

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

(Associação Ampla entre a UNICENTRO e a UEPG)

EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DO GLP-1 E NA
EXPRESSÃO DE ADIPOCINAS EM RATOS OBESOS

PAULO VINICIUS SVIDNICKI

Ponta Grossa

2013

PAULO VINICIUS SVIDNICKI

EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DO GLP-1 E NA
EXPRESSÃO DE ADIPOCINAS EM RATOS OBESOS

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 Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Viviane Nogaroto Vicari

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sabrina Grassioli

Ponta Grossa

2013

Catálogo na Fonte
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

- S696 Svidnicki, Paulo Vinicius
Efeito do exercício físico na expressão e atividade do GLP-1 e na expressão de adipocinas em ratos obesos / Paulo Vinicius Svidnicki. Ponta Grossa, 2013. 110f.
- Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de concentração Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro - Oeste.
Orientadora: Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari.
Co-orientadora: Profa Dra. Sabrina Grassioli.
1. Síndrome metabólica. 2. Incretinas. 3. Expressão gênica. 4. Íleo distal. 5. Tecido adiposo visceral. I. Vicari, Viviane Nogaroto. II. Grassioli, Sabrina. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Universidade Estadual do Centro – Oeste. Mestrado em Ciências Biológicas. IV. T.

CDD: 616.39



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. 08/2013

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, pelo candidato PAULO VINICIUS SVIDNICKI.

Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro de dois mil e treze, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência da Drª Viviane Nogaroto Vicari em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) PAULO VINICIUS SVIDNICKI, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Drª Viviane Nogaroto Vicari (Orientadora UEPG), Dr. Giovanni Marino Favero (UEPG) e Drª Henriette Rosa de Oliveira Emilio (UEPG), 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 o candidato passou a defesa de sua dissertação intitulada: **"Efeito do Exercício Físico na Secreção e Atividade do GLP-1 na Expressão de Adipocinas em Ratos MSG Obesos"**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADO**. 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: Efeito do exercício físico na atividade e expressão de GLP-1 e adipocinas em ratos obesos.

Ponta Grossa, 27 de fevereiro de dois mil e treze.

Profª Drª Viviane Nogaroto Vicari Viviane Nogaroto Vicari

Prof. Dr. Giovanni Marino Favero Giovanni Marino Favero

Profª Drª Henriette Rosa de Oliveira Emilio Henriette Rosa de Oliveira Emilio

“A ciência é mais do que um corpo do conhecimento. É uma maneira de pensar. Uma maneira cética de interrogar o universo.”

(Carl Sagan)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Jonas e Iracema, meus irmãos Pedro e Carolina e minha tia Laura, por todo o apoio e carinho.

À minha orientadora e mãe na ciência Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari, pelo incentivo, paciência, amizade e por ter me ensinado tanto, tudo isso foi fundamental para realizar este mestrado e para o meu crescimento profissional. Sempre serei grato pelo seu apoio.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Sabrina Grassioli por toda a ajuda nos experimentos e por ter contribuído imensamente no trabalho.

Aos Professores Dr. Roberto Ferreira Artoni, Dra. Mara Cristina de Almeida e Dr. Marcelo Ricardo Vicari, mais que professores, vocês são meus amigos e foram parte desta minha segunda família nestes anos de laboratório.

Aos amigos e colegas do laboratório de Citogenética e Evolução Alex, Michele, Michelinha, Kaline, Karina, Bárbara, Lucas, Luís, Felipe, Diana, Jordana, Guilherme, Kamila, Marcela, Jonathan, Patrícia, Priscila, Kátia e Anelice, valeu por fazerem parte dessa jornada.

Aos amigos do laboratório de Fisiologia, especialmente à Nayara e Amanda pela grande ajuda no trabalho, além da Gabriela, Camila, Letícia, Kelly, Renata, Cleide, Jéssica, Cláudia, Stefani, Sarah e Elisangela, parceiras dos experimentos e das sessões de natação.

Ao Miguel Aírton de Carvalho pelo companheirismo.

À Zoli, pela gentileza e pela disponibilidade na secretaria do programa.

Aos parceiros dos imprescindíveis churras das quartas feiras, das conversas, das risadas e da grande parceria que foi essencial nestes anos, meus grandes amigos Alain, Leonardo e Rafael, todos juramentados à casa Winterfellas.

Pelo apoio financeiro concedido pela CAPES, CNPq e SETI.

RESUMO

A síndrome metabólica é caracterizada pela presença de alguns fatores de risco que ocorrem simultaneamente em indivíduos obesos, tais como Diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias e hipertensão arterial. O GLP-1 é uma importante incretina que pode melhorar o rendimento das células beta pancreáticas. O tecido adiposo é considerado um tecido endócrino complexo e ativo, o qual secreta fatores, denominados adipocinas, que por meio de um sistema dinâmico de sinalização participam de vias biológicas importantes no balanço energético, metabolismo de nutrientes e sistema imune. Estudos indicam que a prática regular de atividade física tem relação com a prevenção e tratamento da obesidade. Assim, este trabalho avaliou os efeitos do treinamento físico na expressão das seguintes adipocinas coletadas de tecido adiposo visceral: adiponectina, TNF alfa, PPAR gama e PPAR alfa. Além disso, foi avaliada a expressão de GLP-1 de íleo distal, bem como a ação insulínica desta incretina nas ilhotas pancreáticas. O modelo animal de obesidade utilizado neste trabalho foram ratos tratados com glutamato monossódico (MSG) durante o período neonatal, levando os animais a desenvolver obesidade na vida adulta. Os animais foram divididos em quatro grupos: MSG sedentários, MSG exercitados, controles sedentários e, controles exercitados. Animais dos grupos exercitados foram submetidos à natação. Aos 90 dias, os animais foram sacrificados, parâmetros bioquímicos e biométricos foram analisados, as ilhotas pancreáticas foram isoladas e seções da gordura mesentérica e do íleo distal foram armazenadas para ensaios de qRT-PCR (*Quantitative Real-Time polímerase Chain reaction*) e imunohistoquímica. Nossos dados mostram que a prática regular e precoce de atividade física melhora os quadros patológicos relacionados à obesidade apresentada pelos ratos MSG obesos. Os animais exercitados apresentaram uma diminuição da hipertrofia dos adipócitos, levando a uma alteração da expressão de adiponectina e do PPAR alfa, o que pode ter contribuído para uma melhora da homeostase energética nestes animais, entretanto foi demonstrado que o exercício não corrige completamente o perfil inflamatório neste modelo de obesidade. Pela primeira vez, foi demonstrado que o exercício não apresentou ação direta na potencialização da insulina pelo GLP-1, estimulada por níveis pré-prandiais de glicose, bem como não houve aumento na expressão desta incretina nos animais exercitados. O treinamento físico reduziu estes parâmetros apenas nos animais nos ratos CON-EXE. Independentemente da condição (jejum ou glicose) e atividade (exercitados ou sedentários), o tratamento com MSG não teve efeito na expressão de GLP-1 no íleo. A natação induziu uma redução no acúmulo de tecido adiposo e preservou a homeostase glicêmica em ratos MSG obesos, mais provavelmente por modular diretamente a ação insulínica do GLP-1 ou sua resposta nas ilhotas pancreáticas. O treinamento físico inibiu a ação do GLP-1 na presença de menor concentração de glicose. Porém, o treinamento físico foi capaz de restaurar a ação insulínica do GLP-1 na presença de alta concentração de glicose nos ratos MSG obesos.

Palavras-chave: Síndrome metabólica. Incretinas. Expressão gênica. Íleo distal. Tecido adiposo visceral. Ilhotas pancreáticas.

ABSTRACT

Metabolic syndrome is characterized by the presence of some risk factors that occur simultaneously in obese subjects, such as Type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia and hypertension. GLP-1 is an important incretin that stimulates insulin secretion. Adipose tissue is considered an active complex and endocrine tissue, which secretes factors, termed adipokines, which by means of a dynamic signaling pathways involved in important biological energy balance, nutrient metabolism and immune system. Studies indicate that regular physical activity is related to the prevention and treatment of obesity. This study evaluated the effects of exercise training on the expression of adipokines collected following visceral adipose tissue: adiponectin, TNF alpha, PPAR gamma and PPAR alpha. In addition, we evaluated the expression of GLP-1 in the distal ileum and the insulinotropic action of this incretin in the pancreatic islets. The animal model used in this study were obese mice treated with monosodium glutamate (MSG) during the neonatal period, causing the animals to develop obesity in adulthood. The animals were divided into four groups: sedentary MSG, MSG exercised, sedentary controls, and controls exercised. Animals of exercise groups were submitted to swimming. At 90 days, the animals were sacrificed, biometric and biochemical parameters were analyzed pancreatic islets were isolated and sections of mesenteric fat and distal ileum assays were stored for qRT-PCR (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction) and immunohistochemistry. Our data show that regular physical activity and early improves obesity-related pathologies presented by MSG-obese mice. Exercised animals showed a decrease in adipocyte hypertrophy, leading to a change in the expression of adiponectin and PPAR alpha, which may have contributed to an improvement in energy homeostasis in these animals, however it has been shown that exercise does not correct completely the inflammatory profile in this obesity model. For the first time, demonstrated that exercise showed no direct action on the potentiation of insulin by GLP-1 stimulated by pre-prandial glucose, and no increase in the expression of incretin in exercised animals. Physical training reduced these parameters in animals only in mice CON-EXE. Regardless of the condition (fasting or glucose) and activity (exercised or sedentary) MSG treatment had no effect on expression of GLP-1 in the ileum. The swimming induced a reduction in the accumulation of adipose tissue and preserved glucose homeostasis in obese MSG rats, most likely by directly modulating the insulinotropic action of GLP-1 or its response in the pancreatic islets. Physical training inhibited the action of GLP-1 in the presence of low concentrations of glucose. However, physical training was able to restore the insulinotropic action of GLP-1 in the presence of high glucose concentration in MSG obese mice.

Key words: Metabolic syndrome. Incretins. Adiponectin. Gene expression. Distal ileum. Visceral adipose tissue. Pancreatic islets.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Esquema representativo das vias que levam à secreção da insulina nas células beta pancreáticas21

Figura 2 - Fotomicrografia de uma célula L na camada mucosa de intestino humano, evidenciando um grande núcleo central e os grânulos de secreção próximos à lâmina basal (setas)28

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Efeito da natação na secreção de insulina induzida por glicose em ratos MSG obesos64

Figura 2 - Ação insulínica do GLP-1 nas ilhotas pancreáticas de ratos MSG obesos submetidos a treinamento físico65

Figura 3 - Expressão de GLP-1 na região do íleo de ratos MSG obesos submetidos a treinamento físico66

Figura 4 - Efeito do exercício nos níveis de mRNA de GLP-167

CAPÍTULO 2

Figura 1- Fotomicrografia do tecido adiposo mesentérico dos ratos submetidos a treinamento físico.....84

Figura 2- Efeitos do exercício físico sobre os níveis de mRNA da Adiponectina, TNF alfa, PPAR gama e PPAR alfa dos ratos MSG submetidos a treinamento físico.....85

LISTA DE SIGLAS

Acil-CoA	Colesterol aciltransferase
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
Adipoq	Adiponectina
ADP	Difosfato de adenosina
AG	Ácidos graxos
ARQ	Núcleo arqueado do hipotálamo
ATP	Trifosfato de adenosina
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CART	Fator de transcrição cocaína-anfetamina dependente
cDNA	DNA complementar
cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico
CON-EXE	Controle Exercitado
CON-SED	Controle Sedentário
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERK	Quinaseinase reguladora do sinal extracelular
GH	Hormônio do Crescimento (<i>Growth Hormone</i>)
GHRH	Hormônio liberador do hormônio do crescimento
GK	Ratos Goto-Kakizaki
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1 (<i>Glucagon-like peptide 1</i>)
GLP-2	Peptídeo semelhante ao glucagon 2 (<i>Glucagon-like peptide 2</i>)
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
GPR40	Receptor de proteína G-acoplado 40 (<i>G protein–coupled receptor 40</i>)
IMC	Índice de Massa Corporal
IRS	Substrato do Receptor de Insulina (<i>Insulina Receptor Substrate</i>)
IRS-1	Substrato do Receptor de Insulina 1 (<i>Insulina Receptor Substrate 1</i>)
IRS-2	Substrato do Receptor de Insulina 2 (<i>Insulina Receptor Substrate 2</i>)
K ⁺ _{ATP}	Canais de potássio sensíveis ao ATP
LPL	Lipase lipoprotéica
malonil-CoA	Colesterol maloniltransferase
MAPK	Proteína quinase mitogênica ativada

mRNA	RNA mensageiro
MSG	Glutamato Monossódico
MSG-EXE	MSG-Exercitado
MSG-SED	MSG-Sedentário
NMDR	Receptores N-Metil-D-Aspartato
NPY	Neuropeptídeo Y
NTS	Núcleo do trato solitário do hipotálamo
OETF	Ratos obesos Otsuka Long-Evans Tokushima
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Pares de base
PC	Peso corporal
PDX-1	Homeobox duodenal e pancreático 1
PI-3-quinase	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PKC ζ	Proteína quinase C ζ
POMC	Pró-opiomelanocorticotropina
PPAR alfa	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa
PPAR gama	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PPAR	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
PPRE	Elementos responsivos aos proliferadores de peroxissoma
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
qRT-PCR	<i>Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction</i>
RI	Resistência à insulina
RIE	Radioimunoensaio
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema nervoso simpático
SUR1	Receptor de sulfonilreia 1
TNF alfa	Fator de necrose tumoral alfa
TSH	Hormônio Tireóideo Estimulante
VMH	Núcleo ventromedial do hipotálamo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	12
1.2 ASPECTOS GERAIS DA OBESIDADE.....	12
1.2.1 A obesidade sob o ponto de vista evolutivo	13
1.2.2 A obesidade e a resistência à insulina	15
1.3 OBESIDADE x EXERCÍCIO FÍSICO.....	17
1.4 OBESIDADE E O PAPEL DAS CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS	19
1.5 ALGUNS MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDO DA OBESIDADE	22
1.6 A OBESIDADE E SUA RELAÇÃO COM O PEPTÍDEO SEMELHANTE AO GLUCAGON.....	26
1.6.1 As células L intestinais.....	27
1.6.2 Regulação da secreção de GLP-1	28
1.6.3 Ações do GLP-1 na liberação de insulina pelas células beta pancreáticas	29
1.6.4 Ações do GLP-1 na proliferação das células beta	30
1.6.5 Ação do GLP-1 na supressão de glucagon.....	31
1.6.6 Ações do GLP-1 no trato gastrointestinal.....	32
1.6.7 Ações do GLP-1 na ingestão alimentar.....	32
1.6.8 Outras ações do GLP-1	33
1.7 A OBESIDADE E O PAPEL DAS ADIPOCINAS	34
1.7.1 Adiponectina	34
1.7.2 Fator de necrose tumoral alfa (TNF alfa)	35
1.7.2 PPAR (receptores ativados por proliferadores de peroxissoma)	36
2 OBJETIVOS	38
2.1 OBJETIVOS GERAIS	38
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 ANIMAIS	39
3.2 TREINAMENTO FÍSICO	39
3.3 AVALIAÇÃO DO GRAU DE OBESIDADE	39
3.4 ESTÍMULO COM SOLUÇÃO DE GLICOSE	40
3.5 ENSAIOS DE IMUNOHISTOQUÍMICA	40

3.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR qRT-PCR (<i>QUANTITATIVE REAL TIME - POLYMERASE CHAIN REACTION</i>)	41
3.7 ENSAIOS COM AS ILHOTAS PANCREÁTICAS.....	43
3.7.1 Isolamento das ilhotas pancreáticas	43
3.7.2 Secreção de insulina induzida por glicose	44
3.7.3 Ação insulínica do GLP-1.....	44
3.7.4 Quantificação da insulina	44
3.8 CORTES HISTOLÓGICOS DO TECIDO MESENTÉRICO	44
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
4 RESULTADOS	46
CAPÍTULO 1 O TREINAMENTO FÍSICO RESTABELECE A AÇÃO INSULINOTRÓFICA DE GLP-1 NAS ILHOTAS PANCREÁTICAS DE RATOS MSG OBESOS.....	47
CAPÍTULO 2 EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA EXPRESSÃO GÊNICA DE ADIPOCINAS EM RATOS MSG OBESOS.....	68
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
6 REFERÊNCIAS	89
7 ANEXOS	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A incidência da obesidade tem crescido drasticamente no mundo todo. Consequentemente, a obesidade e os distúrbios associados constituem atualmente uma séria ameaça para a saúde de muitas populações em todo o planeta, principalmente nos países ocidentais e em desenvolvimento (HOTAMISLIGIL, 2006). A OMS (Organização Mundial da Saúde) estima que mais de um bilhão de adultos no mundo estejam em sobrepeso, trezentos milhões dos quais são clinicamente obesos, ou seja, possuem índice de massa corporal (IMC) igual ou maior que 30 kg/m^2 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). Outro dado alarmante é o aumento na taxa de obesidade infantil (ROCCHINI, 2002).

A obesidade está associada com vários problemas de saúde que contribuem diretamente para o aumento nas taxas de morbidade e mortalidade nas populações, incluindo aumento de risco de desenvolver resistência à insulina (RI), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), esteatose hepática, aterosclerose, doenças degenerativas, como algumas demências, doenças das vias respiratórias e alguns tipos de câncer (SEMENKOVICH, 2006). Este conjunto de doenças também está começando a surgir em crianças em idades cada vez mais precoces, um fenômeno que era inconcebível há apenas algumas décadas atrás (ROCCHINI, 2002). Logo, a OMS considera a obesidade uma epidemia global, a qual tem alcançado taxas alarmantes, sendo atualmente considerada um dos maiores problemas para a saúde pública, visto os custos incalculáveis gerados para os sistemas de saúde no tratamento de suas comorbidades (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

1.2 ASPECTOS GERAIS DA OBESIDADE

A obesidade é definida como uma manifestação fenotípica de acúmulo excessivo ou anormal de tecido adiposo que altera a homeostase corporal, sendo resultante de interações complexas de fatores genéticos e ambientais, os quais estão correlacionados com estilos de vida sedentários e/ou de baixo gasto energético (ORDOVÁS e SHEN, 2008).

Desde o final do século 19, já era relatado que alguns fatores de risco que ocorriam simultaneamente nos indivíduos obesos, tais como DM2, dislipidemias e hipertensão arterial, estavam intimamente associados ao aumento das doenças cardiovasculares (HALLER, 1977; SINGER, 1977). Estes fatores de risco, em associação com a RI, levaram à proposta da existência de uma condição única patofisiológica, denominada síndrome metabólica, que pode levar à manifestação de quadros secundários, tais como derrames, câncer, osteoartrite, apneia do sono e demais doenças relacionadas a quadros inflamatórios (SINGLA et al, 2010).

A relação entre adiposidade visceral e desenvolvimento da síndrome metabólica é, provavelmente, derivada do quadro inflamatório associado. Há pelo menos duas maneiras pelas quais o tecido adiposo pode influenciar a homeostase da glicose e agir como fator para o desenvolvimento da resistência à insulina e da síndrome metabólica (KAHN e FLIER, 2000). Primeiramente, o estoque excessivo de tecido adiposo resulta em um aumento do fluxo de ácidos graxos para outros tecidos, interferindo na sinalização da insulina e inibindo assim a absorção de glicose, fator que contribui para a RI. Além disso, o tecido adiposo comporta-se como um órgão endócrino complexo e ativo, secretando vários fatores imunomoduladores e múltiplas moléculas bioativas - as adipocinas (GONZÁLEZ e RODRIGUEZ, 2011).

A resposta inflamatória de curto prazo é crucial para o reparo de tecidos e envolve a integração de muitos sinais complexos em células e órgãos distintos. Entretanto, as consequências de uma inflamação a longo prazo, decorrente da obesidade, referida como de baixo grau ou crônica (HOTAMISLIGIL, 2006), pode gerar uma produção desregulada das adipocinas, característica que está ligada às doenças associadas à obesidade, como RI, hiperlipidemia e doenças cardiovasculares (RITCHIE e CONNELL, 2007).

1.2.1 A obesidade sob o ponto de vista evolutivo

Dentre os processos mais críticos para a sobrevivência de uma espécie estão a habilidade de resistir à fome e a capacidade de gerar uma resposta imunológica efetiva contra patógenos. Em meio aos mecanismos envolvidos na

eficiência energética podemos citar o armazenamento de nutrientes, quando o acesso à comida é intermitente. Porém, na presença de um aporte nutricional excessivo, este estado metabólico que outrora era vantajoso, pode levar a um estágio de acúmulo de adiposidade e desencadear seus problemas associados (BEUTLER, 2004). A habilidade de combater infecções também levou à seleção de fortes respostas imunológicas, principalmente após declínios populacionais, durante períodos de doenças infecciosas epidêmicas e pandêmicas (LEVIN, LIPSITCH e BONHOEFFER, 1999). A combinação destas características é provavelmente a origem da organização biológica, que é altamente capaz de processar e armazenar energia e é também equipada com uma poderosa, e às vezes excessiva, resposta imune (HOTAMISLIGIL, 2006).

A relação entre as respostas metabólicas e imunológicas possui muitos fundamentos evolutivos. As unidades funcionais chave, que controlam funções metabólicas e imunológicas em organismos complexos, evoluíram a partir de estruturas ancestrais de menor complexidade. Uma destas estruturas, por exemplo, é a gordura corporal da *Drosophila*, que incorpora os homólogos do fígado e dos sistemas hematopoiético e imunológico. Este órgão também é reconhecido como o equivalente do tecido adiposo dos mamíferos, possuindo desenvolvimento e funções similares (SONDERGAARD, 1993). A gordura corporal da drosófila tem funções cruciais no balanço energético e no fornecimento de nutrientes, e coordena as respostas metabólicas apropriadas. Portanto, este local está envolvido na coordenação de respostas inflamatórias com o estado metabólico (LECLERC e REICHHART, 2004). Nos organismos de maior complexidade, o tecido adiposo, o fígado e o sistema hematopoiético se especializaram em funções distintas. Entretanto, estes órgãos têm as suas heranças de desenvolvimento mantidas, as quais são compartilhadas em ancestralidade com organismos de menor complexidade tecidual. Portanto, é possível compreender a situação na qual vias metabólicas comuns ou sobrepostas regulam funções metabólicas e imunológicas, por meio de fatores e vias sinalizadoras comuns (RUSTEN et al, 2004). Os órgãos envolvidos formam uma rede dinâmica contínua entre resposta imune e metabólica e são estabelecidas também comunicações com outros locais, como as ilhotas pancreáticas e o músculo. De fato, esta interface pode contribuir para a importância destes órgãos no início e desenvolvimento de doenças

metabólicas, particularmente no contexto da obesidade e DM2 (SHOELSON, LEE e GOLDFINE, 2006).

1.2.2 A obesidade e a resistência à insulina

Tanto a obesidade como o DM2 estão associados com a RI. Porém, a maioria dos indivíduos com RI não desenvolvem hiperglicemia (WELLEN e HOTAMISLIGIL, 2005). Em condições normais, as células beta pancreáticas aumentam a liberação de insulina suficientemente para compensar a redução na eficiência da sua ação, mantendo a tolerância à glicose normalizada (POLONSKY, GIVEN e VAN CAUTER, 1988). Para a obesidade e a RI estarem associadas com o DM2, as células beta devem estar incapacitadas de compensar totalmente a deficiência na sensibilidade à insulina. A disfunção nas células beta existe em indivíduos que possuem alto risco de desenvolver a doença mesmo quando a concentração de glicose é normal (KAHN, 2001). A RI é molecularmente caracterizada por distúrbios nas vias intracelulares do receptor de insulina, que culminam com um decréscimo do transportador de glicose, o GLUT4 (transportador de glicose tipo 4). A captação de glicose em tecidos chamados insulina-dependentes é proporcional a quantidade de GLUT4 translocado para a membrana de células musculares esqueléticas e adipócitos (ROPELLE et al, 2006).

Variações na sensibilidade à insulina ocorrem normalmente durante o ciclo de vida, com a RI sendo observada principalmente durante a puberdade (MORAN et al, 1999), gravidez (BUCHANAN et al, 1990), e em idades avançadas (CHEN, BERGMAN e PORTE, 1988). Contudo, a variação no estilo de vida como falta de prática de atividade física e alta ingestão de carboidratos estão associadas com a diminuição na sensibilidade à insulina (GOODYEAR e KAHN, 1998).

Como dito anteriormente, o fator principal no aparecimento da RI e outras características relacionadas com a síndrome metabólica é a obesidade. O tecido adiposo modula o metabolismo liberando na circulação ácidos graxos (AG), glicerol, hormônios e citocinas pró-inflamatórias, sendo que em indivíduos obesos a produção de muitos destes produtos está alterada. A insulina é o principal hormônio estimulador da síntese de triglicerídeos, portanto, elevada concentração de insulina favorece a lipogênese e o aumento do conteúdo de tecido adiposo corporal.

(SCHERER, 2006).

A distribuição de gordura corporal é um dos fatores determinantes de sensibilidade à insulina. Ao passo que a obesidade é tipicamente associada com a RI, a sensibilidade à insulina também varia marcadamente em indivíduos magros por causa de diferenças na distribuição de gordura corporal (CNOP et al, 2002). Indivíduos magros com uma maior distribuição periférica de gordura são mais sensíveis à insulina do que indivíduos magros que possuem uma distribuição de gordura predominantemente central, isto é, nas áreas abdominal e peitoral (KAHN, HULL e UTZSCHNEIDER, 2006). As diferenças nas características destes dois depósitos de tecido adiposo podem explicar em parte por que os efeitos metabólicos da gordura abdominal e a subcutânea diferem. Por exemplo, a gordura abdominal expressa mais genes que codificam proteínas secretoras e proteínas responsáveis pela produção de energia (MAEDA et al, 1997). A quantidade de proteína liberada pelos adipócitos também difere de acordo com a sua localização (FAIN et al, 2004). A secreção de adiponectina, uma adipocina que está envolvida na regulação da ação da insulina, é maior nos adipócitos do omento do que nos adipócitos subcutâneos, e a quantidade liberada destes adipócitos do omento é mais fortemente e negativamente correlacionada com IMC (MOTOSHIMA et al, 2002). Pequenos adipócitos também liberam mais adiponectina do que adipócitos maiores, e adipócitos do omento são tipicamente menores do que células adiposas subcutâneas (REYNISDOTTIR et al, 1997). Embora cada adipócito dos depósitos abdominais secrete mais adiponectina, os depósitos subcutâneos representam uma maior proporção de gordura corporal, e assim sua contribuição para os níveis totais desta adipocina serão invariavelmente maiores (MOTOSHIMA et al, 2002).

A distribuição de AG aos tecidos pode também ser modulada por sua fonte. A gordura abdominal é mais lipolítica do que a gordura subcutânea e também menos sensível ao efeito antilipolítico da insulina (MONTAGUE e O'RAHILLY, 2000). Esta diferença nas características dos adipócitos, combinada com a proximidade do fígado ao depósito visceral, provavelmente resulta em uma maior exposição deste órgão do que os tecidos periféricos aos AG não esterificados. Esta diferença na exposição e a presença de um gradiente de AG poderia explicar por que o fígado pode ser resistente à insulina enquanto que os tecidos periféricos não o são (KIM et al, 2003).

1.3 OBESIDADE x EXERCÍCIO FÍSICO

A prática regular de atividade física tem uma grande relação com a prevenção e tratamento da obesidade. Os benefícios adquiridos são normalmente consequência de alterações como o aumento da taxa metabólica, o que auxilia na redução do peso corporal, além do aumento do fluxo sanguíneo muscular, devido ao aumento da demanda de oxigênio pelo organismo, e aumento da frequência cardíaca e respiratória pela maior oxidação dos AG, com redução de glicogênio (GUYTON e HALL, 1997). O exercício também promove a diminuição das concentrações plasmáticas de insulina, com a consequente melhora da tolerância à glicose (ARAÚJO e MENÓIA, 2008). Dentre outros benefícios, a prática regular de atividade física melhora a capacidade de hidrolisar o triacilglicerol do tecido adiposo e oxidar os AG que chegam ao músculo, a fim de atender ao aumento da demanda energética imposta pelos mesmos durante a atividade física (FONSECA et al, 2006). Há também aumento na liberação de adrenalina e noradrenalina que se ligam a receptores beta-adrenérgicos das membranas dos adipócitos, estimulando a lipólise e consequentemente a mobilização de energia para o tecido muscular (SCHEURINK e STEFFENS, 1989). Outros hormônios, como o de crescimento (GH), tireóideo estimulante (TSH) e o adrenocorticotrófico (ACTH), também têm sua produção aumentada com a prática de atividade física, os quais dentre outras funções, ajudam a promover a lipólise e mobilizar AG para a corrente sanguínea (ARAÚJO e MENÓIA, 2008).

Durante a atividade física, a quantidade de AG livres é proporcional a sua utilização, ou seja, quanto maior a quantidade de AG na circulação maior será a utilização pelos tecidos. (FONSECA et al, 2006).

A intensidade da atividade física é proporcional à demanda energética necessária para suprir o metabolismo, assim, atividades aeróbicas são recomendadas a indivíduos com sobrepeso e obesos. Com o aumento do metabolismo energético, aumenta-se também a lipólise e consequentemente ocorre diminuição de gordura corporal (CURI et al, 2003).

O conhecimento a nível molecular dos efeitos do exercício envolve as vias que levam ao aumento da captação de glicose no músculo esquelético e

outras células. Pela ação da insulina, a cascata de reação é iniciada pela ligação da insulina à subunidade alfa extracelular do receptor de insulina, autofosforilação de resíduos de tirosina na subunidade beta, fosforilação da tirosina nos receptores de insulina IRS-1 (substrato do receptor de insulina 1) e IRS-2 (substrato do receptor de insulina 2), e ativação da PI-3-quinase (Fosfatidilinositol 3-quinase) (CLARKE et al, 1994). Muitos estudos demonstram que estes sinais não são componentes do mecanismo pelo qual o exercício estimula a captação de glicose nas células, pois a atividade contrátil não estimula a autofosforilação de receptores de insulina isolados (TREADWAY et al, 1989), a fosforilação de receptores e da tirosina dos IRS (GOODYEAR et al, 1995), ou a atividade da PI-3-quinase (WOJTASZEWSKI et al, 1996). Além do mais, a wortmanina, um inibidor da atividade da PI-3-quinase, não inibe o transporte de glicose estimulado pela contração *in vitro* (LEE, HANSEN e HOLLOSZY, 1995). Estes estudos demonstram que os sinais moleculares que levam ao aumento de captação de glicose, tanto pelo estímulo do exercício como pelo da insulina, são diferentes. Além disso, também foi demonstrado que a cascata de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno, que também é aumentada em resposta ao exercício, não está envolvida na melhora da captação de glicose com exercício (GOODYEAR et al, 1996). Esses estudos têm implicações importantes para determinar os mecanismos pelos quais a insulina e o exercício regulam a captação de glicose nas células musculares, principalmente em indivíduos com RI. É provável que o exercício funcione ativando mecanismos alternativos para este fim.

Há algumas evidências que sugerem que o aumento da concentração de cálcio intracelular que leva à interação dos filamentos de actina e miosina na contração muscular é um fator crítico no transporte de glicose, mediado pelo exercício (MARLIS, 2002). Visto que a concentração de cálcio citoplasmático está elevada por apenas uma fração de segundo seguida por cada contração, esses íons provavelmente não ativam diretamente o sistema de transporte de glicose. Ao invés disso, o aumento de cálcio citoplasmático pode iniciar ou facilitar a ativação de sinais moleculares intracelulares ou cascatas de sinalização que levem tanto a efeitos imediatos como a efeitos prolongados do exercício no transporte de glicose (RICHTER et al, 1987). A PKC (proteína quinase C) é um exemplo de sinal dependente de cálcio que é ativada pela contração muscular, e pode estar envolvida

nesta regulação, visto que tratamento com inibidores de PKC estão associadas com diminuições no transporte de glicose, pelo estímulo da contração (CLELAND et al, 1989). Existem também evidências de componentes autócrinos e parácrinos envolvidos neste mecanismo de transporte, um dos quais é o óxido nítrico. Esta molécula é liberada pela contração do músculo esquelético, e a inibição da produção desta está relacionada com a diminuição do transporte de glicose, tanto a nível basal, como estimulado pela contração, um efeito que pode estar sendo regulado por um mecanismo mediado por cGMP (Monofosfato de guanosina cíclico) (BALON et al, 1996). Outra molécula que pode estar envolvida no estímulo de transporte de glicose é acallicreína, uma proteína que catalisa a produção de bradiquinina e é um potencial estimulador da síntese de óxido nítrico. A adenosina é outra proteína que também é secretada por fibras musculares ativas, e tem sido sugerido que os receptores para esta proteína modulam o mecanismo de sinalização pelo qual a contração resulta no estímulo sinérgico do transporte de glicose (VERGAUWEN, HESPEL e RICHTER, 1994).

Além da ativação de sinais intracelulares específicos, o processo glicogenolítico pode ser um importante regulador do translocamento de GLUT4 induzido pelo exercício no músculo esquelético. Embora não existam evidências claras deste processo, é sugerido que moléculas de transporte estejam associadas com partículas de glicogênio no músculo e que a hidrólise de glicogênio estimulada pela contração libera o GLUT4, levando à translocação destes transportadores para a superfície celular (GOODYEAR e KAHN, 1998).

1.4 OBESIDADE E O PAPEL DAS CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS

As células beta pancreáticas são conhecidas por sua habilidade de produzir e regular a liberação de insulina. A quantidade deste hormônio liberado varia de acordo com a natureza, quantidade e rota do estímulo envolvido, além da concentração de glicose existente. Portanto, a célula beta é crucial na regulação fisiológica das concentrações plasmáticas de glicose (KAHN, 2001).

A sensibilidade à insulina também modula a função das células beta e quase sempre está diminuída na obesidade. Em indivíduos saudáveis, existe um *feedback* entre a sensibilidade dos tecidos e as células beta, com aumento de

secreção nestas em resposta ao aumento na demanda hepática, muscular e adiposa (KAHN et al, 1993). Para que haja uma homeostase glicêmica adequada, mudanças na sensibilidade à insulina devem ser combinadas por uma mudança proporcional oposta no seu nível circulante. Falhas neste *feedback* resultam em uma alteração na tolerância à glicose e consequente desenvolvimento de diabetes (KAHN, HULL e UTZSCHNEIDER, 2006).

A resposta das células beta a mudanças na sensibilidade à insulina provavelmente envolvem um aumento no metabolismo celular de glicose, sinalização por AG e sensibilidade a incretinas (CHEN et al, 1994).

O estímulo da secreção de insulina requer o metabolismo da glicose para consequente geração de ATP. Portanto, com a entrada de glicose através dos receptores GLUT 1 e GLUT 2, o aumento de ATP/ADP, resultantes da glicólise, desencadeiam o fechamento dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K^+_{ATP}) nas células beta, despolarização da membrana celular e influxo de cálcio, através de canais de cálcio voltagem dependentes, resultando na exocitose de grânulos de insulina (CHEN et al, 1994) (Figura 1). O aumento no metabolismo celular de glicose envolve um aumento da atividade da enzima glicoquinase, a enzima responsável pela fosforilação de glicose após a sua entrada na célula (KAHN et al, 1989). O aumento de citrato gerado pelo metabolismo da glicose leva a geração de malonil-CoA e aumento de acil-CoA de cadeia longa e diacilglicerol, pela inibição da carnitina palmitol transferase1. Isto leva a ativação da PKC e estímulo da liberação de insulina (PRENTKI et al, 2002). Os AG também influenciam na liberação de insulina por sinalização através de receptores de proteína G GPR40 (Receptor acoplado à proteína G 40), que desencadeiam uma sinalização intracelular e subsequente aumento de cálcio e a liberação de grânulos de insulina, ou através da geração de acil-CoA, estimulando diretamente a exocitose dos grânulos, ou por ativação da PKC (ITOH et al, 2003).

atividade aumentada do componente alfa2-adrenérgico está associada com diminuição da liberação de insulina, enquanto que um aumento na atividade beta-adrenérgica potencializa a liberação de insulina. Ambas as vias agem por meio da adenilato ciclase, resultando em uma diminuição ou aumento na concentração de cAMP, respectivamente (KAHN, HULL e UTZSCHNEIDER, 2006).

1.5 ALGUNS MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDO DA OBESIDADE

Com o aumento da incidência de doenças metabólicas em todo o mundo, o desenvolvimento de novas tecnologias que visem um melhor entendimento destas doenças se tornou prioridade, buscando sempre uma maior rapidez para soluções de problemas como a obesidade, diabetes, hiperlipidemia e outras complicações (SHAFRIR, 1992). Os modelos experimentais para estudo da obesidade têm se tornado ferramentas essenciais para compreensão e descoberta de bases moleculares de patogêneses de complicações neurais e vasculares, ações de agentes terapêuticos e, influências ambientais ou genéticas que aumentam o risco de desenvolver as doenças associadas com a síndrome metabólica, como o DM2 (BAILEY e FLATT, 2003). Dentre os modelos animais existentes, os mais comumente usados são os desenvolvidos em roedores, por razões como curto tempo de geração, herdabilidade de hiperglicemia e/ou obesidade em determinadas linhagens, além das questões econômicas (CHEN e WANG, 2005). Em muitos modelos animais, a DM2, hiperlipidemia e obesidade podem ser induzidas por drogas ou manipulações genéticas (LI et al, 2003; MATHEWS e LEITER, 2005).

Os ratos obesos Otsuka Long-Evans Tokushima (OLETF) são uma linhagem de ratos descobertos em 1984 que apresentam diabetes espontâneo, poliúria, polidipsia e uma forma branda de obesidade (KAWANO et al, 1992). Isto se deve a essas linhagens possuírem a forma recessiva de um gene que está envolvido na indução do diabetes, o *odb-1*, presente no cromossomo X destes ratos, alterando a funcionalidade das ilhotas pancreáticas.

Os ratos Goto-Kakizaki (GK) são ratos não obesos, com uma forma leve de DM2 e que apresentam hiperglicemia precoce, hiperinsulinemia e resistência à insulina (SUSUKI et al, 1997). Este modelo foi obtido por meio da seleção de linhagens de indivíduos com intolerância à glicose a partir de colônias de ratos

Wistar não diabéticos. Este fenótipo é dado como resultado de três loci independentes, que contêm genes que são responsáveis de alguma forma pela secreção de insulina debilitada, hiperglicemia e proliferação das células beta deficientes, devido à exposição à hiperglicemia durante a gestação (SUSUKI et al, 1997).

Os camundongos db/db são uma linhagem de ratos diabéticos que possuem uma mutação, ocorrida espontaneamente, no receptor de leptina, que é um hormônio liberado pelos adipócitos e que age no cérebro para suprimir o apetite e estimular o metabolismo. Esta mutação leva ao desenvolvimento da obesidade e consequentemente do diabetes, devido à resposta da insulina à glicose estar debilitada (COLEMAN, 1980; KODAMA et al, 1994).

Os camundongos ob/ob, por sua vez, possuem uma mutação no próprio hormônio leptina. Estes animais apresentem hiperfagia e se tornam proeminentemente obesos, apresentando inclusive DM2, porém são menos hiperglicêmicos do que os camundongos db/db (ERICKSON et al, 1996).

Os ratos Zucker são originários de uma colônia onde vários grupos de animais com diabetes foram identificados (PETERSON et al, 1990). Os machos são homozigotos para receptores de leptina não funcionais (fa/fa), o que leva ao desenvolvimento da obesidade e hiperlipidemia. Além disso, apresentam resistência à insulina em idades precoces, seguida por uma secreção de insulina deficiente, resultando em um quadro de hiperglicemia. Assim, estes animais se tornaram um modelo experimental para o DM2, com previsível progressão de um estado pré-diabético a um diabético (ETGEN e OLDHAM, 2000).

Existem ainda, muitos modelos de roedores modificados por engenharia genética, incluindo camundongos transgênicos e *knockout*. Estes animais têm sido utilizados para estudos de patofisiologias relacionadas a alterações em um único gene, ou em um conjunto de genes, que levam ao desenvolvimento de doenças metabólicas, especialmente a expressão de fatores chave na sinalização, ação e secreção da insulina. Estes modelos experimentais possibilitaram a investigação das interações entre genes, ou entre genes e o ambiente, no desenvolvimento do DM2 (BAUDRY et al, 2002).

Algumas substâncias também são utilizadas para induzir uma condição de síndrome metabólica em alguns modelos animais. Por exemplo, a administração neonatal intraperitoneal de streptozotocina desencadeia hiperglicemia, com progressão para RI e hipertensão, levando a um quadro de DM2 na idade adulta (IWASE, 1991).

Alguns modelos são obtidos aplicando-se uma dieta hipercalórica, como 40% de calorias na forma de gordura, por exemplo. Esta alimentação pode elevar a concentração plasmática de insulina em duas vezes em resposta a um estímulo com glicose, além de induzir RI (LUO et al, 1998). Outros estudos utilizam modelos gerados a partir de obesidade induzida por dieta materna, fazendo com que a prole apresente risco aumentado de desenvolver síndrome metabólica, assim como doenças cardiovasculares (SAMUELSSON, 2008).

1.5.1 Modelo animal de obesidade: glutamato monossódico (MSG)

O SNC está diretamente envolvido no controle da obesidade e o depósito de massa corporal é controlado por muitas de suas áreas. Existem grupos de neurônios presentes no hipotálamo que, após receberem sinais periféricos neurais e humorais, alteram a resposta para a ingestão de alimentos e o gasto energético. Sinais aferentes e eferentes, os quais permitem ao cérebro controlar a massa corporal, são principalmente conduzidos ao sistema nervoso autônomo (SNA). Modelos experimentais de obesidade envolvendo humanos e animais apresentam alta atividade parassimpática e baixa atividade simpática. Este desequilíbrio do SNA explica as principais características observadas na obesidade. Lesões em algumas áreas do hipotálamo como a região ventromedial (VMH), núcleo arqueado (ARQ) e paraventricular (PVN), podem resultar em desenvolvimento de obesidade. Isto demonstra o importante papel destes núcleos nas vias neuronais que geram respostas integradas aos sinais no controle metabólico (ATEF et al, 1992; BOURET e SIMERLY, 2004).

Dentre os diversos núcleos neurais que compõem o hipotálamo, o ARQ desempenha um papel central. Os neurônios deste núcleo são ativados ou inibidos por sinais importantes para a manutenção do peso corporal, por exemplo, por meio da leptina, da glicose e de sinais oriundos indiretamente do núcleo do trato

solitário (NTS) para onde convergem os sinalizadores do trato gastrointestinal. Todos esses sinalizadores acionam vias neurais que são espalhadas para os demais núcleos hipotalâmicos e determinam as respostas autonômicas e hormonais que serão direcionadas à periferia (BOURET e SIMERLY, 2006).

A indução de obesidade com MSG em ratos foi primeiramente proposta no início da década de 70, quando os ratos foram tratados com MSG durante os primeiros dias de vida (BURDE, SCHANKER e KAYES, 1971). O MSG tem ação neurotóxica durante este período de vida por ativar receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDR), que levam a elevações na concentração de cálcio citosólico, ativando a morte neural por apoptose das células do ARQ, assim como dos neurônios circunventriculares. A formação de um edema na região do ARQ do hipotálamo já pode ser observada 1 dia após a administração de MSG aos ratos recém-nascidos (NAGATA et al, 2006; SASAKI et al, 2009). O MSG reduz as células em uma taxa de aproximadamente 75%, alterando a produção de substâncias orexigênicas e anorexigênicas, como pró-opiomelanocorticotropina (POMC), o fator de transcrição cocaína-anfetamina dependente (CART) e o neuropeptídeo Y (NPY), levando a anormalidades neuroquímicas, endócrinas, metabólicas e comportamentais (BUNYAN, MURRELL e SHAH, 1976). Estas alterações afetam também a homeostase, resultando em disfunções no crescimento, na reprodução e no metabolismo, com consequente indução da obesidade, tolerância à glicose diminuída e RI (NAGATA et al, 2006).

Estudos indicam que os ratos tratados com MSG, no período neonatal, desenvolvem obesidade aos 2 meses de idade e seu peso aumenta aproximadamente 60 g, aos 5 meses (NAGATA et al, 2006; SASAKI et al, 2009). Aos 90 dias de vida, esses animais apresentam a maioria das características marcantes da síndrome metabólica: obesidade visceral e subcutânea, alta quantidade circulante de insulina, tanto no estado de jejum quanto alimentado, RI, intolerância à glicose e dislipidemia (SCOMPARIN et al, 2006). Desta forma, este modelo de obesidade apresenta características similares a indivíduos jovens e obesos que estão em fases críticas para o desenvolvimento e instalação do DM2. Apesar da RI, o modelo de obesidade MSG ainda secreta insulina o suficiente para manter a normoglicemia de jejum e evitar a instalação do DM2 (MORRISON et al, 2007). Foi demonstrado, por meio de análises das atividades elétricas neurais de

camundongos MSG, que ocorre também um desequilíbrio autonômico, e isto pode ter uma relação direta com a quebra da homeostase glicêmica e com o aumento da capacidade de acumular gordura nos tecidos destes animais (SCOMPARIM et al, 2009). Animais MSG apresentam também baixa quantidade circulante de catecolaminas, hormônios liberados pela glândula suprarrenal que tem efeitos como aumento da frequência cardíaca, pressão sanguínea e aumento da glicose circulante (SCOMPARIN et al, 2006). O fato de roedores MSG possuírem secreção de insulina aumentada pode estar relacionado com a alta atividade do nervo vago que ocorre nestes animais, visto que a vagotomia subdiafragmática bilateral precoce bloqueia a hiperinsulinemia em ratos MSG (BALBO et al, 2000).

Estudos demonstram que o exercício físico constituído de natação, iniciado aos 21 dias, retarda o início da obesidade induzida por MSG em camundongos e melhora a secreção de insulina nestes animais (ANDREAZZI et al, 2009), o que indica que há preservação da capacidade das células beta pancreáticas de produzirem insulina adequadamente frente à determinada concentração de glicose (NAPOLI et al, 2004). A hiperinsulinemia de jejum e a intolerância à glicose também são corrigidos pela natação. Portanto, o exercício pode interferir no controle central do gasto energético, o que preserva a sensibilidade à insulina e mantém controlada a sua secreção pelas células beta (SCOMPARIN et al, 2009).

1.6 A OBESIDADE E SUA RELAÇÃO COM O PEPTÍDEO SEMELHANTE AO GLUCAGON (GLP-1)

O Peptídeo semelhante ao glucagon, ou GLP-1, é uma incretina com grande potencial insulínico. É produzido principalmente pelas células L intestinais localizadas predominantemente no íleo distal, cólon e reto (EISSELE et al, 1992; SJOLUND et al, 1983). A passagem de nutrientes, incluindo glicose, AG e fibras, estimulam a expressão do GLP-1 e sua liberação pelas células L (PERFETTI e MERKEL, 2000). As funções deste hormônio consistem na liberação pós-prandial de insulina dependente de glicose (KREYMANN et al, 1987), diminuição da motilidade gástrica, supressão do glucagon plasmático e promoção da saciedade, além de estimular o crescimento e neogênese das células beta pancreáticas (XU et al, 1999).

O sucesso demonstrado pelo GLP-1 em reduzir a glicemia levou à aprovação da utilização da exendina-4, um agonista do receptor de GLP-1, para o tratamento de pacientes com DM2 (NIELSEN, YOUNG e PARKER 2004). Alguns estudos demonstram que a secreção de GLP-1 é reduzida em pacientes com DM2 (NAUCK et al, 1986), o que pode contribuir, em parte, para as condições prejudiciais observadas nestes pacientes, como a hiperglicemia (LIM e BRUBAKER, 2006).

1.6.1 Células L Intestinais

As células L são a segunda maior população de células endócrinas presentes no intestino delgado e grosso. São encontradas em maior abundância no jejuno distal, no íleo e também ao longo do intestino grosso e reto (EISSELE et al, 2002). Estas células são do “tipo aberto” e possuem forma de frasco. Estão localizadas nas microvilosidades intestinais que alcançam o lúmen do intestino e possuem um domínio rico em grânulos endócrinos, próximos à lâmina basal (LARSSON et al, 1975) (Figura 2). A forma destas células sugere que elas podem responder a mudanças no ambiente do lúmen intestinal, resultando em uma descarga basal do conteúdo de seus grânulos (KIEFFER e HABENER, 1999).

Figura 2: Fotomicrografia de uma célula L na camada mucosa de intestino humano, evidenciando um grande núcleo central e os grânulos de secreção próximos à lâmina basal (setas).



Fonte: KIEFFER e HABENER, 1999.

O gene do pró-glucagon é o responsável pela produção de GLP-1, e é expresso tanto nas células L, quanto nas células alfa pancreáticas (LEE, BRUBAKER e DRUCKER, 1990). A clivagem do pró-glucagon pela enzima pró-hormônio convertase 1/3, que também é expressa nas células L, libera tanto o GLP-1 quanto o GLP-2 (*glucagon-like peptide 2*), sendo este último um hormônio envolvido no metabolismo e crescimento intestinal. A célula L também libera outros peptídeos como a glicentina e a oxintomodulina, os quais também possuem funções ligadas à regulação energética (DHANVANTARI, SEIDAH e BRUBAKER, 1996).

1.6.2 Regulação da secreção de GLP-1

A liberação de GLP-1 ocorre sob o controle de nutrientes, hormônios e vias neurais. Existe um mecanismo de liberação bifásico, ou seja, tanto hormonal quanto neural, que ocorre inicialmente (aproximadamente entre 15 e 30 minutos após ingestão alimentar), e um mais tardio (entre 30 a 60 minutos após a ingestão de alimentos), que ocorre após o contato direto das células L com os nutrientes (ELLIOTT et al, 1993).

O desenvolvimento de estudos *in vitro* para avaliar a liberação de GLP-1 a nível celular tem fornecido alguma informação a respeito das vias de sinalização que regulam a secreção e expressão desta incretina. Estudos com culturas celulares de determinadas linhagens de células L indicam que a ativação da proteína quinase A (PKA) estimula a sua liberação e síntese (BRUBAKER, SCHLOOS e DRUCKER, 1998). Em contraste, a ativação da PKC resulta em um aumento na secreção de GLP-1, mas parece não aumentar a transcrição do gene pró-glucagon (DAMHOLT, BUCHAN e KOFOOD, 1998). A inibição da secreção por meio de bloqueador de canal de cálcio (CoCl_2) e estímulo da liberação por aumento da concentração de cálcio intracelular indicam que o cálcio exerce um papel na secreção basal pelas células L (BRUBAKER, SCHLOOS e DRUCKER, 1998). Estudos recentes têm demonstrado que a expressão de pró-glucagon também pode ser ativada por uma via mediada pela beta catenina a partir do fator de transcrição 7 tipo 2 (TCF7L2), ou fator de transcrição 4 (TCF4), como também é conhecido (YI, BRUBACKER e JIN, 2005). Alguns estudos relatam inclusive que variações do TCF7L2 podem estar ligados ao risco do desenvolvimento do DM2 (GRANT et al, 2006). Assim, podem existir múltiplos sinais envolvidos na resposta das células L, os quais são importantes ao permitir uma resposta integrada, gerando um efeito apropriado ao organismo (KIEFFER e HABENER, 1999).

1.6.3 Ações do GLP-1 na liberação de insulina pelas células beta pancreáticas

As células beta pancreáticas possuem receptores específicos de GLP-1, e sua ativação possui múltiplas ações. O GLP-1 estimula rapidamente a secreção de insulina, além de promover também a sua expressão gênica. Outras ações conhecidas são o crescimento das células beta e sua neogênese, importantes funções que podem ser clinicamente relevantes para o tratamento do diabetes (PERFETTI e MERKEL, 2000).

O mecanismo que envolve o GLP-1 na secreção de insulina em resposta à glicose nas células beta requer a via de sinalização da glicose, que resulta na geração de ATP, além da sinalização por meio do receptor do GLP-1 (acoplado com uma proteína G estimulatória) e a uma adenilato ciclase cálcio-calmodulina sensitiva (MOJSOV, WEIR e HABENER, 1987). Este receptor ativa vias envolvendo a PKA e o AMPc, que fecham os canais de potássio sensíveis ao ATP,

que são integrados pelo retificador de entrada Kir6.2 e o receptor de sulfonilureia SUR1. O fechamento destes canais provoca então a despolarização das células, levando à abertura dos canais de cálcio sensíveis ao ATP. Ocorre então o influxo de Ca^{2+} através destes canais, o que ativa a secreção de insulina pelo processo de exocitose (Figura 1). O GLP-1 também exerce uma influência direta na entrada de cálcio por canais sensíveis a dihidropiridina (tipo L) e na abertura de canais de cátion não seletivos Ca^{2+} -ativados, que são permeáveis tanto Ca^{2+} quanto a Na^+ (KREYMAN et al, 1987). A própria fosforilação dos grânulos pela PKA também acarreta na liberação de insulina. Portanto, as funções do GLP-1 geram uma resposta apropriada das células beta na presença de glicose (KIEFFER e HABENER, 1999).

1.6.4 Ação do GLP-1 na proliferação das células beta

Foi também demonstrado que o GLP-1 exerce um efeito trófico na proliferação das células beta pancreáticas (AIZAWA et al, 1998). Em roedores com intolerância a glicose ou diabetes, o GLP-1 e seu análogo, a Exendina 4, aumentaram em número as células beta pancreáticas. O GLP-1 promoveu replicação destas células em camundongos e estimulou também a síntese de DNA em culturas celulares por meio de vias dependentes da PI-3-quinase (BUTEAU et al, 1999).

O GLP-1 também é capaz de promover a diferenciação de precursores das células beta no epitélio do ducto pancreático. Além disso, o GLP-1 exibe efeitos antiapoptóticos em células beta de modelos de roedores obesos (DRUCKER, 2006). Dados indicam que estes efeitos antiapoptóticos são também observados em culturas isoladas de ilhotas humanas (AIZAWA et al, 1998). Esses efeitos do GLP-1 podem envolver os alvos da PI-3-quinase, como a quinase relacionada com sinais extracelulares (ERK) e a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK p38) (BUTEAU et al, 2001).

Outro mecanismo pelo qual o GLP-1 tem efeito positivo na proliferação das células beta pode ser pela regulação positiva do PDX-1 (homeobox duodeno pancreático), um fator de transcrição que é essencial para o desenvolvimento e função das células beta. Este fator exerce um papel central na

transcrição do gene da insulina e também na sua secreção (HUI, WRIGHT e PERFETTI, 2001).

Estudos também têm indicado a ativação da proteína quinase C ζ (PKC ζ) pelo GLP-1, que também pode estar envolvida na proliferação das células beta (BUTEAU et al, 2001). Assim, ao menos duas vias de sinalização (ativação pela PI-3-quinase de ERK, MAPK, ou PKC e translocação de cAMP/PKA pelo PDX-1) podem estar envolvidas no efeito proliferativo do GLP-1 nas células beta pancreáticas. Estes dados sugerem que futuras terapias envolvendo as vias de transdução de sinais do GLP-1 podem ser utilizadas para melhorar a capacidade das células beta, aumentando assim sua proliferação e secreção (MACDONALD et al, 2002).

1.6.5 Ação do GLP-1 na supressão de glucagon

O glucagon é um hormônio sintetizado pelas células alfa no pâncreas. Sua principal ação ocorre no fígado, onde estimula a glicogenólise, glicoenogênese e a produção de corpos cetônicos, o que resulta em um aumento de nível de glicose plasmático. O glucagon, portanto, possui efeitos antagônicos aos da insulina (FOA, BAJAJ e FOA, 1987).

O GLP-1 apresenta a capacidade de restringir a secreção de glucagon nas ilhotas pancreáticas, sendo considerado, portanto um importante mecanismo para a regulação da concentração plasmática de glicose (NAUCK et al, 2002). Porém, o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não é completamente compreendido. O efeito inibitório é provavelmente indiretamente mediado via liberação de insulina e secreção de somatostatina, visto que esta última também apresenta secreção aumentada em resposta ao GLP-1, efeito independente da concentração de glicose (FEHMANN, GOKE e GOKE, 1995). Entretanto, um possível efeito direto do GLP-1 não está completamente excluído, ao passo que seus receptores também são expressos nas células alfa, produtoras de glucagon (HOLST, 2002).

1.6.6 Ações do GLP-1 no trato gastrointestinal

O GLP-1 exerce efeito inibitório na secreção e motilidade do trato gastrointestinal, particularmente no esvaziamento gástrico (HOLST, 2002). A administração de GLP-1 em indivíduos saudáveis resulta em uma diminuição do esvaziamento gástrico e da absorção de glicose, o que gera uma subsequente redução da concentração de glicose pós-prandial (NAUCK et al, 1997). Estes eventos sugerem a participação do GLP-1 no fenômeno de “freamento ílfaco”, pelo qual nutrientes presentes no íleo distal induzem uma redução na motilidade e na atividade secretória da parte superior do intestino. Estas ações provavelmente envolvem mecanismos mediados por redes neurais, incluindo vias do nervo vago (GAUTIER et al, 2005).

O papel fisiológico do GLP-1, portanto, ajusta a capacidade absorptiva do intestino, além de regular a quantidade de quimo, reduzindo o trânsito gastrointestinal e diminuindo a secreção de enzimas digestivas. É provável que estes efeitos do GLP-1 no trato digestório sejam mais importantes do ponto de vista fisiológico do que a sua ação insulínica propriamente dita (HOLST, 2002). Em condições patológicas, como no diabetes, os efeitos inibitórios do GLP-1 na motilidade gastrointestinal, particularmente no esvaziamento gástrico, despertam um grande interesse decorrente do seu potencial de regular a homeostase glicêmica pós-prandial (GAUTIER et al, 2005).

1.6.7 Ações do GLP-1 na ingestão alimentar

O GLP-1 tem um potencial de reduzir a ingestão calórica e de promover a saciedade. Em estudos experimentais com roedores, a administração de GLP-1 reduziu significativamente a ingestão alimentar (VAN DIJK e THIELE, 1999). Esta redução na ingestão e consequente menor ganho de peso também foi observada na administração sistêmica de um análogo de GLP-1 em macacos rhesus, em camundongos db/db obesos e em ratos diabéticos Zucker (MEIER et al, 2002). Em indivíduos normais, a administração intravenosa de GLP-1 induziu aumento na sensação de saciedade, assim como uma redução na ingestão alimentar (FLINT et al, 1998). Efeitos similares foram observados em indivíduos obesos e em pacientes com DM2, os quais tratados com infusões subcutâneas do

GLP-1 apresentaram redução de ingestão e perda de peso associada (ZANDER et al, 2002).

O mecanismo exato pelo qual o GLP-1 é capaz de modular a ingestão alimentar não está completamente desvendado. É possível que o GLP-1 periférico aja nas fibras vagais aferentes, onde modula transmissões neurais ao SNC. Esta hipótese é suportada pela localização de neurônios contendo GLP-1 no núcleo do trato solitário, o qual projeta dentro de regiões hipotalâmicas envolvidas no controle do apetite (MEIER et al, 2002). Outra possibilidade é que o GLP-1 circulante alcance diretamente receptores acessíveis localizados na barreira hemato-encefálica, que por sua vez retransmitem ao núcleo cerebral envolvido na homeostase de nutrientes (BAGGIO e DRUCKER, 2007). É também provável que a própria inibição do esvaziamento gástrico mediado pelo GLP-1 aumente a sensação de saciedade e leve ao término da ingestão de alimento, portanto participando da regulação do consumo alimentar (GAUTIER et al, 2005).

1.6.8 Outras ações do GLP-1

O GLP-1 pode ter alguns efeitos fisiológicos no coração. A partir de receptores presentes no coração, no seu estado basal, o GLP-1 pode inibir a contração cardíaca, porém após lesão cardíaca ele pode melhorar o desempenho do miocárdio tanto em animais como em humanos (MEIER et al, 2002). Estas observações podem indicar o GLP-1 como um agente ativo na proteção cardíaca, porém ainda são necessários mais estudos para viabilizar o entendimento de como isso ocorre (HOLST, 2007).

O GLP-1 também pode ter efeitos neurotrópicos. Assim, a administração intracerebroventricular de GLP-1 foi associada com efeitos neuroprotetores em ratos (DURING et al, 2003), sendo inclusive proposto como um novo agente terapêutico para doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer (PERRY e GREIG, 2004). Foi relatado que o estímulo de receptores de GLP-1 aumenta a pressão sanguínea e a frequência cardíaca e ativa neurônios regulatórios autonômicos em ratos, levando a ativação de respostas cardiovasculares (YAMAMOTO et al, 2002). Além do mais, tem sido sugerido que certos neurônios catecolaminérgicos expressam receptores de GLP-1, o que pode

relacionar o GLP-1 periférico com os centros de controle autonômicos que participam das suas diversas ações neuroendócrinas e autonômicas (YAMAMOTO et al, 2003).

Existem também receptores de GLP-1 nos pulmões, mas a função desta proteína neste órgão não está bem esclarecida (LANKAT-BUTTGEREIT et al, 1994).

1.7 A OBESIDADE E O PAPEL DAS ADIPOCINAS

A relação entre adiposidade visceral e desenvolvimento da síndrome metabólica é também derivada do quadro inflamatório associado. Isto se deve ao tecido adiposo ser considerado um tecido endócrino complexo e ativo, que secreta numerosos fatores imunomoduladores (HUTLEY e PRINS, 2005). Os adipócitos são células envolvidas principalmente no armazenamento energético. Além disso, estas células possuem uma grande capacidade secretora, sintetizando e secretando diversos fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos, as chamadas adipocinas (KERSHAW e FLIER, 2004). Há ainda adipocinas que não são secretadas pelos adipócitos propriamente ditos, mas sim por macrófagos infiltrados no tecido adiposo (WEISBERG et al, 2003). O tecido adiposo se comunica constantemente com outros órgãos, como o SNC (KERSHAW e FLIER, 2004). Desta forma, por meio de um sistema dinâmico de sinalização, o tecido adiposo e as adipocinas participam de vias biológicas importantes como o consumo e o balanço energético, metabolismo de nutrientes e sistema imune (ESPOSITO et al, 2006). A seguir, serão discutidas determinadas adipocinas que possuem funções importantes na sensibilidade à insulina e no metabolismo energético e no processo inflamatório.

1.7.1 Adiponectina

A adiponectina é uma proteína secretada em grande quantidade pelo tecido adiposo. Sua concentração plasmática é inversamente proporcional à adiposidade. Ou seja, baixa concentração desta proteína (hipoadiponectinemia) está relacionada com altos índices de massa adiposa, menor sensibilidade à insulina, níveis plasmáticos de lipídios desfavoráveis e aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (TRUJILLO e SCHERER, 2005). Portanto, a adiponectina desempenha um importante papel em processos metabólicos ligados à

obesidade, DM 2 e doenças cardiovasculares, devido às suas propriedades antiaterogênicas, antiinflamatórias e sensibilizadoras de insulina (HUTLEY e PRINS, 2005). A adiponectina age com a insulina para inibir a produção hepática de glicose, além de estimular a oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético e outros tecidos (MATSUZAWA et al, 2004). Na obesidade e DM 2, a expressão dos receptores de adiponectina no músculo esquelético está aumentada. Esta proteína também age aumentando a produção de óxido nítrico (NO) e adenosina monofosfato-ativado quinase, diminuindo a proteína C-reativa e interleucina-6 e inibindo o TNF alfa. Além disso, reduz a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e desencadeia suas propriedades antiinflamatórias reduzindo a produção de citocinas pelos macrófagos, via inibição do NfKapa-beta (BERG, COMBS e SCHERER, 2002). Desse modo, a adiponectina pode ter grande aplicação nos estudos clínicos, como um indicador dos fatores que compõe a síndrome metabólica.

1.7.2 TNF alfa (Fator de necrose tumoral alfa)

O TNF alfa é uma adipocina pro-inflamatória que estimula a expressão de outros mediadores inflamatórios, incluindo a leptina e a IL-6, ao passo que a expressão e secreção de adiponectina é reduzida em resposta ao TNF alfa (HUTLEY e PRINS, 2005). É demonstrado que a expressão aumentada de TNF alfa e a consequente redução da expressão de adiponectina tem grande importância no desenvolvimento da síndrome metabólica. Durante o ganho de peso, ocorre aumento da expressão de TNF alfa, que consequentemente diminuem durante períodos de perda de peso (WANG, JENKINS e TRAYHURN, 2005). O TNF alfa circulante é secretado principalmente em macrófagos acumulados no tecido adiposo de indivíduos obesos, enquanto que os adipócitos produzem predominantemente uma forma não secretada ligada à membrana (XU et al, 2002). O TNF alfa estimula lipólise, e níveis aumentados deste estão correlacionados com resistência à insulina, hiperinsulinemia e hipertensão. Esta adipocina também age aumentando a ativação de NFkapa-Beta no endotélio e no músculo liso, resultando na expressão de moléculas de adesão vasculares e citocinas, levando ao acúmulo de células inflamatórias (WANG, JENKINS e TRAYHURN, 2005).

1.7.3 PPAR (Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma)

Os PPARs são fatores de transcrição ligante-dependentes que regulam a expressão de genes-alvo pela ligação à PPRE (elementos responsivos aos proliferadores de peroxissoma) específicos, que estão situados em sítios regulatórios de cada gene. O receptor liga-se ao PPRE como um heterodímero, juntamente com um fator protéico adicional, o receptor do ácido 9-cis retinóico (RXR). Sob atuação de agonistas, a conformação do PPAR é alterada, criando um sítio de ligação, com posterior recrutamento de coativadores transcripcionais, resultando em aumento na transcrição gênica (LOVISCAH, 2000). Numerosos ácidos graxos e derivados, incluindo uma variedade de eicosanóides e prostaglandinas, têm sido identificados como ligantes para os PPARs, tendo também sido demonstrado serem alvos para numerosas classes de compostos sintéticos, utilizados no tratamento do diabetes e dislipidemias (TORRA et al, 2001). Portanto, o conhecimento dos mecanismos moleculares e fisiológicos destes receptores torna-se extremamente importante, quer no desenvolvimento como na utilização de drogas para o tratamento de doenças metabólicas.

O PPAR gama (Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama) é predominantemente expresso no tecido adiposo. Entretanto, pode possuir efeitos secundários em tecidos insulino-responsivos, tais como muscular esquelético e fígado. O PPAR gama tem papel fundamental na diferenciação de adipócitos. (SEMPLE, CHATTERJEE e O'RAHILLY, 2006). Sabe-se que o PPAR gama regula a expressão de numerosos genes nos adipócitos, e estes estão envolvidos no metabolismo de lipídeos, incluindo a, acil-CoA sintetase e lipase lipoprotéica (LPL). Além disso, este fator de transcrição controla a expressão da proteína transportadora de ácidos graxos 1 (FATP-1) e CD36, ambos envolvidos na captação de lipídeos pelos adipócitos (TAVARES, HIRATA, M. e HIRATA, C, 2007). A ativação do PPAR gama poderia induzir um aumento da remoção de ácidos graxos pelo tecido adiposo, com consequente diminuição na concentração plasmática e transporte para o músculo. Essa diminuição de ácidos graxos no músculo aumenta a sensibilidade à insulina e a atividade adipogênica do PPAR gama contribui de forma importante neste efeito (SEMPLE, CHATTERJEE e O'RAHILLY, 2006). Seu nível reduzido nos tecidos metabolicamente importantes na homeostase da glicose, por

exemplo, músculo esquelético, fígado e células beta pancreáticas, aumenta a questão de sua possível importância fisiológica e farmacológica nesses sítios (LOVISCAH, 2000). Além disso, sua alta expressão em macrófagos é bem estabelecida em indivíduos obesos, cuja infiltração nos tecidos adiposos com função comprometida pode ser patologicamente importante (WEISBERG et al, 2003).

O PPAR alfa, por sua vez, é expresso principalmente em órgãos e tecidos em que ocorra a oxidação de ácidos graxos, como o fígado, músculo, endotélio vascular e músculo liso. Os genes regulados pelo PPAR alfa participam na regulação de proteínas-chave envolvidas no metabolismo de lipídios, oxidação de ácidos graxos, hemostasia e inflamação (TORRA et al, 2001). Portanto, o PPAR alfa pode estar envolvido com risco de doenças cardiovasculares através de múltiplas vias, incluindo alterações nas concentrações de lipídios, obesidade, resistência à insulina, e respostas inflamatórias (TAI et al, 2002).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS:

Avaliar os efeitos do treinamento físico na expressão da incretina GLP-1 e suas ações sobre as ilhotas pancreáticas, bem como a expressão de adipocinas do tecido adiposo mesentérico de animais portadores de síndrome metabólica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar os efeitos do exercício físico aeróbico (natação) na ação insulínica do GLP-1 nas ilhotas pancreáticas, utilizando-se ratos obesos MSG;
- Analisar os efeitos do exercício quanto à expressão do hormônio GLP-1 produzido pelas células L intestinais pela técnica de qRT-PCR, além de localização proteica por meio de ensaios de imunohistoquímica, em cortes histológicos de íleo distal;
- Avaliar os níveis de mRNA das adipocinas adiponectina, TNF alfa, PPAR gama e PPAR alfa presentes no tecido adiposo mesentérico destes animais;
- Estudo da morfologia dos adipócitos do tecido visceral por meio de cortes histológicos e sua relação com a expressão de algumas adipocinas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, Brasil, segundo protocolo 02860, de acordo com a lei Federal Brasileira (Anexo A).

Ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) (n=32) foram selecionados e tratados durante os 5 primeiros dias de vida, por meio de aplicações subcutâneas na região cervical, com MSG (4 mg/g de peso corporal) ou solução salina equimolar, no caso dos animais controle. Ao completarem 21 dias de vida, os animais foram desmamados e divididos em quatro grupos: controles sedentários (CON-SED) (n=8); controles exercitados (CON-EXE) (n=8); MSG sedentários (MSG-SED) (n=8); e, MSG exercitados (MSG-EXE) (n=8). Durante todo o experimento, os animais permaneceram sob condições controladas de luminosidade (12h de claro/escuro) e temperatura (21 ± 2 °C), e tiveram livre acesso à água e alimento comercial.

3.2 TREINAMENTO FÍSICO

Após o desmame (21 dias), animais CON (n = 16) e MSG (n = 16) foram subdivididos em dois grupos, exercitados (EXE) e sedentários (SED). Na primeira semana de natação, todos os animais foram habituados à água e adaptados ao programa de natação. Este período consistiu de natação livre, três vezes por semana e o tempo de natação aumentou gradualmente de 5, 15 e 30 minutos. Após uma semana de adaptação, cada sessão do programa de treinamento consistiu de natação, durante 30 minutos por dia, três vezes por semana. Pelo fato dos ratos serem nadadores naturais, os protocolos de natação são amplamente utilizados. A intensidade do exercício foi determinada pelo peso utilizado. A cada semana os animais eram pesados e o equivalente a 5% do peso corporal era preso à base da cauda dos animais, com a finalidade de assegurar um exercício constante durante todo o período. A natação foi praticada em piscina para ratos (1m²), com água aquecida a 32 ± 2 °C. A temperatura da água foi mantida a esta temperatura para eliminar o estresse induzido pelo frio. A profundidade maior de 30 centímetros preveniu os ratos de descansarem no fundo da piscina. Após a

natação, os animais foram secos e devolvidos às gaiolas. Os ratos nadaram durante dez semanas. No máximo seis ratos de cada grupo foram colocados simultaneamente na piscina às 16:00 horas nos dias de treinamento. Dois grupos, CON-SED e MSG-SED, permaneceram sedentários durante todo o experimento.

3.3 AVALIAÇÃO DO GRAU DE OBESIDADE

Ao completarem 90 dias de vida, 48 horas após a última sessão de treinamento, foram medidos o comprimento nasoanal (CNA), em centímetros, e o peso corporal dos animais, em gramas. O índice de Lee foi calculado da seguinte maneira: $\sqrt[3]{(\text{peso corporal (g)}) / (\text{comprimento naso - anal (cm)})}$ (BERNARDIS e PATTERSON, 1968). Após o sacrifício dos animais, o sangue foi coletado em tubos contendo heparina. O plasma foi obtido por centrifugação a 3000 g a 4 °C. A glicose plasmática foi medida pelo método de glicose-oxidase (Gold Analisa®) e a insulina foi medida por radioimunoensaio (RIE). Os depósitos de gordura visceral (mesentérica) foram retirados, lavados em solução salina e pesados. Os dados foram expressos considerando-se o peso corporal (g/100g do peso corporal).

3.4 ESTÍMULO COM SOLUÇÃO DE GLICOSE

Aos 90 dias de vida, 4 animais de cada grupo (CON-SED, CON-EXE, MSG-SED e MSG-EXE - total=16 ratos) foram sacrificados após 12 horas de jejum e este grupo foi denominado “grupo Jejum”. Ao grupo restante (total de 16 ratos divididos também nos 4 grupos), foram administrados 7 mL de solução de glicose (na concentração 1g/mL), 30 minutos antes do sacrifício, sendo este denominado “grupo Glicose”. Portanto, cada um dos dois grupos permaneceu contendo os quatro subgrupos, de acordo com o tratamento recebido: CON-SED, CON-EXE, MSG-SED e MSG-EXE.

3.5 ENSAIOS DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a realização da técnica de imunohistoquímica, foram retiradas amostras de tecido da porção terminal do íleo distal dos animais, as quais foram fixadas em Bouin por 24 horas. As amostras foram processadas convencionalmente para secções em parafina, cortadas em micrótomo com espessura de 5 µm e

montadas em lâminas tratadas com 3-aminotrietoxisilano. Para coloração de imunohistoquímica, as secções foram desparafinizadas em xilol, reidratadas por meio de concentrações graduais de etanol, e então lavadas em água corrente. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato (ácido cítrico 10mM, pH 6,0). A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com 3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Então, as secções foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS 10mM, pH 7,4) e incubadas com bloqueador proteico (caseína 0,4% em PBS). Após nova lavagem com PBS, as secções foram incubadas com anticorpo monoclonal anti GLP-1 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) durante 18 horas, a 4 °C. Os cortes foram então lavados com PBS e incubados com Bloqueador Pós Primário (Leica, Newcastle, UK), em temperatura ambiente, por 30 minutos, e novamente lavados com PBS. A ativação da peroxidase foi estabelecida com DAB (3,3' - diaminobenzidina tetrahydrocloridro a 1,74 %, em solução tampão). Então, as secções foram contra coradas com hematoxilina 0,02%, desidratadas com concentrações crescentes de etanol e as lâminas finalmente montadas em meio Permount (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). As lâminas utilizadas como controles negativos foram incubadas com PBS, sendo que o anticorpo primário não foi utilizado. Não foram detectadas reações específicas nestas secções.

Para estimar a frequência de células imunorreativas, foram realizadas fotomicrografias dos cortes (em microscópio Olympus BX41, acoplado ao sistema de captura de imagem Olympus DP71) e o número de células marcadas foi contado em dez unidades de área (1 área = 1000 μm^2), aleatoriamente em cada secção, para todos os animais.

3.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR qRT-PCR (*QUANTITATIVE REAL TIME - POLYMERASE CHAIN REACTION*)

Para as reações de qRT-PCR, amostras de aproximadamente 5 mm³ do íleo distal e da gordura mesentérica foram retiradas e armazenadas em tubos de 1,5 mL contendo RNAlater[®] (Qiagen). Os tecidos foram estocados à -80 °C até seu processamento.

A extração do RNA total foi realizada assepticamente, utilizando-se o kit comercial “*Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit*” (GE Healthcare), de acordo

com indicações do fabricante (Anexo B). Alíquotas de 2 µL de RNA total foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed (Biotium), para verificação da integridade da amostra (Anexo C). O RNA total foi quantificado em NanoVue (GE Healthcare). As amostras de RNA foram armazenadas em ultrafreezer -80 °C até sua utilização.

Para a síntese do cDNA (DNA complementar), aproximadamente 1 µg de RNA total foi submetido à transcrição reversa, utilizando-se o kit comercial “*First-Strand cDNA Synthesis Kit*” (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante (Anexo D). Alíquotas de cDNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% e posteriormente estocadas a -20 °C.

A análise da expressão gênica foi realizada por ensaios de qRT-PCR em equipamento Stratagene MxPro 3005P qPCR (Agilent Technology). Todas as amostras de cDNA a serem testadas foram deixadas em uma mesma concentração inicial (aproximadamente 60 ng) e todos os ensaios foram realizados em duplicatas. Na tabela 1, podem ser encontradas as sequências dos *primers* utilizados para amplificação do GLP-1 (Gene ID: 2641) e das seguintes adipocinas: adiponectina (Gene ID: 246253), TNF alfa (Gene ID: 24835), PPAR alfa (Gene ID: 25747), PPAR gama (Gene ID: 25664), além do rDNA 18S (Gene ID: 100008588), o qual foi utilizado como gene de referência neste trabalho (controle interno). Os *primers* para ensaios de qRT-PCR foram desenhados e, posteriormente sintetizados, a partir de sequências nucleotídicas depositadas no banco de dados *Gene Bank* presente no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tabela 1 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de qRT-PCR, bem como o tamanho do fragmento gerado pela amplificação.

Gene	Primer forward (5' → 3')	Primer reverse (5' → 3')	Tamanho do fragmento (pb)
Adiponectina*	AAGGACAAGGCCGTTCTCT	GGCAGTCAGTTGGTATCATGG	209
TNF alfa*	GCTCCCTCTCATCATTCCA	GCTTGGTGGTTTGCACGAC	102
PPAR alfa*	ATGCCAGTACTGCCGTTTC	GGCCTTGACCTTGTTTCATGT	221
PPAR gama*	CCAGAGTCTGCTGATCTGCG	GCCACCTCTTTGCTCTGCTC	218
GLP-1	GGAATAACATTGCCAAACGTC	GCCTTTCACCAGCCAAGCAA	125
18S	ATGCGTGCATTTATCAGA	AACTATCCCGTCTGCAAG	156

* Fonte: ROMAN-RAMOS et al, 2011.

Nas reações de amplificação, foram utilizados os seguintes reagentes: SYBR Green master mix 1X (Stratagene); 8 µM dos *primers forward* e *reverse*; e, água suficiente para 25 µL finais. Um controle negativo, o qual continha água em vez de cDNA molde, foi incluído nas corridas para cada um dos genes. O equipamento foi programado da seguinte maneira: 5 minutos a 94 °C; 40 ciclos: 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C e 30 segundos a 72 °C. A curva de dissociação apresentou as seguintes condições: 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 55 °C e 10 segundos a 94 °C. Foi então obtido o *Threshold Cycle* (Ct) e a mudança relativa na expressão gênica foi apresentada como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

3.7 ENSAIOS COM AS ILHOTAS PANCREÁTICAS

3.7.1 Isolamento das ilhotas Pancreáticas

Ilhotas pancreáticas foram isoladas por meio da técnica da collagenase (LACY e KOSTIANOVISKY, 1967), com adaptações (Anexo E). Cerca de 8 mL de tampão de Hanks contendo collagenase tipo V (1 mg/mL, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO) foi injetada no ducto hepático comum dos ratos. O pâncreas, perfundido com esta solução, foi rapidamente retirado e incubado em tubos Falcon durante 15 minutos, a 37 °C, agitações foram realizadas para facilitar a degradação do tecido pancreático. A suspensão foi então filtrada com uma malha metálica. O filtrado foi submetido a 5 lavagens contínuas contendo uma solução

resfriada de Hanks e albumina bovina (BSA) a 0,12%, com o objetivo de extrair a colagenase, enzimas digestivas liberadas pelo tecido e demais fragmentos celulares, como o tecido acinar. As ilhotas foram então coletadas com o auxílio de lupa e transferidas para placa de Petri contendo solução de Hanks.

3.7.2 Secreção de insulina induzida por glicose

Grupos de 4 ilhotas foram pré-incubadas por 60 minutos em 1 mL de solução de Krebs, contendo 5,6 mM de glicose. Esta solução foi gaseada com O₂/CO₂ (95/5%) e mantida em pH 7,4 e suplementada com albumina (0,12%). Então, as ilhotas foram submetidas a diferentes concentrações de glicose (5,6 e 16,7mM) e incubadas por 60 minutos. Amostras de meios de incubação foram coletadas, congeladas e armazenadas para posterior dosagem de insulina.

3.7.3 Ação insulínica do GLP-1

Grupos de 4 ilhotas foram pré-incubadas por 60 minutos em 1 mL de solução de Krebs, contendo 5,6 mM de glicose, em condições semelhantes às descritas acima. Após este período, as ilhotas foram incubadas com glicose a 5,6 ou 16,7 mM por 60 minutos, na presença ou ausência de GLP-1 (10 nM). Amostras de meios de incubação foram coletadas, congeladas e armazenadas até sua dosagem, que foi realizada por radioimunoensaio (RIE).

3.7.4 Quantificação da insulina

A insulina secretada foi quantificada pelo método de RIE, utilizando-se anticorpo específico para insulina de rato (anti-rat) para traçar a curva padrão e insulina recombinante humana marcada com Iodo¹²⁵. A técnica baseia-se na competição do anticorpo pela insulina radioativa e da amostra a ser avaliada. Os valores de radioatividade após 48 horas de competição são lidos em contagem por minuto (cpm) e convertidos pelo contador de radioatividade Gama, em ng/mL.

3.8 CORTES HISTOLÓGICOS DO TECIDO MESENTÉRICO

As amostras coletadas do tecido mesentérico dos animais foram fixadas em Bouin por 24 horas e então processadas convencionalmente para secções em parafina, cortadas em micrótomo com espessura de 5 µm e coradas

convencionalmente com hematoxilina e eosina. Para isso, foi realizada a desparafinização em xilol e posteriores banhos em concentrações decrescentes de álcool. Após lavagem em água destilada, os cortes foram corados com Hematoxilina de Harris por 1 minuto e novamente lavados com água destilada. Após, as secções foram embebidas em eosina por 1 minuto. Após nova lavagem, a desidratação dos tecidos corados foi feita em concentrações crescentes de álcool e xilol, para então as lâminas serem montadas. Os cortes foram então analisados em microscópio (Olympus BX41, acoplado ao sistema de captura de imagem Olympus DP71) e o tamanho dos adipócitos foi determinado utilizando-se o *software* “Image J 1.45s”, calculando-se o tamanho de 200 adipócitos escolhidos aleatoriamente de cada um dos 8 animais de cada grupo. Além disso, foi estimada a quantidade de adipócitos por quadrante, contando-se quantas células haviam em um quadrante de 500 μm^2 de área em cada corte, estabelecendo-se uma média em três cortes para cada animal, de cada grupo.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Os testes estatísticos utilizado foram os testes ANOVA com Pós teste de Bonferroni ou teste T de *Student*, com significância atribuída de $p < 0,05$. As análises foram realizadas por meio do *software* GraphPad Prism[®] 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados na forma de capítulos, os quais correspondem a dois artigos científicos.

Capítulo 1

O treinamento físico restabelece a ação insulínica de GLP-1 nas ilhotas pancreáticas de ratos MSG obesos

Capítulo 2

Efeito do exercício físico na expressão gênica de adipocinas em ratos MSG obesos

CAPÍTULO 1:

O treinamento físico restabelece a ação insulínica de GLP-1 nas ilhotas pancreáticas de ratos MSG obesos

O TREINAMENTO FÍSICO RESTABELECE A AÇÃO INSULINOTRÓPICA DE GLP-1 NAS ILHOTAS PANCREÁTICAS DE RATOS MSG OBESOS

Resumo: O Peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) é conhecido por promover a secreção de insulina estimulada por glicose nas células beta pancreáticas. Este efeito fisiológico é importante para melhorar o controle glicêmico nas condições de obesidade e diabetes tipo 2 (DM2). O exercício físico reduz a gordura visceral e melhora a sensibilidade à insulina, reduzindo o risco de desenvolver o DM2. A administração neonatal de glutamato monossódico (MSG) induz a hipersecreção de insulina, intolerância à glicose e resistência à insulina. Neste trabalho, foi investigado o efeito da natação na ação insulínica do GLP-1 nas ilhotas pancreáticas de ratos MSG obesos. Os ratos foram divididos inicialmente em dois grupos: tratados com MSG e controle (CON). Os dois grupos foram subdivididos em exercitados (EXE) e sedentários (SED). Ratos exercitados foram submetidos à natação. As ilhotas pancreáticas foram isoladas pela técnica da collagenase e incubadas com glicose (5,6 ou 16,7 mM), na presença ou ausência de GLP-1 (10 nM). O conteúdo de tecido adiposo, a glicose e o nível de insulina plasmática também foram avaliados. O íleo foi coletado, e a expressão gênica do GLP-1 foi quantificada por qRT-PCR e imunohistoquímica, para ambas as condições de jejum e após administração de glicose. Ratos MSG-SED tiveram maior conteúdo de gordura, insulinemia de jejum e hiperglicemia comparados aos ratos CON-SED. A natação reduziu a secreção de insulina induzida por glicose em ambos os grupos. A ação insulínica do GLP-1 na presença de 5,6 mM de glicose foi preservada nas ilhotas de ratos MSG-SED. Porém, o treinamento físico inibiu a ação insulínica do GLP-1 na presença de 5,6 mM de glicose nos dois grupos. A ação insulínica do GLP-1 foi ausente nas ilhotas dos animais MSG-SED na presença de 16,7 mM de glicose. A natação restaurou a ação do GLP-1 na presença de 16,7 mM de glicose nas ilhotas obtidas de ratos MSG-EXE. Em todos os grupos, a imunoreatividade e a expressão gênica das células do íleo aumentaram pela ingestão de glicose. O treinamento físico reduziu estes parâmetros apenas nos animais do grupo CON-EXE. Independentemente da condição (jejum ou glicose) e atividade (exercitados ou sedentários), o tratamento com MSG não teve efeito na expressão de GLP-1 do íleo. A natação induziu uma redução no acúmulo de tecido adiposo e preservou a homeostase glicêmica em ratos MSG obesos, provavelmente por modular diretamente a ação insulínica do GLP-1 ou sua resposta nas ilhotas pancreáticas. O treinamento físico inibiu a ação do GLP-1 na presença de menor concentração de glicose. Porém, o treinamento físico foi capaz de restaurar a ação insulínica do GLP-1 na presença de alta concentração de glicose nos ratos MSG obesos.

Palavras-chave: Obesidade. Ilhotas. Insulina. Íleo. Expressão gênica.

INTRODUÇÃO

A homeostase energética é regulada por regiões hipotalâmicas do sistema nervoso central (SNC). Vários sinais liberados de tecidos periféricos por meio de hormônios e nutrientes são traduzidos pela secreção de diferentes neuropeptídeos nas vias neuronais hipotalâmicas e resulta em mudanças na atividade autonômica e no eixo hipotálamo-hipófise (BLOUET e SHWARTZ, 2010). A obesidade é causada por um desequilíbrio no armazenamento e gasto energético e está diretamente relacionada à comunicação imprópria e/ou secreção de vários

fatores homeostáticos. O acúmulo excessivo de tecido adiposo está associado com várias anormalidades, tais como, descontrolo na concentração de glicose, resistência à insulina, hiperinsulinemia e dislipidemia, o que caracteriza a síndrome metabólica (DESPRÉS e LEMIEUX, 2006). Assim, a síndrome metabólica pode ser definida como um grupo de sintomas que aumentam o risco de desenvolver o diabetes mellitus tipo 2 (DM2). A preservação da homeostase da glicose é um grande desafio para pacientes diabéticos. As células beta pancreáticas são importantes neste processo, pois elas secretam insulina em resposta à variações nas concentrações de glicose no meio extracelular, evitando condições hiperglicêmicas. A resistência à insulina é um estado patológico que ocorre quando a sinalização de insulina está comprometida, forçando as células beta a produzirem mais insulina para cobrir a demanda corporal e manter a homeostase glicêmica (MILINAR et al, 2007). Inicialmente, a resistência à insulina é compensada pela hipersecreção de insulina pelas células beta pancreáticas. Entretanto, após longos períodos, a hipersecreção de insulina deteriora a atividade das células beta, reduzindo a produção e/ou secreção de insulina e acelera o início do DM2. Assim, impedir a obesidade e suas complicações relacionadas como a resistência à insulina é fundamental para prevenir o princípio do DM2 (KAHN; HULL e UTZSCHNEIDER, 2006).

Estudos recentes têm contribuído para o entendimento da homeostase energética por demonstrar que as células enteroendócrinas, situadas na parede do intestino, agem como sensores de nutrientes e liberam hormônios denominados incretinas em resposta a ingestão de alimento. Uma atenção especial vem sendo dada ao GLP-1, secretado pelas células L intestinais localizadas no íleo distal e no cólon. A administração de GLP-1 à pacientes com DM2 resultou em uma redução na concentração sanguínea de glicose (TAHRANI et al, 2011). Algumas funções fisiológicas que são ativadas pelo GLP-1 são: a diminuição do esvaziamento gástrico, supressão do apetite e redução do peso corporal, pela ação no hipotálamo. Além disso, o GLP-1 promove a secreção de insulina estimulada por glicose e a proliferação de células beta pancreáticas (AHRÉN, 2009). Sabe-se que pacientes obesos com diabetes têm redução do número de células beta devido à apoptose e a redução da proliferação celular. Estudos demonstram que a fisiologia do GLP-1 é deficiente em pacientes com DM2 e que a administração de GLP-1 exógeno corrige

este defeito. Porém, a circulação do GLP-1 é de vida curta (AHRÉN, 2009). Após sua liberação, mais de 80% do hormônio circulante é degradado dentro de 2 minutos pela enzima dipeptidil peptidase-4 (DPP-4). Estudos da secreção do GLP-1 em resposta à refeições mistas em pacientes com DM2 revelaram um comprometimento pronunciado da secreção de GLP-1, quando comparado a outras incretinas estudadas. A diminuição na secreção de GLP-1 em pacientes obesos também tem sido observada (NASLUND et al, 1998) e é relacionada com um defeito na sua ação incretínica (KNOP et al, 2009). Contudo, não se sabe exatamente como a obesidade afeta a secreção de GLP-1.

A sensibilidade das ilhotas pancreáticas de diabéticos ou obesos ao GLP-1 também é severamente diminuída. O receptor de GLP-1 é um receptor transmembrana de sete domínios que pertence à família de receptores acoplados à proteína G. A atividade insulínica do GLP-1 nas células beta, que é estritamente dependente de glicose, é exercida via interação com o receptor de GLP-1 localizado na membrana das células beta (HOLST e GROMADA, 2004). A ligação do GLP-1 ao receptor causa a ativação (via proteína G-estimulatória) da adeniato ciclase (AC), resultando na formação de cAMP. A maioria das ações do GLP-1 são secundárias à formação de cAMP e subsequente ativação da proteína quinase A (PKA) e ao fator trocador de guanina regulado pelo cAMP II (cAMP-GEF II). Além disso, estudos têm mostrado que o receptor de GLP-1 também é encontrado nos corpos celulares do gânglio nodoso, dos quais emanam sensores aferentes do trato gastro intestinal. Assim, o efeito do GLP-1 nas células beta pode ocorrer indiretamente via ativação de longos reflexos dos nervos vago-vagais (MURPHY e BLOOM, 2006).

A perda de peso melhora a maioria dos fatores envolvidos na patogênese do DM2, isto é, ação da insulina e função das células beta, e é considerada a principal terapia para pacientes obesos. O exercício físico reduz o acúmulo de tecido adiposo e atenua e/ou previne a resistência à insulina, o que contribui com a preservação da homeostase glicêmica (MAARBJERG; SYLOW e RICHTER, 2011). Similarmente, estes efeitos podem ser produzidos por administração contínua de GLP-1 em pacientes obesos e diabéticos. Recentemente, tem crescido o interesse no entendimento dos efeitos do exercício nas mudanças na concentração plasmática destas incretinas (BROOM et al, 2009). Tem sido

demonstrado que o treinamento físico agudo e aeróbico afetam a secreção de incretinas, incluindo o GLP-1. Estes achados sugerem a intrigante possibilidade que o exercício pode funcionar em parte como um regulador fisiológico para liberação ou ação destes hormônios. Tem sido sugerido que alterações na quantidade de insulina plasmática e melhoras na sua ação, seguidas de sessões de exercício, podem ser devido à ação das incretinas (BURMEISTER et al, 2012). Embora a perda de peso e a cirurgia bariátrica demonstrem que os peptídeos intestinais respondam a perturbações metabólicas em pessoas obesas, são limitados os dados que demonstrem a existência de efeitos do exercício físico nestes peptídeos. Ainda, existe a possibilidade de que o treinamento físico module a ação insulínica do GLP-1 diretamente nas células beta pancreáticas. Considerando-se o efeito estimulatório do GLP-1 na proliferação das células beta, estes dados levantam a hipótese de que o exercício possa ajudar na prevenção do DM2 por meio do estímulo ao aumento do número de células beta (DELGHINGARO-AUGUSTO et al, 2012). Estudos prévios em humanos e animais têm mostrado que o treinamento físico por si só geralmente melhora a sensibilidade das células beta e reduz a resposta da insulina à glicose. Porém, a adaptação da resposta ao GLP-1 nas células beta ainda é pouco conhecida.

O núcleo arqueado (ARQ) é considerado uma das mais importantes estruturas hipotalâmicas, pois é um alvo para os hormônios e fatores metabólicos sanguíneos envolvidos na regulação da ingestão alimentar e na homeostase energética. Elevadas doses de glutamato monossódico (MSG) administradas durante a fase neonatal induzem dano no ARQ, o que interrompe o eixo neuroendócrino e o controle metabólico, provocando o início da obesidade. Ratos MSG obesos apresentam acúmulo de tecido adiposo, resistência à insulina, intolerância à glicose e dislipidemia. Assim, este modelo de obesidade reproduz o perfil de síndrome metabólica (DAWSON e WALLACE, 1989). Além disso, as ilhotas pancreáticas dos ratos MSG obesos apresentam alta responsividade à glicose e ação colinérgica insulínica reprimida. O uso de um GLP-1 secundário (NN2211) (LARSEN et al, 2001) demonstrou que a administração subcrônica de agonistas de GLP-1 conferem grande perda de peso tanto em ratos magros como em tratados com MSG, indicando que a ação periférica do GLP-1 está intacta no modelo de obesidade MSG. Porém, o tratamento neonatal com MSG aboliu completamente o

efeito anoréxico central do GLP-1. O treinamento físico nos ratos MSG obesos reduz o tecido adiposo e diminui a resistência à insulina (ANDREAZZI et al, 2009). Recentemente, um estudo demonstrou que o exercício aumenta a produção de GLP-1 nas células L intestinais e células alfa pancreáticas, melhorando a secreção de insulina e reduzindo a hiperglicemia (ELLINGSGAARD et al, 2011). Assim, a proposta deste trabalho foi avaliar os efeitos do exercício na ação insulínica do GLP-1 nas ilhotas pancreáticas e a expressão de GLP-1 nas células L intestinais de ratos MSG obesos.

METODOLOGIA

Grupo de animais

Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, Brasil, segundo protocolo 02860, de acordo com a lei Federal Brasileira.

Ratos Wistar (n=32) foram tratados com injeções de MSG durante os cinco primeiros dias de vida, por meio de aplicações subcutâneas na região cervical de 4 g/kg de peso corporal. Animais controle (CON) receberam solução salina equimolar no mesmo período. Ao completarem 21 dias de vida, os animais foram desmamados. Os animais permaneceram sob condições controladas de luminosidade (12h de claro/escuro) e temperatura (21 ± 2 °C), e tiveram livre acesso à água e alimento comercial (Nuvital, Curitiba, Brasil). Somente machos foram utilizados neste protocolo experimental.

Treinamento físico

Após o desmame (21 dias), animais CON (n = 16) e MSG (n = 16) foram subdivididos em dois grupos, exercitados (EXE) e sedentários (SED). Na primeira semana de natação, todos os animais foram habituados à água e adaptados ao programa de natação. Este período consistiu de natação livre, três vezes por semana e o tempo de natação aumentou gradualmente de 5, 15 e 30 minutos. Após uma semana de adaptação, cada sessão do programa de treinamento consistiu de natação, durante 30 minutos por dia, três vezes por semana. Pelo fato dos ratos serem nadadores naturais, os protocolos de natação

são amplamente utilizados. A intensidade do exercício foi determinada pelo peso utilizado. A cada semana os animais eram pesados e o equivalente a 5% do peso corporal era preso à base da cauda dos animais, com a finalidade de assegurar um exercício constante durante todo o período. A natação foi praticada em piscina para ratos (1m²), com água aquecida a 32±2 °C. A temperatura da água foi mantida a esta temperatura para eliminar o estresse induzido pelo frio. A profundidade maior de 30 centímetros preveniu os ratos de descansarem no fundo da piscina. Após a natação, os animais foram secos e devolvidos às gaiolas. Os ratos nadaram durante dez semanas. Seis ratos de cada grupo foram colocados simultaneamente na piscina às 16:00 horas. Dois grupos, CON-SED e MSG-SED, permaneceram sedentários durante todo o experimento.

Secreção de insulina induzida por glicose

Grupos de 4 ilhotas foram pré-incubadas por 60 minutos em 1 mL de solução de Krebs, contendo 5,6 mM de glicose. Esta solução foi gaseada com O₂/CO₂ (95/5%) e mantida em pH 7,4 e suplementada com albumina (0,12%). Após, as ilhotas foram submetidas a diferentes concentrações de glicose (5,6 e 16,7mM) e incubadas por 60 minutos. Amostras de meios de incubação foram coletadas, congeladas e armazenadas para posterior dosagem de insulina.

Ação insulínica do GLP-1

Grupos de 4 ilhotas foram pré-incubadas por 60 minutos em 1 mL de solução de Krebs, contendo 5,6 mM de glicose, em condições semelhantes às descritas acima. Após este período, as ilhotas foram incubadas com glicose a 5,6 ou 16,7 mM por 60 minutos, na presença ou ausência de GLP-1 (10 nM). Amostras de meios de incubação foram coletadas, congeladas e armazenadas até sua dosagem, que foi realizada por radioimunoensaio (RIE).

Parâmetros bioquímicos e biométricos

Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento foram medidos o comprimento nasoanal e o peso corporal dos animais, dados utilizados para cálculo do índice de Lee ($\sqrt[3]{(\text{peso corporal}(g)) / (\text{comprimento naso} - \text{anal} (cm))}$)

(BERNARDIS e PATTERSON, 1968). Após doze horas de jejum, os ratos foram sacrificados por decapitação. Amostras de sangue total foram coletadas em tubos com heparina. O plasma foi obtido por centrifugação a 3000 g a 4 °C. A glicose plasmática foi medida pelo método da glicose-oxidase (Gold Analisa[®]), e a concentração de insulina foi medida por RIE. O conteúdo de gordura mesentérica foi removido e pesado.

Condições dos animais para protocolo de expressão gênica e imunohistoquímica

O tecido retirado do íleo, o qual foi utilizado nas análises moleculares descritas abaixo, foi coletado em dois grupos separados, tratados com diferentes condições. Na condição de jejum, metade dos animais foi sacrificada após 12 horas de jejum. Ao grupo restante, foi oferecida uma solução de glicose (1 g/mL), 30 minutos antes do sacrifício.

Ensaio de imunohistoquímica

Foram retiradas amostras de tecido da porção terminal do íleo distal dos animais e fixadas em Bouin por 24 horas. As amostras foram processadas convencionalmente para secções em parafina, cortadas em micrótomo com espessura de 5 µm e montadas em lâminas tratadas com 3-aminotrietoxisilano. As secções foram desparafinizadas em xilol, reidratadas por meio de concentrações graduais de etanol, e então lavadas em água corrente. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato (ácido cítrico 10mM, pH 6,0) e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com 3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Então, as secções foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS 10mM, pH 7,4) e incubadas com caseína 0,4%. Após nova lavagem com PBS, as secções foram incubadas com anticorpo monoclonal anti GLP-1 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) durante 18 horas, a 4 °C. Os cortes foram então lavados com PBS e incubados com Bloqueador Pós Primário (Leica, Newcastle, UK), em temperatura ambiente, por 30 minutos. A ativação da peroxidase foi estabelecida com DAB (3,3' - diaminobenzidina tetrahydroclorido a 1,74 %). As secções foram contra coradas com hematoxilina 0,02%, desidratadas com concentrações crescentes de etanol e as lâminas finalmente montadas em meio Permount (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). As lâminas utilizadas como controles

negativos foram incubadas com PBS, sendo que o anticorpo primário não foi utilizado.

Para estimar a frequência de células imunorreativas, foram realizadas fotomicrografias dos cortes (em microscópio Olympus BX41, acoplado ao sistema de captura de imagem Olympus DP71) e o número de células marcadas foi contado em dez unidades de área ($1 \text{ área} = 1000 \mu\text{m}^2$), aleatoriamente em cada uma das três secções por lâmina, para todos os animais.

Análise da expressão gênica por qRT-PCR (*Quantitative Real Time - Polymerase Chain Reaction*)

Secções de aproximadamente 5 mm^3 do íleo distal foram usadas para extração do RNA total, utilizando-se o kit comercial “*Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit*” (GE Healthcare), de acordo com indicações do fabricante. Para a síntese do cDNA (DNA complementar), aproximadamente $1 \mu\text{g}$ de RNA total foi submetido à transcrição reversa, utilizando-se o kit comercial “*First-Strand cDNA Synthesis Kit*” (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante.

A análise da expressão gênica foi realizada por ensaios de qRT-PCR em equipamento Stratagene MxPro 3005P qPCR (Agilent Technology). Todas as amostras de cDNA a serem testadas foram deixadas em uma mesma concentração inicial e todos os ensaios foram realizados em duplicatas. Foram utilizados oligonucleotídeos para amplificação dos seguintes genes: GLP-1 (f: GGAATAACATTGCCAAACGT e r: GCCTTTCACCAGCCAAGCA) e o controle endógeno rRNA 18S (f: ATGCGTGCATTTATCAGA e r: AACTATCCCGTCTGCAAG). As reações foram montadas utilizando-se os seguintes reagentes: SYBR *Green master mix* 1X (Stratagene); $8 \mu\text{M}$ dos *primers forward* e *reverse*; e, água suficiente para $25 \mu\text{L}$ finais. O equipamento foi programado da seguinte maneira: 5 minutos a 94°C ; 40 ciclos: 15 segundos a 94°C , 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C ; seguido de uma curva de dissociação. A mudança relativa na expressão gênica foi apresentada como $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Análise estatística

Todos os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Os testes estatísticos utilizados foram os testes ANOVA com Pós teste de Bonferroni ou teste T de *Student*, com significância atribuída de $p < 0,05$. As análises foram realizadas por meio do *software* GraphPad Prism[®] 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

De acordo com os dados apresentados na tabela 1, a administração neonatal de MSG induziu a obesidade na idade adulta. O peso corporal e o comprimento naso-anal foram, respectivamente, 10% e 8% menores nos grupos MSG-SED, em comparação ao grupo CON-SED. Deste modo, o índice de Lee foi 7% maior nos animais MSG-SED do que nos animais CON-SED. Confirmando a instalação da obesidade, os ratos MSG-SED apresentaram aumento de 100% de gordura mesentérica, quando comparados com os CON-SED ($p < 0,05$). A natação não teve efeito no comprimento naso-anal em ambos os grupos. Porém, houve redução de aproximadamente 6,8% e 7,2% de peso corporal e 25% e 18% de acúmulo de gordura mesentérica, respectivamente, nos grupos CON-EXE e MSG-EXE, em relação aos respectivos grupos sedentários ($p < 0,05$). A insulina de jejum e a concentração de glicose plasmática foram aumentados em 46% e 15%, respectivamente, nos ratos MSG-SED em relação aos CON-SED. Ambos os parâmetros foram restabelecidos pela natação no grupo MSG-EXE ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Os resultados da secreção de insulina induzida por glicose podem ser observados na figura 1. A secreção de insulina estimulada por alta concentração de glicose (16,7 mM) foi aproximadamente 40% maior nas ilhotas pancreáticas dos ratos MSG-SED do que nas ilhotas obtidas de ratos CON-SED ($p < 0,05$). A administração neonatal de MSG não teve efeito na secreção de insulina estimulada por baixas concentrações de glicose (5,6 mM). O exercício físico induziu a redução na secreção de insulina estimulada por glicose em ambos os grupos. Nas ilhotas obtidas dos ratos CON-EXE e MSG-EXE, a secreção de insulina induzida na presença de 16,7mM de glicose foi respectivamente 50% e 67% menor, em relação

a ilhotas isoladas dos grupos sedentários ($p<0,05$). Ilhotas do grupo CON-EXE apresentaram redução de 25% na secreção de insulina induzida por baixas quantidades de glicose (5,6 mM), em relação a ilhotas do grupo CON-SED ($p<0,05$).

O efeito insulínico do GLP-1 na secreção de insulina induzida por glicose nas ilhotas pancreáticas de ratos sedentários e exercitados pode ser observado na figura 2. A adição de GLP-1 (10 nM) na presença de glicose a 5,6 mM aumentou 77% e 100% a secreção de insulina estimulada por glicose nas ilhotas dos grupos CON-SED e MSG-SED, respectivamente (figura 2 A). Porém em ilhotas de ratos exercitados, a ação insulínica do GLP-1 em 5,6mM de glicose foi bloqueada em ambos os grupos. Em ilhotas isoladas do grupo CON-EXE, a adição de GLP-1 provocou inibição de 21% na secreção de insulina estimulada por glicose. Em ilhotas pancreáticas obtidas de ratos MSG-EXE, a atividade insulínica do GLP-1 foi reduzida a apenas 17% ($p<0,05$). O efeito da adição de GLP-1 na presença de altas concentrações de glicose (16,7 mM) está representado na figura 2 B. O GLP-1 potencializou a secreção de insulina induzida por glicose em aproximadamente 54% e 69% nas ilhotas de CON-SED e CON-EXE, respectivamente. Entretanto, a ação insulínica do GLP-1 foi ausente em ilhotas de ratos MSG-SED e esta resposta foi restabelecida pelo exercício físico. A adição de GLP-1 aumentou a secreção de insulina estimulada por glicose em 64% em ilhotas isoladas obtidas dos ratos MSG-EXE ($p<0,05$).

Os ensaios de imunohistoquímica, utilizando-se o anticorpo contra GLP-1, demonstraram que o número de células imunorreativas ao GLP-1 não foi diferente entre os ratos MSG-SED e CON-SED, independente do estado avaliado, jejum ou glicose. Independentemente do tratamento ou do exercício, houve aumento significativo, em média de 26,9% no número de células intestinais imunorreativas ao GLP-1 nos animais que consumiram glicose em relação aos animais em jejum (Figuras 3A e 3B). Todavia, o efeito do exercício foi dependente do grupo. Apenas em ratos CON a marcação com GLP-1 foi afetada pelo exercício. O intestino de ratos CON-EXE apresentaram menor imunoreatividade ao GLP1, quando comparado aos ratos CON-SED, tanto no estado jejum (19,5% menor, $p=0,037$) (Figura 3A - A e B e 3B), quanto no estado glicose (18,8% menor, $p=0,005$) (Figura 3A - E e F e 3 B).

Os dados resultantes dos ensaios de qRT-PCR mostraram que os níveis de expressão de GLP-1 não foram diferentes entre os grupos MSG-SED e CON-SED, em ambos os estados avaliados. No entanto, houve aumento significativo, independentemente do tratamento ou do exercício, na expressão gênica de GLP-1 em média 10,6 vezes no estado glicose quando comparado ao grupo jejum (Figura 4). O exercício apresentou influência nos ratos controle. O nível de expressão do GLP-1 foi significativamente menor nos ratos CON-EXE comparado aos CON-SED. Sendo no grupo Jejum 9,7 vezes menor ($p=0,018$) e no grupo Glicose 8,3 vezes menor ($p=0,009$) (Figura 4).

DISCUSSÃO

O hipotálamo está associado com o controle da homeostase energética. O núcleo arqueado do hipotálamo (ARQ) possui uma função central, recebendo vários sinais periféricos por meio de nutrientes e hormônios envolvidos na regulação do peso corporal. Nesta região cerebral estes sinais são convertidos em respostas eferentes apropriadas, como por exemplo, a modulação do SNA e/ou a ativação do hipotálamo e da hipófise (BLOUET e SCHWARTZ, 2010). O dano no ARQ pode ser induzido pela administração de altas doses de MSG durante o período neonatal. Após a lesão do ARQ em ratos tratados com MSG, estes animais desenvolvem uma série de anormalidades neuroendócrinas e metabólicas, como obesidade central, resistência à insulina, intolerância à glicose, dislipidemia, alterações cardiovasculares e aumento de hormônios como o cortisol e a leptina (HIRATA et al, 1997). Assim, ratos MSG obesos reproduzem características similares também observadas na síndrome metabólica encontrada em humanos obesos. Nossos resultados confirmam que a administração neonatal de MSG induz a obesidade, hiperinsulinemia e hiperglicemia moderada. Além disso, nosso estudo também mostra que estes animais possuem comprimento naso-anal e peso corporal menores. Estas características são atribuídas ao baixo nível do hormônio do crescimento (GH) presente neste modelo de obesidade (KUBOTA, NAKAGAWA e IGARASHI, 1994). A natação durante o crescimento foi efetiva em reduzir o conteúdo de tecido adiposo e preservar a homeostase de glicose em ratos MSG-EXE. Resultados similares também foram encontrados em camundongos e ratos MSG obesos submetidos a exercício físico (SAGAE et al, 2011). Sabe-se que o

treinamento físico melhora a resistência à insulina, além de ativar o sistema nervoso simpático (SNS), assim como o eixo simpato-adrenal (SCHEURINK et al, 1989). Assim, sugere-se que a redução no tecido adiposo observada em nosso estudo possa ser atribuída à ação lipolítica de noradrenalina e norepinefrina liberada pela ativação do SNS. Scomparin et al (2009) demonstraram que a natação aumenta diretamente a atividade dos nervos do SNS e também aumenta a quantidade de catecolaminas de camundongos MSG obesos. O descontrole do SNA é uma característica marcante da obesidade induzida por tratamento com MSG. Esta desregulação autonômica pode ser restabelecida com a natação.

A alteração na secreção de insulina induzida por glicose é um evento central presente na obesidade e no DM2. De acordo com os nossos dados, as ilhotas pancreáticas dos ratos MSG obesos apresentam hipersecreção de insulina. Estudos demonstram que o desequilíbrio autonômico está envolvido na alteração do controle da insulina em ilhotas de ratos MSG obesos. A vagotomia precoce corrige a alta atividade parassimpática e evita a hipersecreção de insulina, assim como normaliza as respostas neurotransmissoras nas ilhotas obtidas de ratos MSG obesos (BALBO et al, 2007). A natação restabelece a secreção de insulina induzida por glicose nas ilhotas de ratos MSG obesos. Utilizando-se outros modelos, dados similares também foram observados (CALEGARI et al, 2011). Novamente, um aumento na atividade neuronal do pâncreas endócrino poderia ser responsável por estas adaptações na responsividade à glicose. Além disso, o exercício melhora a sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos, reduzindo a sobrecarga da síntese e secreção da insulina pelas células beta pancreáticas.

A obesidade e o DM2 são caracterizados pela resistência à insulina e pela deficiência na captação de glicose, culminando com o desequilíbrio na sua homeostase. O GLP-1 é um importante hormônio incretínico e tem sido demonstrado sua capacidade de estimular a secreção de insulina em resposta à nutrientes ou à ingestão de glicose (AHRÉN, 2009). O GLP-1 também induz a proliferação das células beta (MURPHY e BLOOM, 2006). Assim, o efeito fisiológico do GLP-1 no pâncreas endócrino evita a deterioração da função das células beta. O GLP-1 é produzido principalmente pelas células L intestinais em resposta à ingestão calórica, principalmente de carboidratos e lipídeos (NAUCK et al, 2011). Corroborando com

dados da literatura (MARTÍNEZ-RODRIGUES e GIL, 2012), nosso estudo demonstrou que as células imunorreativas ao GLP-1, assim como a expressão gênica do GLP-1 no íleo foram aumentadas pela ingestão de glicose em relação à condição de jejum em todos os grupos. Pela primeira vez, nosso estudo demonstrou que ratos MSG obesos não possuem alteração na expressão do GLP-1 no íleo. Utilizando um derivado de GLP-1 (NN2211), Larsen et al (2001) demonstraram que a administração de um agonista de GLP-1 confere profunda perda de peso e redução de triglicerídeos em ratos MSG obesos. De acordo com estes autores, o efeito do GLP-1 provavelmente reflete as ações periféricas pós-prandiais da insulina. Juntos, estes dados indicam que a secreção de GLP-1 nos ratos MSG obesos poderia ser o problema. Porém, mais estudos são necessários para esclarecer este mecanismo nos ratos MSG obesos.

Observamos que independentemente das condições de estímulo com glicose ou jejum, a prática de natação reduziu a imunoreatividade e a expressão de mRNA do GLP-1 no íleo dos animais CON (não obesos). Isto sugere que o treinamento físico regular poderia inibir a expressão gênica nas células L intestinais. O mecanismo pelo qual esta regulação negativa ocorre é ainda desconhecido. Recentemente, tem sido proposto que a proteína UCP2 está intimamente envolvida no estímulo da secreção do GLP-1 pela glicose, nas células L (CHEN et al, 2012). O treinamento físico aumenta a expressão da UCP2 em vários tecidos. Assim, sugerimos que o treinamento físico poderia elevar a expressão de UCP2 no íleo, reduzindo a expressão de GLP-1 nas células intestinais. Em contrapartida, Ellingsgaard et al (2011) demonstraram que o exercício agudo (corrida) aumenta a produção e secreção de GLP-1, um mecanismo dependente da IL-6 liberada durante o exercício. O exercício agudo ou crônico poderia determinar estas diferentes respostas na expressão do GLP-1 nas células L intestinais. Entretanto, em ratos MSG obesos a expressão de GLP-1 e a imunoreatividade das células L não foi modificada. Estes dados indicam que as modulações induzidas pelo exercício físico na expressão do GLP-1 nas células L estão atenuadas. Por outro lado, de acordo com nossos resultados, a expressão de GLP-1 no íleo induzida por ingestão de glicose está intacta nos ratos MSG obesos.

A concentração venosa do GLP-1 aumenta com o exercício, sendo possível que a ativação dos receptores de GLP-1 esteja envolvido na resposta normal ao exercício (DELGHINGARO-AUGUSTO et al, 2011). A concentração plasmática de GLP-1 não foram avaliados em nosso trabalho. Porém, O GLP-1 é um substrato para a enzima DPP4 e é rapidamente inativado e degradado. Alguns trabalhos têm descrito efeitos benéficos de inibidores da DPP4 nas ilhotas de modelos de animais obesos e diabéticos, incluindo os ratos Zucker (BRAND et al, 2009), camundongos db/db (MORITOH, TAKEUCHI e HAZAMA, 2010) e animais com dieta rica em gordura (LAMOUNT e DRUCKER, 2008). Pela primeira vez, a ação insulínica do GLP-1 foi investigada em ilhotas pancreáticas de ratos MSG obesos. Foi demonstrado que a ação insulínica do GLP-1 na presença de baixa concentração de glicose é preservada, enquanto que a ação insulínica do GLP-1 na presença de alto nível de glicose é ausente em ilhotas de ratos MSG obesos. Tem sido estabelecido que as ilhotas pancreáticas dos ratos MSG obesos também apresentam redução da resposta colinérgica na secreção de insulina estimulada por glicose. Miguel e colaboradores (2003) sugerem uma importante cooperação funcional entre o neurotransmissor Ach e o GLP-1 na secreção da insulina mediada pelo subtipo de receptor muscarínico M3. A hipersecreção de insulina ocorre somente na presença de alta concentração de glicose nas ilhotas dos ratos MSG. Assim, sugerimos que neste modelo de obesidade, a hipersecreção de insulina é mantida somente pelo aumento do metabolismo da glicose, uma vez que importantes efeitos insulínicos como pelo GLP-1 e Ach estão atenuados.

O efeito insulínico do GLP-1 em baixas concentrações de glicose (5,6 mM) foi inibido nas ilhotas obtidas de ratos exercitados, em ambos os grupos. Considerando que o exercício melhora a sensibilidade à insulina, a adaptação das ilhotas poderia ser um importante mecanismo para evitar condições hipoglicêmicas. Porém, na presença de altas concentrações de glicose (16,7 mM) o efeito do GLP-1 nas ilhotas pancreáticas de ratos CON não foi modificada. Surpreendentemente, a prática de natação restabeleceu o efeito insulínico do GLP-1 na secreção de insulina induzida por glicose nas ilhotas pancreáticas de ratos MSG-exercitados. Foi demonstrado pela primeira vez que o treinamento constituído por natação modula diretamente a ação insulínica do GLP-1 em ilhotas isoladas de ratos MSG obesos. O mecanismo envolvido nesta resposta não é conhecido. De

acordo com estudos recentes, a IL-6 tem um papel central na secreção de GLP-1 durante a corrida em esteira (ELLINGSGAARD et al, 2011). Além disso, trabalhos prévios demonstraram que as células alfa podem ser uma fonte de GLP-1, sob condições de estresse das células beta (HANSEN et al, 2011). Assim, o GLP-1 derivado das células alfa pode agir localmente na célula beta para potencializar a secreção de insulina induzida por glicose nas ilhotas de ratos MSG-exercitados. Finalmente, a secreção de GLP-1 pode ser modulada pelo SNA, principalmente pelo nervo vago. O treinamento físico altera a atividade do SNA, o qual poderia determinar mudanças na secreção de GLP-1 nas ilhotas pancreáticas (DELGHINGARO-AUGUSTO et al, 2012), o que pode ser importante nos ratos MSG obesos, como um modelo de obesidade que apresenta disfunção autonômica.

CONCLUSÃO

Em resumo, no presente estudo foi demonstrado que a prática regular de natação é capaz de atenuar as características da obesidade induzida pelo tratamento neonatal com MSG, incluindo a hipersecreção de insulina. O exercício restaurou a ação insulínica do GLP-1 nas ilhotas pancreáticas dos ratos MSG obesos. Esta melhora na resposta ao GLP-1 pode ser importante nos mecanismos pelos quais o exercício preserva a função das células beta pancreáticas.

REFERÊNCIAS

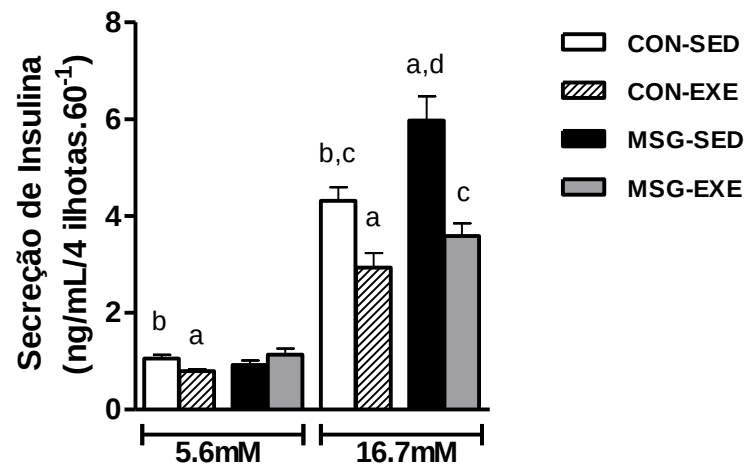
As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

Tabela 1 – Parâmetros bioquímicos e biométricos em ratos MSG obesos submetidos a treinamento físico.

Variáveis analisadas	CON-SED	CON-EXE	MSG-SED	MSG-EXE
Peso Corporal (g)	328.8±15.14 ^{c,d}	307.1±4.5 ^d	291.6±8.2 ^a	270.4±5.6 ^{a,b}
Comprimento naso-anal (cm)	23.7±0.2 ^{c,d}	22.8±0.2 ^{c,d}	20.5±0.3 ^{a,b}	21.1±0.3 ^{a,b}
Índice de Lee	0.304±0.002 ^c	0.301±0.003 ^{c,d}	0.331±0.004 ^{a,b,d}	0.314±0.002 ^{b,c}
Gordura Mesentérica (g/100 pc)	0.84±0.04 ^{c,d}	0.63±0.03 ^{c,d}	1.69±0.09 ^{a,b,d}	1.38±0.09 ^{a,b,c}
Glicose de jejum (mg/dL)	110.0±2.04 ^c	103.6±4.31 ^c	127.9±2.42 ^{a,b,d}	105.7±4.29 ^c
Insulina de jejum (ng/mL)	0.39±0.03 ^c	0.29±0.03 ^c	0.57±0.05 ^{a,b,d}	0.37±0.03 ^c

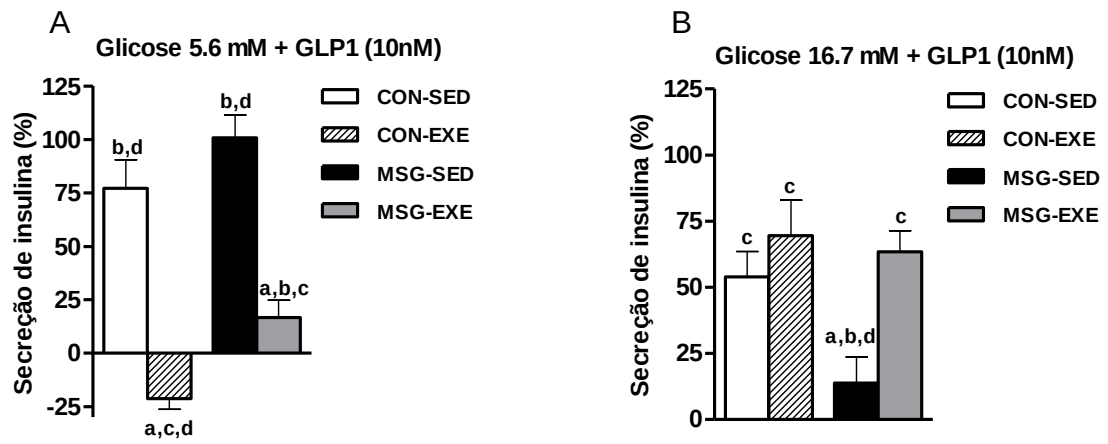
Dados apresentados como média ± erro padrão da média. Foram utilizados 4 ratos de todos os grupos. As letras acima dos números representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$). O teste empregado foi ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. ^aCON-SED; ^bCON-EXE; ^cMSG-SED; ^dMSG-EXE.

Figura 1 – Efeito da natação na secreção de insulina induzida por glicose em ratos MSG obesos.



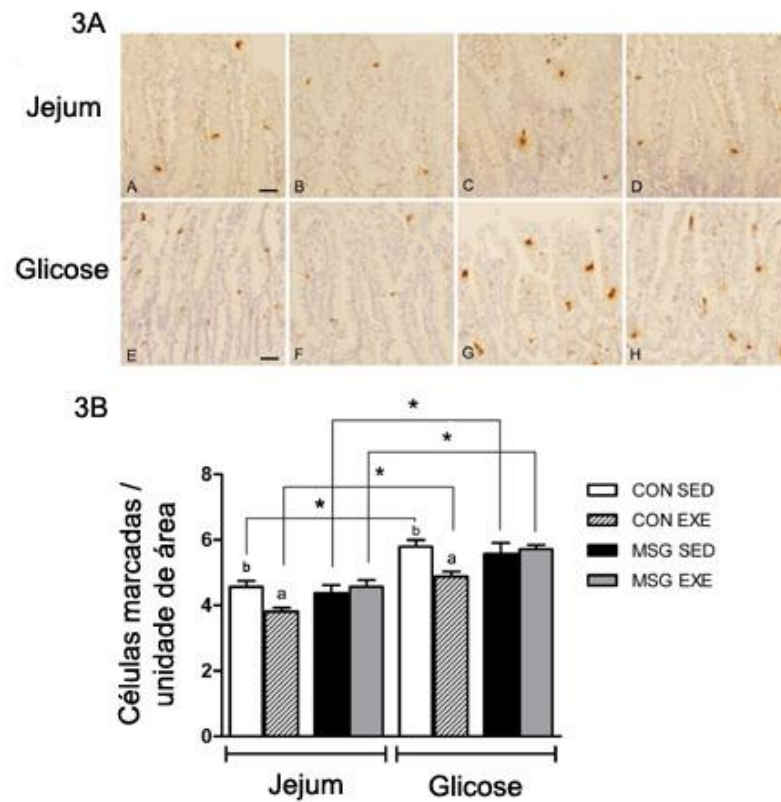
Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de 4 ratos por grupo. Grupos de 4 ilhotas foram incubadas em 1 mL de solução de Krebs na presença de glicose nas concentrações de 5,6 ou 16,7 mM. As letras acima das barras representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$). Foi utilizado o teste T de *Student*. ^aCON-SED; ^bCON-EXE; ^cMSG-SED; ^dMSG-EXE.

Figura 2 – Ação insulínótropica do GLP-1 nas ilhotas pancreáticas de ratos MSG obesos, submetidos a treinamento físico.



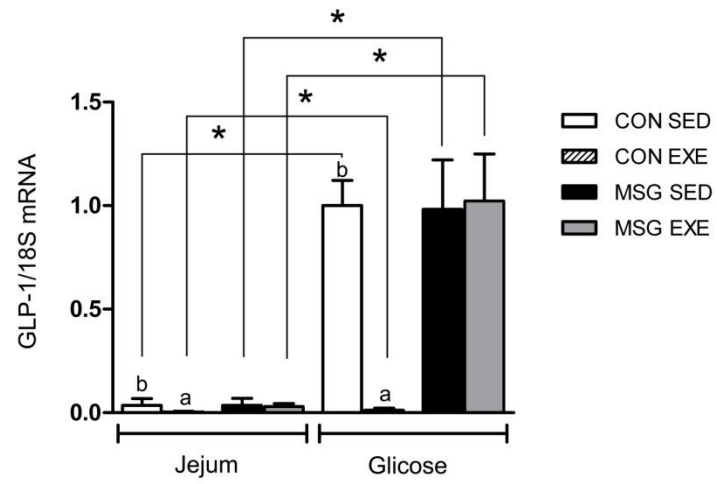
Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. 4 ratos de cada grupo foram utilizados. Grupos de 4 ilhotas foram incubadas em 1 mL de solução de Krebs com glicose a 5,6 ou 16,7 mM na presença ou ausência de GLP-1 (10 nM). As letras acima das barras representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$). Foi utilizado o teste ANOVA. ^aCON-SED; ^bCON-EXE; ^cMSG-SED; ^dMSG-EXE.

Figura 3 – Expressão de GLP-1 na região do íleo de ratos MSG obesos submetidos a treinamento físico



3A - Fotomicrografia de células imunorreativas ao GLP-1 (células com marcações acastanhadas) na camada mucosa da região do íleo distal do intestino dos ratos. A-D: Grupo Jejum e E-H: Grupo Glicose. A e E: CON-SED; B e F: CON-EXE; C e G: MSG-SED; D e H: MSG-EXE. Barra: 50 μ m. 3B - Efeito do exercício no número de células imunorreativas à GLP-1, por unidade de área, na camada mucosa do íleo distal do intestino dos ratos. As letras e símbolos acima das barras representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$). Foi utilizado o teste T de *Student*. ^aCON-SED; ^bCON-EXE. (*) Jejum e Glicose.

Figura 4 - Efeitos do exercício físico sobre os níveis de mRNA de GLP-1.



As letras e símbolos acima das barras representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$). Foi utilizado o teste T de *Student*. ^aCON-SED; ^bCON-EXE. (*) Jejum e Glicose.

CAPÍTULO 2

Efeito do exercício físico na expressão gênica de adipocinas em ratos MSG obesos

EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA EXPRESSÃO GÊNICA DE ADIPOCINAS EM RATOS MSG OBESOS

Resumo: O tecido adiposo é considerado um tecido endócrino complexo e ativo, o qual secreta numerosos fatores imunomoduladores. Os adipócitos são células envolvidas principalmente no armazenamento energético. Além disso, estas células possuem uma grande capacidade secretora, sintetizando e secretando diversos fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos, as chamadas adipocinas. Por meio de um sistema dinâmico de sinalização, o tecido adiposo e as adipocinas participam de vias biológicas importantes como o consumo e o balanço energético, metabolismo de nutrientes e sistema imune. Este trabalho visa avaliar os efeitos do treinamento físico na expressão das adipocinas adiponectina, TNF alfa, PPAR gama e PPAR alfa do tecido mesentérico de ratos obesos. O modelo animal de obesidade utilizado neste trabalho são ratos tratados com glutamato monossódico (MSG), durante o período neonatal. A administração de MSG danifica neurônios do núcleo arqueado (ARQ) do hipotálamo, região importante na manutenção do peso corporal. Os animais foram divididos em quatro grupos: MSG sedentários, MSG exercitados, controles sedentários e, controles exercitados. Animais do grupo exercitado foram submetidos à natação. Aos 90 dias, os animais foram sacrificados, parâmetros bioquímicos e biométricos foram analisados e amostras de gordura mesentérica foram armazenadas para ensaios de qRT-PCR e cortes histológicos. Os animais MSG apresentaram aumento da expressão de TNF alfa, PPAR gama e PPAR alfa. Nossos dados mostram que a prática regular e precoce de atividade física melhora os quadros patológicos relacionados à obesidade bem como diminuindo a hipertrofia dos adipócitos, porém não corrige totalmente o perfil inflamatório neste modelo. A alteração na expressão da adiponectina e do PPAR alfa nos ratos controle pode ser um dos mecanismos envolvidos na regulação da homeostase energética decorrente de exercício físico nestes animais.

Palavras-chave: Síndrome metabólica. Obesidade. Tecido adiposo visceral.

INTRODUÇÃO

A relação entre adiposidade visceral e desenvolvimento da síndrome metabólica é, provavelmente, derivada do quadro inflamatório associado, visto que o tecido adiposo é considerado um tecido endócrino complexo e ativo, o qual secreta numerosos fatores imunomoduladores (HUTLEY e PRINS, 2005). Os adipócitos são células envolvidas principalmente no armazenamento energético. Além disso, estas células possuem uma grande capacidade secretora, sintetizando e secretando diversos fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos, as chamadas adipocinas (KERSHAW e FLIER, 2004). Há ainda adipocinas que não são secretadas pelos adipócitos propriamente ditos, mas sim por macrófagos infiltrados no tecido adiposo (WEISBERG et al, 2003). O tecido adiposo se comunica constantemente com outros órgãos, como o SNC (KERSHAW e FLIER, 2004). Desta forma, por meio de um sistema dinâmico de sinalização, o tecido adiposo e as adipocinas participam de vias biológicas importantes como o consumo e o balanço energético, metabolismo de nutrientes e sistema imune (ESPOSITO et al, 2006). Dentre a adipocinas envolvidas em quadros de obesidade e DM2 podemos citar a adiponectina, o TNF alfa e o

PPAR.

A adiponectina é uma proteína secretada em altas concentrações pelo tecido adiposo e sua concentração plasmática é inversamente proporcional à adiposidade. Ou seja, baixas concentrações desta proteína (hipoadiponectinemia) estão relacionados com altos índices de massa corporal, menor sensibilidade à insulina, concentração plasmática de lipídios desfavorável e aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (TRUJILLO e SCHERER, 2005). Portanto, a adiponectina desempenha um importante papel em processos metabólicos ligados à obesidade, DM 2 e doenças cardiovasculares, devido às suas propriedades antiaterogênicas, antiinflamatórias e sensibilizadoras de insulina (HUTLEY e PRINS, 2005). O TNF alfa é uma adipocina pró-inflamatória que estimula a expressão de outros mediadores inflamatórios, incluindo a leptina e a IL-6, ao passo que a expressão e secreção de adiponectina é reduzida em resposta ao TNF alfa (HUTLEY e PRINS, 2005). É demonstrado que a expressão aumentada de TNF alfa e a consequente redução da expressão de adiponectina tem grande importância no desenvolvimento da síndrome metabólica. O TNF alfa circulante é secretado principalmente em macrófagos acumulados no tecido adiposo de indivíduos obesos, enquanto que os adipócitos produzem predominantemente uma forma não secretada ligada à membrana (XU et al, 2002). O TNF alfa estimula lipólise, e o aumento da secreção deste fator está correlacionado com resistência à insulina, hiperinsulinemia e hipertensão. O PPAR gama (Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama) é predominantemente expresso no tecido adiposo. Entretanto, pode possuir efeitos secundários em tecidos insulino-responsivos, tais como muscular esquelético e fígado. O PPAR gama tem papel fundamental na diferenciação de adipócitos e no metabolismo de lipídeos, regulando a expressão de numerosos genes nestas células (SEMPLE, CHATTERJEE e O'RAHILLY, 2006). Seu nível reduzido nos tecidos metabolicamente importantes na homeostase da glicose, por exemplo, músculo esquelético, fígado e células beta pancreáticas, aumenta a questão de sua possível importância fisiológica e farmacológica nesses sítios (LOVISCAR, 2000). Além disso, sua alta expressão em macrófagos é bem estabelecida em indivíduos obesos, cuja infiltração nos tecidos adiposos com função comprometida pode ser patologicamente importante (WEISBERG et al, 2003).

O PPAR alfa, por sua vez, é expresso principalmente em órgãos e

tecidos em que ocorra a oxidação de ácidos graxos, como o fígado, músculo, endotélio vascular e músculo liso. Os genes regulados pelo PPAR alfa participam na regulação de proteínas-chave envolvidas no metabolismo de lipídios, oxidação de ácidos graxos, hemostasia e inflamação (TORRA et al, 2001). Portanto, o PPAR alfa pode estar envolvido com risco de doenças cardiovasculares através de múltiplas vias, incluindo alterações nas concentrações de lipídios, obesidade, resistência à insulina, e respostas inflamatórias (TAI et al, 2002).

Ratos tratados com glutamato monossódico (MSG), nos primeiros dias após o nascimento, desenvolvem obesidade na vida adulta. Além disso, apresentam altas concentrações de insulina circulante e quadros de resistência à insulina e dislipidemia, sintomas característicos de portadores de síndrome metabólica, com exceção de que estes animais apresentam concentração normal de glicose em jejum (CUNHA et al, 2010; ELFERS, RALSTON e ROTH, 2011; SASAKI et al, 2009).

Sabe-se que a prática regular de atividade física tem demonstrado ótimos resultados no controle da obesidade e suas comorbidades associadas, além de contribuir para a melhora do estado inflamatório no qual o indivíduo obeso se encontra (KERSHAW e FLIER, 2004). Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar o perfil de expressão gênica de algumas adipocinas do tecido adiposo mesentérico de ratos MSG obesos submetidos à natação.

MÉTODOS

Animais

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob o protocolo nº 02860. Ratos Wistar machos (n=32) foram selecionados e tratados durante os 5 primeiros dias de vida com MSG (4 mg/g de peso corporal) ou solução salina equimolar (animais controle), por meio de aplicações subcutâneas na região cervical. Ao completarem 21 dias de vida, os animais foram desmamados e divididos em quatro grupos: controles sedentários (CON-SED) (n=8); controles exercitados (CON-EXE) (n=8); MSG sedentários (MSG-SED) (n=8); e, MSG exercitados (MSG-EXE) (n=8). Durante todo o experimento, os animais permaneceram sob condições controladas

de luminosidade (12h de claro/escuro) e temperatura (21 ± 2 °C), e tiveram livre acesso à água e alimento comercial.

Treinamento físico

Primeiramente, os animais foram adaptados ao protocolo de natação por um período constituído de natação livre, três vezes por semana e o tempo de natação aumentou gradualmente de 5, 15 e 30 minutos. Após uma semana de adaptação, cada sessão do programa de treinamento consistiu de natação, durante 30 minutos por dia, três vezes por semana. Animais dos grupos exercitados (CON-EXE e MSG-EXE) foram submetidos à natação praticada em piscina para ratos, com água aquecida (32 ± 2 °C), para evitar o estresse induzido pelo frio. O treinamento foi administrado desde os 21 até os 90 dias de vida, três vezes por semana, durante 30 minutos (SCOMPARIN et al, 2006). A intensidade do exercício foi determinada pelo peso utilizado. A cada semana os animais eram pesados e o equivalente a 5% do peso corporal era preso à base da cauda dos animais, com a finalidade de assegurar um exercício constante durante todo o período. A profundidade maior de 30 centímetros preveniu os ratos de descansarem no fundo da piscina. Após a natação, os animais foram secos e devolvidos às gaiolas. Os ratos nadaram durante dez semanas. Seis ratos de cada grupo foram colocados simultaneamente na piscina às 16:00 horas. Dois grupos, CON-SED e MSG-SED, permaneceram sedentários durante todo o experimento.

Avaliação do grau de obesidade

Ao completarem 90 dias de vida, foram medidos o comprimento nasoanal e o peso corporal dos animais, dados utilizados para cálculo do índice de Lee (BERNARDIS e PATTERSON, 1968). Além disso, os depósitos de gordura visceral (mesentérica) foram retirados, lavados em solução salina e pesados. Os dados foram expressos considerando-se o peso corporal (g/100g do peso corporal).

Análise da expressão gênica por qRT-PCR (*quantitative real time - polymerase chain reaction*)

Secções de aproximadamente 5 mm³ de gordura mesentérica foram usadas para extração do RNA total, utilizando-se o kit comercial “*Illustra RNAspin*

Mini RNA Isolation Kit” (GE Healthcare), de acordo com indicações do fabricante. Para a síntese do cDNA (DNA complementar), aproximadamente 1 µg de RNA total foi submetido à transcrição reversa, utilizando-se o kit comercial “*First-Strand cDNA Synthesis Kit*” (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante.

Na tabela 1, podem ser encontradas as sequências dos *primers* utilizados para amplificação das seguintes adipocinas: adiponectina (Gene ID: 246253), TNF alfa (Gene ID: 24835), PPAR alfa (Gene ID: 25747), PPAR gama (Gene ID: 25664) e do rDNA 18S (Gene ID: 100008588), o qual foi utilizado como gene de referência neste trabalho (controle interno). As amplificações foram realizadas no equipamento Stratagene MxPro 3005P qPCR (Agilent Technology). Todas as amostras de cDNA a serem testadas foram deixadas em uma mesma concentração inicial e os ensaios foram realizados em duplicatas. As reações foram montadas utilizando-se os seguintes reagentes: SYBR *Green master mix* 1X (Stratagene); 8 µM dos *primers forward* e *reverse*; e, água suficiente para 25 µL finais. O equipamento foi programado da seguinte maneira: 5 minutos a 94 °C; 40 ciclos: 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C e 30 segundos a 72 °C; seguido de uma curva de dissociação. A mudança relativa na expressão gênica foi apresentada como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Cortes histológicos do tecido mesentérico

As amostras coletadas do tecido mesentérico dos animais foram fixadas em Bouin por 24 horas e então processadas convencionalmente para secções em parafina, cortadas em micrótomo com espessura de 5 µm e coradas convencionalmente com hematoxilina e eosina. Para isso, foi realizada a desparafinização em xilol e posteriores banhos em concentrações decrescentes de álcool. Após lavagem em água destilada, os cortes foram corados com Hematoxilina de Harris por 1 minuto e novamente lavados com água destilada. Após, as secções foram embebidas em eosina por 1 minuto. Após nova lavagem, a desidratação dos tecidos corados foi feita em concentrações crescentes de álcool e xilol, para então as lâminas serem montadas. Os cortes foram então analisados em microscópio (Olympus BX41, acoplado ao sistema de captura de imagem Olympus DP71) e o tamanho dos adipócitos foi determinado com o *software* “*Image J 1.45s*”, calculando-se o tamanho de 200 adipócitos escolhidos aleatoriamente de cada um dos 8

animais de cada grupo. Além disso, foi estimada a quantidade de adipócitos por quadrante, contando-se quantas células haviam em um quadrante de 500 μm^2 de área em cada corte, estabelecendo-se uma média em três cortes para cada animal, de cada grupo.

Análise estatística

Todos os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Os testes estatísticos utilizados foram os testes ANOVA ou teste T de *Student*, com significância atribuída de $p < 0,05$. As análises foram realizadas por meio do software GraphPad Prism[®] 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

De acordo com os dados apresentados na tabela 2, a administração neonatal de MSG induziu a obesidade na idade adulta. O peso corporal e o comprimento naso-anal foram, respectivamente, 10% e 8% menores nos grupos MSG-SED em comparação ao grupo CON-SED ($p < 0,05$). Deste modo, o índice de Lee foi 7% maior nos animais MSG-SED em relação aos animais CON-SED ($p < 0,05$). Confirmada a instalação da obesidade, os ratos MSG-SED apresentaram aumento de 100% de gordura mesentérica, quando comparados com os CON-SED ($p < 0,05$). A natação não teve efeito no comprimento naso-anal em ambos os grupos. Porém, houve redução de aproximadamente 6,8% e 7,2% de peso corporal e 25% e 18% de acúmulo de gordura mesentérica, respectivamente, nos grupos CON-EXE e MSG-EXE, em relação aos respectivos grupos sedentários ($p < 0,05$).

A tabela 2 e a figura 1 demonstram a área e número de adipócitos por quadrante dos animais. O tratamento com MSG induziu a hipertrofia dos adipócitos nestes animais, visto que animais MSG-SED apresentaram adipócitos 166% maiores e 32% em menor número por quadrante em comparação com animais controle ($p < 0,05$). O treinamento físico diminuiu em torno de 88% o tamanho dos adipócitos no grupo CON-EXE e 74% no grupo MSG-EXE, em relação aos respectivos grupos sedentários ($p < 0,05$), além de aumentar o número de adipócitos por quadrante nos grupos exercitados, em aproximadamente 53% no grupo CON EXE ($p < 0,05$) e 51% no MSG-EXE ($p < 0,05$).

Os dados resultantes dos ensaios de qRT-PCR para os níveis de expressão de adiponectina não foram estatisticamente significativos entre os grupos MSG-SED e CON-SED. Entretanto, o exercício apresentou influência nos ratos controle. O nível de expressão da adiponectina foi aproximadamente 6 vezes maior nos ratos CON-EXE comparado aos CON-SED. ($p<0,05$) (Figura 2A). Os níveis de expressão de TNF alfa apresentaram um aumento de aproximadamente 4 vezes no grupo MSG-SED, em relação ao grupo CON-SED ($p<0,05$). Entretanto, o exercício não apresentou influência nos níveis de TNF alfa em nenhum dos grupos (Figura 2B). Os níveis de mRNA de PPAR gama foram por volta de 4,5 vezes maiores no grupo MSG-SED quando comparado ao grupo CON-SED ($p<0,05$). Entretanto, o exercício não apresentou influência nos grupos analisados (Figura 2C). Os dados resultantes dos ensaios de qRT-PCR para os níveis de expressão de PPAR alfa foram em média 3,7 vezes maiores no grupo MSG-SED em relação ao grupo CON-SED ($p<0,05$). A prática de atividade física resultou em um aumento de 4,1 vezes na sua expressão nos ratos CON-EXE comparado aos CON-SED ($p<0,05$) (Figura 2D).

DISCUSSÃO

Os ratos MSG são considerados bons modelos animais para estudo da obesidade. Na idade adulta, apresentam algumas características de portadores de síndrome metabólica, tais como: obesidade visceral e subcutânea, concentração de insulina elevada, resistência à insulina e hiperlipidemia, porém não desenvolvem quadro de DM2 (SASAKI et al, 2009). O tratamento com MSG provoca lesões no ARQ, desregulando uma importante área envolvida na regulação do peso corporal e no controle glicêmico (BURDE, SCHANKER e KAYES, 1971; SCHWARTZ e PORTE, 2005).

Modelos animais de obesidade como ratos Zucker (fa/fa), camundongos *ob/ob* e *db/db* manifestam hiperfagia e hiperinsulinemia (BRAYMAN et al, 1992). Porém, animais MSG não apresentam aumento na ingestão alimentar, são normofágicos (DAWSON, WALLACE e GABRIEL, 1989; BALBO et al, 2000b; ANDREAZZI et al, 2009). Grupos de ratos utilizados como controles e ratos MSG obesos ingerem aproximadamente a mesma quantidade de comida, sugerindo que a principal causa da obesidade nestes animais não seja diretamente um distúrbio de apetite (SASAKI et al, 2011). Entretanto, independentemente da ingestão calórica,

roedores MSG desenvolvem todas as características da obesidade (SCOMPARIN et al, 2006). As prováveis causas da obesidade nos animais MSG seriam a redução do metabolismo energético (TSUKAHARA et al, 1998) e uma disfunção do sistema nervoso autônomo (YASUDA et al., 2004), que se caracteriza por uma alta atividade parassimpática e baixa atividade simpática, consequências da lesão hipotalâmica causada pelo MSG (BALBO et al, 2000).

O Índice de Lee é uma medida indireta do índice de obesidade usado para roedores (BERNARDIS e PATTERSON, 1968). Estes resultados, juntamente com os índices de gordura mesentérica dos animais, demonstraram que a administração neonatal de MSG induziu a obesidade na idade adulta nos ratos utilizados neste estudo. Porém, pode-se observar que os ratos MSG obesos apresentaram redução do peso corporal e no CNA, em relação ao grupo controle, fatos que podem ser explicados por complicações endócrinas presentes neste modelo. Animais MSG obesos apresentam redução do hormônio de crescimento (GH) circulante, consequência da lesão do ARQ, que promove também uma deficiência na produção do hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) (TAMURA et al, 2002). A ausência do hormônio de crescimento reduz o volume de massa muscular e óssea (DAVIES, 2007), e pode contribuir também para a adiposidade destes animais (REMKE, WILSDORF e MULLER, 1988); Trata-se de um hormônio calorífero, que normalmente produz lipólise e anabolismo, sendo que sua deficiência produz falha da mobilização das gorduras, com aumento da glicólise e glicogenólise, hipoglicemia de jejum e adiposidade.

Por muito tempo, acreditou-se que a prática da atividade física não surtia efeito no controle da obesidade, visto que era acompanhada pelo aumento do consumo de alimentos. Lewis et al (1993) demonstraram que o exercício físico aumentava a concentração do neuropeptídeo NPY em múltiplos sítios hipotalâmicos de ratos, incluindo a região do ARQ, fator que contribuiria para o aumento da ingestão alimentar. Porém, estudos demonstraram que a natação não altera a ingestão alimentar nos animais controle ou MSG (IRANI et al, 2005; ANDREAZZI et al, 2009). Neste estudo foi demonstrado que a natação foi eficaz em promover a redução dos estoques de gordura mesentérica nos animais MSG exercitados, em relação ao grupo sedentário, corroborando com SCOMPARIN et al (2006), reforçando a hipótese de menor ativação simpática em ratos MSG obesos como um

dos fatores atrelados ao desenvolvimento de excesso de tecido adiposo. De acordo com Lee et al (2005), a prática regular de exercícios, mesmo sem ocasionar a perda de peso, está associada a uma redução substancial das gorduras visceral e total, além de levar a uma melhora significativa no quadro de obesidade.

O tecido adiposo possui importantes funções como reserva de energia, além da produção de citocinas que participam de muitas vias em diversos processos fisiológicos, como ingestão alimentar, regulação do balanço energético, ação da insulina, metabolismo de lipídeos e da glicose, angiogênese, remodelação vascular, regulação da pressão sanguínea e coagulação (HUTLEY e PRINS, 2005). Cortes histológicos deste tecido demonstraram a presença de adipócitos hipertrofiados e em menor número por quadrante nos ratos MSG obesos, em relação ao seu grupo controle. Isto pode levar a diminuição da produção de algumas adipocinas anti-inflamatórias, como a adiponectina, além de contribuir também com a resistência à insulina, recorrente neste modelo animal (HIRATA et al, 1997). O aumento de citocinas pró-inflamatórias e ácidos graxos livres que ocorrem nos adipócitos com hipertrofia prejudica a via de sinalização intracelular da insulina e promovem um estado de resistência a este hormônio (CUSI, 2009). A hiperinsulinemia é uma resposta compensatória ao quadro de resistência à insulina, que por sua vez aumenta a adipogênese. Nos animais exercitados, podemos observar a diminuição do tamanho dos adipócitos e o aumento em número por quadrante dos mesmos, tanto nos animais obesos, quanto nos controles, evidenciando o papel do treinamento físico sobre células da gordura visceral. A prática regular de exercício físico reduz a quantidade de ácidos graxos livres, e pode ser uma importante terapia para esta condição (BODEN, 2002). Os adipócitos do tecido adiposo abdominal, especialmente do tecido adiposo visceral, são mais sensíveis e responsivos ao efeito lipolítico das catecolaminas (NICKLAS, 1997). Isso ocorre devido a este tecido possuir uma maior densidade e sensibilidade dos receptores adrenérgicos beta1 e beta2 e menor número de receptores adrenérgicos alfa2. O exercício físico aumenta significativamente as concentrações de catecolaminas, sessões repetidas de exercício podem levar a uma mobilização preferencial de lipídeos do tecido adiposo visceral (HANSEN et al, 2007). Assim, nossos dados corroboram os efeitos do exercício físico crônico no tecido adiposo abdominal, reduzindo a hipertrofia das células adiposas.

A adiponectina age com a insulina para inibir a produção hepática de glicose, além de estimular a oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético e outros tecidos (MATSUZAWA et al, 2004). A expressão de mRNA da adiponectina é inversamente correlacionada com a obesidade, DM2 e doenças cardiovasculares (HUTLEY e PRINS, 2005). Em relação à adiponectina, nossos ensaios evidenciaram não haver diferença em sua expressão, tanto nos animais MSG obesos quanto no grupo controle. Outros trabalhos já demonstraram que o modelo de obesidade MSG não reflete hiperadiponectinemia ou resistência à adiponectina, um fenômeno observado em modelos de ratos Zucker, por exemplo (ROMAN-RAMOS et al, 2001; SEGERSVARD et al, 2008; YAMAUCHI et al, 2007), ou hipoadiponectinemia, como é observado em ratos tratados com dieta rica em gordura (SHULTZ et al, 2012). O nosso estudo demonstrou que a natação estimulou a expressão gênica da adiponectina nos animais controle não obesos, corroborando com outros estudos que apontam um aumento nos níveis plasmáticos de adiponectina em resposta ao exercício aeróbico em humanos (KRIKETOS et al, 2004; SIMPSON e SINGH, 2007) e também em camundongos submetidos a dieta rica em gordura (SHULTZ et al, 2012). Estes resultados podem ter contribuído com a melhora do quadro geral destes animais exercitados. Estudos correlacionam a adiponectina ao aumento da sensibilidade à insulina em órgãos como fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, que pode ser causado pelo aumento na oxidação de ácidos graxos nestes tecidos (BAUCHE et al, 2007; SHULTZ et al, 2012).

Os animais obesos tratados com MSG apresentaram maior expressão de TNF alfa, comparando-se com os animais controle, como observado por ROMAN-RAMOS e colaboradores (2001). De fato, os níveis de expressão de TNF alfa estão aumentados em quadros de obesidade, DM2 e doenças cardiovasculares (HUTLEY e PRINS, 2005). Durante o ganho de peso, ocorre aumento da expressão de TNF alfa, que conseqüentemente diminui em períodos de perda de peso (WANG, JENKINS e TRAYHURN, 2005). O TNF alfa é considerado uma importante citocina inflamatória altamente expressa no tecido adiposo que está envolvida na sinalização da insulina e em vias pró-inflamatórias. É relatado que este aumento na expressão de TNF alfa também pode ter uma relação direta com a hiperinsulinemia apresentada por animais obesos (HOTAMISLIGIL et al, 1995). Isto também pode estar ocorrendo devido ao quadro de inflamação crônica no tecido adiposo, que contém infiltração de macrófagos que também produzem adipocinas

que contribuem para a resistência à insulina em animais obesos e diabéticos (WEISBERG et al, 2003). Alguns autores afirmam que o TNF alfa estimula a expressão do inibidor do ativador de plasminogênio 1 e da proteína complemento 3, causando a redução de adiponectina e desregulando outras citocinas (MOLLER, 2000). O exercício físico não teve influência sobre os níveis de mRNA de TNF alfa nos animais estudados.

Corroborando com Roman-Ramos et al (2011), o PPAR alfa e gama tiveram seus níveis de mRNA aumentados nos animais MSG, o que pode indicar uma condição inflamatória devido ao quadro de obesidade. A ativação do PPAR gama no tecido adiposo dos ratos MSG pode ter levado ao aumento do tamanho dos adipócitos, mas não levou ao aumento nos níveis de adiponectina. Sugere-se que a ativação dos PPARs é responsável pelo perfil inflamatório desregulado dos ratos MSG (ROMAN-RAMOS et al, 2011). No entanto, alguns autores afirmam que a ativação dos PPAR alfa e gama pode melhorar a resistência à insulina induzida pela obesidade (TAVARES, HIRATA e HIRATA, 2007). O PPAR gama é o regulador mais importante da transcrição de fatores adipogênicos, pois regula a expressão de adipocinas e outras proteínas envolvidas com o metabolismo da glicose e dos lipídeos. Além disso, o PPAR gama é principalmente expresso em tecidos responsivos à insulina, como o tecido adiposo, onde atua na diferenciação dos adipócitos e na expressão de genes específicos do tecido adiposo (GILDE, FRUCHART e STAEELS, 2006). O PPAR gama ativa enzimas lipogênicas e exacerba a esteatose, além de aumentar o número de adipócitos e promover hipóxia, contribuindo ao incremento de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo (HOSOGAI et al, 2011). Nossos resultados indicam que o PPAR gama pode estar participando diretamente no aumento no conteúdo de gordura visceral e no aumento do tamanho dos adipócitos nos animais obesos. Em contrapartida, o exercício não foi capaz de corrigir seus níveis nos animais MSG obesos. Isto pode ocorrer devido ao papel do PPAR gama talvez não ser apenas metabólico, mas também no controle inflamatório, participando de vias de citocinas pró-inflamatórias e na modulação da fase aguda na resposta inflamatória por mecanismos independentes de mudanças lipoproteicas (SEMPLE, CHATTERJEE e O'RAHILLY, 2006), já que, de acordo com nossos dados, o exercício não corrige o perfil inflamatório neste modelo de obesidade, visto que os níveis de TNF também permanecem altos neste animais,

mesmo com o treinamento físico. Porém, mais estudos são necessários para determinar qual é exatamente a participação do PPAR gama e sua relação com a obesidade.

Os altos níveis de mRNA de PPAR alfa podem ter relação com o aumento de peso corporal nos animais MSG, sendo que o exercício não teve influência sobre a expressão deste gene nestes animais. A maior expressão do mRNA de PPAR alfa nos animais controle exercitados pode ser explicada pela alta atividade mitocondrial e beta oxidação peroxissômica nestes animais. O PPAR alfa promove a entrada de ácidos graxos na mitocôndria e participa da síntese da membrana e detoxificação de moléculas ativas endógenas e exógenas, as quais podem ser seus ligantes (GILDE, FRUCHART e STAELS, 2006; PYPHER et al, 2010).

CONCLUSÃO

Em resumo, nosso estudo reforça os indícios de que o exercício físico é uma importante estratégia para controlar os efeitos maléficos da obesidade. O exercício aeróbico praticado regularmente e iniciado precocemente reduz os estoques de gordura e a hipertrofia dos adipócitos dos animais treinados, porém a natação não corrige totalmente o perfil inflamatório neste modelo de obesidade. O exercício pode auxiliar na regulação da homeostase por meio do aumento da expressão de adiponectina e do PPAR alfa. Mais estudos são necessários para esclarecer quais outras adipocinas têm a sua produção alterada pelo exercício e o efeito resultante na homeostase energética.

REFERÊNCIAS

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

Tabela 1 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de qRT-PCR, bem como o tamanho do fragmento gerado pela amplificação.

Gene	<i>Primer forward</i> (5' → 3')	<i>Primer reverse</i> (5' → 3')	Tamanho do fragmento (pb)
Adiponectina*	AAGGACAAGGCCGTTCTCT	GGCAGTCAGTTGGTATCATGG	209
TNF alfa*	GCTCCCTCTCATCATTCCA	GCTTGGTGGTTTGCACGAC	102
PPAR alfa*	ATGCCAGTACTGCCGTTTC	GGCCTTGACCTTGTTTCATGT	221
PPAR gama*	CCAGAGTCTGCTGATCTGCG	GCCACCTCTTTGCTCTGCTC	218
18S	ATGCGTGCATTTATCAGA	AACTATCCCGTCTGCAAG	156

* Fonte: ROMAN-RAMOS et al, 2011.

Tabela 2 – Características biométricas dos ratos MSG obesos submetidos a treinamento físico.

Variáveis	CON-SED	CON-EXE	MSG-SED	MSG-EXE
Peso Corporal (g)	328.8±15.14 ^{c,d}	307.1±4.5 ^d	291.6±8.2 ^a	270.4±5.6 ^{a,b}
Comprimento naso-anal (cm)	23.7±0.2 ^{c,d}	22.8±0.2 ^{c,d}	20.5±0.3 ^{a,b}	21.1±0.3 ^{a,b}
Índice de Lee	0.304±0.002 ^c	0.301±0.003 ^{c,d}	0.331±0.004 ^{a,b,d}	0.314±0.002 ^{b,c}
Gordura Mesentérica (g/100 pc)	0.84±0.04 ^{c,d}	0.63±0.03 ^{c,d}	1.69±0.09 ^{a,b,d}	1.38±0.09 ^{a,b,c}

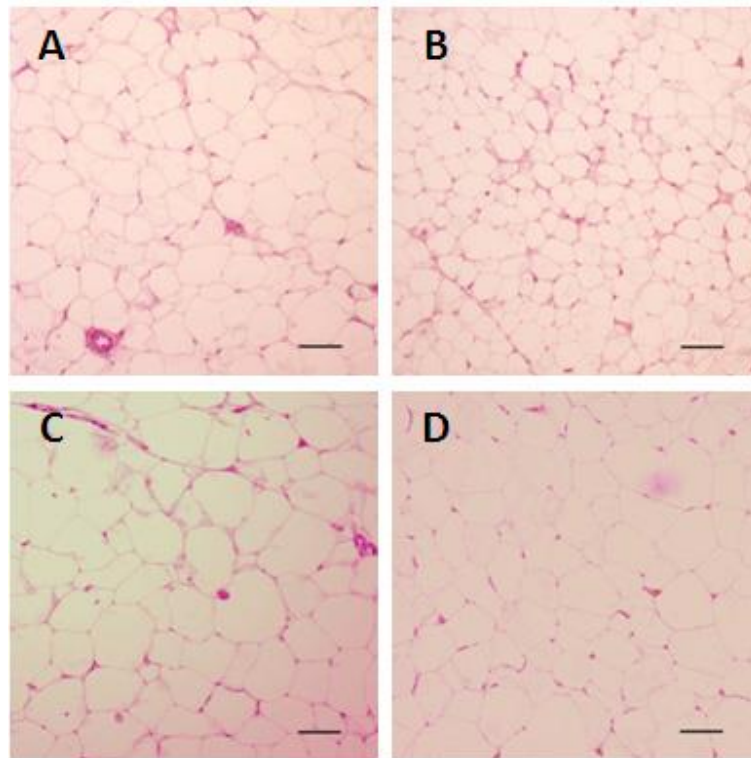
Dados apresentados como média ± erro padrão da média. Foram utilizados 4 ratos de todos os grupos. As letras acima dos números representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$). O teste empregado foi ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. ^aCON-SED; ^bCON-EXE; ^cMSG-SED; ^dMSG-EXE.

Tabela 3 - Área e número de adipócitos por quadrante dos animais

	CON-SED (A)	CON-EXE (B)	MSG-SED (C)	MSG-EXE (D)
Área dos adipócitos (pixels/μm)	5.129.986 $\pm$ 185.333	2.754.891 $\pm$ 89.928 ^a	13.611.267 $\pm$ 766.742 ^{a,d}	3.582.413 $\pm$ 270.529 ^c
Adipócitos por quadrante	38,67 $\pm$ 1,201	83,01 $\pm$ 3,215 ^a	26,67 $\pm$ 2,028 ^{a,d}	53,67 $\pm$ 2,603 ^c

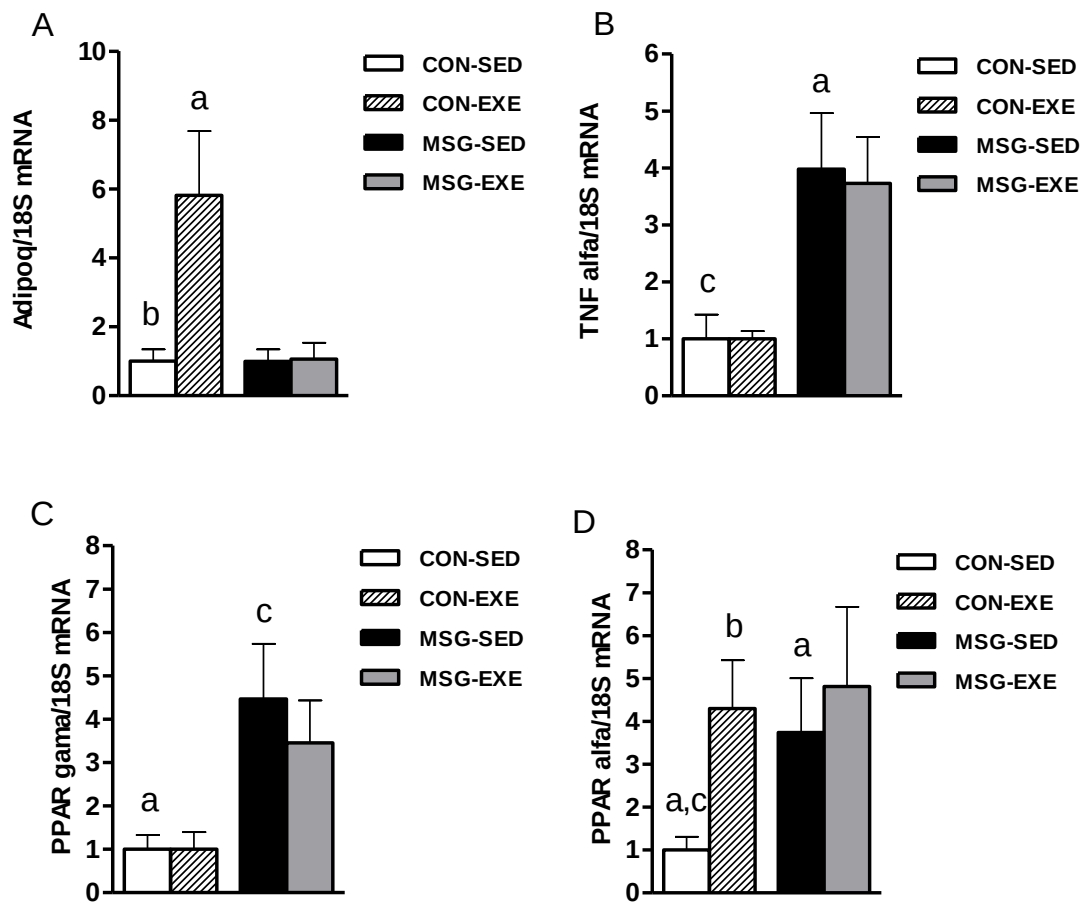
Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Foram utilizados 4 ratos de todos os grupos. As letras acima dos números representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$). O teste empregado foi ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. ^aCON-SED; ^bCON-EXE; ^cMSG-SED; ^dMSG-EXE.

Figura 1 – Fotomicrografia do tecido adiposo mesentérico dos ratos submetidos a treinamento físico



Fotomicrografia de lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Animais MSG apresentaram hipertrofia de adipócitos em comparação com os animais controles ($p < 0,05$). Os grupos exercitados apresentaram redução no tamanho dos adipócitos em relação aos respectivos grupos sedentários ($p < 0,05$). A: CON-SED; B: CON-EXE; C: MSG-SED; D: MSG-EXE. Barra = 50 μm .

Figura 2 - Efeitos do exercício físico sobre os níveis de mRNA da Adiponectina, TNF alfa, PPAR gama e PPAR alfa dos ratos MSG submetidos a treinamento físico.



Efeitos do exercício físico sobre os níveis de mRNA das adipocinas. A - Adiponectina, B - TNF alfa, C - PPAR gama e D - PPAR alfa. As letras acima das barras representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$). Foi utilizado o teste T de *Student*. ^aCON-SED; ^bCON-EXE; ^cMSG-SED; ^dMSG-EXE.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Intervenções efetivas para aumentar a prática de exercícios físicos são extremamente importantes. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas para identificação dos benefícios gerados pelos exercícios físicos a curto e longo prazo para compreensão dos aspectos psicológicos, comportamentais, genéticos e fisiológicos desta prática (BRYAN et al, 2007).

Ratos estimulados por MSG são utilizados em pesquisas para estudo da obesidade, e suas comorbidades, pois em curtos períodos de tempo apresentam características de portadores de síndrome metabólica, tais como: obesidade visceral e subcutânea, resistência à insulina e dislipidemia, porém sem desenvolver DM2 (SASAKI et al, 2009). Animais MSG sedentários apresentam elevados níveis de glicose e insulina de jejum, indicando a presença de RI nestes animais, o que demanda um grande esforço das células beta em produzirem e liberarem maiores quantidades de insulina. Nestes casos, as células beta perdem sua capacidade de regular a secreção de insulina e os níveis de glicose permanecem descontrolados (ANDREAZZI et al, 2009). A insulina é o principal hormônio lipogênico e seus níveis periféricos estão diretamente associados ao aumento da massa adiposa (BALBO et al, 2002), como pode ser observado nos ratos MSG obesos, os quais apresentam acúmulo de gorduras subcutâneas e mesentéricas.

Tem sido sugerido que a ação da insulina, seguida por uma sessão de exercício físico é melhorada, e isto também pode ser modulado por meio das incretinas (MARTINS et al, 2007; UEDA et al, 2009). Este estudo demonstrou que a natação, iniciada em idade prematura, melhorou os quadros patológicos relacionados à obesidade apresentada pelos ratos MSG obesos. A natação foi eficaz em promover a redução dos estoques de gordura mesentérica nos animais MSG exercitados, em relação ao grupo sedentário. Demonstramos também que a prática da natação restabeleceu os índices de glicose e insulina à normalidade no grupo MSG-EXE, visto que pode ser atribuído ao exercício o aumento da sensibilidade à insulina (POEHLMAN et al, 2000) e a normalização dos seus níveis, resultantes da diminuição dos estoques de gordura (SCHWARTZ e PORTE, 2005). Com isso, o exercício pode ocasionar uma redução da resistência à insulina e melhora no quadro

de intolerância à glicose, quadro que também ocorre em humanos e outros animais obesos (HAHM et al, 1999; OKADA et al, 2004).

Estudos prévios em humanos e animais têm mostrado que o exercício por si só geralmente melhora a sensibilidade das células beta e reduz a resposta de insulina à glicose. Este mecanismo de adaptação das células beta pode ocorrer em resposta ao GLP-1, entretanto não se sabe exatamente como isso ocorre (GOODYEAR e KAHN, 1998; MARLIS, 2002). Neste trabalho, foi analisado o efeito insulínico de GLP-1 na secreção de insulina, induzida por glicose, nas ilhotas pancreáticas isoladas dos ratos. Estes animais têm o funcionamento das ilhotas comprometido, porém demonstramos que a prática de atividade física foi capaz de restabelecer a resposta insulínica do GLP-1, mediante estímulo por concentrações pós-prandiais de glicose.

Foi demonstrado também que a carga de glicose administrada aos animais 30 min antes do sacrifício foi efetiva em estimular a expressão do GLP-1 e sua liberação pelas células L. Os níveis de mRNA de GLP-1 foram significativamente maiores nos grupos de animais submetidos à ingestão de carboidrato (glicose) antes do sacrifício, do que nos animais sacrificados em jejum, resultados que corroboram com os ensaios de imunohistoquímica da região do íleo distal. Em ambas as condições de jejum e glicose, os animais CON-EXE tiveram uma menor expressão e secreção de GLP-1, comparado ao grupo CON-SED. Os grupos MSG não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, quanto à prática de atividade física, na expressão de GLP-1. Estes dados sugerem que o exercício pode agir preferencialmente na captação de glicose nos tecidos periféricos pela potencialização da ação periférica da insulina pós-prandial do que na potencialização da secreção de insulina pelo GLP-1 em si.

O exercício pode interferir no controle central do gasto energético, preservando a sensibilidade à insulina e mantendo controlada a sua secreção pelas células beta (SCOMPARIN et al, 2009). Entretanto, os mecanismos envolvidos na melhora das respostas metabólicas frente ao exercício ainda são discutidos. Trabalhos indicam que o exercício físico aumenta os níveis de GLP-1 de jejum e pós-prandiais em humanos (SLIWOWSKI et al, 2001; MARTINS et al, 2007). Já os resultados de qRT-PCR e imunohistoquímica não evidenciaram um aumento de

GLP-1 nos animais MSG submetidos à natação. Provavelmente, outros mecanismos podem estar envolvidos mais diretamente na melhora dos problemas metabólicos causados pela obesidade do que na expressão de GLP-1 propriamente dita. Assim, a busca por outros candidatos a estarem envolvidos nos mecanismos pelos quais o exercício físico age no controle metabólico são necessários.

Nos animais exercitados, observamos uma diminuição no tamanho dos adipócitos e o aumento em número por quadrante dos mesmos, tanto nos animais obesos, quanto nos controles, evidenciando o papel do treinamento físico sobre células da gordura visceral. A prática regular de exercício físico reduz a quantidade de ácidos graxos livres, e pode ser uma importante terapia para esta condição (BODEN, 2002). Estes dados validam os efeitos do exercício físico crônico no tecido adiposo abdominal, reduzindo a hipertrofia das células adiposas. A expressão gênica da adiponectina foi estimulada pelo exercício físico nos animais COM-EXE. Estudos correlacionam a adiponectina ao aumento da sensibilidade à insulina em órgãos como fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. A maior expressão de TNF alfa apresentada pelos animais obesos corrobora com a hipótese de que os níveis de expressão de TNF alfa estão aumentados em quadros de obesidade, DM2 e doenças cardiovasculares. Os PPARs alfa e gama também tiveram seus níveis de mRNA aumentados nos animais MSG, o que pode indicar uma condição inflamatória devido ao quadro de obesidade, pois sugere-se que a ativação dos PPARs é responsável pelo perfil inflamatório desregulado dos ratos MSG. A maior expressão do mRNA de PPAR alfa nos animais controle exercitados pode ser explicada pela alta atividade mitocondrial e beta oxidação peroxissômica nestes animais.

Este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos do treinamento físico na expressão da incretina GLP-1 e suas ações sobre as ilhotas pancreáticas, bem como a expressão de adipocinas do tecido adiposo mesentérico de animais portadores de síndrome metabólica. Nossos resultados demonstraram que intervenções efetivas para aumentar a prática de exercícios físicos são importantes. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de novas pesquisas para identificação dos benefícios gerados pelos exercícios físicos a curto e longo prazo para compreensão dos aspectos psicológicos, comportamentais, genéticos e fisiológicos desta prática.

6 REFERÊNCIAS

- AHRÉN, B. Islet G protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes. **Nature reviews**, v. 8, n. 5, p. 369–385, 2009.
- AHREN, B. TABORSKY, G. J.; PORTE, D. Neuropeptidergic versus cholinergic and adrenergic regulation of islet hormone secretion. **Diabetologia**, v. 29, n. 827–836, 1986.
- AIZAWA, T. et al. Glucose action ‘beyond ionic events’ in the pancreatic b-cell. **Trends Pharmacol Sci**, v.19, p.496-499, 1998.
- ANDREAZZI A. E. et al. Swimming exercise at weaning improves glycemic control and inhibits the onset of monosodium L-glutamate-obesity in mice. **J Endocrinol**, v. 201, p. 351–359, 2009.
- ARAÚJO, A. P. S.; MENÓIA, E. Lipolytic activity during physical exercises: consumption of oxygen, production of adenosine triphosphate and neuro–humoral stimulation. **J Health Res**, v. 1, n. 2, p. 177-184, maio/ago, 2008.
- ATEF, N. et al. Increased islet blood flow in obese rats: role of the autonomic nervous system. **Am J Physiol**, v.262 n.5, p. 736-740, 1992.
- BAGGIO, L. L.; DRUCKER, J. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. **Gastroenterology**, v. 132, p. 2131–2157, 2007.
- BAILEY, C. J.; FLATT, P. R. Animal syndromes resembling type 2 diabetes. **Blackwell Science**, v. 25, n. 1, p. 25-30, 2003.
- BALBO, S. L. et al. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulina secretion of hypothalamic obese rat. **Endocrine**, v. 31, n. 2, p. 142–148. 2007
- BALBO, S. L. et al. Insulina secretion and acetylcholinesterase activity in monosodium L-glutamate-induced obese mice. **Hormone Res**, v. 54, p. 186-191, 2000b.
- BALBO, S. L. et al. Parasympathetic activity changes insulina response to glucose and neurotransmitters. **Diabetes Metab**, v. 28, n. 3, p. 13-17, 2002.
- BALBO, S. L. et al. Vagotomy reduces obesity in MSG-treated rats. **Res Comm Mol Pathol Pharmacol**, v.108, p. 291-296, 2000a.
- BALON, T.W. et al. Skeletal muscle glucose transport is mediated by nitric oxide via a cGMP-related mechanism. **Med Sci Sports Exerc**, v. 28 n. 58, 1996.
- BAUCHE, I. B. et al. Overexpression of adiponectin targeted to adipose tissue in transgenic mice: impaired adipocyte differentiation. **Endocrinology**, v. 148, p. 1539–1549, 2007.

BAUDRY, A. et al. Genetic manipulation of insulina signaling, action and secretion in mice. **EMBO Reports**, v. 4, p. 323–328, 2002.

BERG, A. H. ;COMBS, T. P.; SCHERER, P. E. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* v.13, p.84-89, 2002.

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

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Mol Immunol**, v. 40, p. 845-859, 2004.

BLOUET, C.; SCHWARTZ, G. J. Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. **Behav Brain Res**, v. 209, n.1, p. 1-12, 2010.

BODEN G. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Curr Opin. Clin Nutr Metab Care.* v.5, p. 545–549, 2002.

BOURET, S. G.; SIMERLY, R. B. Minireview: Leptin and development of hypothalamic feeding circuits. **Endocrinology**, v.145, n.6, p.2621-26216. Jun, 2004.

BRAND, C. L. et al. Synergistic effect of the human GLP-1 analogue liraglutide and a dual PPARalpha/gamma agonist on glycaemic control in Zucker diabetic fatty rats. **Diabetes Obes Metab**, v. 11, n. 8, p. 795-803, 2009.

BRUBAKER, P. L.; SCHLOOS, J.; DRUCKER, D.J. Regulation of glucagonlike peptide-1 synthesis and secretion in the GLUTag enteroendocrine cell line. **Endocrinology**, v. 139 p. 4108-4114, 1998.

BRYAN, A. et al. A Transdisciplinary model integrating genetic, physiological, and psychological correlates of voluntary exercise. **Health Psychol**, v. 26, p. 30-39, 2007.

BUCHANAN, T. A. et al. Insulina sensitivity and B-cell responsiveness to glucose during late pregnancy in lean and moderately obese women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes. **Am J Obstet Gynecol**, v. 162, p. 1008-1014, 1990.

BUNYAN, J.; MURRELL, E. A.; SHAH, P. P. The induction of obesity in rodents by means of monosodium glutamate. **Br J Nutr**, v. 35, p. 25-39, 1976.

BURDE, R. M.; SCHANKER, B.; KAYES, J. Acute effect of oral and subcutaneous administration of monosodium glutamate on the arcuate nucleus of the hypothalamus in mice and rats. **Nature**, London, v. 233, p. 511-560, 1971.

BUTEAU, J. et al. Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and

duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in b(INS-1)-cells. **Diabetologia**, v. 42, p. 856-864, 1999.

BUTEAU, J. et al. Protein kinase C activation mediates glucagon-like peptide-1-induced pancreatic B-cell proliferation. **Diabetes**, v. 50, p. 2237-2243, 2001.

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

CHEN, C. et al. Mechanism of compensatory hyperinsulinemia in normoglycemic insulina-resistant spontaneously hypertensive rats. Augmented enzymatic activity of glucokinase in beta-cells. **J Clin Invest**, v. 94, p. 399-404, 1994.

CHEN, M.; BERGMAN, R. N.; PORTE, D. Insulina resistance and beta-cell dysfunction in aging: the importance of dietary carbohydrate. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 67, p. 951-957, 1988.

CHEN, Y. et al. Uncoupling protein 2 regulates glucagon-like peptide-1 secretion in L-cells. **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 26, p. 3451-3457, 2012.

CLARKE, J. F. et al. Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3 L1 cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin. **Biochem J**, v. 300, p. 631-635, 1994.

CLELAND, P. J. et al. Exercise-induced translocation of protein kinase C and production of diacylglycerol and phosphatidic acid in rat skeletal muscle in vivo. Relationship to changes in glucose transport. **J Biol Chem**, v. 264, n.30, p. 17704-17711, out., 1989.

CNOP, M. et al. The concurrent accumulation of intra-abdominal and subcutaneous fat explains the association between insulina resistance and plasma leptin concentrations: distinct metabolic effects of two fat compartments. **Diabetes**, v. 51, p. 1005-1015, 2002.

COLEMAN, D. L. Lessons from studies with genetic forms of diabetes in the mouse. **Metabolism**, v. 32, n. 35, p. 162–164, 1980.

CUNHA, N. V. Cox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats. **Life Sci**, v. 87, p. 375-381, 2010.

CURI, R. et al. Ciclo de Krebs como fator limitante na utilização de ácidos graxos durante o exercício aeróbico. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 47, n. 2, p. 135-143, Abril, 2003.

CUSI K. Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. **Clin Liver Dis**.v. 13, p. 545–63, 2009.

DAMHOLT, A. B.; BUCHAN, A. M. J.; KOFOD, H. Glucagon-like-peptide-1 secretion from canine L-cells is increased by glucose-dependent- insulinotropic peptide but unaffected by glucose. **Endocrinology**, v. 139, p. 2085-2091, 1998.

DELGHINGARO-AUGUSTO, V. et al. Voluntary running exercise prevents beta-cell failure in susceptible islets of the Zucker diabetic fatty rat. **Am J Physiol**. v. 302, n. 2, p. 254-264, 2012.

DHANVANTARI, S.; SEIDAH, N. G.; BRUBAKER, P. L. Role of prohormone convertases in the tissue-specific processing of proglucagon. **Mol Endocrinol**, v. 10, p. 342 –355,1996.

DRUCKER, D. J. Biological actions and therapeutic potential of the glucagonlike peptides. **Gastroenterology**, v. 122, p. 531–544, 2002.

DRUCKER, D. J. The biology of incretin hormones. **Cell Metab**, v. 3, p. 153–165, 2006.

DURING, M. J. et al. Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. **Nat Med**, v. 9, p.1173–1179, 2003.

EISSELE, R. et al. Glucagon-like peptide-I cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig, and man. **Eur J Clin Invest**, v. 22, p. 283-291, 1992.

ELFERS, C.; RALSTON, M.; ROTH, C. L. Studies of different female rat models of hypothalamic obesity. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v. 24, p. 131-137, 2011.

ELLINGSGAARD, H. et al. Interleukin-6 enhances insulina secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. **Nature medicine**. v. 17, n.11, 2011.

ELLIOTT, R. M. et al. Glucagon-like peptide 1(7-36)amide and glucose-dependent insulinaotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. **J Endocrinol**, v. 138, p. 159-166, 1993.

ERICKSON, J. C.; HOLLOPETER, G.; PALMITER, R. D. Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. **Science**, v. 274, p. 1704–1707, 1996.

ESPOSITO, K. et al. Role of adipokines in the obesity inflammation relationship: the effect of fat removal. **Plast Reconstr Surg**. v. 118, n. 4, p. 1048-1059, 2006.

ETGEN, G. J.; OLDHAM, B. A. Profiling of Zucker diabetic fatty rats in their progression to the overt diabetic state. **Metabolism**, v. 49, p. 684–688, 2000.

FAIN, J. N. et al. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. **Endocrinology**. v. 145, p. 2273-2282, 2004.

FEHMANN, H. C.; GOKE, R.; GOKE, B. Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide 1 and glucose dependent insulina releasing polypeptide. **Endocrine Rev**, v.16, p. 390-410, 1995.

FLINT, A. et al. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intakes in humans. **J Clin Invest**, v. 101, p. 515-20, 1998.

FOA, P.; BAJAJ, J.; FOA, N. **Glucagon: Its Role in Physiology and Clinical Medicine**, Springer, Berlin, 1977.

FONSECA, A. et al. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 2, p.216-229, abril 2006.

GAUTIER, J. F. et al. Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Metab**, v. 31, p.233-242, 2005.

GILDE, A. J.; FRUCHART, J. C. H.; STAELS, B., Peroxisome proliferators-activated receptors at the crossroads of obesity, diabetes, and cardiovascular disease. **J Am Coll Cardiol**. 48, p. 24-32, 2006.

GONZÁLEZ-CASTEJÓN, M.; RODRIGUEZ, C. A. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review. **Pharmacol Res**, v. 64, n. 5, p. 438-455 nov. 2011.

GOODYEAR, L. J. et al. Effects of contractile activity on tyrosine phosphoroteins and phosphatidylinositol 3-kinase activity in rat skeletal muscle. **Am J Physiol**, v. 268, p. 987-995, 1995.

GOODYEAR, L. J. et al. Effects of exercise and insulina on mitogen-activated protein kinase signaling pathways in rat skeletal muscle. **Am J Physiol**, v. 271, n. 2, p. 403-408, ago.1996.

GOODYEAR, L. J.; KAHN, B. B. Exercise, glucose transport, and insulina sensitivity. **Annu Rev Med**, v. 49, p. 235-261, 1998.

GRANT, S. F. et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. **Nat Genet**, v. 38, p. 320–323, 2006.

HAHM, S. et al. Targeted deletion of the Vgf gene indicates that the encoded secretory peptide precursor plays a novel role in the regulation of energy balance. **Neuron**, v. 23, p. 537-548, 1999.

HALLER, H. Epidemiology and associated risk factors of hyperlipoproteinemia. **Z Gesamte Inn Med**, v. 32, p. 124-128, 1977.

HANSEN, A. M. K. et al. Upregulation of alpha cell glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in Psammomys obesus--an adaptive response to hyperglycaemia? **Diabetologia**. v. 54, n. 6, p. 1379–1387, 2011.

HANSEN, D. et al. The effects of exercise training on fat-mass loss in obese patients during energy intake restriction. **Sports Med.** v. 37, n.1, p. 31-46, 2007.

HAYASHI, T.; WOJTASZEWSKI, J. F.; GOODYEAR, L. J. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. **Am J Physiol**, v. 273, p. 1039-1051, 1997.

HENRIKSSON, J. et al. Skeletal muscle and hormonal adaptation to physical training in the rat: role of the sympatho-adrenal system. **Acta Physiol Scand**, v. 123, p. 127-138, 1985.

HIRATA, A. E. et al. Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulina resistance to peripheral glucose uptake. **Braz J Med Biol Res.** v. 30, n. 5, p. 671–674, 1997.

HOLST, J. J. The Physiology of Glucagon-like Peptide 1. **Physiol Rev**, v. 87, p. 1409-1439, 2007.

HOLST, J. J. Therapy of type 2 diabetes mellitus based on the actions of glucagon-like peptide-1. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 18, p. 430-441, 2002.

HOLST, J. J.; GROMADA, J. Role of incretin hormones in the regulation of insulina secretion in diabetic and nondiabetic humans. **AJP-Endo**, v. 287, n. 2, p. 199-206, ago. 2004.

HOSOGAI, N. et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. **Diabetes.** v. 56, p. 901-911, 2007.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n.14, p. 860-867, dec. 2006.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factoralpha in human obesity and insulin resistance. **J Clin Invest.** v. 95, p. 2409-2415, 1995

HUI, H.; WRIGHT, C.; PERFETTI, R. Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1–positive pancreatic ductal cells into insulina-secreting CELLS. **Diabetes**, v. 50, P. 785-796, 2001.

HUTLEY, L.; PRINS, J. B. Fat as an Endocrine Organ: Relationship to the Metabolic Syndrome. **Southern Sci Clin Invest.**v. 330, n. 6, p. 281-289, dez. 2005.

ITOH, Y. et al. Free fatty acids regulate insulina secretion from pancreatic beta cells through GPR40. **Nature**, v. 422, p. 173–176, 2003.

IWASE, M. A new animal model of non-insulina-dependent diabetes mellitus with hypertension: neonatal streptozotocin treatment in spontaneously hypertensive rats. **Fukuoka Igaku Zasshi**, v. 82, p. 415–427, 1991.

JIANG, J.; TOROK, N. Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. **Metab Syndr Relat Disord**. v. 6, p. 1-7, 2008.

KAHN, B. B.; FLIER, J. S. Obesity and insulina resistance. **J Clin Invest**, v. 106, p.473-481, 2000.

KAHN, S. E. et al. Increased beta-cell secretory capacity as mechanism for islet adaptation to nicotinic acid-induced insulina resistance. **Diabetes**, v. 38, p. 562-568, 1989.

KAHN, S. E. et al. Quantification of the relationship between insulina sensitivity and B-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. **Diabetes**, v. 42, p. 1663–1672, 1993.

KAHN, S. E. The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, p. 4047–4058, 2001.

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

KAWANO, K et al. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Strain. **Diabetes**, v. 41, p. 1422–1428, 1992.

KERSHAW, E. E; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **J. Clin Endocrinol Metab**. v. 89, p.2548-2556, 2004.

KIEFFER, T. J.; HABENER, J. F. The Glucagon-Like Peptides. **Endocrine Rev**, v. 20, n. 6, p. 876-913, 1999.

KILIMNIK, G. et al. Intraislet production of GLP-1 by activation of prohormone convertase 1/3 in pancreatic alpha-cells in mouse models of ss-cell regeneration. **Islets**, v. 2, p. 149-155, 2010.

KIM, S. P. et al. Primacy of hepatic insulina resistance in the development of the metabolic syndrome induced by an isocaloric moderate-fat diet in the dog. **Diabetes**, v. 52, p. 2453-2460, 2003.

KODAMA, H. et al. The possible role of age-related increase in the plasma glucagon/insulina ratio in the enhanced hepatic gluconeogenesis and hyperglycemia in genetically diabetic (C57BL/KsJ-db/db) mice. **Jpn J Pharmacol**, v. 66, p. 281–287, 1994.

KREYMAN, B. et al. Glucagon-like peptide-1 [7-36]: a physiological incretin in man. **The Lancet**, v. 5, p. 1300-1304, 1987.

KRIKETOS, A. D. et al. Exercise Increases Adiponectin Levels and Insulin Sensitivity in Humans. **Diabetes Care**. v. 27, n. 2, p. 629-630, fev. 2004.

KUBOTA, A.; NAKAGAWA, Y.; IGARASHI, Y. Studies of gene expression in liver of insulina-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3 and growth hormone (GH) receptor/GH binding protein in rats treated neonatally with monosodium glutamate (). **Horm Metab Res.** v. 26, n. 11, p. 497-503, 1994.

LAMONT, B. J.; DRUCKER, D. J. Differential Antidiabetic Efficacy of Incretin Agonists Versus DPP-4 Inhibition in High Fat – Fed Mice. **Diabetes.** v. 57, n. 1, p.190-198, jan. 2008.

LANKAT-BUTTGEREIT, B. et al. Molecular cloning of a cDNA encoding for the GLP-1 receptor expressed in rat lung. **Exp Clin Endocrinol**, v. 102, p. 341-347, 1994.

LARSEN, P. J. et al. Systemic Administration of the Long-Acting GLP-1 Derivative NN2211 Induces Lasting and Reversible Weight Loss in Both Normal and Obese Rats. **Diabetes**, v. 50, p. 2530-2539, nov. 2001.

LARSSON, L. I. et al. Distribution and properties of glucagon immunoreactivity in the digestive tract of various mammals: an immunohistochemical and immunochemical study. **Histochemistry**, v. 44, p. 281-290, 1975.

LECLERC, V.; REICHHART, J. M. The immune response of *Drosophila melanogaster*. **Immunol Rev**, v. 198, p. 59–71, 2004.

LEE, A. D.; HANSEN, P. A.; HOLLOSZY, J. O. Wortmannin inhibits insulina-stimulated but not contraction-stimulated glucose transport activity in skeletal muscle. **FEBS Lett**, v. 361, p. 51-54, 1995.

LEE, Y. C.; BRUBAKER, P. L.; DRUCKER, D. J. Developmental and tissue-specific regulation of proglucagon gene expression. **Endocrinology**, v. 127, p. 2217-2222, 1990.

LEVIN, B. R.; LIPSITCH, M.; BONHOEFFER, S. Population biology, evolution, and infectious disease: convergence and synthesis. **Science**, v. 283, p. 806-809, 1999.

LI, Z. et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 37, p. 343-350, 2003.

LIM, G. E. BRUBAKER, P. L. . Glucagon-Like Peptide 1 Secretion by the L-Cell. **Diabetes**, v. 55 n. 2, p. 70-77. Dez. 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real- Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOVISCAH, M. Distribution of PPARs in human skeletal muscle and adipose tissue: relation to insulina action. **Diabetologia**. v. 43, p.304-311, 2000.

LUO, J. et al. Nongenetic mouse models of non-insulina-dependent diabetes mellitus. **Metabolism**, v. 47, p. 663–668, 1998.

MACDONALD, P. E. et al. The Multiple Actions of GLP-1 on the Process of Glucose-Stimulated Insulina Secretion. **Diabetes**, v. 51, n. 3, p. 434-442, dez. 2002.

MAEDA, K. et al. Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. **Gene**, v.190, p. 227-235, 1997.

MARLIS, E. B. Intense Exercise Has Unique Effects on Both Insulina Release and Its Roles in Glucoregulation. **Diabetes**, v. 51, n. 1, p. 271-273, Feb. 2002.

MARTÍNEZ-RODRÍGUES, R.; GIL, A. Nutrient-mediated modulation of incretin gene expression; a systematic review. **Nutr Hosp**. v. 27, n. 1, p. 46-53, 2012.

MARTINS, C et al. Effects of exercise on gut peptides, energy intake and appetite. **J Endocrinol**, v. 193, p. 251-258, 2007.

MATHEWS, C. E.; LEITER, E. Rodent Models for the Study of Diabetes, In: Kahn, C. R. et al, **Joslin's Diabetes Mellitus**, Fourteenth Edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Company, 2005, p. 291–327.

MATSUZAWA, Y. et al. Adiponectin and metabolic syndrome. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 24, p. 29-33, 2004.

MEIER J. J. et al. Glucagon-like peptide 1 as a regulator of food intake and body weight: therapeutic perspectives. **Eur J Pharmacol**, v. 440, p. 269-279, 2002.

MIGUEL, J. C. et al. Cooperative enhancement of insulinaotropic action of GLP-1 by acetylcholine uncovers paradoxical inhibitory effect of beta cell muscarinic receptor activation on adenylate cyclase activity. **Bioch Pharmacol**. v. 65, n. 2, p. 283-292, 2003.

MOJSOV, S.; WEIR, G. C.; HABENER, J. F. Insulinaotropin: glucagon-like peptide-I(7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulina release in the perfused rat pancreas. **J Clin Invest**, v. 79, p. 616-619, 1987.

MOLLER, D.E. Potential role of TNF- α in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. **Trends Endocrinol Metab**. v. 11, p. 212–217, 2000.

MONTAGUE, C. T.; O'RAHILLY, S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. **Diabetes**, v. 49, p. 883-888, 2000.

MORAN, A. et al. Insulina resistance during puberty: results from clamp studies in 357 children. **Diabetes**, v. 48, p. 2039–2044, 1999.

MORITOH, Y.; TAKEUCHI, K.; HAZAMA, M. Combination treatment with alogliptin and voglibose increases active GLP-1 circulation, prevents the development of diabetes and preserves pancreatic beta-cells in prediabetic db/db mice. **Diabetes Obes Metab**. v, 12, n. 3, p. 224-233, 2010.

MOTOSHIMA, H. et al. Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: effects of insulina and rosiglitazone. **J. Clin Endocrinol Metab**, v. 87, p. 5662–5667, 2002.

MU, J. et al. Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic beta-cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. **Diabetes**. v. 55, n. 6, p. 1695-1704, 2006.

MURPHY, K. G.; BLOOM, S. R. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. **Nature**. v. 444, n. 7121, p. 854–859, 2006.

NAGATA, M. et al. Type 2 diabetes mellitus in obese mouse model induced by monosodium glutamate. **Exp Anim**, v. 55, p. 109-115, 2006.

NAPOLI, C. et al. Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. **PNAS**, v.101, p. 8797–8802, 2004.

NAUCK, M. A. et al. Effects of glucagon-like peptide 1 on counter regulatory hormone responses, cognitive functions and insulina secretion during hyperinsulinaemic stepped hypoglycaemic clamp experiments in healthy volunteers. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, p. 1239-1246, 2002.

NAUCK, M. A. et al. Inhibition of gastric emptying by physiological and pharmacological doses of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1) outweighs insulinaotropic effects in healthy normoglycemic volunteers. **Am J Physiol**, v. 273, p. 981-988, 1997.

NAUCK, M. A. et al. Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes. **Diabetologia**. v.54, n.1 p. 10-18, 2011.

NICKLAS, B. J. Effects os endurance exercise on adipose tissue metabolism. **Exerc Sport Sci Rev**. v. 25, p 77-103, 1997.

NIELSEN, L. L.; YOUNG, A. A.; PARKES, D. G. Pharmacology of exenatide (synthetic exendin-4): a potential therapeutic for improved glycemic control of type 2 diabetes. **Regulatory peptides**, v. 117, n. 2, p. 77-88, 2004.

O'HALLORAN, D. J. et al. Glucagon-like peptide- 1 (7-36)-NH₂: a physiological inhibitor of gastric acid secretion in man. **J Endocrinol**, v. 126, p. 169-173, 1990.

OKADA, S. et al. In vivo insulina action in adrenodemedullated rats after voluntary running. **Diabetes Res Clin Pr**, v. 65, p. 71–78, 2004.

ORDOVÁS, J. M; SHEN, J. Gene–environment interactions and susceptibility to metabolic syndrome and other chronic diseases. **J Periodontol**, v. 79, n. 8, p. 1508-1513, 2008.

PERFETTI, R; MERKEL, P. Glucagon-like peptide-1: a major regulator of pancreatic b-cell function. **Eur J Endocrinol**, v. 143, p.717-725, 2000.

PERRY, T. A; GREIG, N. H. A new Alzheimer's disease interventive strategy: GLP-1. **Curr Drug Targets**, v. 5, p. 565-571, 2004.

PETERSON, R. G. et al. Zucker diabetic fatty as a model for non-insulina-dependent diabetes mellitus. **ILAR News**, 1990; 32: 16–19.

POLONSKY, K. S.; GIVEN, B. D.; VAN CAUTER, E. Twenty-four-hour profiles and patterns of insulina secretion in normal and obese subjects. **J Clin Invest**, v. 81, p. 442-448, 1988.

PRENTKI, M. et al. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. **Diabetes**, v. 51 n. 3, p. 405–413, 2002.

PYPER SR, Viswakarma N, Yu S, Reddy JK. PPARAlpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. **Nucl Recept Signal**, v. 8, p. 2, 2010.

RACETTE, S. B. et al. Modest weight loss improves insulina action in obese African Americans. **Metabolism**, v. 54, p. 960-965, 2005.

REYNISDOTTIR, S. et al. Comparison of hormone sensitive lipase activity in visceral and subcutaneous human adipose tissue. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, p. 4162-4166, 1997.

RICHTER, E. A. et al. Contraction-associated translocation of protein kinase C in rat skeletal muscle. **FEBS Lett**, v. 217, p. 232-236, 1987.

RITCHIE, S. A.; Connell, J. M. C. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Nutr Metab Cardiovas**, v. 17, p. 319-326, 2007.

ROCCHINI, A. P. Childhood obesity and a diabetes epidemic. **N Engl J Med**, v.346, p. 854–855, 2002.

ROMAN-RAMOS, R. et al. Monosodium Glutamate Neonatal Intoxication Associated with Obesity in Adult Stage is Characterized by Chronic Inflammation and Increased mRNA Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Mice. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 108, p. 406-413, 2011.

ROPELLE, E. R. et al. Reversal of diet-induced insulina resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. **J Physiol**, v. 577, n. 3, p. 997-1007, Dez. 2006.

RUSTEN, T. E. et al. Programmed autophagy in the Drosophila fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. **Dev Cell**, v. 7, p. 179-192, 2004.

SAGAE, S. C. Sex differences in brain cholinergic activity in MSG-obese rats submitted to exercise. **Can J Physiol Pharmacol**. v. 89, p. 845–853, 2011.

SAMUELSSON, A. M. et al Diet-Induced Obesity in Female Mice Leads to Offspring Hyperphagia, Adiposity, Hypertension, and Insulina Resistance A Novel Murine Model of Developmental Programming. **Hypertension**, v. 51 p. 383-392, 2008.

SANTORO, S. et al. Enterohormonal Changes After Digestive Adaptation: Five-Year Results of a Surgical Proposal to Treat Obesity and Associated Diseases. **Obesity Surgery**, v. 18, n. 1, p. 17-26, 2008.

SASAKI, Y. et al. Dose dependent development of diabetes mellitus and non alcoholic steatohepatitis in monosodium glutamate-induced obese mice. **Life Sci**, v. 85, p. 490-498, 2009.

SCHERER, P. E. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. **Diabetes**, v. 55, n.6, p. 1537-1545, Jun. 2006.

SCHEURINK, A. J., et al. Adrenal and sympathetic catecholamines in exercising rats. **Am J of Physiol**. v. 256, p.155–160, 1989.

SCHEURINK, A. J.; STEFFENS, A. B. Experience affects exercise-induced changes in catecholamines, glucose, and FFA. **Am J Physiol**, v.256, n.1, p. 169-173, 1989.

SCOMPARIN D. X. 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 Sci**, v. 79, n. 22, p. 2151-2156, Out. 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.

SEGERSVARD, R. et al. Obesity alters cytokine gene expression and promotes liver injury in rats with acute pancreatitis. **Obesity**. v. 16, p.23-28, 2008.

SEMENKOVICH, C. F. Insulina resistance and atherosclerosis. **J Clin Invest**, v.116, p. 1813–1822, 2006.

SEMPLE, R. K.; CHATTERJEE, V. K. V.; O'RAHILLY, S. PPAR gama and human metabolic disease. **J Clin Invest**. v.116, p. 581-589, 2006.

SHAFRIR, E. Animal models of non-insulina-dependent diabetes. **Diabetes Metab Rev**, v. 8, p. 179–208, 1992.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulina resistance. **J Clin Invest**, v. 116, p. 1793-1801, 2006.

SHULTZ, A et al. Swimming training beneficial effects in a mice model of nonalcoholic fatty liver disease. **Exp Toxicol Pathol**. v. 64, p. 273-282, 2012

SIMPSON, K. A.e SINGH, M. A. F. Effects of Exercise on Adiponectin: A Systematic Review. **Obesity**, v. 16, n. 241-256, fev. 2008.

SINGER, P. Diagnosis of primary hyperlipoproteinemias. **Z Gesamte Inn Med**, v. 32, p. 129-133, 1977.

SINGLA, P.; BARDOLOI, A.; PARKASH, A. A. Metabolic effects of obesity: a review. **J Diabetes**, v. 1, n. 3 p. 76-88, 2010.

SJOLUND, D. et al. Endocrine cells in human intestine. An immunocytochemical study. **Gastroenterol**, v. 85, p. 1120-1130, 1983.

SLIWOWSKI, Z. et al. Leptin, gastrointestinal and stress hormones in response to exercise in fasted or fed subjects and before or after blood donation. **J Physiol Pharmacol**, v. 52, n.1, p. 53-70, 2001.

SONDERGAARD, L. Homology between the mammalian liver and the Drosophila fat body. **Trends Genet**, v.9, n.6, p. 193, Jun. 1993.

SUZUKI, N, et al. An early insulina intervention accelerates pancreatic beta-cell dysfunction in young Goto-Kakizaki rats, a model of naturally occurring noninsulina-dependent diabetes. **Endocrinology**, v. 138, p. 1106–1110, 1997

TAI, E. S. et al. Association Between the PPARA L162V Polymorphism and Plasma Lipid Levels. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 22,p. 805-810, 2002.

TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR gama): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose, Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 51, n. 4, p.526-533, 2007.

THE WORLD HEALTH REPORT 2002. Reducing Risks, Promoting Healthy Life. World Health Organization, Geneva, 2002.

TORGAN, C. E. et al. Exercise training and clenbuterol reduce insulina resistance of obese Zucker rats. **Am J Physiol**, v. 264, p. 373-379, 1993.

TORRA, I. P. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors: from transcriptional control to clinical practice. **Curr opin lipidol**. v. 12, p. 245-254, 2001.

TREADWAY, J. L. et al. Effect of exercise on insulina receptor binding and kinase activity in skeletal muscle. **Am J Physiol**, v. 256, p.138-144, 1989.

TRUJILLO, M. E.; SCHERER, P. E. Adiponectin–journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. **J Intern Med**. v. 257, p.167–175, 2005.

UEDA, S. Y. et al. Changes in gut hormone levels and negative energy balance during aerobic exercise in obese young males. **J Endocrinol**, v. 201, p. 151-159,

2009.

VAN DIJK, G.; THIELE, T. E. Glucagon-like peptide-1(7-36) amide: a central regulator of satiety and interoceptive stress. **Neuropeptides**, v.33, p. 406-414, 1999.

VERGAUWEN, L.; HESPEL, P.; RICHTER, E. A.. Adenosine receptors mediate synergistic stimulation of glucose uptake and transport by insulina and by contractions in rat skeletal muscle. **J Clin Invest**, v. 93, p. 974-981, 1994.

WANG, B.; JENKINS, J.R.; TRAYHURN, P. Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: integrated response to TNFalpha. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 288, p.731–740, 2005.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**. v. 112, p. 1796- 808, 2003.

WELLEN, K. E; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. **J Clin Invest**, 115, 1111-1119, 2005.

WOJTASZEWSKI, J. F. P. et al. Wortmannin inhibits both insulina- and contraction-stimulated glucose uptake and transport in rat skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v. 81, p.1501-1509, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic report of a WHO consultation on obesity. Geneva, Switzerland: WHO; 1292 p. 1998.

XU, G. et al. Exendin-4 stimulates both b-cell replication and neogenesis, resulting in increased b-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. **Diabetes**, v. 48, p. 2270-2276, 1999.

XU, H. et al. Altered tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) processing in adipocytes and increased expression of transmembrane TNF-alpha in obesity. **Diabetes**. v. 51, p. 1876–1883, 2002.

YAMAMOTO, H. et al. Glucagon-like peptide-1 receptor stimulation increases blood pressure and heart rate and activates autonomic regulatory neurons. **J Clin Invest**, v. 110, p. 43-52, 2002.

YAMAMOTO, H. et al. Glucagon-like peptide-1-responsive catecholamine neurons in the area postrema link peripheral glucagon-like peptide-1 with central autonomic control sites. **J Neurosci**, v. 23, p. 2939-2946, 2003.

YAMAUCHI, T. et al. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. **Nat Med**. v. 13, p. 332-339, 2007.

YI, F.; BRUBAKER, P. L.; JIN, T. TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta. **J Biol Chem**, v. 280, p. 1457-1464, 2005.

ZANDER, M. et al. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycemic control, insulina sensitivity, and b-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. **Lancet**, v. 359, p. 824-830, 2002.

ANEXOS

ANEXO A – Carta de aprovação da Comissão de Ética do Uso de Animal

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL****CARTA DE APROVAÇÃO****Processo – 02/2010****Título - “A atividade física iniciada precocemente corrige as alterações na responsividade a glicose e a acetilcolina em ilhotas pancreáticas de animais obesos – MSG”****Interessado -** Sabrina Grassioli**Data de Entrada – 09/03/2010****Resultado:** Aprovado**Data/Prazo – Validade de dois anos para projetos de pesquisa.**
20/04/2012**Considerações**

Prezado(a) Professor(a),

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

- APROVADO, por dois anos, para a utilização ratos (*Rattus norvegicus*).
- Processo cadastrado sob o número: 02860

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**Data 20/04/2012**Professor Dr. Giovani Marino Favero
Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPGAv. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaíras
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264

Anexo B - Protocolo para extração de RNA total

Após a retirada de uma pequena amostra de tecido, a mesma foi armazenada imediatamente em tubos de 1,5 ml, tipo eppendorf, contendo 700 µl de solução de *RNA later* (Qiagen). Foram então acondicionadas em ultra-frezzer na temperatura de -80 °C.

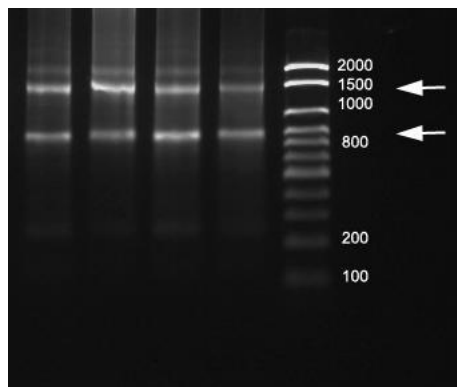
O tecido armazenado em *RNA later* foi então processado para a extração do RNA total. Primeiramente, o tubo contendo a amostra foi sujeito à centrifugação por 5 minutos à 15000g em centrífuga refrigerada (4°C) para que houvesse a separação do tecido da solução, que foi descartada. O tecido presente no fundo do tubo foi então macerado mecanicamente na presença de nitrogênio líquido, com ajuda de um pistilo de vidro.

Após disrupção mecânica do tecido, foi utilizado o kit “*Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit*” (GE Healthcare) para a extração e purificação do RNA total do precipitado celular. Os demais passos foram seguidos de acordo com as instruções presentes no protocolo do kit. Vale salientar que todo o processo foi realizado em fluxo laminar previamente esterilizado e foram tomadas todas as precauções necessárias para evitar a contaminação das amostras e prevenir a degradação do RNA, como o uso de luvas e máscaras cirúrgicas e materiais autoclavados e especialmente selecionados para o manuseio com RNA.

Primeiramente, adicionou-se ao precipitado celular 350 µl do tampão RA1 e 3,5 µl de β-mercaptoetanol, os quais foram homogeneizados. O lisado foi então sujeito à filtração em “mini filtros RNAspin”, acoplados a tubos coletores (oferecidos pelo kit), por 1 minuto a 11000g a 4°C. Ao filtrado, foram então misturados 350 µl de etanol 70% e a solução colocada em uma “mini coluna RNAspin”, acoplados a tubos coletores, e sujeita à centrifugação por 30 segundos a 8000g a 4°C. Após a troca do tubo coletor, a membrana de sílica presente na coluna foi tratada com o 350 µl do tampão MDB (*Membrane Desalting Buffer*) para remoção do sal presente na coluna e centrifugada a 11000g por 1 minuto em centrífuga refrigerada. Em seguida, a amostra foi digerida com a enzima DNase a temperatura ambiente por 15 minutos para a remoção do DNA. Posteriormente, foram realizadas lavagens com 200 µl do tampão RA2 por 1 minuto a 11000g e 600 µl do tampão

RA3, previamente acrescido de etanol 100%, por 1 minuto a 11000g a 4°C, sendo esta última lavagem repetida duas vezes. Finalmente, o RNA foi eluído da coluna com 50 µl de água livre de RNase por centrifugação a 11000g por 1 minuto a 4°C. Uma pequena alíquota de 5 µl de RNA foi sujeita à eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen) para verificar a integridade da amostra e 2 µl foram utilizados para quantificação e análise de pureza no espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare). O restante foi acondicionado em ultra-frezer -80°C para estocagem e posterior utilização.

Anexo C – Gel de agarose 1%, corado com GelRed, contendo 4 amostras de RNA total extraídas da porção de íleo distal dos ratos. As setas indicam as bandas de rRNA 28S (~1500 pb) e 18S (~800 pb). Na última coluna, está representado o marcador de peso molecular (Norgen).



Anexo D - Protocolo para síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, utilizando como molde o RNA total obtido anteriormente, foi utilizado o kit “*First-Strand cDNA Synthesis Kit*” (GE Healthcare). O experimento foi seguido de acordo com as instruções presentes no manual do fabricante.

Foram utilizados 1 µg de RNA total como molde para a geração da primeira fita de cDNA. Primeiramente, a solução de RNA foi aquecida a 65°C durante 10 minutos e, depois colocada em gelo imediatamente. Adicionou-se então ao RNA pré-desnaturado 11 µl da solução *bulk first-strand cDNA reaction mix*, a qual é constituída da transcriptase reversa M-MuLV (*Moloney Murine Leukemia Vírus*), desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) na concentração de 1,8 mM e BSA (0,08 mg/ml), todos em tampão apropriado para a reação enzimática (Tris-HCl 45 mM, pH 8,3, KCl 68 mM, DTT 15 mM, MgCl₂ 9 mM) . Juntamente a este mix, foram adicionados 1 µl de solução contendo DTT 200 mM e 1 µl (5 µg) do oligonucleotídeo *Not I*-d(T)₁₈. Após homogeneização da solução, a mesma foi incubada a 37°C por 1 hora.

Uma alíquota de 2 µl do cDNA foi aplicada em gel de agarose 1% (Invitrogen) para verificação da integridade da amostra e observação de um provável rastro, evidenciando assim o resultado esperado da técnica. Para quantificação e análise da pureza do material, 2 µl de cDNA foram aplicados no espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare). O restante da solução foi acondicionado a -20°C para estocagem.

ANEXO E - Soluções utilizadas no isolamento e incubação das ilhotas pancreáticas.**Soluções para preparar solução de Krebs**

Utilizar água deionizada para a preparação das soluções I, II e III, os valores abaixo são equivalentes a um litro de cada solução

solução I – 26,890 g/L de Cloreto de Sódio (NaCl)

Solução II - 8,065 g/L de Bicarbonato e Sódio (NaHCO_3), 0,490 g/L de Cloreto de Potássio (KCl) e 0,813 g/L de Cloreto de Magnésio (MgCl).

Solução III – 0,588 g/L de Cloreto de Cálcio (CaCl_2).

Solução salina de Hanks

Misturar os seguintes sais em água deionizada:

8 g/L de Cloreto de Sódio (NaCl); 0,4 g/L de Cloreto de Potássio (KCl); 0,2 g/L de Sulfato de Magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); 0,048 g/L de Fosfato de Sódio (Na_2HPO_4); 0,06 g/L de Fosfato de Potássio (KH_2PO_4); 0,185 g/L de Cloreto de Cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Gaseificar a solução por 10 minutos no carbogênio. Então adicionar 0,35 g/L de Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3) e acertar o pH para 7,4.

Preparação do Krebs

Os valores a seguir são equivalentes a um litro de solução Krebs. Usar 250 mL da solução I, 250 mL da solução II e 250 mL da III. Adicionar albumina (0,1 g/mL). Completar com 250 mL de água deionizada. Acertar o pH para 7,4. Após, armazenar a 4 °C.

Preparação da Solução de Hanks

Deixar 10 minutos no carbogênio, adicionar Glicose (0,1 g/ 100mL), adicionar Albumina (0,1g/ 100mL) e acertar o pH para 7,4. Armazenar a 4 °C.

Preparação da collagenase

Usar 8 mL em cada pâncreas dos ratos. Adicionar 1 mg/mL (0,1g/100 mL) de Hanks e 0,1 g de albumina por mL. Armazenar a 4 °C.