencializador Acetilcolina (Ach)

O principal estímulo para a secreção dos grânulos de insulina é o aumento da glicose sanguínea, no entanto, outros fatores como hormônios, nutrientes, íons e neurotransmissores potencializam a secreção de insulina. Os agentes denominados potencializadores se caracterizam pela dependência da glicose para que seus efeitos sobre a célula β sejam observados (CARDOSO et al., 2007; CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; LEIBIGER; LEIBIGER; BERGGREN, 2008).

Dentre os diversos moduladores da secreção de insulina destacam-se os efeitos dos neurotransmissores autonômicos, os quais exercem seus efeitos via ligação a receptores específicos presentes na superfície das células β pancreáticas. O SNA é dividido em SNS e o SNP. O SNS libera os neurotransmissores adrenalina (liberada pelas células cromafins da medula adrenal, quando o eixo simpato-adrenal é ativo) e a noradrenalina em seus terminais neurais e, o SNP libera apenas Ach em suas terminações. As ilhotas pancreáticas recebem ambas divisões autonômicas, as quais apresentam efeito antagônico (AHREN, 2000; SCHEURINK; STEFFENS, 1990).

O simpático pode estimular a secreção de insulina ao ativar os receptores β -adrenérgicos e inibir a secreção quando são ativados os receptores α -adrenérgicos, sendo este último prevalente em células β . O neurotransmissor parassimpático Ach pode ter ação sobre dois receptores, os nicotínicos e muscarínicos. No pâncreas, a ativação parassimpática promove a secreção dos grânulos insulínicos através da ativação de receptores muscarínicos específicos presentes na membrana da célula β (MACDONALD; JOSEPH; RORSMAN, 2005).

A participação de centros nervosos parassimpáticos pode ser estimulada ainda após a ativação de receptores olfato-gustativos. O estímulo de tais receptores ativa ramificações parassimpáticas do nervo vago, as quais se dirigem até o NTS. No NTS a próxima região ativa é o núcleo motor dorsal do vago (NDMV) de onde as fibras colinérgicas pré-ganglionares partem. Estas fibras colinérgicas farão sinapse em gânglios dentro do pâncreas, a partir destes gânglios saem as fibras pós-

ganglionares, que finalmente liberam neurotransmissor Ach nas terminações nervosas presentes no pâncreas endócrino, o que potencializa e promove o aumento precoce da secreção de insulina, caracterizando a fase cefálica da secreção insulínica (AHREN, 2000; DAMIANI; DAMIANI; DE MENEZES FILHO, 2010).

A ativação colinérgica é ativada durante a fase pré-absortiva e permanece ativa durante todo o processo de ingestão alimentar. O estímulo da atividade vagal sobre as células β é de suma importância, pois prepara o organismo para a posterior sobrecarga de glicose, após a absorção pela mucosa intestinal dos nutrientes ingeridos. Os estímulos parassimpáticos se acentuam de acordo com o aumento da glicemia, mecanismo que auxilia na mais rápida normalização do índice glicêmico (AHRÉN; WIERUP; SUNDLER, 2006; SCOMPARIN et al., 2009).

A divisão parassimpática do SNA exerce seus efeitos sobre as células β através da liberação do neurotransmissor Ach pelos terminais do nervo vago. Os principais efeitos colinérgicos sobre as células β ocorrem via ativação dos receptores específicos, denominados receptores muscarínicos, representados por 5 subtipos (M1, M2, M3, M4 e M5) (HAGA, 2012). Estes são classificados de modo geral em duas grandes classes, de acordo com suas estruturas, funções e ao tipo de proteína G aos quais são acoplados. Sendo M1, M3 e M5 os que apresentam seletividade para as proteínas G da família Gq/11, sua ação ativa a proteína fosfolipase C (PLC). Outra classe abrange o M2 e M4 acoplados ao subtipo Gi/o, os quais têm ação inibitória na atividade da adenilato ciclase (AC) (ISHII; KURACHI, 2006; KOWLURU, 2010). Todos os subtipos de receptores muscarínicos estão distribuídos tanto no SNC quanto nos tecidos periféricos (GAUTAM et al., 2007).

O pâncreas endócrino apresenta os 4 tipos de receptores muscarínicos (M1, M3, M4 e M5). As células β apresentam os receptores M1 e M3, no entanto o receptor M3 tem papel central no desencadeamento da via de estímulo para secreção de insulina por apresentar-se prevalente nas células β (HENQUIN; NENQUIN, 1988; IISMAA et al., 2000; ZAWALICH et al., 2004).

Após tornar-se ativo, através da ligação com a Ach, o receptor muscarínico M3 desencadeia vias de sinalização para estímulo da secreção de insulina (LEIBIGER; LEIBIGER; BERGGREN, 2008). Uma das mais importantes vias ativada é a da enzima fosfolipase C isoforma β (PLC β), esta após a ativação pela proteína G, promove a quebra de fosfolípidios de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

(PIP₂) gerando inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG) dois segundos mensageiros. A molécula de IP₃ tem ação no retículo endoplasmático (reserva intracelular de Ca²⁺) se liga a um receptor específico presente na membrana promovendo a liberação e elevação dos níveis de Ca²⁺ no citoplasma. DAG por sua vez promove a ativação da PKC, a qual aumenta a taxa de exocitose dos grânulos de insulina (AZUA et al., 2011; LEIBIGER; LEIBIGER; BERGGREN, 2002; 2008).

Embora o desajuste autonômico na obesidade acarrete uma série de consequências ao organismo, acentuando a deposição de tecido adiposo, é de suma importância ressaltar o significativo papel do SNP sobre o pâncreas endócrino em condições de equilíbrio do SNA.

A relevância da ação colinérgica sobre as células β é reforçada através de modelos animais *knockout* para o receptor M3, os quais apresentam defeito na secreção de insulina, por não haver a ativação da via PLC através do receptor M3. Como consequências, são observadas nestes animais, a redução de 15-20% da eficiência na captação de glicose, redução de até 60% nos níveis de insulina circulante aliada à redução da tolerância à glicose (GAUTAM et al., 2007). Em contraste, a super expressão do receptor M3 em células β promove o aumento da tolerância à glicose e normalização da secreção de insulina, além de tornar animais que super expressam o M3 resistentes a desenvolver hiperglicemia e intolerância à glicose mesmo que expostos a dietas direcionadas ao desenvolvimento destes quadros (ZAWALICH et al., 2004). Assim, fica claro a estreita relação entre a presença e a ativação dos receptores M3 nas células β e homeostase glicêmica.

Estudos realizados em comunidades de Índios Pima, as quais apresentam as mais altas taxas de obesidade e DM2 no mundo, confirmam a prevalência do sistema parassimpático em humanos. Estas evidências do aumento da atividade parassimpática no pâncreas também são confirmadas em estudos relacionados à obesidade infantil (BEDI; KHULLAR; VARSHNEY, 2009; DE COURTEN et al., 2004; NAGAI; MORITANI, 2004). Modelos de obesidade em animais experimentais também apresentam a prevalência parassimpática. Dentre eles podemos citar o modelo de obesidade neuroendócrino por glutamato monossódico (MSG) e o modelo de obesidade por redução de ninhada (BALBO et al., 2000; RINALDI et al., 2012). Ambos, assim como diversos outros modelos animais, apresentam hiperatividade vagal, acompanhada de hiperinsulinemia e intolerância à glicose

confirmando a prevalência parassimpática (BALBO et al., 2002; BALBO et al., 2000; RINALDI et al., 2012).

Estudos vêm demonstrando que ilhotas pancreáticas de animais obesos apresentam problemas na resposta secretória ao estímulo colinérgico. Balbo e colaboradores (2002) demonstram a redução da secreção de insulina em ilhotas isoladas frente aos efeitos da Ach em modelos obesos MSG. Segundo os autores deste estudo, esta resposta reduzida da secreção de insulina é resultado de alterações em mecanismos que acionam os receptores muscarínicos presentes nas células β pancreáticas. O reajuste autonômico de animais MSG e restabelecimento da sensibilidade à insulina frente a ação da Ach podem ser observados após a vagotomia subdiafragmática. Além de normalizar os níveis de insulina, a vagotomia é capaz de reduzir em cerca de 50% o ganho de peso corporal neste modelo de obesidade (BALBO et al., 2002; BALBO et al., 2000).

Mecanismos ativos (aumento da glicemia e efeitos potencializadores da Ach e do GLP1) para secreção de insulina então ilustrados na Figura 2, seguindo a descrição dos tópicos 1.5.1 e 1.5.2 .

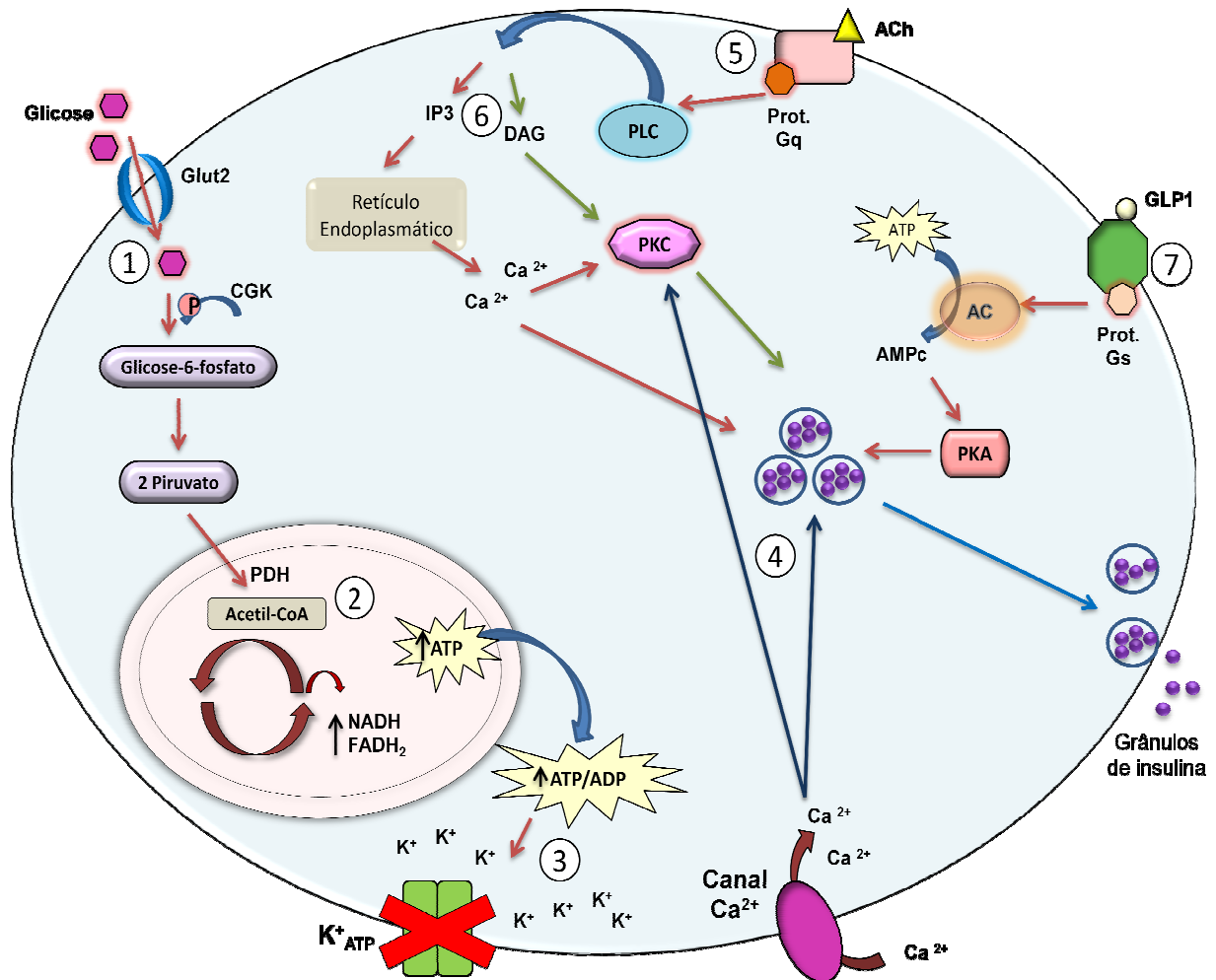


Figura 2. Secreção de insulina estimulada por glicose e potencializadores. 1) Glicose entra na célula β segue para glicólise gerando como produtos duas moléculas de NADH, ATP e Piruvato. 2) Piruvato é metabolizado no Ciclo de Krebs, gerando NADH e FADH_2 , que transportam os elétrons até a cadeia transportadora de elétrons. Há formação do gradiente de prótons e a difusão destes prótons para o citosol mitocondrial gerando o aumento da produção de ATP. 3) Há aumento da proporção ATP/ADP no citoplasma e consequente fechamento do K^+_{ATP} , promovendo acúmulo de íons K^+ intracelular, e posterior despolarização da membrana causando a abertura dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependente e o influxo do Ca^{2+} extracelular. 4) Grânulos de insulina são mobilizados pela ação do Ca^{2+} e PKC. 5) ACh se liga ao receptor na membrana da célula β , ativando a proteína G que age ativando a PLC o qual quebra fosfolipídios de membrana gerando os segundo mensageiros IP_3 e DAG. 6) IP_3 promove a saída do Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, e DAG que ativa juntamente com os íons Ca^{2+} a PKC. Tanto os íons Ca^{2+} quanto PKC agem na exocitose da insulina. 7) GLP1 ativa receptor de membrana acoplado a proteína G, ativando a PKA via AC, PKA auxilia na secreção insulínica (Adaptado de KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, et al. (2006)).

1.6 OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA

Sobrepeso e obesidade são os principais contribuintes para o desenvolvimento da RI, anormalidade presente em indivíduos com SM, além de ser a principal característica do DM2. Segundo a OMS (2012), a diabetes afeta cerca de

347 milhões de pessoas no mundo, sendo que o DM2 representa cerca de 90% dos casos. O DM2 pode ter causas genéticas ou adquiridas, sendo uma das principais patologias aliadas à obesidade. Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2012), o Brasil apresenta cerca de 12 milhões de diabéticos, com maior incidência em indivíduos com mais de 30 anos. A prevalência dos casos de diabetes encontram-se nas regiões sul e sudeste do Brasil aliados aos fatores: envelhecimento populacional, histórico familiar e obesidade (SARTORELLI; FRANCO, 2003).

O aumento de tecido adiposo corporal intervém nas condições metabólicas do organismo. O tecido adiposo passa a promover o aumento da liberação de AGL e adipocinas. Mais recentemente descobriu-se que o acúmulo excessivo de tecido adiposo está relacionado a um estado pró-inflamatório em indivíduos obesos (ZECCHIN; CARVALHEIRA; SAAD, 2004). Este desajuste na produção de citocinas pelo tecido adiposo interfere diretamente na cascata de sinalização da insulina, contribuindo para o desenvolvimento da RI. Em condições normais, a insulina tem ação nos tecidos como músculo e tecido adiposo, promovendo o aumento da captação da glicose. No fígado promove o bloqueio da produção e liberação de glicose através do bloqueio da gliconeogênese e glicogenólise (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

A RI começa a se desenvolver quando as concentrações fisiológicas de insulina já não proporcionam a captação eficiente de glicose nos tecidos muscular e adiposo, bem como sua ação em inibir a liberação de glicose pelo fígado torna-se comprometida, elevando os níveis glicêmicos (CESARETTI; KOHLMANN JUNIOR, 2006).

A eficiente captação da glicose faz-se necessária, pois esta é a principal fonte energética utilizada por todas as células do organismo, em especial é indispensável para suprir a demanda do SNC, o qual utiliza aproximadamente 80% da glicose a nível basal. Quando o nível glicêmico é drasticamente reduzido (hipoglicemia) mecanismos como a quebra do glicogênio hepático são imediatamente ativos evitando a falta de substrato energético ao sistema nervoso. Os estoques de glicogênio são preenchidos novamente após a ingestão alimentar, mecanismo estimulado pela insulina, que promove a absorção e armazenamento da glicose como glicogênio no fígado e no músculo esquelético e, em forma de triglicéridos (TAG), no tecido adiposo. No entanto em condições patológicas como no DM2

alguns tecidos tornam-se resistentes à ação da insulina (BOGAN, 2012; BRYANT; GOVERS; JAMES, 2002; HUANG; CZECH, 2007).

O mecanismo de RI em obesos e indivíduos com DM2 pode estar ligado a alterações, como baixas concentrações e redução da atividade do receptor de insulina, baixa ativação das proteínas IRS-1/2 e PI3 quinase (PI3K), translocação dos GLUTs e intervenções na atividade de enzimas intracelulares (ZECHHIN; CARVALHEIRA; SAAD, 2004).

A principal ligação entre a obesidade e a RI envolve o aumento das adipocinas produzidas pelo tecido adiposo e a ativação de vias de sinalização inflamatórias. Dentre as citocinas inflamatórias produzidas no tecido adiposo uma das mais importantes é o TNF- α , super expresso em indivíduos obesos (ZECHHIN; CARVALHEIRA; SAAD, 2004).

A hipertrofia dos adipócitos promove alterações funcionais e vasculares no tecido adiposo, como consequência há liberação de citocinas e outros sinais pró-inflamatórios. Estes sinais ativam os macrófagos residentes entre os adipócitos, bem como promovem a infiltração de macrófagos oriundos do sangue, culminando em uma inflamação local que promove apoptose de adipócitos e eleva os níveis de TNF- α e IL-6 (SAVAGE; PETERSEN; SHULMAN, 2005; THOLE et al., 2012).

O TNF- α promove a ativação da enzima serina-quinase IB kinase (IKK). Esta enzima aumenta as fosforilações em serina dos IRS, inibindo a atividade tirosino-quinase do IR em células. O processo inflamatório local também pode ocorrer em outros órgãos, em que, de um modo geral, também ocorrem fosforilações inibitórias na cascata da insulina inibindo ou reduzindo seus efeitos (SALTIEL; KAHN, 2001). Nos adipócitos e no músculo as fosforilações inibitórias impedem a migração dos GLUT₄ para a membrana, reduzindo a captação da glicose, tendo como consequência as hiperglicemias. No fígado a falha na cascata de sinalização da insulina promove o aumento da gliconeogênese e glicogenólise. (HUANG; CZECH, 2007; MUOIO; NEWGARD, 2008).

Outro importante fator ligado a RI na obesidade é o acúmulo de metabólitos derivados do metabolismo dos ácidos graxos circulantes e de triglicerídeos no músculo, fígado e na célula β . Os AGL reduzem a captação de glicose celular interferindo diretamente na transmissão do sinal de insulina, pela ativação de uma serina-quinase PKC- θ (proteína quinase C- θ) que fosforila os IRS em resíduos de serina, inativando a transmissão do sinal. Os ácidos graxos também ativam a enzima

JNK, além de outra proteína de resposta inflamatória, a IKK, envolvida no bloqueio da ação da insulina (BASTARD et al., 2006; PAULI et al., 2009; SALTIEL; KAHN, 2001).

Durante o quadro de RI os níveis basais da insulina não conseguem ativar a captação da glicose com eficiência, então os indivíduos começam a apresentar níveis elevados da glicemia e quadro de hiperinsulinemia. O pâncreas endócrino, especificamente as células β pancreáticas, aumentam a produção e secreção de insulina na tentativa de promover um mecanismo compensatório. Inicialmente a normoglicemia é mantida por mecanismos de proliferação e hiperplasia das células β elevando a produção de insulina. No entanto, a longo prazo, o organismo já se encontra em um quadro de hiperglicemia, que se torna crônico (glicotoxicidade) (GUILHERME et al., 2008; MUOIO; NEWGARD, 2008).

Estes eventos são frequentemente observados em obesos, os quais possuem o número de células β aumentado na tentativa de suprir a demanda por insulina, além de possuírem os níveis de citocinas pró-inflamatórias elevado de 2 a 5 vezes comparado a indivíduos normais (STEINER et al., 2010). Este mecanismo compensatório exige que as células β pancreáticas trabalhem a um nível acima do normal, o que ao longo do tempo provoca disfunção em vários processos celulares internos, provocando a falência das células β e a instalação definitiva do DM2 (GUILHERME et al., 2008; MUOIO; NEWGARD, 2008; STEINER et al., 2010).

Além da glicotoxicidade, lipotoxicidade (exposição crônica aos ácidos graxos) outros fatores como estresse do retículo plasmático e estresse oxidativo contribuem para a redução da massa de células β . Estes também promovem resposta inflamatória nas células β e o aumento de citocinas inflamatórias nas ilhotas. Estas citocinas interferem no fluxo de cálcio nas células β de modo a desencadear a ativação das vias apoptóticas (RAMADAN et al., 2011). Portanto, a RI e a falha da adaptação do pâncreas endócrino leva à instalação definitiva da DM2.

1.7 EXERCÍCIO FÍSICO X OBESIDADE/DM2

Visando o controle da obesidade tem sido recomendado que medidas como intervenções na alimentação e a prática de exercício físico sejam inclusos cada vez mais cedo nos hábitos da população (ROMERO; ZANESCO, 2006). O desenvolvimento do DM2 está associado à inatividade física e à obesidade. Em

obesos a expressão do GLUT₄ no tecido muscular é diminuída, sendo a RI a principal causa desta redução.

A prática do exercício físico promove adaptações metabólicas que estimulam a captação de glicose pelo músculo esquelético, através da translocação dos GLUT₄, além de aumentar a atividade das fibras oxidativas e diminuir a atividade de proteínas inflamatórias (PAULI et al., 2009). O aumento da captação de glicose em resposta ao exercício é mediado por uma variedade de eventos de sinalização intramiocelular. Dentre as quais está o aumento da sinalização do receptor de insulina, a ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), aumento do Ca²⁺ citosólico, ativação da proteína-quinase dependente de calmodulina (CaMK), ativação da Akt/PKB e PKC. Estes mecanismos ativos durante o exercício fazem parte de adaptações metabólicas que geram a via de captação de glicose independente de insulina (HAWLEY; LESSARD, 2008; HUANG; CZECH, 2007).

Entre as várias vias acionadas pelo exercício no tecido muscular destaca-se a via da AMPK, que se caracteriza pela ativação de uma enzima específica, a AMPK. Sua ativação ocorre porque durante o exercício físico o consumo energético celular é maior, promovendo o aumento da relação AMP:ATP nas células, o que provoca a mudança conformacional de uma enzima chave na via de transporte dos GLUT₄. Esta enzima é a AMPK, que se torna suscetível a fosforilações e ativação pela AMPK quinase (AMPKK). Durante o processo de contração muscular há a despolarização da membrana sarcoplasmática e dos túbulos T, o que leva à liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático. O aumento de Ca²⁺ intracelular promove a ativação de uma proteína sensível ao aumento dos níveis de Ca²⁺, a quinase-b dependente de calmodulina (CaMKKb). Esta por sua vez também promove o aumento da atividade de mais moléculas de AMPK. A AMPK ativa vias para produção do ATP, além de inibir as vias anabólicas que promovem o gasto energético (vias biossintéticas). Assim, durante o exercício físico, a ativação da AMPK promove a captação de glicose por um mecanismo independente da insulina. A glicose captada é metabolizada gerando energia rápida, além de aumentar a captação da glicose, a AMPK também melhora a sensibilidade à insulina no músculo esquelético por ativar vias de metabolização do excesso de lipídeos musculares, o que melhora a ação das vias desencadeadas pela insulina. No fígado a AMPK também ativa a oxidação de ácidos gordos e bloqueia a síntese de colesterol e triglicéridos (PAULI et al., 2009; SCHIMMACK; DEFRONZO; MUSI, 2006).

A ativação do SNS e do eixo simpato-adrenal (SSPA) é outro mecanismo para suprir as necessidades energéticas durante o exercício físico. Esta ativação estimula a liberação de noradrenalina pelos terminais simpáticos e das catecolaminas das células cromafins presentes na medula da adrenal, promovendo glicogenólise hepática e muscular, além do aumento da lipólise no tecido adiposo (SCHEURINK et al., 1989).

Estudos em modelos animais de DM2 têm demonstrado que, além de promover a melhora na captação da glicose sanguínea, o exercício físico aeróbio exerce importantes efeitos benéficos sobre o pâncreas endócrino. O exercício físico promove a proliferação e a sobrevivência das células β . Em adição, o exercício também reduz a concentração de citocinas pró-inflamatórias nas ilhotas, o que atenua a apoptose de células β (STEHN-BITTEL, 2011).

Estudos com camundongos obesos obtidos pela administração neonatal de MSG e submetidos à natação regular demonstraram que o exercício foi capaz de normalizar a hiperinsulinemia, RI e a dislipidemia. Em modelos de obesidade por alta ingesta calórica submetidos à prática de exercício físico também demonstraram redução dos depósitos de gordura corporal, normalização da hiperinsulinemia e da RI (GOMES et al., 2012).

Embora os benefícios do exercício sobre o sistema cardiovascular e sobre a perda de peso sejam bem conhecidos, seus efeitos sobre o pâncreas endócrino são contraditórios; em especial em modelos de obesidade. A maioria dos estudos entra em consenso quanto aos benefícios da prática física na melhora de parâmetros relacionados à obesidade, no entanto, encontram-se contraditórios frente à ação modulatória do exercício sobre a célula β pancreática (ALMEIDA et al., 2012a; DE OLIVEIRA et al., 2010).

Estudos em camundongos MSG-obesos submetidos à natação regular encontraram maior responsividade à glicose em ilhotas pancreáticas isoladas (SCOMPARIN et al., 2009).

Estudos realizados por Ueda et. al. (2003) e Calegari et. al. (2011) apresentam resultados opostos quanto ao conteúdo de GLUT₂ presente nas células β de animais exercitados (CALEGARI et al., 2011; UEDA et al., 2003). Tendo no primeiro estudo apresentado o aumento de sua expressão e no segundo redução, o que foi proposto como resultado a diferentes protocolos de treinamento (CALEGARI et al., 2011). Ratos Zucker (fa/fa) - modelo de obesidade genética, submetidos à natação

apresentaram redução da glicemia, aumento da insulina, maior proliferação das células β e aumento do volume das ilhotas (BEAUDRY; RIDDELL, 2012; RAWAL et al., 2013).

De acordo com a literatura, o treinamento físico pode alterar os padrões de secreção de insulina frente aos diferentes protocolos de exercícios físicos aplicados. Neste contexto, diversos trabalhos estudam as adaptações do pâncreas endócrino em relação ao exercício agudo (resposta ocorreu durante e / ou após uma única sessão de exercício) e crônico (adaptações de treinamento físico a longo prazo) (CALEGARI et al., 2011; TSUCHIYA et al., 2012).

Almeida e colaboradores (2012) observaram que ratos submetidos a exercícios agudos apresentaram conteúdo de insulina reduzida em relação aos grupos sedentários, além de não apresentar diferença na secreção de insulina estimulada por diferentes concentrações de glicose (ALMEIDA et al., 2012b).

No entanto Oliveira e colaboradores (2010) encontraram resultados contraditórios, em que o exercício agudo leva ao aumento de insulina nas ilhotas de ratos, apresentando maior responsividade em altas concentrações de glicose (DE OLIVEIRA et al., 2010). Em resposta ao exercício crônico ilhotas de ratos apresentam aumento da secreção de insulina quando expostas a altas concentrações de glicose (16,7mM) (TSUCHIYA et al., 2012).

Além de comprovar que o exercício físico auxilia na sensibilidade à insulina e à prevenção da hipertrofia das ilhotas, Leite e colaboradores (2013) demonstram que ilhotas pancreáticas isoladas de ratos MSG exercitados apresentam redução da capacidade de resposta à glicose, no entanto, isso não se deve a alterações no fluxo glicolítico e / ou o ciclo de Krebs neste modelo (LEITE et al., 2013). Adicionalmente, o exercício no modelo MSG é capaz de restaurar a resposta das ilhotas ao efeito insulínico do GLP1 (SVIDNICKI et al., 2013).

Embora a literatura traga resultados contraditórios quanto aos efeitos da prática de exercício físico diante do número variado de protocolos e de modelos experimentais, é necessário ressaltar que o exercício tem papel importante na prevenção e atenuação de alterações metabólicas. Para tanto, faz-se necessário que novos estudos sejam realizados, para auxiliar na melhor compreensão dos efeitos metabólicos do exercício.

1.8 IMPRINTING METABÓLICO OU PROGRAMAÇÃO METABÓLICA

1.8.1 Períodos Gestacionais e Janelas de Programação

O surgimento de um novo indivíduo é dependente de rápidos processos de proliferação celular que ocorrem após a fecundação entre o óvulo e o espermatozóide. Este processo de sucessivas divisões celulares permite o rápido crescimento, bem como, a diferenciação celular necessária à especificidade de tecidos e ao funcionamento fisiológico adequado (COELHO et al., 2006; OLIVER-KRASINSKI; STOFFERS, 2008).

Durante todas as fases do desenvolvimento celular os tecidos do embrião em proliferação e/ou diferenciação sofrem interferências internas referentes às sinalizações das próprias células embrionárias, assim como, de sinalizações providas do ambiente materno. Cada fase do desenvolvimento possui características e necessidades específicas, isso pode ser observado pela simples mudança no metabolismo embrionário antes mesmo da implantação uterina. Por exemplo, durante a fase da pré-implantação (menos que 8 células) o metabolismo é quase que exclusivamente dependente do piruvato. Todavia, após completar 8 células o consumo de glicose torna-se a principal fonte de energia e carbono do embrião (COELHO et al., 2006). Os fenômenos através dos quais diversos eventos precoces, que podem intervir durante um período crítico e específico do desenvolvimento, e que acarretam um efeito duradouro, persistente ao longo da vida do indivíduo, predispondo-os a determinadas doenças é chamado de “*imprinting/ programação metabólica*” (HANLEY et al., 2010; WATERLAND; GARZA, 1999).

Durante todo o período gestacional são consideradas três as principais “janelas de programação”. Sendo estas, no início da gestação durante a formação do sistema cardiovascular, fase do estabelecimento de estruturas renais, já no meio da gestação e fase final da gravidez, onde há grande crescimento fetal e crescimento do tecido adiposo que continua a se multiplicar após o nascimento (BATESON et al., 2004). Após o nascimento destacam-se como janelas de programação o período lactacional e a puberdade, ambos são considerados períodos críticos do desenvolvimento. Mudanças em tais períodos podem levar ao aumento da pré-disposição e/ou desenvolvimento de doenças cardiovasculares, metabólicas e neuroendócrinas (BATESON et al., 2004; GUILLOTEAU et al., 2009).

Diversos estudos epidemiológicos em humanos e em modelos animais enfatizam a ocorrência do *imprinting* metabólico. Um estudo clássico de Ravelli, Stein et al., sobre a “fome Holandesa” e que relacionam a restrição alimentar materna e posterior desenvolvimento da obesidade nos filhos, é um exemplo clássico que o *imprinting* metabólico pode levar ao desenvolvimento de doenças ao longo da vida (RAVELLI; STEIN; SUSSER, 1976).

Os termos *imprinting* e programação metabólica têm sido utilizados por pesquisadores como eventos em comum, no entanto, autores propõem situações distintas para cada um dos fenômenos.

Para Waterland e Ganza (1999) *imprinting* é a relação entre os fenômenos biológicos básicos que fundamentam as relações entre experiências nutricionais do início da vida e doenças posteriores. Embora, os autores não descartem o termo “programação metabólica”, eles consideram que é referente a efeitos em que não se sabe a magnitude, se os efeitos são duradouros até a vida adulta e quais os principais aspectos que proporcionaram as mudanças.

O termo *imprinting* é condicionado a algumas características como estar ligado a uma janela crítica no início do desenvolvimento, ter efeito duradouro até a idade adulta, tendo um resultado específico e que possa ser mensurável, além de apresentar uma relação dose-resposta (WATERLAND; GARZA, 1999).

Segundo Lucas (2000), programação metabólica refere-se a um efeito que abrange uma vasta gama de sistemas biológicos, enquanto que *imprinting* tem uma gama muito mais estreita (LUCAS, 2000). A epigenética é o mecanismo molecular que tem sido usado para explicar os eventos do *imprinting* e/ou programação metabólica. Ela é definida por mudanças nas expressões gênicas sem que ocorram alterações na sequência do DNA. Eventos epigenéticos incluem metilação do DNA, modificações como acetilação, fosforilação de histonas, levando a remodelação da cromatina. Todas estas modificações epigenéticas já foram observadas em diversos modelos de marcação metabólica. (GOTTLIE et al., 2007; HANLEY et al., 2010).

Durante o desenvolvimento do organismo, seja na vida intrauterina, abrangendo todo o período gestacional ou ainda pós-natal, referente principalmente aos períodos de amamentação e toda a primeira infância, os tecidos encontram-se em fases de maior proliferação, diferenciação e crescimento, havendo uma alta plasticidade celular nestas fases (GUILLOTEAU et al., 2009). Tais períodos são considerados pontos chave para que ocorram mudanças severas no organismo,

visto a complexidade de formações das vias metabólicas e principalmente o desenvolvimento do sistema nervoso central (GUILLOTEAU et al., 2009; WATERLAND; GARZA, 1999). A plasticidade no desenvolvimento do organismo é um mecanismo pelo qual as chances de sobrevivência ao meio aumentam, no entanto, mudanças em eixos fisiológicos podem ser permanentes, pré-dispondo o indivíduo a desordens futuras (GRINO, 2005; LEVIN, 2006).

Vários mecanismos podem intervir no correto funcionamento e desenvolvimento celular e em vias celulares específicas, assim, o organismo responde de diversas formas a nível celular, tecidual ou sistêmico. Respostas ao *imprinting* a nível celular são correspondentes às mudanças na transcrição gênica, em estruturas mitocondriais e no retículo endoplasmático.

Adicionalmente, a programação metabólica pode levar à redução celular em determinados órgãos, redução na sensibilidade a certos hormônios como a insulina, no pâncreas, músculo, tecido adiposo e fígado, o que interfere no perfeito funcionamento sistêmico (BATESON et al., 2004). No entanto, em alguns casos, com a constante diferenciação celular e contato com diferentes fatores ambientais, criam um ambiente em que os efeitos de eventos anteriores podem ser minimizados pelo próprio organismo (HANLEY et al., 2010).

Dentre os estudos genéticos a cerca do *imprinting* observou-se que um genótipo pode manifestar diferentes condições fisiológicas e morfológicas em relação a diferentes ambientes durante o período de desenvolvimento, tendo seus efeitos permanentes no sistema fisiológico ou ainda em estruturas somáticas (GUILLOTEAU et al., 2009).

Segundo estudos a obesidade, RI, bem como o DM2 podem desenvolver-se nos indivíduos em consequência da marcação metabólica. Sendo comprovada esta relação em diferentes estudos, os quais abordam as influências entre a alimentação materna, dietas com alto teor de gordura, desnutrição e excesso de nutrição ao desencadeamento de doenças futuras (COTTRELL; OZANNE, 2007; GRINO, 2005). Também é descrito que indivíduos que sofrem *imprinting* metabólico e já possuem uma predisposição genética, potencializam um ciclo vicioso, onde a obesidade tende a aumentar ao longo das gerações (LEVIN, 2000b).

Após o nascimento a prole sofre uma série de adaptações ao novo ambiente, sendo uma das mais importantes à transição entre a disponibilidade e a forma de alimentação. Ainda no ambiente uterino o feto tem seu organismo adequado ao

ambiente materno, sofrendo com qualquer variação dos padrões metabólicos e hormonais da mãe (BATESON et al., 2004). Desordens durante a gestação, como diabetes gestacional, excesso de peso, privações alimentares, alterações hormonais, entre outros, estão relacionados ao sobrepeso e ao desenvolvimento da síndrome metabólica na prole (LEVIN, 2006). Descendentes de mães que tiveram gestação com sobrepeso ou DM2, nascem com excesso de gordura e tendem a manter um elevado peso durante a infância (BARKER, 2007). A adipogênese iniciada ainda na gestação tem continuidade após o nascimento, tendo um potencial ilimitado de crescimento (TAYLOR; POSTON, 2007).

Sendo a gestação um período de estreita relação entre a mãe e a prole, a dieta durante a gestação é um importante ponto para garantir a qualidade de vida do neonato. Estudos relacionados a tal período têm demonstrado que a composição alimentar materna com excesso ou insuficiência de carboidratos, proteínas e gordura pode resultar em mudanças no embrião, manifestando-se logo após o nascimento ou ainda mais tardiamente (AALINKEEL et al., 1999; GUILLOTEAU et al., 2009).

Durante o desenvolvimento embrionário, mais especificamente no terceiro trimestre da gestação humana, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) em formação é influenciado por níveis elevados ou muito reduzidos de diversos hormônios, além do estado nutricional materno (BATESON et al., 2004). As interferências na ontogênese do HPA levam a alterações na expressão de genes para receptores de glicocorticoides, enzimas, canais e transportadores (ACHARD et al., 2006; GUILLOTEAU et al., 2009). Alterações de hormônios como a insulina e o hormônio do crescimento estão intimamente ligados ao futuro desenvolvimento da síndrome metabólica na prole, a qual abrange RI, adiposidade, hipertensão e dislipidemia (GUILLOTEAU et al., 2009; LEVIN, 2000a).

A leptina é outro hormônio de extrema relevância durante o desenvolvimento intrauterino, produzido principalmente pelo tecido adiposo, tendo a capacidade de regular a ingesta alimentar, sinalizando regiões do hipotálamo, as quais possuem receptores específicos para a mesma. Durante a gestação a leptina derivada do tecido adiposo e da placenta pode interferir regulando funções neuroendócrinas, do metabolismo energético e RI no feto (SAGAWA et al., 2002).

No período pós-natal a prole, além de sofrer influência do meio, sofre com alterações nos padrões de ingesta materna, pois ainda está ligada à mãe por meio da amamentação, período em que muitas vias e sistemas do neonato ainda se

encontram em formação. Neonatos com retardo fetal, neonatal ou infantil, devido às condições como privação materna ou ao nascimento prematuro, quando em meio de nutrição adequada (dieta normal) apresentam crescimento acelerado e acima do normal para a idade.

Este mecanismo em que o organismo tenta compensar o crescimento do recém-nascido é denominado como *catch up* de crescimento. Este crescimento acelerado em algumas situações é decorrente da exposição ao ambiente rico em calorias e gorduras e/ou hábito sedentário (ONG et al., 2000; SUZUKI; JAYASENA; BLOOM, 2012; TAYLOR; POSTON, 2007). Na tentativa de compensar o retardo no desenvolvimento, o organismo passa a reter reservas energéticas em forma de tecido adiposo, que, quando associado ao hábito de vida sedentário, é apontado como sendo a causa da programação às desordens como obesidade, diabetes, DCV e SM durante a vida adulta (COTTRELL; OZANNE, 2007; GUILLOTEAU et al., 2009).

A instalação da obesidade é decorrente do acúmulo energético provindo de uma dieta rica em nutrientes que excede o necessário ao organismo (TAYLOR; POSTON, 2007). Durante os diferentes estágios da gestação determinados períodos tornam-se ponto auge para o desenvolvimento de estruturas e vias específicas. No último período gestacional, fase em que há o maior crescimento fetal, a restrição alimentar materna pode afetar o desenvolvimento do feto de tal forma a elevar os riscos de DM2 na prole (GUILLOTEAU et al., 2009).

Diversos estudos abordam modelos experimentais com diferentes formas de indução do *imprinting* (HANLEY et al., 2010; WATERLAND; GARZA, 2002). Dentre estes está o modelo por desnutrição da prole, onde os indivíduos desnutridos apresentam perfil característico, com redução no crescimento, composição corporal alterada, havendo maior massa gorda, anormalidades cardiovasculares, desequilíbrio hormonal e disfunções no metabolismo da glicose e insulina, associados ao desenvolvimento da RI durante a vida adulta (GAROFANO; CZERNICHOW; BREANT, 1998).

Outro modelo descrito é referente às alterações maternas durante a gestação que podem influenciar no desenvolvimento da prole. Nos quais implicam a idade da gestante, restrição alimentar, contatos químicos, doses hormonais, fatores físicos, como temperatura que pode intervir no fluxo sanguíneo e de oxigênio, intolerância à

glicose e diabetes (HANLEY et al., 2010; HANSON et al., 2011; MCMILLEN; ADAM; MÜHLHÄUSLER, 2005; WATERLAND; GARZA, 1999).

Alterações metabólicas na mãe também influenciam no desenvolvimento da prole, como pode ser descrito no caso de mães diabéticas durante a lactação, as quais possuem alto teor de glicose e insulina no leite. Durante a lactação promove alterações como alta expressão de neuropeptídeo NPY em proles, impulsionando o desenvolvimento de hiperfagia, obesidade e distúrbios diabetogênicos (PATEL; SRINIVASAN, 2011).

Outro modelo de grande relevância é o de indução do *imprinting* por super alimentação através de redução da ninhada. A programação metabólica pode ocorrer principalmente durante a lactação. Comprovado em estudos com ratos neonatos criados em ninhadas de tamanho reduzido com até 4 filhotes, apresentam aumento na adiposidade, desenvolvendo hiperfagia, hiperglicemia, RI, ganho de peso corporal e resistência à leptina no ARQ (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2000; MCMILLEN; ADAM; MÜHLHÄUSLER, 2005).

Dentre os modelos de *imprinting* descritos acima, tomamos como foco deste estudo o modelo de *imprinting* durante a lactação. Em roedores a lactação caracteriza-se como uma fase de grande importância, pois há continuidade da formação dos núcleos hipotalâmicos, formação de comunicação entre grupos de neurônios específicos e continuidade do desenvolvimento do tecido adiposo (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2000).

1.9 IMPRINTING DURANTE A LACTAÇÃO OU PÓS-NATAL

A lactação, período que dá continuidade à nutrição intrauterina, é considerada período crítico ao desenvolvimento devido à ocorrência de diferenciação metabólica de células adiposas, de regiões do hipotálamo que regulam o apetite e também do desempenho de funções neuroendócrinas na prole (BALABAN; SILVA, 2004; TAYLOR; POSTON, 2007; ZHENG, 2011).

O leite é tido como uma fonte de nutrientes ideal ao desenvolvimento adequado do neonato, podendo sozinho suprir todas as necessidades nutricionais até aproximadamente os 6 meses de vida em humanos, além de ser apontado como um fator de proteção contra o desenvolvimento do DM2, quando a amamentação

em humanos é exclusiva durante os primeiros 6 meses (GUILLOTEAU et al., 2009; PATEL; SRINIVASAN, 2011).

Estudos em grupos experimentais de animais têm demonstrado que os efeitos da superalimentação neonatal pós-natal, durante o período de lactação, reflete em um rápido crescimento e maior ganho de tecido adiposo, além de interferir no metabolismo do neonato. Além de intervir promovendo alterações como redução da massa de células β , dislipidemias, alterações nas membranas de eritrócitos e alterações no fígado (GAROFANO; CZERNICHOW; BREANT, 1998; GUILLOTEAU et al., 2009).

Estudos também descrevem o desenvolvimento de co-morbididades como hipertensão, doenças cardiovasculares, hiperinsulinemia, RI e DM2 também são associadas à alimentação durante a infância, os quais são acompanhados pelo quadro de obesidade, o que compõem a síndrome metabólica (WATERLAND; GARZA, 1999).

A super nutrição durante os primeiros meses de vida também está relacionada ao aumento da adiposidade nas proles, visto as influências que o aumento energético exerce no metabolismo dos tecidos e na expressão de reguladores chave da obesidade, como a alteração dos níveis de leptina pós-natal, o que altera a plasticidade neuronal e dos adipócitos, podendo assim acarretar uma má programação celular, desencadeando a facilidade de ganho de peso após o *imprinting*, que persiste na vida adulta (PLAGEMANN, 2005; TAYLOR; POSTON, 2007).

Na maioria dos mamíferos o período pós-natal imediato (amamentação) é complementar ao desenvolvimento de órgãos que ainda continuam a se desenvolver, como é o caso do pâncreas em que ocorre a maturação das ilhotas e do sistema neuronal hipotalâmico em roedores (PATEL; SRINIVASAN, 2011). Após o nascimento, em humanos, há um longo período até os 4 anos de idade em que o pâncreas sofre remodelações em suas ilhotas, o que torna o órgão suscetível a sofrer programações durante esta fase (REMACLE et al., 2007).

Em roedores a remodelação do pâncreas ocorre durante os 20 primeiros dias de vida pós-natal (BERLEZE, 2005). Eventos durante a vida pré-natal e início da pós-natal podem pré dispor os indivíduos a alterações em circuitos neuronais os quais regulam a homeostase energética, responsáveis por torná-los mais propensos

a várias desordens, entre elas a obesidade (DAVIDOWA; LI; PLAGEMANN, 2002; PLAGEMANN et al., 1999).

1.10 *IMPRINTING* METABÓLICO, DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E DO PÂNCREAS ENDÓCRINO

Conforme descrito anteriormente, diferentes sistemas são afetados pela marcação metabólica, dentre os quais se destacam os efeitos sobre o SNC e o pâncreas endócrino. Em relação ao SNC, as principais transformações devido à programação metabólica ocorrem em períodos críticos em que há continuidade da formação encefálica, estabelecimento de novas sinapses, migrações de célula neuronais, apoptose e crescimento axonal (LEVIN, 2000b).

O desenvolvimento do SNC está intimamente relacionado ao desenvolvimento fisiológico, homeostático e das vias energéticas. Possíveis programações dos circuitos neuronais resultantes de processos complexos de mudanças podem ser passadas pelas gerações aumentando os índices de peso corporal (LEVIN, 2000a; WALTER; PAULSEN, 2003). Tais eventos podem sofrer influência de acordo com o tempo de exposição, a quantidade e o contato precoce a uma alimentação com alto teor energético, tendo a alimentação papel fundamental na maturação funcional e no desenvolvimento encefálico (WATERLAND; GARZA, 1999).

O desenvolvimento encefálico ocorre mais rapidamente durante o crescimento fetal, tendo continuidade na vida pós-natal, tanto em humanos, como em roedores (LEVIN, 2000b; WATERLAND; GARZA, 1999; 2002). O perfeito desenvolvimento do SNC é de ordem primária durante a formação fetal, assim qualquer evento que põe em risco sua formação, como situações de privação ou contato com substâncias prejudiciais, leva o organismo a preservar o crescimento encefálico mesmo que à custa de órgãos periféricos. Este processo de priorizar o desenvolvimento do SNC pode ser evidenciado em estudos com modelos experimentais por desnutrição materna durante a gestação. Neste modelo por desnutrição materna, o organismo da prole tenta preservar o crescimento encefálico à custa do desenvolvimento de outros órgãos como fígado, músculo, rim e pâncreas, sendo os dois últimos os mais afetados (COTTRELL; OZANNE, 2007; GRINO, 2005).

As mudanças na plasticidade neuronal ocorrem durante toda a vida do indivíduo, estudos têm demonstrado que cérebros de modelos animais obesos e humanos possuem uma série de alterações neuronais, chave no controle energético (DAVIDOWA; LI; PLAGEMANN, 2002; VAN DE SANDE-LEE et al., 2011). Embora as causas da obesidade ainda não estejam bem estabelecidas, sabe-se da relação direta do tecido adiposo por sua capacidade de armazenamento energético e proliferação celular. Em adição, o tecido nervoso permanece estabelecendo novas conexões neuronais ao longo da vida, as quais podem exercer várias funções sendo mantidas por seu uso repetido, envolvidas com o desenvolvimento do sobrepeso (GUILLOTEAU et al., 2009). Mudanças na expressão, localização e na ação de neuropeptídeos específicos nas redes cerebrais responsáveis pelo controle do apetite podem ser modeladas de acordo com a alimentação alterada durante períodos críticos do desenvolvimento na gestação e na lactação (MCMILLEN; ADAM; MÜHLHÄUSLER, 2005).

O hipotálamo é uma região frequentemente afetada pelo *imprinting* metabólico. Os circuitos neuronais hipotalâmicos estão propensos a intervenções hormonais, como a leptina durante o período neonatal, além de uma série de outros fatores, inclusive presentes no leite materno, podem intervir na reorganização hipotalâmica (BOURET, 2009; GUILLOTEAU et al., 2009). Coincidentemente o aumento da leptina plasmática neonatal é observado durante o período de estabelecimento dos principais circuitos neuronais hipotalâmicos (BOURET, 2009).

Em roedores a diferenciação dos núcleos hipotalâmicos segue até 20 dias após o nascimento, onde reguladores chave, como neuropeptídeos e receptores, podem sofrer programações dependentes de fatores externos, assim como a maturação do SNC que continua após o nascimento (GROVE et al., 2005; TAYLOR; POSTON, 2007).

Neurônios que compõem o ARQ e os outros núcleos hipotalâmicos em ratos iniciam sua proliferação do neuroepitélio entre o 12º ao 17º dia de gestação, no entanto, as projeções neuronais têm seu pico de crescimento logo após o nascimento, sendo dois períodos críticos para a neurogênese hipotalâmica, o que acarreta consequências futuras no metabolismo e nutrição (BOURET, 2009).

A supernutrição pós-natal em ninhadas reduzidas tem apontado alterações estruturais e funcionais no VMH, o qual passa a ter baixa responsividade a estímulos anorexígenos. A baixa responsividade a estímulos anorexígenos acabam

promovendo a quebra do equilíbrio autonômico aumentando a atividade do nervo vago subdiafragmático, o que reflete uma secreção aumentada de insulina (RINALDI et al., 2012).

O pâncreas é um órgão com desenvolvimento embrionário complexo, formado por uma porção endócrina e outra exócrina, as quais possuem funções distintas. Sua formação inicia-se durante a gastrulação, a partir de células endodérmicas. O crescimento e a diferenciação das células durante a formação do órgão é dependente das condições do meio em que está inserido (OLIVER-KRASINSKI; STOFFERS, 2008).

Em humanos o desenvolvimento do pâncreas endócrino ocorre principalmente durante os últimos meses de gestação e no decurso dos 5 primeiros anos de vida. Durante a primeira infância o crescimento da massa de células β ocorre rapidamente, tendo uma pausa na adolescência (STEINER et al., 2010). Em roedores o desenvolvimento do pâncreas endócrino é prevalente do 10º ao 20º dia, durante a gestação, após o nascimento a remodelação do pâncreas ocorre até a segunda semana de vida (BERLEZE, 2005).

Sendo o desenvolvimento do pâncreas um processo altamente complexo, envolvendo uma série de fatores como de crescimento, transcrição e diferenciação nas diferentes linhagens celulares, qualquer intervenção na formação pancreática tende a se manter durante toda a vida do indivíduo (GITTES; PRASADAN; TULACHAN, 2010). Durante o desenvolvimento do pâncreas endócrino fatores ambientais podem promover alterações que estão associadas à pré-disposição ao desenvolvimento de doenças como o DM1 e DM2 durante algum período da vida (WATERLAND; GARZA, 2002). Estudos vêm relacionando o DM1, doença auto-imune que combate seletivamente as células β pancreática, a fatores como o excesso de peso pós-natal, ingesta de leite enriquecido com suplementos e a precoce introdução de dieta sólida para o bebê (HANLEY et al., 2010; HUMMEL et al., 2004).

Durante a gestação, a insulina, além de exercer papel no controle glicêmico materno, também tem grande influência na programação fisiológica do feto, estando associada à distribuição lipídica corporal, plasticidade e desenvolvimento neuronal, controle glicêmico pós-natal e desenvolvimento psicomotor da prole (LEVIN, 2006). Os fatores de crescimento e a insulina também desempenham papel fundamental na

diferenciação neuronal, formação de crescimento neuronal, transmissões sinápticas e na densidade de receptores adrenérgicos- α_2 (LEVIN, 2000b).

Outros estudos a cerca do papel da insulina na obesidade têm demonstrado que a insulina quando aplicada em altas doses no hipotálamo durante a fase pós-natal, leva à obesidade, exercendo o efeito de redução neuronal no VMH. O desenvolvimento de algumas mudanças ocorre no ARQ quando há a ausência de insulina materna durante a gestação, causando o aumento de neurônios que liberam galanina no PVN e NPY no ARQ, promovendo o aumento da ingesta alimentar (LEVIN, 2000a).

1.11 MODELO DE OBESIDADE POR SUPERNUTRIÇÃO

Diversas pesquisas têm apontado que a supernutrição durante a lactação está ligada a pré-disposição da obesidade na vida adulta. A comprovação desta relação entre supernutrição na lactação e obesidade pode ser observada em estudos durante a infância em humanos, em que a introdução precoce de alimentos sólidos à alimentação, a utilização exagerada e/ou substituição do leite materno por fórmulas alimentares durante a lactação leva a um perfil obeso prevalente (NOVAES et al., 2009; TRAEBERT et al., 2004).

Em modelos experimentais com animais, diversos métodos são utilizados para promover a superalimentação na lactação. Dentre os modelos experimentais estão os de dietas hipercalóricas materna, que promovem maior aporte energético a prole (DE OLIVEIRA et al., 2010). Outro modelo de super nutrição durante a lactação é o “*pup in a cup*”, no qual animais são alimentados artificialmente por cânulas, com leite rico em carboidratos (SRINIVASAN et al., 2003).

Widdowson e McCance, em 1960, já relacionavam a nutrição durante a fase pós-natal ao desencadeamento do aumento de peso e diversas outras desordens na vida adulta. A redução de ninhadas logo após o nascimento tem sido o modelo de excesso de alimentação pós-natal amplamente utilizado por diversos pesquisadores para se estudar a origem de doenças como obesidade e DM2.

Conforme descrito anteriormente, o período de aleitamento é um período crítico, pois intervenções durante esta fase podem favorecer o ganho de peso na idade adulta (MCCANCE; WIDDOWSON, 1960). Animais superalimentados no início da vida pós-natal apresentam características como excesso de peso, RI, aumento

no tamanho do coração, hiperfagia, aumento da secreção de insulina (hiperinsulinemia) e aumento de GLUT₂ (AALINKEEL et al., 1999) em ilhotas pancreáticas (THOLE et al., 2012). As intervenções alimentares durante a amamentação influenciam profundamente no funcionamento do pâncreas em desenvolvimento (AALINKEEL et al., 1999; THOLE et al., 2012).

Alterações em níveis hormonais estão estreitamente relacionados aos efeitos de alterações em órgãos-alvo, a hiperinsulinemia (devido à hiperatividade parassimpática) e hiperleptinemia evidente em ratos superalimentados fundamentam a má-programação observada dos circuitos energéticos no hipotálamo, resultando em hiperfagia e sobrepeso nestes animais (PATEL; SRINIVASAN, 2011).

A hiperinsulinemia de jejum em ratos de ninhadas reduzidas é explicada por Rinaldi (2012) como sendo resultado do aumento da atividade parassimpática, representada pela hiperatividade vagal (RINALDI et al., 2012). Parâmetros como intolerância à glicose em neonatos derivados de ninhadas reduzidas são revertidos quando os mesmos são expostos a protocolo de exercício físico moderado, o que é demonstrado por Gomes e colaboradores (2012), o qual submeteu ratos de ninhadas reduzidas a prática de esteira, os quais tiveram a tolerância à glicose e RI normalizada (GOMES et al., 2012). Frankenfeld (2009) também aplicou protocolos de exercício físico em esteira nos animais super alimentados e observou redução na gordura corporal total, aumento do glicogênio hepático e aumento do HDL (FRANKENFELD, 2009).

Estudos têm apontado que o SNS é um dos mais importantes na regulação do balanço energético e que a instalação da obesidade pode estar relacionada à oscilações simpáticas. Diversos fatores são elencados como responsáveis por afetar a correta inervação simpática. Estudos com ninhadas reduzidas têm demonstrado que o excesso de nutrição pós-natal promove a redução da atividade simpática e o aumento do parassimpático, contrariamente às condições fisiológicas normais (RINALDI et al., 2012).

Os efeitos da redução de ninhada sobre o pâncreas endócrino são contraditórios em relação à secreção de insulina frente aos estímulos da glicose. Alguns trabalhos demonstram que as ilhotas pancreáticas em animais supernutridos apresentam disfunção, secretando altas quantidades de insulina em resposta à glicose, estes animais apresentam ainda quadro de hiperinsulinemia, além de RI e intolerância à glicose (PLAGEMANN et al., 1992; RINALDI et al., 2012).

Cunha (2007) em seu estudo com secreção de insulina *in vitro*, demonstra que em altas concentrações de glicose as ilhotas dos animais hiperalimentados secretam mais insulina comparada aos normais, justificando este aumento na secreção devido a presença de maior conteúdo de GLUT₂ nas ilhotas pancreáticas dos animais superalimentados (CUNHA, 2007). Srinivasan et. al. (2003) observou o aumento da secreção de insulina aos 12 dias de vida e durante a fase adulta de animais obesos de ninhadas reduzidas alimentadas artificialmente por dieta rica em carboidratos, este também demonstrou o aumento da expressão de GLUT₂ (SRINIVASAN et al., 2003).

Contudo, outros trabalhos apontam que animais oriundos de ninhadas reduzidas têm secreção de insulina reduzida frente aos estímulos da glicose. Waterland e Garza (2002) sustentam a hipótese de que o pâncreas endócrino é alvo primário da impressão metabólica. Em seu trabalho foram apontados a redução de receptores para colecistocinina (CCK) e alterações em genes responsáveis pela formação de subunidades das bombas ATPase mitocondrial e Ca²⁺ ATPase. Tais alterações são apontadas pelos autores como estando relacionadas à baixa responsividade das células β ao estímulo da glicose (WATERLAND; GARZA, 2002).

As células β pancreáticas possuem um grau de plasticidade que as permitem controlar a produção de insulina de acordo com a situação fisiológica em que o organismo se encontra, podendo aumentar sua massa celular ou mesmo reduzi-la (KARGAR; KTORZA, 2008). Este processo relativamente dinâmico é dependente da proliferação, apoptose e neogênese. Em modelos com camundongos neonatos supernutridos na lactação, alterações morfológicas como hipertrofia é observado em ilhotas pancreáticas, iniciando desde a instalação da obesidade e persiste até a idade adulta (THOLE et al., 2012). Este processo é uma resposta fisiológica a um estado patológico, o qual requer o aumento nos níveis da insulina (KARGAR; KTORZA, 2008). Além da hipertrofia das ilhotas, alterações como acúmulo de tecido adiposo, presença de infiltrados inflamatórios, aumento de proteínas das vias de apoptose e aumento de TNf- α também foram demonstrados por THOLE (2012) em camundongos supernutridos (THOLE et al., 2012).

Outras alterações encontradas no modelo de ninhada reduzida são descritas por Rodrigues e colaboradores (2007), os quais descrevem que o tecido adiposo dos animais supernutridos apresenta resistência à ação da insulina. Esta resistência à insulina resulta na debilidade na translocação dos GLUT₄, chegando a apresentar

redução de 40% dos GLUT₄ na membrana plasmática dos adipócitos de animais oriundos de ninhadas reduzidas. O mesmo trabalho justifica que esta redução se deve à diminuição expressiva das proteínas dos IRS-1 e PI3K nos adipócitos dos animais super nutridos aos 90 dias. Além disso, demonstra que em condições basais a fosforilação da proteína Akt nos adipócitos é semelhante entre os grupos, mas, após o estímulo de insulina, o grupo controle apresenta aumento de 60% nas fosforilações da Akt em relação aos supernutridos (RODRIGUES et al., 2007).

Outras alterações quanto ao tecido adiposo é exposto por Boullu – Ciocca e colaboradores (2008), confirmando o aumento de TNF- α e IL-6 no tecido adiposo mesentérico de animais superalimentados aos 150 dias (BOULLU-CIOCCA et al., 2008). Outro órgão afetado pela redução de ninhada é o fígado. Conceição e colaboradores (2013) descrevem alterações na sinalização da insulina no fígado, dentre as quais estão a redução das proteínas IRS1, Akt e PI3K, justificando o comprometimento glicêmico. Além das alterações na via de sinalização da insulina, o mesmo trabalho aponta infiltrações de células inflamatórias e o quadro de microesteatose hepática (CONCEIÇÃO et al., 2012).

Embora confirmado na literatura, em diversos trabalhos de intervenções em períodos críticos ao desenvolvimento do organismo acarretam alterações metabólicas que intervêm de forma negativa na saúde do indivíduo, há carência de informações sobre os efeitos da programação metabólica no pâncreas endócrino, particularmente em situações especiais, tais como o exercício físico. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo investigar os efeitos da programação metabólica promovidos pela redução de ninhada na responsividade do pâncreas endócrino a agentes estimuladores e potencializadores da secreção de insulina, bem como, avaliar o impacto da atividade física regular sobre estes parâmetros.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do exercício físico regular sobre a obesidade induzida por marcação metabólica e a responsividade do pâncreas endócrino a agentes estimuladores e potencializadores da secreção de insulina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Induzir a obesidade pela marcação metabólica (*metabolic imprinting*).
- b) Avaliar os depósitos de gordura corporal em ratos obesos por marcação metabólica.
- c) Estudar a secreção de insulina estimulada por glicose.
- d) Analisar o efeito colinérgico no pâncreas de ratos obesos por marcação metabólica.
- e) Investigar a responsividade deste modelo ao treinamento físico e a melhora na ação e secreção de insulina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados *Rattus norvegicus* machos e fêmeas da linhagem Wistar, cedidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Todos os procedimentos foram realizados com a aprovação do comitê de Ética em Pesquisa Animal (03482/2012) da mesma. Os animais foram mantidos em condições controladas de luminosidade (ciclos 12h claro/escuro) e temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$). A ração comercial para roedores (NuviLab-CR1®) e água foram ofertadas *ad libitum*, a todos os grupos experimentais.

3.2 MODELO EXPERIMENTAL

Para o acasalamento foram utilizados apenas fêmeas e machos virgens, para minimizar possíveis intervenções oriundas dos genitores. Para o acasalamento os animais foram acomodados em caixas plásticas no sistema de arem (3 fêmeas para 1 macho). Após a confirmação da prenhez as fêmeas foram separadas em caixas individualizadas nas quais foram mantidas do nascimento ao período lactacional da prole. Foram utilizadas de 10 a 17 ninhadas por grupos experimentais. Para indução do modelo experimental de obesidade por superalimentação, no primeiro dia após o nascimento todas as ninhadas eram ajustadas para 10 filhotes. No terceiro dia de vida, as ninhadas foram subdivididas em dois grupos: Ninhadas Normais (NN), contendo 9 filhotes e Ninhadas Reduzidas (NR), contendo 3 filhotes por fêmea. A redução da ninhada ocorreu no 3º dia de vida, para que o organismo das mães ajustasse a quantidade de leite produzido proporcional às ninhadas com maior número de filhotes (PLAGEMANN et al., 1999). Nas ninhadas em que o número de machos era insuficiente, utilizou-se filhotes fêmeas para completar as ninhadas durante o período de amamentação (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2000; THOLE et al., 2012). Durante os 21 dias de lactação foram avaliados diariamente os parâmetros como peso corporal e ingesta alimentar. Após o período de 21 dias os animais foram desmamados, ajustados aleatoriamente dentro de seus respectivos grupos em 6 animais por caixa e subdivididos em 4 grupos experimentais conforme descrito: ninhada normal sedentária (NNSD) e ninhada normal exercitada

(NNEXE), ninhada reduzida sedentária (NRSED) e ninhada reduzida exercitada (NREXE).

3.3 AVALIAÇÃO DA OBESIDADE

A obesidade foi avaliada pelo cálculo do índice de Lee (IL), aos 21 e 90 dias de vida, o qual representa relação entre a raiz cúbica do peso corporal (g) e o comprimento naso-anal (CNA) (cm) ($\sqrt[3]{\text{peso corporal}/\text{CNA}}$) (BERNARDIS; PATTERSON, 1968). Pela retirada e pesagem das gorduras viscerais (mesentérica, retroperitoneal e epididimal) da cavidade abdominal e da gordura subcutânea (inguinal), expressos em g/100g do peso corporal.

3.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO

Após o desmame (21 dias de vida), os grupos experimentais exercitados iniciaram o treinamento físico de acordo com protocolo descrito por Leite et al. (2013) e Nery et al. (2011) com modificações conforme descrito a seguir (LEITE et al., 2013; NERY et al., 2011). O treinamento físico consistiu em natação realizada em piscina para ratos com água aquecida ($32 \pm 2^\circ\text{C}$). A primeira semana de aplicação do protocolo consistiu em um período de adaptação ao meio líquido, sendo composta de três sessões com duração de tempo crescente (5, 10 e 15 minutos) e livre de carga. Na segunda semana, cada sessão teve duração de 30 minutos, sendo acrescida uma carga equivalente a 2% do peso corporal presa na base da cauda. A partir da terceira semana a carga presa à cauda passou a 5% do peso do animal. Deste modo, os animais treinados nadavam 3 vezes por semana, durante 30 minutos, com sobrecarga equivalente a 5% do peso corporal até os 90 dias de vida. A sobrecarga é acrescida à cauda dos animais para evitar a acomodação do animal em meio líquido. As sessões de natação iniciavam-se às 16h00min. Após cada sessão os animais eram secos e devolvidos as suas caixas. Este protocolo de treinamento corresponde a um treino de intensidade moderada (60% do consumo de oxigênio máximo) (GOBATTO et al., 2001). Os demais grupos permaneceram sedentários.

3.5 ISOLAMENTO ILHOTAS PANCREÁTICAS

O isolamento das ilhotas pancreáticas foi realizado através da técnica da collagenase com modificações (LACY; KOSTIANOVSKY, 1967). Aos 90 dias, após 24 horas após a última sessão de exercício físico e 12 horas de jejum os animais foram decapitados, e em seguida submetidos à laparotomia para localização do ducto hepático comum. Posteriormente foi realizada a oclusão da porção final do ducto pancreático para posterior perfusão do pâncreas através do ducto hepático. A perfusão foi realizada com aproximadamente 8 mL de solução Hank's (em mM: 1,3 Cloreto de cálcio (CaCl_2); 0,8 Sulfato de Magnésio (MgSO_4); 5,4 Cloreto de Potássio (KCl); 0,4 de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4); 4,3 Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3); 137 Cloreto de Sódio (NaCl); 0,3 Fosfato de Sódio Monobásico (Na_2HPO_4); 5,6 mM de glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), pH 7,4, contendo collagenase (Sigma®) tipo V (1mg/mL). Após a homogênea perfusão do pâncreas, fez-se a retirada e transferência do órgão para tubo tipo falcon contendo 5mL Hank's, sendo em seguida transferido para o banho-maria a 37°C por aproximadamente 6-8 min. Após a dissolução do tecido pancreático, a massa foi submetida a filtração em peneira de aço inoxidável e a sucessivas lavagens em solução Hanks sob banho de gelo. Posteriormente, as ilhotas foram manualmente coletadas com auxílio de lupa e pipetas. Para cada grupo experimental, no mínimo de 4-5 animais foram usados para formar um conjunto de ilhotas que eram posteriormente separadas em grupos de 4 e transferidas para placas de cultura (LACY; KOSTIANOVSKY, 1967).

3.6 PRÉ-INCUBAÇÃO

Para que as ilhotas pudessem se adequar ao meio *in vitro*, elas foram submetidas a um período de pré-incubação. Grupos de 4 ilhotas foram transferidas para poços contendo 1mL de solução Krebs (20mM NaCl; 4,8 mM KCL; 2,5 mM CaCl_2 ; 1,2 mM de Cloreto de magnésio (MgCl_2) e NaHCO_3), suplementado com 0,1% de albumina bovina (fração V), pH 7,4 e glicose (5,6 mM) e transferidos para incubadora de CO_2 (SANYO North America Corporation), aerada com mistura gasosa (95%, O_2 /5%, CO_2), com temperatura controlada de 37°C durante 1h. A

secreção da pré-incubação foi descartada e em seguida substituída pelas soluções teste.

3.7 INCUBAÇÃO

Após a retirada da solução de pré-incubação os diferentes grupos de ilhotas foram incubados por mais 1 hora em solução Krebs nas mesmas condições de oxigenação, temperatura e pH descritas anteriormente. Para avaliar a responsividade das ilhotas pancreáticas a glicose, ilhotas pancreáticas foram incubadas em 1mL de solução Krebs contendo glicose nas seguintes concentrações: 8,3; 16,7; 20,0 e 28,0 mM durante 60min. Adicionalmente, outro grupo de ilhotas foi submetido à incubação em 1mL de Krebs contendo glicose 8,3 mM na presença de diferentes concentrações de Ach (0,1; 1; 10; 100 e 1000 μ M) durante 60 min. Alíquotas das incubações foram coletadas e armazenadas em freezer -80°C para posterior dosagem de insulina pela técnica do radioimunoensaio (RIE), conforme descrito abaixo.

3.8 DOSAGEM INSULINA: RIE

A técnica por RIE consiste na interação competitiva de moléculas de insulina humana radioativa marcada com iodo (I^{125}) (Perkin Elmer), e das moléculas de insulina não radioativa das amostras experimentais, os quais competem por um anticorpo específico contra insulina (anti-rato). A leitura da radiação é realizada por um contador de radioatividade GAMA, após 48 horas de competição. O resultado é baseado em uma curva padrão com quantidades específicas de radiação e de insulina não radioativa conhecidas. Após a leitura tem-se a quantidade de insulina em cada uma das amostras em cpm/min posteriormente convertida em log da concentração final de insulina em ng/mL (BERSON; YALOW, 1968).

3.9 CURVA CRESCIMENTO E CONSUMO ALIMENTAR

As ninhadas foram pesadas diariamente até o desmame (21 dias). A partir dos 21 dias, os animais de todos os grupos experimentais foram pesados e tiveram o consumo alimentar avaliado a cada dois dias. O consumo alimentar foi calculado

pela subtração da comida ofertada e a sobra, dividido pelo número de animais em cada caixa, os dados foram expressos como g/g de peso corporal.

3.10 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

As amostras bioquímicas de sangue foram coletadas após um período de 12 horas de jejum. As dosagens das concentrações plasmáticas de triglicerídeos (mg/dL) e colesterol total (mg/dL) foram determinados pelo método enzimático-Gold Analisa, BR. A concentração de glicose (mg/dL) foi determinada pelo método enzimático colorimétrico Analisa, BR, conforme instruções do fabricante.

3.11 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após decorrido os 90 dias, os animais foram sacrificados e amostras de tecidos como pâncreas, tecido adiposo branco e tecido adiposo marrom foram posteriormente retiradas e fixadas em Alfac (álcool 80% 85mL, formaldeído 40% 10mL, ácido acético glacial 5mL) para análise histomorfológica. Do pâncreas padronizou-se a retirada de aproximadamente 1,5 cm da porção esplênica do órgão (cauda) garantindo que as possíveis alterações encontradas não fossem decorrentes das diferentes regiões dos órgãos. A fixação permaneceu por 16 horas, em seguida as peças foram transferidas para solução estoque (álcool 70%). Posteriormente as peças foram processadas iniciando-se pelas etapas de desidratação (álcool 80%, 90%, absoluto e xilol), seguindo para a inclusão em parafina (Paraffin Wax), segundo protocolos histológicos de rotina. As peças foram seccionadas em micrótomo à 4µm de espessura, seguindo o padrão de corte seriado, descartando-se aproximadamente 20 cortes entre cada lâmina ($\pm$ 80µm) para evitar a análise das mesmas estruturas. As lâminas eram devidamente etiquetadas e permaneciam fixando por no mínimo 24 horas, em seguida eram submetidas ao protocolo de coloração H&E (hematoxilina e eosina). Após a secagem as lâminas histológicas foram fotografadas em diferentes dimensões, de acordo como as estruturas a serem avaliadas, em microscópio de campo claro (Olympus BX41) com captura digital das imagens (software DP-Controller). Para avaliação e mensuração das estruturas presentes nas imagens utilizou-se o software J-Pró image. Parâmetros avaliados por corte nos diferentes tecidos: pâncreas

mediu-se área e número de ilhotas por corte usando a objetiva de 4X; no tecido adiposo branco avaliou-se a área e número dos adipócitos por corte em objetiva de 20X, e no tecido adiposo marrom foi realizadas contagem do número de núcleos em objetiva de 40X.

3.12 WESTERN BLOTTING

As ilhotas isoladas de todos os grupos experimentais foram armazenadas em solução tampão para extração de proteínas contendo: Uréia (7M), Tiuréia (2M), E.D.T.A. (5mM), Triton x-100 (1%), Fluoreto de Sódio (100mM), Ortovanadato de Sódio (100mM), Pirofosfato de Sódio (100mM), Aprotinina (1mg/mL) e PMSF (1 mmol/L) (AMARAL et al., 2003). Para determinar o teor total de proteínas utilizou-se o método de Bradford (BRADFORD, 1976), sendo utilizadas 15 µg de extrato de proteína total a partir das ilhotas pancreáticas para transferências em membrana de nitrocelulose. As membranas foram então incubadas com anticorpos para fosfolipase C β (PLC β) monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) ou com Receptor Muscarínico subtipo 3 (M3) policlonal (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) . As diluições de anticorpos foram feitas de acordo com as instruções do fabricante em tampão TRIS-Tween contendo 30 g / L de leite em pó desnatado. Detecção banda foi realizada por quimioluminescência (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) após incubação com um anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria óptica (Imagem J, National Institutes of Health, EUA).

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A significância estatística avaliada pela Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni entre pares selecionados. Quando apropriado Teste t de Student's também foi usado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas, bem como a elaboração dos gráficos foram feitas com auxílio do software GraphPad Prism 5.

4. RESULTADOS

Todos os dados serão apresentados demonstrando primariamente o efeito da redução do número de filhotes por ninhada, seguido do efeito do exercício físico. Dados demonstrados seguem a ordem de apresentação: NNSD versus NRSD, NNSD versus NNEXE e NRSD versus NREXE.

4.1 EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL DURANTE A LACTAÇÃO

Conforme demonstra a figura 3A, durante o período lactacional (0-21 dias) observou-se que a partir do 12º dia de vida ratos NR apresentaram maior peso corporal (18,5%, $p < 0,05$) em relação aos filhotes NN; diferença que persistiu até o desmame. Deste modo a área sob a curva (ASC) do peso corporal durante a lactação foi 18,5% maior no grupo NR, comparado ao grupo NN (figura 1B). A figura 1C representa o CNA das ninhadas no 21º dia de vida. Ratos NR apresentaram aumento de 8% em relação no CNA em relação aos animais NN ($p < 0,05$). Adicionalmente as ninhadas NR apresentaram IL maior em cerca de 9,1% comparado as ninhadas NN (figura 1D).

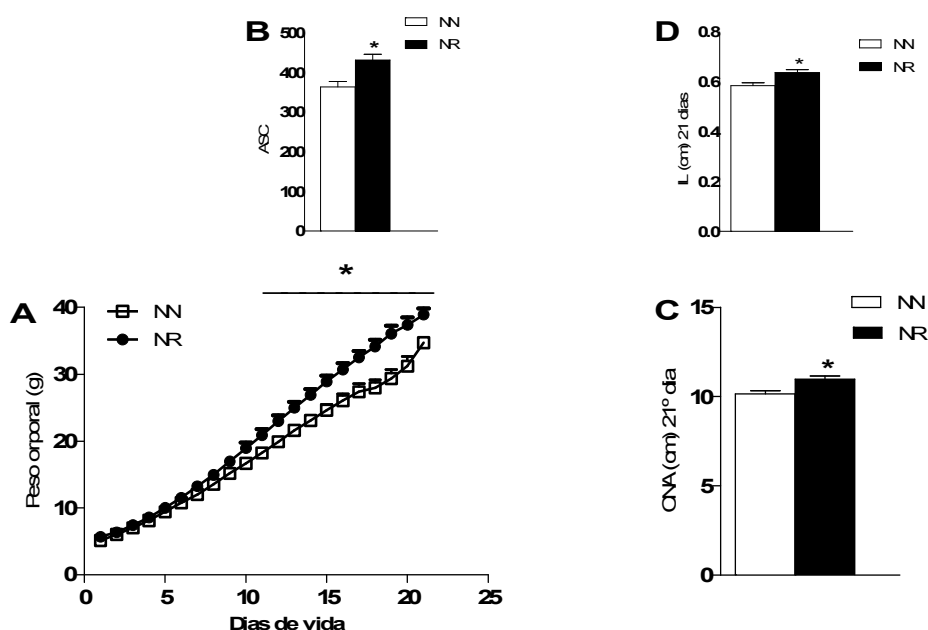


Figura 3. Evolução do Peso Corporal durante o período Lactacional. Os dados representam a média±EPM, $n = 15-20$ ratos por grupo. A figura 3A representa a evolução do peso corporal cuja ASC está representada na figura 3B. O CNA aos 21 dias está representado na figura 3C e o IL aos 21 dias de vida na figura 3D. Os símbolos nos gráficos representam diferenças estatísticas no teste t de Student's. * $p < 0,05$.

4.2 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, OBESIDADE E DADOS BIOQUÍMICOS.

A redução do número de filhotes por ninhadas induziu a obesidade, comprovado por meio das alterações nos parâmetros biométricos e depósitos de gordura, estes dados estão evidenciados na tabela 1. Os animais do grupo NRSED apresentaram aos 90 dias aumento de peso corporal em 8,7% em relação ao grupo NNSD. O efeito do exercício físico pode ser observado quando demonstrada a redução do peso corporal aos 90 dias de 8,8% e 7,2% dos grupos NNEXE e NREXE respectivamente, comparado a seus grupos sedentários. O CNA não foi alterado pela hiperalimentação lactacional e nem pela natação. O IL apresentou aumento de 3% no grupo NRSED em relação ao NNSD. Nos grupos exercitados houve redução de 2,8% (NNEXE) e 3,7% (NREXE) em relação aos grupos sedentários ($p<0,05$). Conforme também demonstra à tabela 1 a gordura mesentérica aumentou 22% no grupo NRSED em relação ao NNSD. O exercício reduzido em 21% e 20% os depósitos de gordura mesentérica nos grupos NNEXE e NREXE respectivamente, em relação a seus respectivos grupos sedentários. Quanto aos depósitos de gordura perigonadal o grupo NRSED apresentou aumento de 26,6% em relação ao NNSD. Por outro lado, em animais exercitados houve redução de 17% (NNEXE) e 14,6% (NREXE) em relação a seus controles ($p<0,05$). A gordura retroperitoneal apresentou aumento de 27,8% nos animais superalimentados sedentários em relação ao grupo NNSD. Novamente o efeito do exercício físico fica evidente, promovendo redução de 21% (NNEXE) e 23,5% (NREXE) nos grupos exercitados comparado a seus controles sedentários. Os depósitos de gordura subcutânea, inguinal não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Nos depósitos de gordura marrom, não constatamos diferença entre os grupos NRSED em relação ao NNSD. Contudo, nos grupos NNEXE e NREXE o exercício físico promoveu aumento de 106,8% e 63,9% respectivamente, em relação aos seus grupos controles ($p<0,05$).

Tabela 1. Parâmetros biométricos e obesidade aos 90 dias: efeito da redução do número de filhotes por ninhada e aplicação do exercício físico. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média. Todas as amostras foram coletadas após jejum de 12 horas; n= 20-28 ratos por grupo. As letras acima dos números na tabela representam a diferença significativa de $p < 0,05$ em análise de variância ANOVA, com pós teste *Bonferroni* entre pares selecionados, nos quais os grupos: ^aNNSED, ^bNNEXE, ^cNRSED e ^dNREXE.

	NNSED	NNEXE	NRSED	NREXE
Peso Corporal (g)	308,0 $\pm$ 3,87 ^{b,c}	282,4 $\pm$ 3,90 ^a	335,0 $\pm$ 4,41 ^{a,d}	310,7 $\pm$ 2,90 ^c
CNA (cm)	21,77 $\pm$ 0,14	21,86 $\pm$ 0,14	22,05 $\pm$ 0,18	22,10 $\pm$ 0,13
IL	0,31 $\pm$ 0,006 ^{b,c}	0,30 $\pm$ 0,001 ^a	0,32 $\pm$ 0,002 ^{a,d}	0,31 $\pm$ 0,002 ^c
Gordura Mesentérica (g/100g)	0,67 $\pm$ 0,03 ^{b,c}	0,53 $\pm$ 0,02 ^a	0,82 $\pm$ 0,02 ^{a,d}	0,66 $\pm$ 0,03 ^c
Gordura Perigonadal (g/100g)	0,84 $\pm$ 0,04 ^{b,c}	0,6894 $\pm$ 0,03 ^a	1,054 $\pm$ 0,03 ^{a,d}	0,8995 $\pm$ 0,04 ^c
Gordura Inguinal (g/100g)	0,22 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,03
Gordura Retroperitoneal (g/100g)	1,30 $\pm$ 0,06 ^{b,c}	1,03 $\pm$ 0,06 ^a	1,66 $\pm$ 0,07 ^{a,d}	1,27 $\pm$ 0,06 ^c
Gordura marrom interescapular (g/100g)	0,07 $\pm$ 0,003 ^b	0,14 $\pm$ 0,011 ^a	0,09 $\pm$ 0,003 ^d	0,15 $\pm$ 0,005 ^c

Novamente os efeitos da redução de ninhadas são confirmados através das alterações nos parâmetros bioquímicos. Os níveis basais de glicose encontraram-se aumentados em 16,2% nos animais NRSED em relação aos NNSED. Tendo o exercício papel significativo na redução da glicemia em 16% para ambos os grupos NNEXE e NREXE, em relação os seus respectivos controles sedentários. Conforme também demonstra a tabela 2, o perfil lipídico foi alterado pela natação. Os níveis de triglicerídeos foram 19,7% e 19,1% menores nos grupos NNEXE e NREXE, respectivamente comparado aos sedentários (NNSED e NRSED). Os grupos NNEXE e NREXE apresentaram redução 13% e 24% respectivamente nos níveis de colesterol, comparado a seus grupos sedentários. Os níveis de insulina plasmática foram similares entre os grupos.

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos: efeito da redução do número de filhotes por ninhada e aplicação do exercício físico. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média. Todas as amostras foram coletadas após jejum de 12 horas; n= 20-28 ratos por grupo. As letras e números na tabela representam a diferença significativa de $p < 0,05$ em análise de variância ANOVA, com pós teste *Bonferroni* entre pares selecionados, nos quais os grupos: ^aNNSED, ^bNNEXE, ^cNRSED e ^dNREXE.

	NNSED	NNEXE	NRSED	NREXE
Glicemia (mg/dL)	98,57 $\pm$ 4,22 ^{b,c}	83,25 $\pm$ 3,43 ^a	114,5 $\pm$ 4,27 ^{a,d}	96,35 $\pm$ 5,21 ^c
Triglicerídeos (mg/dL)	63,69 $\pm$ 3,90 ^b	51,10 $\pm$ 2,68 ^a	64,84 $\pm$ 4,52 ^d	52,45 $\pm$ 2,60 ^c
Colesterol (mg/dL)	128,4 $\pm$ 3,09 ^b	110,0 $\pm$ 2,89 ^a	136,5 $\pm$ 8,30 ^d	100,4 $\pm$ 2,68 ^c
Insulina (ng/mL)	0,223 $\pm$ 0,03	0,183 $\pm$ 0,03	0,288 $\pm$ 0,04	0,272 $\pm$ 0,03

A figura 4 representa a evolução do peso ponderal e consumo alimentar dos grupos no período dos 22 aos 90 dias de vida. A análise da ASC (figura 4B) demonstra o aumento do peso corporal de 9% do grupo NRSED em relação ao NNSED. A natação promoveu redução de 8,4% e 11,5% do peso corporal nos grupos NNEXE e NREXE respectivamente, comparado a seus respectivos grupos sedentários. A manipulação no tamanho das ninhadas e a aplicação do protocolo de exercício físico não alteraram significativamente o consumo alimentar entre os grupos (Figura 4C e 4D).

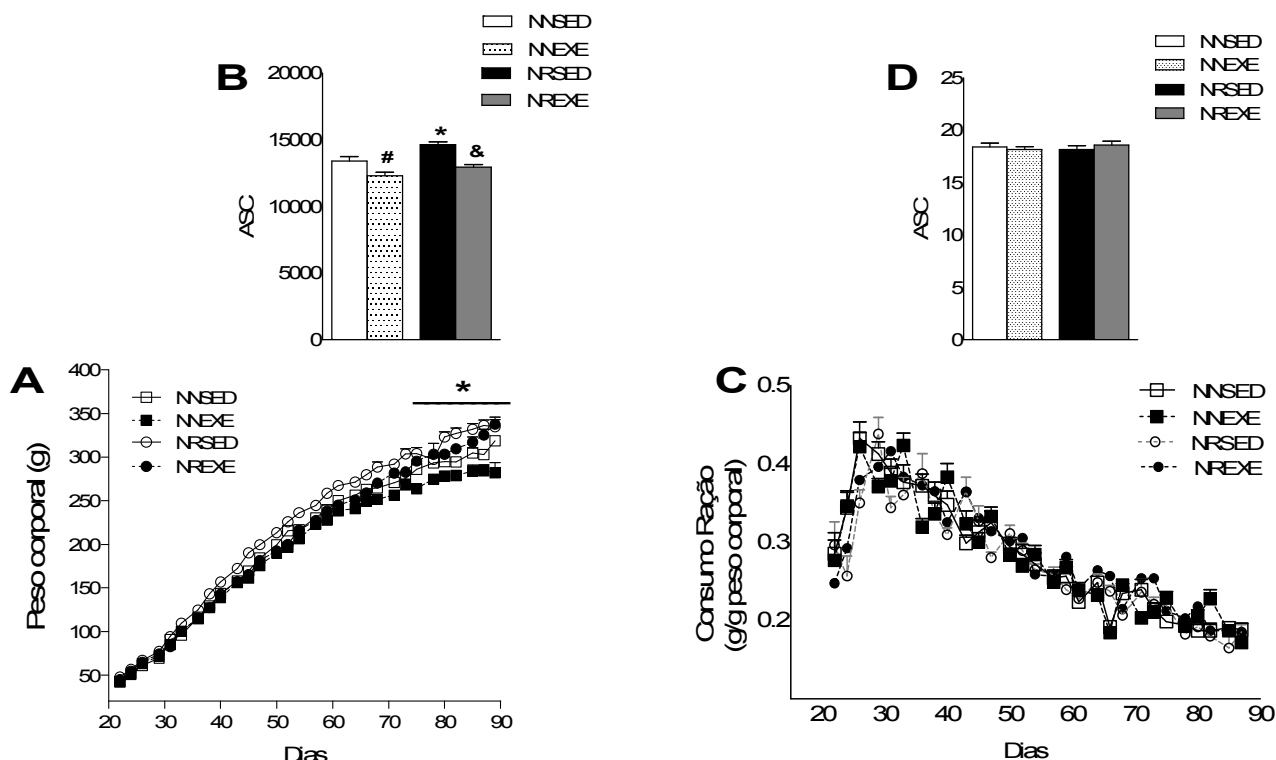


Figura 4. Influência da Natação sobre o Crescimento Corporal e o Consumo Alimentar. A figura A representa a evolução do peso ponderal dos 22 aos 90 dias, e C representa o consumo alimentar dos 22 aos 90 dias. E os insets B e D representam o gráfico da ASC. Os pontos representam a média $\pm$ erro padrão da média; $n = 20-28$ ratos para todos os grupos. Os símbolos * (NNSD x NRSED); # (NNSD x NNEXE) e & (NRSED x NREXE) nos gráficos representam a diferença significativa de $p < 0,05$ em análise de variância ANOVA, com pós teste *Bonferroni* entre pares selecionados.

4.3 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

A histomorfometria do tecido adiposo perigonadal está representada na figura 5 A-D. Neste depósito o grupo NRSED apresentou aumento no diâmetro (13%) e redução (15%) no número de adipócitos em relação ao grupo NNSD. Nos grupos exercitados, o diâmetro dos adipócitos perigonadais reduziu em 16,7% (NNEXE) e 18,5% (NREXE), enquanto o número de adipócitos aumentou em 11% para ambos os grupos exercitados. Nos depósitos de gordura retroperitoneal (5 E-H) o grupo NRSED apresentou aumento de 17,4% no diâmetro dos adipócitos em relação ao NNSD, não houve diferença no número de adipócitos entre os grupos neste depósito. Após exercício, NREXE apresentou redução 32,4% do diâmetro, e aumento de 16,8% no número de adipócitos. Similarmente, o grupo NNEXE reduziu em 16,2% o diâmetro e aumentou 15,5% o número de adipócitos, ambos comparados a seus grupos sedentários. No tecido adiposo mesentérico (figura 5 I-

L), o grupo NNEXE apresentou redução de 23% na área dos adipócitos por campo em relação ao NNSD. Não havendo diferença significativa no restante dos grupos. Quanto ao número de adipócitos por campo não houve diferença significativa entre os grupos NRSD e NNSD. No entanto, houve aumento de 22% no número de adipócitos após a aplicação do protocolo de exercício no grupo NNEXE comparado a seu controle sedentário (NNSD). Não apresentando diferença significativa no grupo NREXE. No depósito de gordura inguinal houve aumento de 30% no diâmetro celular no grupo NRSD em relação ao NNSD. Os grupos exercitados apresentaram redução de 13,6% (NREXE) e 8,6% (NNEXE) no diâmetro dos adipócitos, comparado aos controles NRSD e NNSD respectivamente. Não houve diferença estatística no número de adipócitos em nenhum grupo. No tecido adiposo marrom (TAM), pode-se observar qualitativamente que os animais supernutridos (NRSD) apresentaram maiores gotas lipídicas dispostas no citoplasma das células adiposas, além de apresentar 25% menos núcleos dispersos nas lâminas quando comparados aos TAM do grupo NNSD. Novamente o exercício promoveu alterações como à redução aparente no tamanho das gotas lipídicas no grupo NNEXE, além de reduzir em 27,9% o número de núcleos por campo. No depósito de TAM do grupo NREXE, no entanto não teve efeito aparente sobre o acúmulo de gotas lipídicas nem sobre o número de núcleos. Todos os dados numéricos das avaliações histomorfológicas estão representados na tabela APÊNDICE-A.

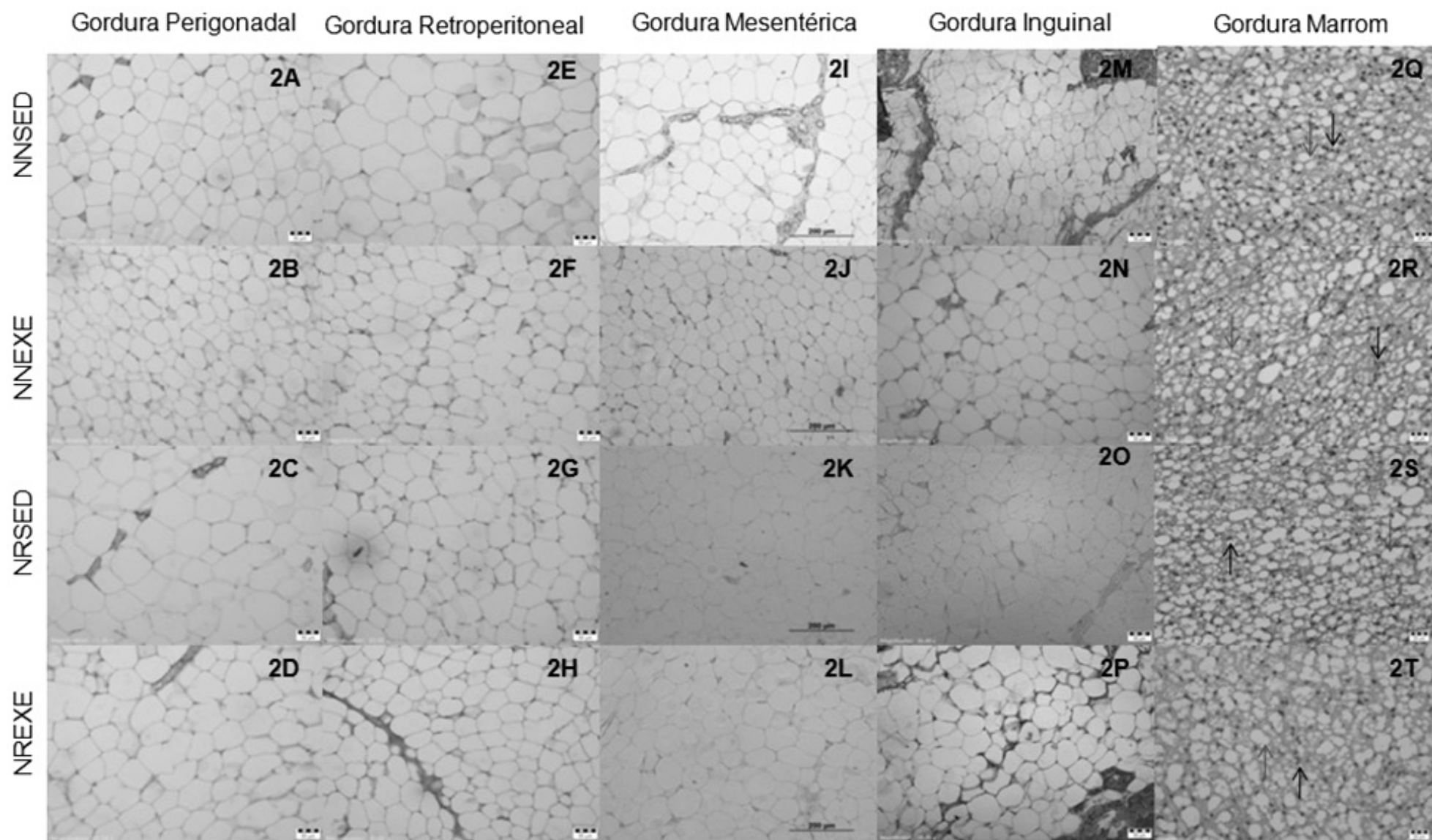


Figura 5. Análise histomorfológica dos diferentes depósitos de tecido adiposo. As imagens representam as gorduras perigonadal (2 A-D), retroperitoneal (2 E-H), mesentérica (2 I-L), inguinal (2 M-P) e marrom interescapular (2 Q-T). Todas as imagens foram fotografadas em objetiva de 20X, exceto a gordura marrom que foi fotografado em objetiva de 40X. Nas figuras Q-T setas vermelhas indicam gotículas de gordura, enquanto setas pretas os núcleos. Colorações em H&E. Foram realizadas análises morfológicas da área e do número, os valores estão representados em média $\pm$ erro padrão no item resultados tabela 3.

4.4 CURVA DOSE-RESPOSTA A GLICOSE EM ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS

A figura representa a curva dose-resposta à glicose em ilhotas pancreáticas isoladas. Ilhotas de animais NRSED secretaram aproximadamente 33% menos insulina em altas concentrações de glicose (16,7; 20,0 e 28,0 mM), em relação a ilhotas do grupo NNSD. Nos grupos exercitados, o exercício reduziu aproximadamente 49% secreção de insulina no grupo NNEXE, no entanto aumentou em aproximadamente 95% a secreção do grupo NREXE. Na análise histomorfológica de pâncreas (figura 7), podemos observar que os animais super nutridos durante a lactação (NRSED) apresentaram aumento de 34,2% no diâmetro e redução de 30% no número de ilhotas comparado ao grupo controle (NNSD). Nos grupos exercitados, houve aumento do número de ilhotas, em 31,7% (NNEXE) e 39,6% (NREXE) e redução de 39,5% (NNEXE) e 33,1% (NREXE) na área das ilhotas.

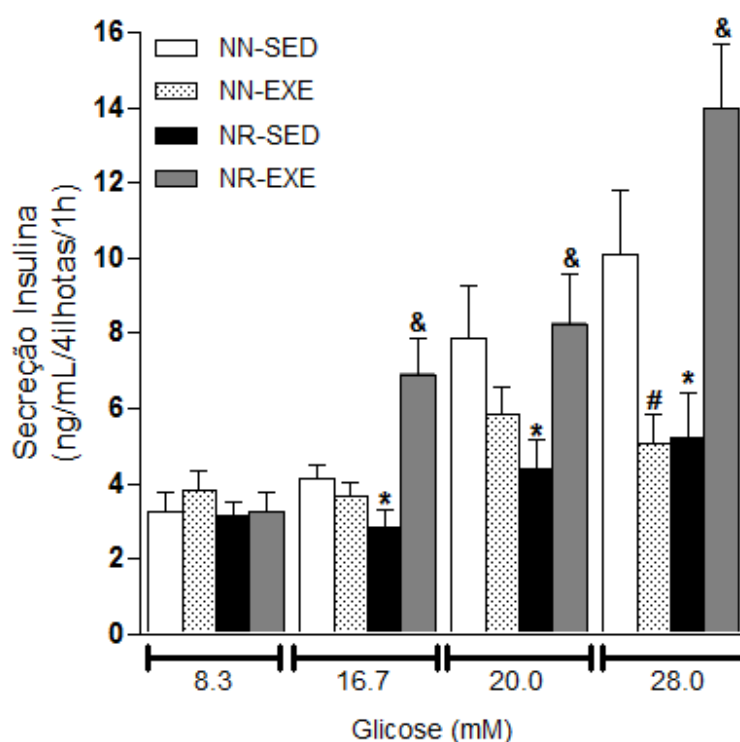


Figura 6. Curva dose-resposta a Glicose em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos superalimentados submetidos à natação. Dados representam a média $\pm$ epm. Representação da curva de secreção em que grupos de 4 ilhotas foram incubadas na presença de 1mL de Krebs contendo crescentes concentrações de glicose. De 16-20 observações foram realizadas para cada grupo. No mínimo 6 animais foram usados para formar a amostra de ilhotas usadas para a incubação. Os símbolos * (NNSD x NRSED); # (NNSD x NNEXE) e & (NRSED x NREXE) nos gráficos representam diferenças estatísticas no teste t de Student's ($p < 0,05$).

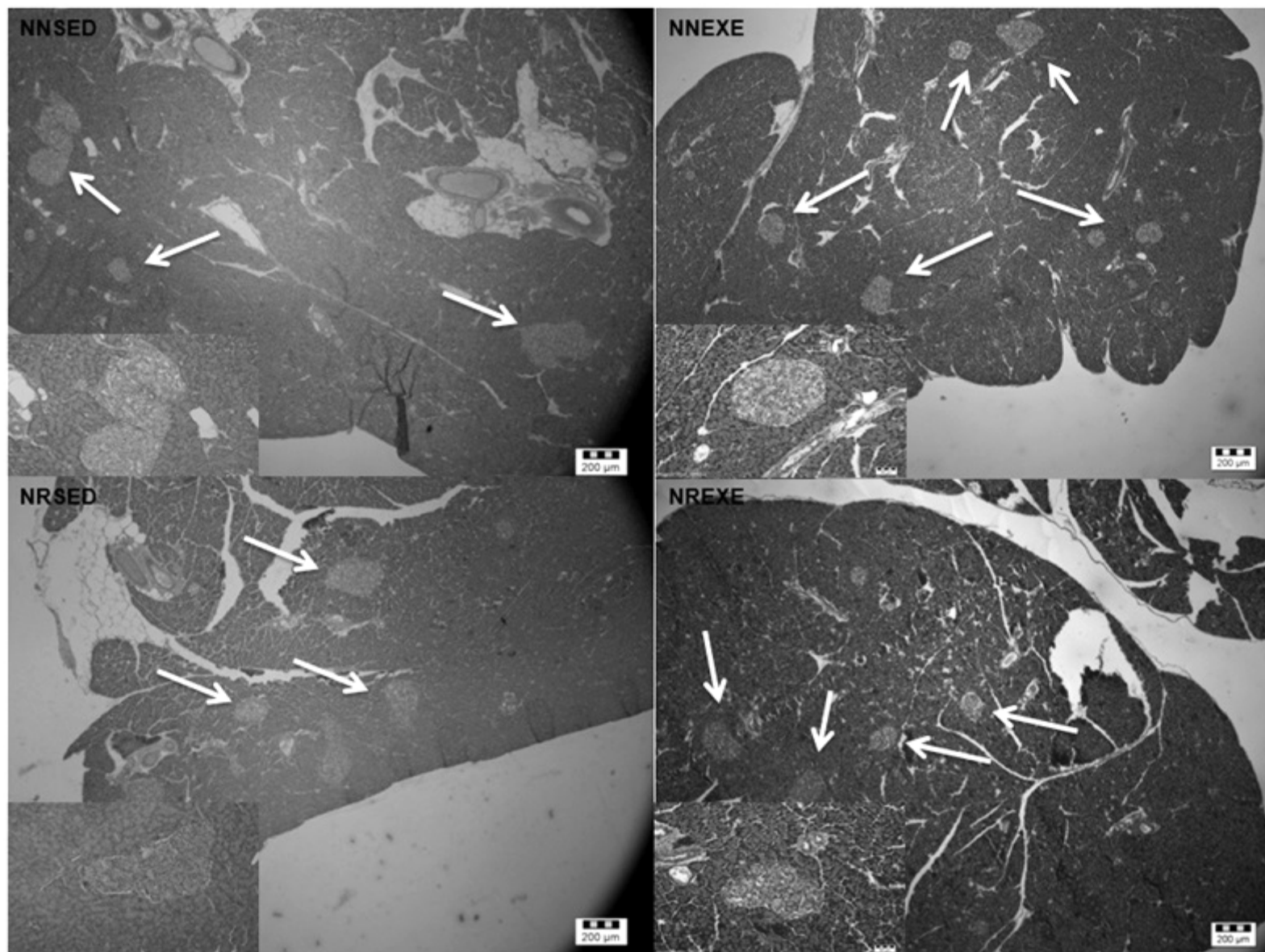


Figura 7. Histomorfometria das ilhotas pancreáticas de ratos superalimentados submetidos à natação. Fotografado em objetiva de 4X, n= 12-15 lâminas por grupo. Fotos dos inserts fotografadas em objetiva de 20X. Coloração em H&E. Setas indicando as ilhotas de Langerhans.

4.5 CURVA DOSE-RESPOSTA A Ach EM ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS.

Como demonstra o gráfico da figura 8A, a adição de diferentes concentrações de Ach em soluções com glicose à 8,3 mM teve efeito potencializador no grupo NNSSED, havendo aumento de 6 vezes na secreção de insulina. No grupo NRSED a Ach inibiu em aproximadamente 104% a secreção nas baixas concentrações (0,1, 1 e 10 μ M), tendo efeito estimulatório apenas nas altas concentrações. No entanto, os grupos exercitados apresentaram redução na secreção de insulina frente aos estímulos da Ach (NNEXE 0,1, 1, 10 e 100 μ M; NREXE 100 e 1000 μ M). A análise da expressão do receptor M3 em ilhotas pancreáticas está representada na figura 8B. Apenas ilhotas do grupo NNEXE apresentaram redução de 44,8% dos receptores M3 em relação a ilhotas do grupo controle. A figura 8C representa o Western Blotting da proteína PLC β , não houve diferença significativa entre os grupos.

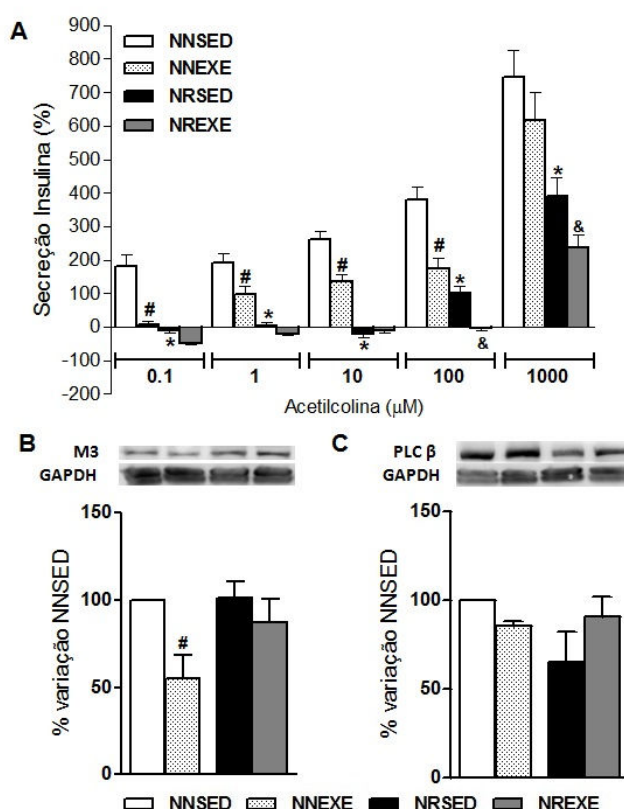


Figura 8. Curva dose-resposta à Ach em ilhotas pancreáticas isoladas e Western Blotting M3 e PLC β de ratos superalimentados submetidos à Natação. Dados representam a média $\pm$ epm. 8A Curva de secreção em que grupos de 4 ilhotas foram incubadas na presença de 1mL de Krebs contendo glicose (8,3 mM) e Ach em crescentes concentrações (0,1 – 1000 μ M). De 16-20 observações foram realizadas para cada grupo. No mínimo 6 animais foram usados para formar a amostra de ilhotas usadas para a incubação. 8B-C Figura representando gel Western Blotting para proteína M3 e PLC β respectivamente. Foram utilizados de 5-8 ratos, cerca de 100-200 ilhotas por amostra. Os símbolos * (NNSSED x NRSED); # (NNSSED x NNEXE) e & (NRSED x NREXE) nos gráficos representam diferenças estatísticas no teste t de Student's (p<0,05).

5. DISCUSSÃO

5.1 OBESIDADE INDUZIDA POR HIPERALIMENTAÇÃO E EXERCÍCIO FÍSICO.

Assim como os dados reportados na literatura em trabalhos como de Faust, et al. (1980), Plagemann, et al, (1992) e Thole, et al. (2012), nossos resultados demonstraram aumento do peso corporal dos filhotes de ninhada reduzida durante o período lactacional, sendo este aumento significativo em nossos resultados a partir do 12º dia de vida . Estes dados confirmam que a lactação é de fato período crítico ao desenvolvimento do organismo, e que alterações neste período nutricional refletem sobre adaptações às quais o organismo em desenvolvimento sofre, podendo estas afetar a saúde durante a vida adulta, caracterizando o processo de marcação metabólica (LUCAS, 2000; MCMILLEN; ADAM; MÜHLHÄUSLER, 2005; WATERLAND; GARZA, 1999). Nossos dados corroboram com outros trabalhos realizados em ratos e em camundongos em que a redução das ninhadas no 3º dia de vida está associado ao sobrepeso dos filhotes superalimentados (CUNHA, 2007; NERY et al., 2011; RINALDI et al., 2012; RODRIGUES et al., 2009; THOLE et al., 2012). Este aumento de peso durante a lactação é justificado devido à maior oferta de leite aos animais de ninhadas reduzidas e a imaturidade do controle da ingesta alimentar neste período. Ainda que os circuitos neuronais hipotalâmicos de ratos se desenvolvam parcialmente durante o período neonatal, estes circuitos neuronais encontram-se até a terceira semana de vida estruturalmente e funcionalmente imaturos, suscetíveis a sofrer interferências do meio. O excesso de nutrientes pode intervir no desenvolvimento da densidade e atividade neuronal do ARQ e do VMH (BOURET; SIMERLY, 2007; RINALDI et al., 2012). Como consequência há o maior armazenamento de energia promovendo o aumento do peso corporal durante a lactação e posteriormente na vida adulta (FAUST; JOHNSON; HIRSCH, 1980; MCMILLEN; ADAM; MÜHLHÄUSLER, 2005; PLAGEMANN et al., 1992). Embora não se saiba exatamente quais os principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento da obesidade em animais de ninhadas reduzidas, acredita-se que a principal causa esteja relacionada às modificações nas vias neurais hipotalâmicas responsáveis pelo comportamento alimentar e o ganho de peso (PLAGEMANN et al., 1999). O excesso de nutrientes, ou ainda a variação hormonal durante os primeiros dias de vida, pode intervir em regiões específicas que estão em formação

e/ou diferenciação no hipotálamo. Dentre elas a remodelação do VMH, havendo redução da densidade neuronal desta região, intervindo diretamente na saciedade visto ser uma das principais regiões hipotalâmicas envolvidas no controle do metabolismo energético e ainda levar a resistência a ação da insulina/leptina no hipotálamo (PLAGEMANN et al., 1999). Plagemann et al. (1999) descrevem alterações como hiperinsulinemia e aumento na expressão de NPY no ARQ e no PVN em animais derivados de ninhadas reduzidas. O ajuste das ninhadas promove a maior oferta de leite aos animais de ninhada reduzida, assim, o aumento da oferta de leite materno associado à maior ingestão reflete no aumento do peso corporal (MCMILLEN; ADAM; MÜHLHÄUSLER, 2005).

Além do aumento de peso, os animais de ninhadas reduzidas apresentaram aumento no IL e no CNA aos 21 dias de vida. Corroborando com nosso trabalho, Frankenfeld (2009), observou em seu estudo que animais supernutridos já possuem CNA maior desde os 14 dias de vida. No entanto, aos 90 dias a diferença no CNA deixou de ser significativa entre os animais supernutridos e seus controles (NNSD).

A diferença no peso corporal dos nossos animais supernutridos passou a diminuir após o desmame, no entanto, aproximadamente aos 75 dias de vida o peso de nossos animais de ambos os grupos sedentários tornaram a apresentar uma diferença crescente e gradual até os 90 dias, em que o sobrepeso reaparece. Comprovando que intervenções na disponibilidade nutricional estão ligadas a alterações permanentes no organismo, resultando em condições diferentes do uso e do armazenamento energético, levando ao aumento na massa corpórea e alterações no metabolismo e nas funções endócrinas (RODRIGUES et al., 2009).

Constatamos que aos 90 dias, paralelo ao aumento do peso corporal, os animais NRSD apresentaram aumento das reservas de gordura mesentérica, perigonadal, retroperitoneal e aumento no IL. Nossos resultados corroboram com estudos de Rodrigues et al. (2009), os quais demonstram maior deposição de gordura visceral em animais de ninhadas reduzidas. Em seus trabalhos Rinaldi et al. (2012) demonstraram que, como em outros modelos de obesidade a programação metabólica por redução de ninhada também promove o desajuste do SNA. Desta forma, o aumento dos depósitos de gordura está associado a este desajuste autonômico, havendo a prevalência da atividade da subdivisão parassimpática (anabólica) sobre a subdivisão simpática (catabólica). Nossos animais não apresentaram hiperinsulinemia, o que seria característico do aumento da atividade

parassimpática no pâncreas. Desta forma sugerimos que o aumento do depósito de gordura pode estar relacionado a uma possível redução da atividade simpática, o que reduziria a atividade lipolítica no tecido adiposo, favorecendo o acúmulo de gordura. O aumento dos depósitos de gordura corporal, em especial a gordura visceral, é fator de risco para desenvolvimento de RI e diversas desordens metabólicas. O acúmulo de tecido adiposo visceral está intimamente ligada à SM. Segundo Hermsdorff e Monteiro (2004), o tecido visceral é mais sensível a lipólise do que os estoques de gordura subcutânea, libera maior quantidade de AGL e adipocinas ligadas a processos pró-inflamatórios, intervindo no processo de sinalização da insulina, promovendo quadro de RI (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004).

Embora nossos animais supernutridos na lactação tenham apresentado aumento de gordura visceral o mesmo não foi observado para o depósito de gordura subcutânea inguinal. Este resultado corrobora com relatos de Rodrigues et al. (2009), que demonstra a ausência de diferença nos depósitos subcutâneos entre animais de ninhadas reduzidas comparado aos controles. O mesmo resultado pode ser observado em modelo de obesidade por dieta hiperlipídica (RAVAGNANI et al., 2012). Desta forma sugerimos que a super nutrição por maior aporte de leite durante a lactação pode intervir em uma resposta metabólica distinta nos diferentes depósitos de gordura, no entanto mais estudos precisam ser realizados para confirmação da hipótese neste modelo.

A literatura reporta diversos estudos a cerca dos efeitos do exercício físico em diferentes modelos experimentais de obesidade e em humanos. Dentre os benefícios da prática de exercício físico estão redução da massa adiposa, restauração da homeostase metabólica promovendo melhora da glicemia, redução da hiperinsulinemia e das deslipidemias (GOMES et al., 2012; STEHNO-BITTEL, 2011). Observamos em nossos resultados que nosso protocolo de exercício físico iniciado logo após o 21º dia de vida persistente até os 90 dias foi capaz de reduzir o peso corporal tanto dos animais superalimentados como nos animais de ninhadas normais. Junto à redução do peso corporal o exercício físico promoveu a redução dos depósitos de gordura visceral.

Em outros modelos animais, como em camundongos tratados neonatalmente com MSG, a prática de natação iniciada precocemente foi capaz de reduzir os depósitos de gordura (SCOMPARIN et al., 2006). Trabalhos animais oriundos de

ninhadas reduzidas, submetidos a treinos crônicos de baixa intensidade também tiveram redução da massa corpórea total além de reduzir os depósitos de gordura (FRANKENFELD, 2009). A redução do peso e dos depósitos de gordura corporal através da prática de exercício físico é devido ao fato do exercício físico ser um potente estimulador do SNA. Mais especificamente durante o exercício físico há prevalência do SNS. Dentre os principais hormônios liberados durante a atividade física em consequência do aumento do SNS estão as catecolaminas (epinefrina e norepinefrina). O aumento do SNS ativa o eixo simpato-adrenal, elevando a síntese de catecolaminas pelas células cromafins presentes na medula adrenal. As catecolaminas se ligam a receptores específicos estimulando a glicogenólise hepática e muscular e a lipólise no tecido adiposo. No tecido adiposo, as catecolaminas se ligam a receptores β -adrenérgicos estimulando o aumento da mobilização energética requerida durante o exercício (DE MOURA; LISBOA; PASSOS, 2008; PROENÇA, 2010; SCOMPARIN et al., 2006). Embora os depósitos viscerais tenham sido reduzidos pela natação, não houve efeito sob o depósito subcutâneo em ambos os grupos exercitados. Segundo DE MOURA et al. (2008) esta condição está relacionada ao fato dos depósitos subcutâneos de gordura apresentarem menor sensibilidade a ação das catecolaminas, visto uma menor concentração de receptores β -adrenérgicos (DE MOURA; LISBOA; PASSOS, 2008).

O aumento da massa adiposa em indivíduos obesos se dá pelo aumento do tamanho dos adipócitos (hipertrofia) e/ou pelo aumento do número de adipócitos no tecido (hiperplasia) (BRAY, 2004; DE QUEIROZ et al., 2009). Em nossos resultados a análise histomorfológica dos depósitos de gordura apontou hipertrofia dos adipócitos tanto na gordura visceral quanto na subcutânea. A hipertrofia dos adipócitos da gordura visceral em animais de ninhadas reduzidas também foi descrito por Conceição et al. (2012), no entanto os autores apontam que não houve diferença no diâmetro do adipócitos subcutâneos. Em nossa análise a hipertrofia dos adipócitos é quase sempre acompanhada da redução do número de células adiposas por campo analisado. Estudos relacionados à adipogênese têm demonstrado que diversos fatores principalmente o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ), atuam coordenadamente para diferenciação de novos adipócitos (DE QUEIROZ et al., 2009; MOURA VI; RI, 2010). Sugerimos que a supernutrição pode intervir nestes mecanismos reduzindo a adipogênese, o que requer mais estudos.

A hipertrofia dos adipócitos está ligada ao início da disfunção celular das células adiposas durante a obesidade, esta hipertrofia dos adipócitos leva ao esgotamento de sua capacidade de armazenar gordura, além de torná-los mais lipolíticos, favorecendo ao aumento das concentrações de AGL no sangue (CANCELLO et al., 2005). Além disso, os adipócitos hipertróficos passam a produzir mais adipocitocinas como TNF- α e IL-6, as quais agravam o perfil inflamatório presente em indivíduos obesos, reduzindo a sensibilidade periférica à insulina (BRAY, 2004; DE QUEIROZ et al., 2009; HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004). Adicionalmente o processo de hipertrofia é acompanhado da insuficiência da vascularização do tecido adiposo, promovendo a apoptose das células adiposas e consequente aumento de infiltrados de macrófagos no tecido adiposo. Estes macrófagos por sua vez, secretam ainda mais TNF- α , agravando o quadro inflamatório na obesidade (MOURA; MONTEIRO, 2010). Boullu – Ciocca et al. (2008) confirmam em seu trabalho que animais que tiveram maior aporte de leite durante a lactação combinado ou não a dieta hiperlipídica possuem hipertrofia dos adipócitos e aumento expressivo de TNF- α e IL-6 no tecido adiposo visceral, confirmando o aumento do perfil inflamatório neste modelo (BOULLU-CIOCCA et al., 2008). A hipertrofia dos adipócitos em nossos animais hipernutridos corrobora como outros trabalhos em diferentes modelos de obesidade, nos quais a hipertrofia dos adipócitos também é relatada (LEITE et al., 2013; SPERETTA, 2011). Boullu-Ciocca e colaboradores (2005) demonstraram que animais de ninhadas reduzidas submetidos ou não a dieta rica em gordura apresentam aumento da sensibilidade a ação de glicocorticóides na gordura visceral. O aumento da produção de glicocorticóides e/ou sensibilidade a ação de glicocorticóides está intimamente associado ao aumento de deposição de gordura (PAULI et al., 2006). Desta forma, é provável que alterações destes hormônios também possam contribuir para a obesidade observada em nossos animais supernutridos.

Além dos benefícios da prática de exercício físico na promoção da redução do peso corporal e restabelecimento de alterações bioquímicas em indivíduos obesos, tem sido comprovado por diversos trabalhos na literatura que o exercício é capaz de restaurar alterações morfológicas decorrentes do estado obeso (CALEGARI et al., 2011; LEITE et al., 2013; SCOMPARIN et al., 2006). Em nosso modelo de obesidade, observamos que o efeito do exercício físico promoveu a melhora do perfil hipertrófico das células adiposas tanto no tecido adiposo visceral como no

subcutâneo nos grupos NREXE e NNEXE. A redução da hipertrofia dos adipócitos nos animais exercitados está relacionada ao aumento da lipólise em condições de carência energética, como já explicado anteriormente. Esta redução do diâmetro dos adipócitos é favorável ao restabelecimento metabólico das células. Pois, como demonstrado por Canello et al. (2005), a redução do tamanho dos adipócitos está associado ao aumento da produção de moléculas anti-inflamatórias pelas células adiposas. Além disso, há redução na produção de adipocitocinas como TNF- α e IL-6, e redução da infiltração de macrófagos e monócitos no tecido adiposo, atenuando o perfil inflamatório.

Arelado ao aumento do peso, os animais NRSED apresentaram maior IL em relação ao grupo NNSED. Este resultado corrobora com estudos de Frankenfeld (2009), que demonstrou a prevalência do IL em animais superalimentados na lactação.

Os depósitos de TAM não apresentaram diferença quanto ao peso entre os grupos de animais oriundos de ninhadas reduzidas e ninhadas normais. O mesmo resultado foi encontrado em estudos de Xiao et al. (2007). Embora haja ausência de diferença no peso, podemos constatar que o maior aporte de leite durante a lactação promove alterações histomorfológicas no TAM. A análise qualitativa das lâminas histológicas demonstra presença de gotículas lipídicas maiores no TAM dos NRSED em relação ao NNSED. Este resultado evidencia a redução da termogênese em ratos supernutridos comparado aos NNSED. A redução da termogênese em animais de ninhadas reduzidas é confirmada por Xiao et al. (2007), os quais demonstram que estes animais apresentam redução de proteínas desacopadora subtipo 1 (UCP-1) no TAM, em condições normais ou quando expostos ao frio. Proteínas UCP-1 desempenham papel central no aumento da taxa metabólica para produção de calor neste tecido. Sugerimos que a prevalência de gotas lipídicas maiores no TAM em ratos metabolicamente programados se deve a uma resposta alterada a estímulos autonômicos neste modelo de obesidade. Em condições normais o SNS promove o aumento da termogênese no TAM através da liberação de norepinefrina em seus terminais (CANNON; NEDERGAARD, 2004). No entanto em animais de ninhadas reduzidas há redução de receptores adrenérgicos que medeiam os estímulos do SNS sobre o TAM, reduzindo a termogênese no tecido (XIAO et al., 2007). Além de gotículas lipídicas maiores o TAM dos nossos animais superalimentados apresentam redução no número de núcleos por campo, o que sugere o aumento do tamanho das

células adiposas neste tecido quando comparado ao controle sedentário. Podemos sugerir também que redução do número de núcleos por campo no grupo NRSED está ligado à redução da proliferação celular no TAM destes animais. Esta hipótese é corroborada por dados mostrando que animais superalimentados na lactação tem redução de receptores adrenérgicos- β_1 , os quais são os principais estimuladores da proliferação celular no TAM (BENGTSSON; CANNON; NEDERGAARD, 2000; CANNON; NEDERGAARD, 2004; XIAO et al., 2007).

Como bem estabelecido na literatura alterações na termogênese estão intimamente relacionadas ao quadro de obesidade. O TAM tem importante função termogênica. Nossos resultados demonstraram que ambos os grupos exercitados apresentaram aumento do TAM em resposta ao protocolo de exercício físico. O aumento no TAM também é observado em animais com diferentes tipos de obesidade submetidos à natação, como também em ratos jovens e velhos submetidos à natação (EGUCHI et al., 2008; OH-ISHI et al., 1996; UENO et al., 1997). Como já descrito anteriormente o TAM é innervado pelo SNS, sendo o simpático fortemente estimulado durante o exercício físico. A ativação do SNS pode exercer efeitos agudos e crônicos sobre o TAM, sendo que o estímulo crônico tem efeito em aumento da quantidade de proteína UCP1, biogênese mitocondrial e tanto hiperplasia e hipertrofia no TAM (VOSSELMAN; VAN MARKEN LICHTENBELT; SCHRAUWEN, 2013). Desta forma o aumento dos depósitos de TAM em ambos grupos exercitados esta relacionado ao estímulo crônico devido ao protocolo de exercício físico iniciado precocemente. Em nossa análise histomorfológica observamos no grupo NNEXE a ativação simpática através do exercício foi efetiva aumentando a termogênese e a síntese proteína, visto que apresentou redução no diâmetro das gotículas lipídicas presentes no TAM e redução no número de núcleos. No entanto não observamos qualquer alteração no TAM do grupo NREXE, desta forma sugerimos a redução de ninhada altera a resposta do TAM ao estímulo simpático crônico, reduzindo a resposta termogênica nestes animais.

Já está bem descrito na literatura que animais supernutridos durante a lactação sofrem mudanças metabólicas as quais acarretam alterações na homeostase glicêmica, lipidemias, hiperinsulinemia, hiperleptinemia e RI (PLAGEMANN et al., 1999; PLAGEMANN et al., 1992). Em nossos resultados os animais oriundos de ninhadas reduzidas apresentaram aumento da glicemia basal, no entanto não encontramos alterações nos níveis de colesterol, triglicerídeos e da insulina basal.

Como reportado por Boullu-Ciocca e colaboradores (2005), animais supernutridos apresentam aumento da sensibilidade aos glicocorticóides no tecido adiposo visceral, o que nos permite sugerir que ausência níveis de triglicérides e colesterol pode estar relacionada ao aumento da lipogênese. Consultando outros trabalhos referentes à redução de ninhadas percebemos que os parâmetros bioquímicos apresentam-se com resultados divergentes na literatura. Nossos resultados são similares aos descritos em outros trabalhos, como de Rodrigues et al. (2007), o qual demonstra a similaridade entre os níveis de glicose e insulina, bem como de colesterol e triglicerídeos entre animais supernutridos com o grupo controle. No entanto outros trabalhos demonstram o aumento da glicemia de jejum acompanhado de hiperinsulinemia (AALINKEEL et al., 1999; PATEL; SRINIVASAN, 2011; RINALDI et al., 2012).

A hiperfagia é descrita como uma das características dos animais hiper nutridos por redução de ninhada durante o período lactacional (PLAGEMANN et al., 1999b). No entanto, ao analisarmos a curva de consumo alimentar observamos que nossos animais NRSED não apresentaram hiperfagia até os 90 dias de vida. A ausência desta característica pode ser observada em outros trabalhos relacionados à redução de ninhada (NERY et al., 2011; XIAO et al., 2007). De acordo com a literatura o comportamento hiperfágido dos animais programados metabolicamente esta relacionado ao aumento da disponibilidade de nutrientes durante a lactação. Em que estes nutrientes desempenham importante papel na modulação do comportamento alimentar, alterando vias responsáveis pelo controle da fome e da saciedade (CUNHA, 2007; MCMILLEN; ADAM; MÜHLHÄUSLER, 2005; PLAGEMANN et al., 1999). Desta forma sugerimos que a disponibilidade de alimento aos animais reduzidos promoveu alterações metabólicas permanentes capazes de alterar o peso corporal, no entanto o aporte energético não foi suficiente para alterar de forma permanente regiões e vias neuronais capazes de torná-los hiperfágicos. Ainda podemos atrelar a falta de dados significativos para hiperfagia ao método utilizado para apresentar os dados, nossos dados são representados em relação ao peso. O mesmo resultado é observado por Xiao e colaboradores (2007) quando o consumo é normalizado para o peso corporal. O comportamento hiperfágico em animais metabolicamente programados durante a lactação é observado em trabalhos como de Cunha (2007), o qual comprovou que o aporte energético dos filhotes criados em ninhadas reduzidas era maior durante a fase adulta em relação aos animais de

ninhadas normais, visto que o leite de suas mães tinha maior conteúdo de gordura (GOMES et al., 2012; PLAGEMANN et al., 1999). O consumo de alimento não foi alterado em ambos os grupos exercitados. Este resultado também é descrito em estudos com animais obesos submetidos à dieta hiperlipídica e ao tratamento neonatal com MSG, submetidos a diferentes protocolos de exercício físico (SCOMPARIN et al., 2009; SPERETTA, 2011).

Atualmente o exercício físico vem sendo amplamente recomendado como forma preventiva e no tratamento de distúrbios metabólicos, presentes no quadro de DM2 e obesidade, visto que a prática de exercício físico regular é uma excelente ferramenta para a manutenção da homeostase glicêmica e a redução das dislipidemias (PAULI et al., 2009; SPERETTA, 2011). Em nossos resultados, o exercício foi capaz de reduzir a glicemia basal nos grupos NNEXE e NREXE, adicionalmente o exercício físico também promoveu a redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos nos grupos NNEXE e NREXE. O exercício físico promove a homeostase glicêmica por diferentes mecanismos. Dentre estes mecanismos está a melhora da sensibilidade à insulina pelos tecidos periféricos, visto que o exercício reduz os depósitos de gordura e diminui a expressão e/ou atividade de proteínas inflamatórias de efeito negativo à ação da insulina (PAULI et al., 2009). Esta melhora é comprovada em estudos com animais obesos submetidos a exercício voluntário (BRADLEY et al., 2008), a prática de esteira (VIEIRA et al., 2009), natação e treino de força (LEITE et al., 2013; SPERETTA, 2011). Adicionalmente, o aumento da captação da glicose durante o exercício ocorre através da ativação de vias independentes da insulina. Durante a contração muscular, o aumento do Ca^{2+} citosólico e a ativação da enzima AMPK desencadeiam vias que culminam no deslocamento das proteínas GLUT₄ e o aumento da captação da glicose (PAULI et al., 2009; RYDER; CHIBALIN; ZIERATH, 2001).

Assim como em nossos resultados a associação entre a prática de exercício físico e o restabelecimento do perfil lipídico em indivíduos e animais experimentais obesos é reportado em diversos estudos (BONIFÁCIO; CÉSAR, 2008; LEITE et al., 2013). Durante a prática do exercício físico a demanda energética muscular é suprida com os estoques de glicogênio muscular. No entanto, as reservas de glicogênio muscular são reduzidas progressivamente, então a demanda energética passa a ser suprida pela utilização dos estoques de lipídeos. O músculo esquelético passa a utilizar os estoques de gordura do próprio tecido, como os armazenados no

tecido adiposo além de triglicerídeos e AGL no plasma, para que sejam oxidadas e gerem energia necessária durante o esforço físico (BONIFÁCIO; CÉSAR, 2008; CURI et al., 2003).

5.2 EFEITOS HIPERALIMENTAÇÃO DURANTE A LACTAÇÃO E DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O PÂNCREAS ENDÓCRINO.

Outra característica descrita em modelos de obesidade em animais e humanos são as alterações morfológicas no pâncreas endócrino, decorrentes de adaptações do organismo para manter a normoglicemia em indivíduos obesos e em pré-diabéticos. Dentre as alterações está a proliferação e hiperplasia das células β , e conseqüente hipertrofia das ilhotas pancreáticas (LEITE; NETO, 2009; SLAVIN et al., 2010; THOLE et al., 2012). Nossos resultados histomorfométrico do pâncreas endócrino confirmam os dados da literatura, demonstrando que os animais com maior aporte de leite durante a lactação apresentaram número reduzido de ilhotas pancreáticas e aumento no diâmetro das mesmas. Thole et al. (2012) demonstraram que o desenvolvimento precoce da hipertrofia em ilhotas de camundongos criados em ninhadas reduzidas está presente logo após o desmame e persistente na vida adulta. A hipertrofia de ilhotas também é descrita em modelos genéticos de obesidade (SLAVIN et al., 2010) e em obesos MSG (LEITE et al., 2013).

Novamente nosso protocolo de exercício físico foi capaz de reverter às alterações histomorfológicas nas ilhotas pancreáticas dos grupos exercitados, comparado aos seus grupos controle sedentários. Ambos os grupos NNEXE e NREXE apresentaram redução na hipertrofia, além de apresentarem aumento no número das ilhotas pancreáticas. Em ratos diabéticos, Rawal et al. (2013) não observou alterações na morfologia das ilhotas pancreáticas, no entanto houve melhora no conteúdos de insulina nas células β . Nossos resultados corroboram com outros trabalhos em que se observou a redução da hipertrofia das ilhotas de animais obesos submetidos ao exercício (LEITE et al., 2013; MARQUES et al., 2010). Diversos trabalhos descrevem o mecanismo compensatório das células β para manter a normoglicemia, dentre eles a proliferação e hiperplasia das células β para elevar a produção de insulina (GUILHERME et al., 2008; MUOIO; NEWGARD, 2008). Assim, esta redução no diâmetro das ilhotas pancreáticas pode estar relacionada aos efeitos do exercício físico sobre o aumento da sensibilidade

periférica à insulina e aumento da captação da glicose independente de insulina. O que reduz a necessidade de síntese e secreção de insulina pelas células β e consequente redução da hipertrofia das células β e consequentemente das ilhotas pancreáticas. Embora a literatura reporte o aumento da massa de células β em função do exercício físico (PARK et al., 2007), em nossos resultados os grupos exercitados apresentaram aumento do número de ilhotas pancreáticas, sendo necessários estudos aprofundados para se compreender de que forma o exercício pode intervir promovendo a proliferação das ilhotas.

Durante o período pós-natal, o pâncreas endócrino é um dos órgãos que tende a sofrer grande interferência do meio, sua formação e adaptação as condições extra-uterinas exigem processos altamente complexos necessários para a diferenciação e manutenção de diferentes linhagens celulares (GITTES; PRASADAN; TULACHAN, 2010). Estudos a cerca do desenvolvimento pancreático relacionam fatores ambientais associados à pré-disposição ao desenvolvimento de doenças como o DM1 e DM2 durante algum período da vida (HANLEY et al., 2010; HUMMEL et al., 2004). Os autores Waterland e Garza (2002) defendem que o pâncreas é um órgão primário afetado no modelo de programação metabólica induzida pela redução de ninhada, e que estas alterações estão ligadas a distúrbios na secreção de insulina.

Em nossos experimentos de incubação das ilhotas *in vitro*, podemos observar alterações na resposta da secreção de insulina estimulada por glicose, em especial redução de resposta a elevadas condições de estímulo. Este resultado corrobora em partes com os resultados apresentados por Waterland e Garza (2002), os quais demonstraram que animais de ninhadas reduzidas aos 280 dias apresentam baixa resposta aos estímulos em altas concentrações de glicose. Os autores justificam a baixa responsividade das células β ao estímulo da glicose em altas concentrações devido às alterações como redução de receptores para colecistocinina (CCK) e em genes responsáveis pela formação de subunidades das bombas ATPase mitocondrial e Ca^{2+} ATPase, observadas nos animais oriundos de ninhadas reduzidas. No entanto, outros trabalhos mostram resultados contraditórios, apontando aumento da responsividade ao estímulo da glicose (CUNHA, 2007; SRINIVASAN et al., 2003). Esta contradição quanto aos resultados podem estar ligados as diferentes intervenções às quais os animais foram submetidos além do número de prole por ninhada. Theys et al. (2009) demonstram em estudos com

animais nascidos de mães desnutridas que a resposta de enzima antioxidantes presentes no pâncreas são sensíveis à manipulações nutricionais durante o período de lactação. Os autores demonstram que estes filhotes são mais vulneráveis ao estresse oxidativo. Desta forma podemos considerar a hipótese que o maior aporte de leite durante a lactação afeta a produção de espécies reativas no pâncreas destes animais.

Outra alteração descrita na literatura, que leva a diferentes respostas na secreção de insulina estimulada pela glicose é o aumento da atividade ou expressão das proteínas mitocondrial desacopladora subtipo 2 (UCP₂) em ilhotas. Em experimentos com ratos *ob/ob knockout* para UCP₂, observou-se que as proteínas UCP₂ desempenham um papel importante na regulação negativa na secreção de insulina estimulada por glicose. Neste estudo os animais *knockout* para UCP₂ apresentaram aumento de secreção de insulina frente aos estímulos da glicose, pois, UCP₂ promovem retorno dos H⁺ ao citoplasma mitocondrial e consequente redução na produção de ATP (ZHANG et al., 2001). Em animais programados metabolicamente por redução de ninhada foi comprovado por Bernardo (2011) que há aumento nas UCP₂ em cardiomiócitos. No entanto, não há descrição de alterações das UCP₂ em ilhotas pancreáticas. Embora não haja comprovações desta alteração no pâncreas, já está comprovado que animais de ninhadas reduzidas têm alterações nas UCP₁ no TAM e UCP₂ em cardiomiócitos, criando indícios de que seja possível a alterações nas UCP₂ nas ilhotas de animais super nutridos durante a lactação. Esta hipótese não deve ser descartada, havendo a necessidade de mais estudos a cerca das alterações mitocondriais em animais super nutridos no período pós-natal. Esta redução na secreção de insulina estimulada pela glicose pode ter origem também em decorrência a disfunção na produção dos níveis das espécies reativas de oxigênio (EROS). Os EROS tem papel duplo na modulação das células β , quando em baixos níveis estes contribuem estimulando a secreção. No entanto em altos níveis, promove estresse oxidativo causando a disfunção na secreção de insulina (CALEGARI et al., 2011).

Adicionalmente, durante elevadas concentrações de glicose ocorre a ativação de uma via independente dos canais de KATP, cujos mecanismos nas células beta ainda não estão completamente esclarecidos (STRAUB; SHARP, 2002). Ilhotas de roedores obesos apresentam alterações nestas vias independentes (GRASSIOLLI et al., 2006), assim não podemos descartar a possibilidade de a redução na

responsividade a glicose observada em ilhotas de animais supernutridos ser promovida por alterações nesta via.

Durante a prática de exercício físico, mecanismos de captação da glicose independentes da insulina são ativos. Assim, o organismo tende a captar mais glicose sem exigir a sobrecarga das células β com o aumento da produção de insulina. Desta forma, o metabolismo celular se reorganiza adequando-se as novas condições fisiológicas decorrentes da prática de exercício físico (CALEGARI et al., 2012; CALEGARI et al., 2011). Em nosso experimento, as ilhotas do grupo NNEXE incubadas com diferentes concentrações de glicose apresentaram redução da secreção de insulina em resposta a alta concentração de glicose (28,0 mM). Nossos resultados estão de acordo com os dados descritos por outros estudos que registraram a redução de até 50% na secreção de insulina de ratos normais submetidos à prática de exercício (CALEGARI et al., 2011; UEDA et al., 2003; ZOPPI et al., 2011). Esta resposta reduzida ao estímulo da glicose em animais exercitados é descrito por diversos estudos como uma adaptação do organismo promovendo o aumento da captação de glicose independente de insulina e o aumento da sensibilidade a insulina dos tecidos periféricos, o que requer menor produção e secreção de insulina. Além disso, embora não esteja bem estabelecido, sabe-se que as células β também sofrem alterações intracelulares que promovem a redução da secreção de insulina. Esta resposta diminuída à glicose contribui reduzindo o estresse celular, aumentando a sobrevivência e funcionalidade das células β (CALEGARI et al., 2012). Dentre as adaptações que o exercício físico promove nas células β está o equilíbrio dos níveis das espécies reativas de oxigênio (EROS). Em trabalhos com animais normais submetidos ao exercício físico houve aumento da atividade das enzimas antioxidantes, reduzindo o stress oxidativo e restabelecimento da secreção de insulina. Adicionalmente, trabalhos têm descrito que exercício pode promover alterações como baixa concentração da enzima glicoquinase, redução do mRNA da pró-insulina e redução dos GLUT₂ nas ilhotas pancreáticas. Redução da glicoquinase e GLUT₂ reduz a síntese de ATP intracelular, o que ativa a via AMPK nas células β . A AMPK por sua vez ativa vias que regulam positivamente o aumento das UCP2, tendo consequente redução da secreção de insulina (CALEGARI et al., 2011).

Nos animais de ninhadas reduzidas (NREXE) nosso protocolo de exercício físico também foi capaz de restabelecer a secreção de insulina das ilhotas. Observamos

que em altas concentrações de glicose (16,7; 20,0 e 28,0 mM) o exercício físico reverteu à baixa secreção de insulina estimulada por glicose, sugerimos que este fato pode estar relacionado à redução do stress oxidativo. Em diferentes estudos com animais diabéticos submetidos ao exercício físico, foi observado aumento da quantidade de insulina nas células β , aumento na secreção de insulina frente a baixas concentrações de glicose, além do aumento das enzimas antioxidantes reduzindo o estresse oxidativo (COSKUN et al., 2004; STEHNO-BITTEL, 2011). Adicionalmente, o exercício físico também é capaz de promover a redução dos infiltrados inflamatórios presentes no pâncreas endócrino em modelos de ratos diabéticos (TEIXEIRA DE LEMOS et al., 2009). Como descrito, animais super nutridos durante a lactação apresentam infiltrados inflamatórios das ilhotas pancreáticas. Sugerimos desta forma que o exercício físico pode ter reduzido o perfil inflamatório das ilhotas pancreáticas restabelecendo a secreção de insulina.

Como descrito anteriormente, animais de ninhadas reduzidas apresentam desajuste no SNA, havendo a prevalência do SNP, sendo uma característica presente em outros modelos animais de obesidade (RINALDI et al., 2012). O desbalanço autonômico afeta diretamente a secreção de insulina, pois o neurotransmissor Ach liberado pelas terminações parassimpáticas no pâncreas endócrino é o principal potencializador da secreção de insulina. Como ponto chave do nosso trabalho, abordamos pela primeira vez a resposta da secreção de insulina de ilhotas isoladas dos animais super nutridos na lactação frente aos estímulos colinérgicos da Ach. Nossos resultados demonstram que animais do grupo NRSED apresentam redução da secreção de insulina frente a estímulos da Ach. Este dado corrobora com os resultados encontrados por Balbo et al. (2002) no modelo de obesidade MSG, os quais também têm redução da secreção de insulina frente aos estímulos da Ach, os autores sugerem que há redução dos receptores M3 nas ilhotas pancreáticas. Batista et al. (2012), também observou que animais com redução de proteína da dieta apresentam redução na secreção de insulina frente aos estímulos do carbacol (agente colinérgico), visto que estes animais apresentam redução nos receptores M3. Embora o principal receptor presente nas células β seja o M3, estudos com células tumorais realizados por Miguel et al., (2002) demonstram que a Ach pode exercer efeitos inibitórios na secreção de insulina quando ativa receptores M2 e M4. Grassioli et al. (2007) em estudos com animais obesos MSG sugere que a ativação dos receptores M2 podem ser a chave para a baixa resposta

destes animais obesos aos estímulos da Ach. Adicionalmente, Oliveira e colaboradores (2013) sugerem que animais alimentados com baixa quantidade de proteína na adolescência apresentam redução da secreção de insulina frente aos estímulos da Ach por apresentar alteração nos subtipos de receptores muscarínicos (DE OLIVEIRA et al., 2013). Nossos resultados de Western Blotting não apontaram diferença na expressão do receptor M3 e da PLC β (principal via ativa pela Ach) em ilhotas isoladas no grupo supernutrido. Desta forma, sugerimos que a redução de ninhada pode ser capaz de promover alterações quanto à proporção e funcionalidade dos subtipos de receptores muscarínicos presente nas células β .

Como já estão bem estabelecido na literatura, as duas divisões autonômicas tem efeitos opostos sobre a secreção de insulina. Em que a divisão parassimpática prevalentemente estimula a secreção de insulina e a simpática inibe. Adicionalmente sabe-se que o exercício físico modula as divisões autonômicas, em que promove a prevalência simpática. Em nossos experimentos o grupo NNEXE apresentou redução na secreção de insulina estimulada com diferentes concentrações de Ach. Nossos resultados demonstram que os animais NNEXE apresentam redução dos receptores M3 em suas ilhotas o que justifica a redução da secreção de insulina observada. Sugerimos ainda que a redução na secreção de insulina possa estar ligada a outras adaptações celulares devido à prevalência simpática dos animais submetidos ao exercício físico precocemente. Esta redução no estímulo parassimpático sobre as células β pode ser observado também no modelo de vagotomia subdiafragmática e modelo *knockout* para o M3, os quais apresentam redução na secreção de insulina (BALBO et al., 2000; GAUTAM et al., 2007). Adicionalmente, em nossos resultados de Western Blotting para a proteína PLC β não houve diferença significativa entre o grupo NNEXE e NNSD. Desta forma estudos mais aprofundados sobre os efeitos do exercício físico nas ilhotas de animais exercitados precisam ser realizados.

Não há registros na literatura de estudos descrevendo o efeito do exercício físico crônico sobre a ação potencializadora da Ach em modelos de programação metabólica. Em nosso estudo nos grupos de animais NREXE observamos que, o exercício potencializou o efeito inibitório da Ach que foi observado nos animais sedentários supernutridos sobre as ilhotas pancreáticas. Sugerimos que alterações na composição e funcionalidade nos tipos de receptores muscarínicos, possam estar ligadas a estas respostas alteradas. Em especial alterações funcionais no receptor

M3. Adicionalmente consideramos que a resposta reduzida a Ach está relacionada a uma adaptação celular, em virtude do exercício físico crônico, para controle da secreção de insulina, reduzindo as possíveis hipoglicemias se somados os efeitos do exercício físico à ação da Ach no pâncreas endócrino.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho confirma que a redução de ninhada é capaz de promover obesidade na vida adulta, reduz a secreção de insulina estimulada por glicose e pela Ach, além de promover o aumento do tecido adiposo branco. A natação precoce foi efetiva em evitar a instalação da obesidade, corrigir a secreção de insulina estimulada por glicose. No entanto, o treinamento de natação não altera o efeito inibitório colinérgico observado em ilhotas de ratos supernutridos.

7. REFERÊNCIAS

- AALINKEEL, R. et al. A dietary intervention (high carbohydrate) during the neonatal period causes islet dysfunction in rats. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v. 277, n. 6, p. E1061-E1069, 1999.
- ACHARD, V. et al. Perinatal programming of central obesity and the metabolic syndrome: role of glucocorticoids. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 4, n. 2, p. 129-137, 2006.
- AHREN, B. Autonomic regulation of islet hormone secretion—implications for health and disease. **Diabetologia**, v. 43, n. 4, p. 393-410, 2000.
- AHRÉN, B.; WIERUP, N.; SUNDLER, F. Neuropeptides and the regulation of islet function. **Diabetes**, v. 55, n. Supplement 2, p. S98-S107, 2006.
- ALMEIDA, F. N. et al. Physical exercise and pancreatic islets. **Islets**, v. 4, n. 4, p.296-301, 2012a.
- _____. Physical exercise and pancreatic islets: Acute and chronic actions on insulin secretion. **Islets**, v. 4, n. 4, p. 296-301, 2012b.
- AMARAL, M. et al. Prolactin-signal transduction in neonatal rat pancreatic islets and interaction with the insulin-signaling pathway. **Hormone and Metabolic Research**, v. 35, n. 05, p. 282-289, 2003.
- AZUA, I. R. D. et al. Novel insights into the function of β -cell M3 muscarinic acetylcholine receptors: therapeutic implications. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 2, p. 74-80, 2011.
- BALABAN, G.; SILVA, G. A. Efeito protetor do aleitamento materno contra a obesidade infantil. **Journal of Pediatrics (Rio J)**, v. 80, n. 1, p. 7-16, 2004.
- BALBO, S. et al. Parasympathetic activity changes insulin response to glucose and neurotransmitters. **Diabetes & Metabism**, v. 28, n. 6 Pt 2, p. 3S13, 2002.
- BALBO, S. et al. Vagotomy reduces obesity in MSG-treated rats. **Research Communications in Molecular Pathology & Pharmacology**, v. 108, n. 5-6, p. 291, 2000.

BARDEESY, N.; DEPINHO, R. A. Pancreatic cancer biology and genetics. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 12, p. 897-909, 2002.

BARKER, D. Obesity and early life. **Obesity Reviews**, v. 8, n. s1, p. 45-49, 2007.

BASTARD, J.-P. et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **European Cytokine Network**, v. 17, n. 1, p. 4-12, 2006.

BATESON, P. et al. Developmental plasticity and human health. **Nature**, v. 430, n. 6998, p. 419-421, 2004.

BATISTA, T. M. et al. Taurine supplementation restores glucose and carbachol-induced insulin secretion in islets from low-protein diet rats: involvement of Ach-M3R, Synt 1 and SNAP-25 proteins. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 3, p. 306-312, 2012.

BEAUDRY, J. L.; RIDDELL, M. C. Effects of glucocorticoids and exercise on pancreatic β -cell function and diabetes development. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 28, n. 7, p. 560-573, 2012.

BEDI, M.; KHULLAR, S.; VARSHNEY, V. Assessment of Autonomic Function Activity in Obese Children. **Vascular Disease Prevention**, v. 6, p. 139-141, 2009.

BENGTTSSON, T.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Gene structure and expression-Differential adrenergic regulation of the gene expression of the b-adrenoceptor subtypes b1, b2 and b3 in brown adipocytes. **Biochemical Journal**, v. 347, n. 3, p. 643-652, 2000.

BENOIT, S. C. et al. Insulin and leptin as adiposity signals. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 59, n. 1, p. 267-285, 2004.

BERLEZE, K. J. **Efeitos de diferentes dietas sobre o metabolismo de lipídeos e de carboidratos em ratas normonutridas e desnutridas**. 2005. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2005.

BERNARDIS, L.; PATTERSON, B. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527-528, 1968.

BERNARDO, A. F. **Estudo da bioenergética mitocondrial de cardiomiócitos de camundongos obesos** 2011. Fisiopatologia Clínica e experimental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

BERTHOUD, H.-R. The neurobiology of food intake in an obesogenic environment. **Proceedings Of The Nutrition Society**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2012.

BOGAN, J. S. Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, p. 507-532, 2012.

BOGUSZEWSKI, C. L.; PAZ-FILHO, G.; VELLOSO, L. A. Neuroendocrine body weight regulation: integration between fat tissue, gastrointestinal tract, and the brain. **Endokrynologia Polska**, v. 61, n. 2, p. 194-206, 2010.

BONIFÁCIO, N. P. A.; CÉSAR, T. B. Metabolismo dos lípidos durante o exercício físico. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 13, n. 4, p. 101-106, 2008.

BOULLU-CIOCCA, S. et al. Postnatal programming of glucocorticoid metabolism in rats modulates high-fat diet-induced regulation of visceral adipose tissue glucocorticoid exposure and sensitivity and adiponectin and proinflammatory adipokines gene expression in adulthood. **Diabetes**, v. 57, n. 3, p. 669-677, 2008.

BOURET, S.; SIMERLY, R. Development of Leptin-Sensitive Circuits. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 19, n. 8, p. 575-582, 2007.

BOURET, S. G. Early life origins of obesity: role of hypothalamic programming. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 48, p. S31-S38, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, R. L. et al. Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, n. 3, p. E586-E594, 2008.

BRATANOVA-TOCHKOVA, T. K. et al. Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. **Diabetes**, v. 51, n. suppl 1, p. S83-S90, 2002.

BRAY, G. A. Medical consequences of obesity. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2583-2589, 2004.

BRYANT, N. J.; GOVERS, R.; JAMES, D. E. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 4, p. 267-277, 2002.

CALEGARI, V. C. et al. Endurance training stimulates growth and survival pathways and the redox balance in rat pancreatic islets. **Journal of Applied Physiology**, v. 112, n. 5, p. 711-718, 2012.

CALEGARI, V. C. et al. Endurance training activates AMP-activated protein kinase, increases expression of uncoupling protein 2 and reduces insulin secretion from rat pancreatic islets. **Journal of Endocrinology**, v. 208, n. 3, p. 257-264, 2011.

CANCELLO, R. et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. **Diabetes**, v. 54, n. 8, p. 2277-2286, 2005.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 277-359, 2004.

CARDOSO, D. E. et al. Avaliação morfológica e dos mecanismos de mobilização de Ca²⁺ pela glicose e acetilcolina em células pancreáticas humanas; Morphologic evaluation and Ca²⁺ mobilization by glucose and acetylcholine in human pancreatic cells. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 3, p. 431-436, 2007.

CARVALHEIRA, J. B. et al. Cross-Talk between the Insulin and Leptin Signaling Systems in Rat Hypothalamus**. **Obesity Research**, v. 13, n. 1, p. 48-57, 2005.

CARVALHEIRA, J. B.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CESARETTI, M. L. R.; KOHLMANN JUNIOR, O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas; Experimental models of insulin resistance and obesity: lessons learned. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 190-197, 2006.

COELHO, E. R. et al. Metabolismo embrionário no período pré-implantação; Preimplantation embryo metabolism. **Femina**, v. 34, n. 8, p. 551-557, 2006.

CONCEIÇÃO, E. P. et al. Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition—role of insulin resistance. **The Journal of nutritional biochemistry**, 2012.

COSKUN, O. et al. Exercise training prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 3, p. 145-154, 2004.

COTTRELL, E. C.; OZANNE, S. E. Developmental programming of energy balance and the metabolic syndrome. **Proceedings Of The Nutrition Society**, v. 66, n. 2, p. 198-206, 2007.

CUNHA, A. C. D. S. R. **Influência da hiperalimentação na lactação sobre o processo de estímulo-secreção de insulina in vitro.** 2007. 53 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

CURI, R. et al. Uma etapa limitante para a oxidação de ácidos graxos durante o exercício aeróbio: o ciclo de Krebs. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 11, p. 87-94, 2003.

DAMIANI, D.; DAMIANI, D.; DE MENEZES FILHO, H. C. Controle do apetite: mecanismos metabólicos e cognitivos. **Pediatria**, v. 32, n. 3, p. 222, 2010.

DAVIDOWA, H.; LI, Y.; PLAGEMANN, A. Hypothalamic ventromedial and arcuate neurons of normal and postnatally overnourished rats differ in their responses to melanin-concentrating hormone. **Regulatory Peptides**, v. 108, n. 2, p. 103-111, 2002.

DAVIDOWA, H.; PLAGEMANN, A. Different responses of ventromedial hypothalamic neurons to leptin in normal and early postnatally overfed rats. **Neuroscience Letters**, v. 293, n. 1, p. 21-24, 2000.

DE COURTEN, B. V. et al. Parasympathetic blockade attenuates augmented pancreatic polypeptide but not insulin secretion in Pima Indians. **Diabetes**, v. 53, n. 3, p. 663-671, 2004.

DE MOURA, E.; LISBOA, P.; PASSOS, M. Neonatal programming of neuroimmunomodulation—role of adipocytokines and neuropeptides. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n. 3, p. 176-188, 2008.

DE OLIVEIRA, C. A. M. et al. Exercise at anaerobic threshold intensity and insulin secretion by isolated pancreatic islets of rats. **Islets**, v. 2, n. 4, p. 240-246, 2010.

DE OLIVEIRA, J. C. et al. Poor pubertal protein nutrition disturbs glucose-induced insulin secretion process in pancreatic islets and programs rats in adulthood to increase fat accumulation. **Journal of Endocrinology**, v. 216, n. 2, p. 195-206, 2013.

DE QUEIROZ, J. C. F. et al. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 53, n. 5, p. 582, 2009.

EGUCHI, R. et al. Efeitos do exercício crônico sobre a concentração circulante da leptina e grelina em ratos com obesidade induzida por dieta; Effects of the chronic exercise on the circulating concentration of leptin and ghrelin in rats With diet-induced obesity. **Revista brasileira de medicina do esporte**, v. 14, n. 3, p. 182-187, 2008.

FAUST, I. M.; JOHNSON, P. R.; HIRSCH, J. Long-term effects of early nutritional experience on the development of obesity in the rat. **The Journal of nutrition**, v. 110, n. 10, p. 2027-2034, 1980.

FRANKENFELD, S. P. **Efeitos do treinamento em esteira em ratos obesos programados pela superalimentação pós-natal**. 2009. 52 f. Dissertação Fisiopatologia Clínica e Experimental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

GAROFANO, A.; CZERNICHOW, P.; BREANT, B. Beta-cell mass and proliferation following late fetal and early postnatal malnutrition in the rat. **Diabetologia**, v. 41, n. 9, p. 1114-1120, 1998.

GAUTAM, D. et al. Role of the M3 muscarinic acetylcholine receptor in β -cell function and glucose homeostasis. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 9, n. s2, p. 158-169, 2007.

GITTES, G. K.; PRASADAN, K.; TULACHAN, S. Pancreas and islet development. In: (Ed.). **Stem Cell Therapy for Diabetes**: Springer, 2010. p.3-40.

GOBATTO, C. A. et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 130, n. 1, p. 21-27, 2001.

GOMES, R. M. et al. Efeito de um programa de exercício físico moderado em ratos de diferentes modelos de obesidade-doi: 10.4025/reveducfis. v23i2. 13242. **Revista da Educação Física/UEM**, v. 23, n. 2, p. 285-294, 2012.

GOTTLIE, M. G. V. et al. Aspectos genéticos do envelhecimento e doenças associadas: uma complexa rede de interações entre genes e ambiente. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 10, n. 3, 2007.

GRASSIOLLI, S. et al. Pancreatic islets from hypothalamic obese rats maintain KATP+ channel-dependent but not-independent pathways on glucose-induced insulin release process. **Endocrine**, v. 30, n. 2, p. 191-196, 2006.

GRASSIOLLI, S.; GRAVENA, C.; DE FREITAS MATHIAS, P. C. Muscarinic M2 receptor is active on pancreatic islets from hypothalamic obese rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 556, n. 1, p. 223-228, 2007.

GRINO, M. Prenatal nutritional programming of central obesity and the metabolic syndrome: role of adipose tissue glucocorticoid metabolism. **American Journal of**

Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 289, n. 5, p. R1233-R1235, 2005.

GROSS, J. L. et al. Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.

GROVE, K. L. et al. Development of metabolic systems. **Physiology & Behavior**, v. 86, n. 5, p. 646-660, 2005.

GUILHERME, A. et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 367-377, 2008.

GUILLOTEAU, P. et al. Adverse effects of nutritional programming during prenatal and early postnatal life, some aspects of regulation and potential prevention and treatments. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, n. Suppl 3, p. 17-35, 2009.

HABER, E. P. et al. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 3, p. 219-227, 2001.

HAGA, T. Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. **Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences**, v. 89, n. 6, p. 226-256, 2012.

HANLEY, B. et al. Metabolic imprinting, programming and epigenetics-a review of present priorities and future opportunities. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. S1, p. S1-S25, 2010.

HANSON, M. et al. Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: theoretical considerations and epigenetic mechanisms. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 106, n. 1, p. 272-280, 2011.

HAWLEY, J.; LESSARD, S. Exercise training-induced improvements in insulin action. **Acta physiologica**, v. 192, n. 1, p. 127-135, 2008.

HENQUIN, J.; NENQUIN, M. The muscarinic receptor subtype in mouse pancreatic B-cells. **FEBS Lett**, v. 236, n. 1, p. 89-92, 1988.

HERMSDORFF, H. H.; MONTEIRO, J. B. Visceral, subcutaneous or intramuscular fat: where is the problem? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 6, p. 803-811, 2004.

HUANG, S.; CZECH, M. P. The GLUT4 glucose transporter. **Cell metabolism**, v. 5, n. 4, p. 237-252, 2007.

HUMMEL, M. et al. Brief communication: early appearance of islet autoantibodies predicts childhood type 1 diabetes in offspring of diabetic parents. **Annals of Internal Medicine**, v. 140, n. 11, p. 882-886, 2004.

IIISMAA, T. P. et al. Quantitative and functional characterization of muscarinic receptor subtypes in insulin-secreting cell lines and rat pancreatic islets. **Diabetes**, v. 49, n. 3, p. 392-398, 2000.

ISHII, M.; KURACHI, Y. Muscarinic acetylcholine receptors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 28, p. 3573-3581, 2006.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840-846, 2006.

KARGAR, C.; KTORZA, A. Anatomical versus functional β -cell mass in experimental diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 10, n. s4, p. 43-53, 2008.

KOWLURU, A. Small G proteins in islet β -cell function. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 1, p. 52-78, 2010.

LACY, P. E.; KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, v. 16, n. 1, p. 35-39, 1967.

LEIBIGER, I. B.; LEIBIGER, B.; BERGGREN, P.-O. Insulin feedback action on pancreatic β -cell function. **FEBS Lett**, v. 532, n. 1, p. 1-6, 2002.

_____. Insulin signaling in the pancreatic β -cell. **Annual Review of Nutrition**, v. 28, p. 233-251, 2008.

LEITE, L.; NETO, J. Integração Neuroendócrina na Regulação da Ingestão Alimentar. **Neurobiologia**, v. 72, n. 2, 2009.

LEITE, N. C. et al. Glycolytic and Mitochondrial Metabolism in Pancreatic Islets from MSG-Treated Obese Rats Subjected to Swimming Training. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 31, n. 2-3, p. 242-256, 2013.

LEVIN, B. E. Metabolic imprinting on genetically predisposed neural circuits perpetuates obesity. **Nutrition**, v. 16, n. 10, p. 909-915, 2000a.

_____. The obesity epidemic: metabolic imprinting on genetically susceptible neural circuits. **Obesity Research**, v. 8, n. 4, p. 342-347, 2000b.

_____. Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1471, p. 1107-1121, 2006.

LUCAS, A. Programming not metabolic imprinting. **The American journal of clinical nutrition**, v. 71, n. 2, p. 602-602, 2000.

MACDONALD, P. E.; JOSEPH, J. W.; RORSMAN, P. Glucose-sensing mechanisms in pancreatic β -cells. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1464, p. 2211-2225, 2005.

MARIATH, A. B. et al. Obesidade e fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis entre usuários de unidade de alimentação e nutrição. **Caderno de Saude Publica**, v. 23, n. 4, p. 897-905, 2007.

MARKUS, A. Neurobiology of obesity. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 551-551, 2005.

MARQUES, C. et al. Beneficial effects of exercise training (treadmill) on insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in high-fat fed C57BL/6 mice. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 5, p. 467-475, 2010.

MCCANCE, R. A.; WIDDOWSON, E. M. The composition of foods. **Medical Research Council - Specification**, n. 235., 1960.

MCMILLEN, I. C.; ADAM, C. L.; MÜHLHÄUSLER, B. S. Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. **The Journal of physiology**, v. 565, n. 1, p. 9-17, 2005.

MOHAMED MAHMOUD EID, H. Antidiabetic activity of *Vaccinium vitis-idaea*, a medicinal plant from the traditional pharmacopeia of the James Bay Cree. 2010.

MOURA, V.; MONTEIRO, R. Papel do tecido adiposo na inflamação e metabolismo do doente obeso. **Alimentação Humana**, v. 16, n. 1, 2010.

MOURA VI; RI, M. PAPEL DO TECIDO ADIPOSEO NA INFLAMAÇÃO E METABOLISMO DO DOENTE OBESO. **Revista da Sociedade Portuguesa de ciências da Nutrição e alimentação**, v. 16, n. 1, p. 15-22, 2010.

MUOIO, D. M.; NEWGARD, C. B. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes. **Nature Reviews molecular cell biology**, v. 9, n. 3, p. 193-205, 2008.

NAGAI, N.; MORITANI, T. Effect of physical activity on autonomic nervous system function in lean and obese children. **International Journal of Obesity**, v. 28, n. 1, p. 27-33, 2004.

NAKANO K et al. Intracellular $\text{Ca}(2+)$ modulation of ATP-sensitive $\text{K}(+)$ channel activity in acetylcholine-induced activation of rat pancreatic beta-cells. **Endocrinology**, v. 143, n. 2, p. 569-579, 2002.

NERY, C. D. S. et al. Medidas Murinometricas e Eficiência Alimentar em Ratos Provenientes de Ninhadas Reduzidas na Lactação e Submetidos ou Não ao Exercício de Natação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 1, p. 49-55, 2011.

NOVAES, J. F. D. et al. Efeitos a curto e longo prazo do aleitamento materno na saúde infantil* Effects of breastfeeding on children's health in the short and long run. **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 34, n. 2, p. 139-160, 2009.

OH-ISHI, S. et al. Swimming training improves brown-adipose-tissue activity in young and old mice. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 89, n. 2, p. 67-78, 1996.

OLIVER-KRASINSKI, J. M.; STOFFERS, D. A. On the origin of the beta cell. **Genes & Development**, v. 22, n. 15, p. 1998-2021, 2008.

ONG, K. K. et al. Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. **BMJ**, v. 320, n. 7240, p. 967-971, 2000.

PARK, S. et al. Exercise improves glucose homeostasis that has been impaired by a high-fat diet by potentiating pancreatic β -cell function and mass through IRS2 in diabetic rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 5, p. 1764-1771, 2007.

PATEL, M. S.; SRINIVASAN, M. Metabolic programming in the immediate postnatal life. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 58, n. Suppl. 2, p. 18-28, 2011.

PAULI, J. R. et al. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 53, p. 399-408, 2009.

PAULI, J. R. et al. Glicocorticóides e síndrome metabólica: aspectos favoráveis do exercício físico nesta patofisiologia. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v. 6, n. 2, p. 217-228, 2006.

PLAGEMANN, A. Perinatal programming and functional teratogenesis: impact on body weight regulation and obesity. **Physiology & Behavior**, v. 86, n. 5, p. 661-668, 2005.

PLAGEMANN, A. et al. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. **Brain Research**, v. 836, n. 1, p. 146-155, 1999b.

PLAGEMANN, A. et al. Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 11, n. 7, p. 541-546, 1999.

PLAGEMANN, A. et al. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 99, n. 03, p. 154-158, 1992.

PROENÇA, A. R. Efeitos de uma sessão aguda de exercício físico e do treino sobre a atividade metabólica de diferentes territórios adiposos de ratos wistar. **Dissertação de Mestrado**, 2010.

QUEIROGA, M. R. Utilização de medidas antropométricas para determinação da distribuição da gordura corporal. **Revista brasileira de atividade física e saúde**, v. 3, n. 1, p. 37-47, 1998.

RAMADAN, J. W. et al. The central role of calcium in the effects of cytokines on beta-cell function: implications for type 1 and type 2 diabetes. **Cell Calcium**, v. 50, n. 6, p. 481-490, 2011.

RAMALHO, R.; GUIMARÃES, C. Papel do tecido adiposo e dos macrófagos no estado de inflamação crônica associada à obesidade: implicações clínicas. **Acta Med Port**, v. 21, n. 5, p. 489-96, 2008.

RAVAGNANI, F. C. D. P. et al. Effects of high fat diets with baru extract and chocolate on adipocyte area of rats subjected to physical exercise. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 18, n. 3, p. 190-194, 2012.

RAVELLI, G.-P.; STEIN, Z. A.; SUSSER, M. W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **The New England journal of medicine**, v. 295, n. 7, p. 349, 1976.

RAWAL, S. et al. Effect of Exercise on Pancreatic Islets in Zucker Diabetic Fatty Rats. **Journal of Diabetes & Metabolism**, 2013.

REMACLE, C. et al. Intrauterine programming of the endocrine pancreas. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 9, n. s2, p. 196-209, 2007.

RINALDI, W. et al. Effect of small litter size on the autonomic and metabolic responses of Wistar rats. **Revista de Nutrição**, v. 25, n. 3, p. 321-330, 2012.

RODRIGUES, A. L. et al. Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic–pituitary–thyroid axis of young and adult rats. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 11, p. 2647-2661, 2009.

RODRIGUES, A. L. et al. Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. **Journal of Endocrinology**, v. 195, n. 3, p. 485-494, 2007.

RODRIGUES, A. M.; SUPPLY, H. L.; RADOMINSKI, R. B. Neuroendocrine control of food intake: implications in the genesis of obesity. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 4, p. 398-409, 2003.

ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Reviews of Nutrition**, v. 19, n. 1, p. 85-91, 2006.

RYDER, J.; CHIBALIN, A.; ZIERATH, J. Intracellular mechanisms underlying increases in glucose uptake in response to insulin or exercise in skeletal muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 171, n. 3, p. 249-257, 2001.

SAGAWA, N. et al. Role of leptin in pregnancy—a review. **Placenta**, v. 23, p. S80-S86, 2002.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, 2001.

SARTORELLI, D. S.; FRANCO, L. J. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional. **Caderno de Saude Publica**, v. 19, n. s1, 2003.

SAVAGE, D. B.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation. **Hypertension**, v. 45, n. 5, p. 828-833, 2005.

SAWCHENKO, P. Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: the anatomists weigh in. **The Journal of comparative neurology**, v. 402, n. 4, p. 435-441, 1998.

SCHEURINK, A. et al. Experience affects exercise-induced changes in catecholamines, glucose, and FFA. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 256, n. 1, p. R169-R173, 1989.

SCHEURINK, A. J.; STEFFENS, A. B. Central and peripheral control of sympathoadrenal activity and energy metabolism in rats. **Physiology & Behavior**, v. 48, n. 6, p. 909-920, 1990.

SCHIMMACK, G.; DEFRONZO, R. A.; MUSI, N. AMP-activated protein kinase: role in metabolism and therapeutic implications. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 8, n. 6, p. 591-602, 2006.

SCOMPARIN, D. et al. Swim training applied at early age is critical to adrenal medulla catecholamine content and to attenuate monosodium L-glutamate-obesity onset in mice. **Life Sciences**, v. 79, n. 22, p. 2151-2156, 2006.

SCOMPARIN, D. X. et al. Autonomic activity and glycemic homeostasis are maintained by precocious and low intensity training exercises in MSG-programmed obese mice. **Endocrine**, v. 36, n. 3, p. 510-517, 2009.

SEINO, S. Cell signalling in insulin secretion: the molecular targets of ATP, cAMP and sulfonylurea. **Diabetologia**, v. 55, n. 8, p. 2096-2108, 2012.

SLAVIN, B. G. et al. Histological, immunocytochemical, and morphometrical analyses of pancreatic islets in the BSB mouse model of obesity. **The anatomical record**, v. 293, n. 1, p. 108-116, 2010.

SPERETTA, G. F. F. **Natação e treinamento de força influenciam sobre a expressão genica de marcadores inflamatórios tecido adiposo e perfil lipídico de ratos obesos**. 2011. 54 (Dissertação mestrado em Ciências Fisiológicas). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

SRINIVASAN, M. et al. Neonatal nutrition: metabolic programming of pancreatic islets and obesity. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, n. 1, p. 15-23, 2003.

STEHRN-BITTEL, L. Exercise increases insulin content and basal secretion in pancreatic islets in type 1 diabetic mice. **Journal of Diabetes Research**, v. 2011, 2011.

STEINER, D. J. et al. Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition. **Islets**, v. 2, n. 3, p. 135-145, 2010.

STRAUB, S. G.; SHARP, G. W. Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 18, n. 6, p. 451-463, 2002.

SUZUKI, K.; JAYASENA, C. N.; BLOOM, S. R. Obesity and appetite control. **Experimental diabetes research**, v. 2012, 2012.

SVIDNICKI, P. V. et al. Swim training restores glucagon-like peptide-1 insulinotropic action in pancreatic islets from monosodium glutamate-obese rats. **Acta Physiologica**, 2013.

TAYLOR, P.; POSTON, L. Developmental programming of obesity in mammals. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 2, p. 287-298, 2007.

TEIXEIRA DE LEMOS, E. et al. Exercise training decreases proinflammatory profile in Zucker diabetic (type 2) fatty rats. **Nutrition**, v. 25, n. 3, p. 330-339, 2009.

THEYS, N. et al. Early low protein diet aggravates unbalance between antioxidant enzymes leading to islet dysfunction. **PLoS One**, v. 4, n. 7, p. e6110, 2009.

THOLE, A. et al. Progenitor cells and TNF-alpha involvement during morphological changes in pancreatic islets of obese mice. **Tissue Cell**, 2012.

TRAEBERT, J. et al. Transição alimentar: problema comum à obesidade e à cárie dentária; Changing from breastfeeding to family feeding: a common problem for both obesity and dental caries. **Review of nutrition**, v. 17, n. 2, p. 247-253, 2004.

TSUCHIYA, M. et al. Chronic exercise enhances insulin secretion ability of pancreatic islets without change in insulin content in non-diabetic rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2012.

UEDA, H. et al. Enhanced expression of neuronal nitric oxide synthase in islets of exercise-trained rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 312, n. 3, p. 794-800, 2003.

UENO, N. et al. Effects of swimming training on brown-adipose-tissue activity in obese ob/ob mice: GDP binding and UCP m-RNA expression. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, v. 95, n. 1, p. 92-104, 1997.

VAGUE, J. The degree of masculine differentiation of obesities a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. **The American journal of clinical nutrition**, v. 4, n. 1, p. 20-34, 1956.

VAN DE SANDE-LEE, S. et al. Partial reversibility of hypothalamic dysfunction and changes in brain activity after body mass reduction in obese subjects. **Diabetes**, v. 60, n. 6, p. 1699-1704, 2011.

VIEIRA, V. J. et al. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. **American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism**, v. 296, n. 5, p. E1164-E1171, 2009.

VOSSelman, M. J.; VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D.; SCHRAUWEN, P. Energy dissipation in brown adipose tissue: from mice to men. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2013.

WAJCHENBERG, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 6, p. 697-738, 2000.

WALTER, J.; PAULSEN, M. Imprinting and disease. Seminars in cell & developmental biology, 2003, **Elsevier**. p.101-110.

WATERLAND, R. A.; GARZA, C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. **The American journal of clinical nutrition**, v. 69, n. 2, p. 179-197, 1999.

_____. Early postnatal nutrition determines adult pancreatic glucose-responsive insulin secretion and islet gene expression in rats. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 3, p. 357-364, 2002.

WYNNE, K. et al. Appetite control. **Journal of Endocrinology**, v. 184, n. 2, p. 291-318, 2005.

XIAO, X. Q. et al. Excess weight gain during the early postnatal period is associated with permanent reprogramming of brown adipose tissue adaptive thermogenesis. **Endocrinology**, v. 148, n. 9, p. 4150-4159, 2007.

YANG, X.; SMITH, U. Adipose tissue distribution and risk of metabolic disease: does thiazolidinedione-induced adipose tissue redistribution provide a clue to the answer? **Diabetologia**, v. 50, n. 6, p. 1127-1139, 2007.

ZAWALICH, W. S. et al. Effects of muscarinic receptor type 3 knockout on mouse islet secretory responses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 315, n. 4, p. 872-876, 2004.

ZECHHIN, H.; CARVALHEIRA, J. B. C.; SAAD, M. J. A. Mecanismos moleculares da resistência à insulina na síndrome metabólica. **Revista Sociedade de Cardiologia Estadual de São Paulo**, v. 14, p. 574-89, 2004.

ZHANG, C.-Y. et al. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, β cell dysfunction, and type 2 diabetes. **Cell**, v. 105, n. 6, p. 745-755, 2001.

ZHENG, S. **The effects of maternal nutrition on offspring gene regulation via epigenetic modulation**. 2011. 151 f. Dissertation Philosophy in Food Science & Human Nutrition, University of Illinois.

ZOPPI, C. C. et al. Exercise training enhances rat pancreatic islets anaplerotic enzymes content despite reduced insulin secretion. **European Journal of Applied Physiology**, v. 111, n. 9, p. 2369-2374, 2011.

8. APÊNDICE

APÊNDICE - A

Tabela. Dados numéricos das medidas histomorfométricas dos diferentes depósitos de tecido adiposo: efeito da redução do número de filhotes por ninhada e aplicação do exercício físico. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média; n=20-28 ratos por grupo. As letras e números na tabela representam a diferença significativa de $p < 0,05$ em análise de variância ANOVA, com pós teste *Bonferroni* entre pares selecionados, nos quais os grupos: ^aNNSD, ^bNNEXE, ^cNRSD e ^dNREXE.

	NNSD	NNEXE	NRSD	NREXE
Gordura Perigonadal				
Área (μm^2)	3673 $\pm$ 48,67 ^{b,c}	3058 $\pm$ 45,88 ^a	4143 $\pm$ 59,78 ^{a,d}	3375 $\pm$ 46,67 ^c
Nº célula/campo ²	68,45 $\pm$ 1,16 ^{b,c}	76,00 $\pm$ 2,23 ^a	58,18 $\pm$ 1,25 ^{a,d}	64,57 $\pm$ 1,61 ^c
Gordura Retroperitoneal				
Área (μm^2)	3653 $\pm$ 59,89 ^{b,c}	3059 $\pm$ 35,04 ^a	4289 $\pm$ 54,24 ^{a,d}	2897 $\pm$ 39,79 ^c
Nº célula/campo ²	61,89 $\pm$ 1,76 ^b	71,50 $\pm$ 1,60 ^a	59,00 $\pm$ 1,42 ^d	68,92 $\pm$ 1,02 ^c
Gordura Mesentérica				
Área (μm^2)	3192 $\pm$ 251,8 ^b	2447 $\pm$ 62,07 ^a	2955 $\pm$ 118,6	3177 $\pm$ 184,8
Nº célula/campo ²	198,1 $\pm$ 17,69 ^b	241,8 $\pm$ 6,56 ^a	211,4 $\pm$ 10,91	193,1 $\pm$ 11,24
Gordura Inguinal				
Área (μm^2)	2562 $\pm$ 51,77 ^{b,c}	2341 $\pm$ 21,69 ^a	3334 $\pm$ 113,7 ^{a,d}	2879 $\pm$ 43,48 ^c
Nº célula/campo ²	85,00 $\pm$ 3,51	87,69 $\pm$ 1,83	86,43 $\pm$ 8,86	80,55 $\pm$ 2,51
Gordura Marrom				
Nº célula/campo ²	125,5 $\pm$ 8,06 ^{b,c}	90,38 $\pm$ 6,97 ^a	93,50 $\pm$ 6,57 ^a	105,4 $\pm$ 7,63

9. ANEXOS



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

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

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 16/2012

Protocolo UEPG – 03482/2012

Título – “O exercício físico e o controle secretor de insulina na obesidade induzida por marcação metabólica”.

Interessado – Dra Sabrina Grassioli

Data de Entrada – 21/03/2012

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – Validade de dois anos para projetos de pesquisa.
11/05/2014

Considerações

Prezado Professor,

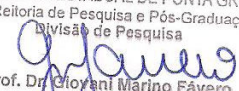
Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização de 80 ratos Wistar.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para 90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Divisão de Pesquisa


Prof. Dr. Giovani Marino Favero
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264