

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

O EXERCÍCIO FÍSICO MODULA O METABOLISMO DA GLICOSE EM
ILHOTAS ISOLADAS DE ANIMAIS OBESOS-MSG

NAYARA DE CARVALHO LEITE

Ponta Grossa

2013

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

O EXERCÍCIO FÍSICO MODULA O METABOLISMO DA GLICOSE EM
ILHOTAS ISOLADAS DE ANIMAIS OBESOS-MSG

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. Dr. Sabrina Grassioli

Ponta Grossa

2013

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

- L533e Leite, Nayara
O exercício físico modula o metabolismo da glicose em ilhotas isoladas de animais obesos-MSG/ Nayara Leite. Ponta Grossa, 2013.
108f.
- Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de concentração Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro - Oeste.
Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Grassioli.
1. Obesidade. 2. Exercício. 3. Ilhotas pancreáticas. 4. Metabolismo. I. Grassioli, Sabrina. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Universidade Estadual do Centro – Oeste. Mestrado em Ciências Biológicas. III. T.

CDD: 591.1



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 04/2013

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, pela candidata **NAYARA DE CARVALHO LEITE**.

Aos dezoito 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 Dr^a Sabrina Grassioli, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **NAYARA DE CARVALHO LEITE**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr^a Sabrina Grassioli (Orientadora UEPG), Prof. Dr. Cláudio César Zoppi (UNICAMP) Dr^a Sandra Lucinei Balbo (UNIOESTE). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: **"O Exercício Físico Modula o Metabolismo da Glicose em Ilhotas Isoladas de Animais Obesos MSG"**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de trinta dias**; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 60 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim não

Novo título: _____

Ponta Grossa, 18 de fevereiro de dois mil e treze.

Prof^a Dr^a Sabrina Grassioli

Prof. Dr. Cláudio César Zoppi

Prof^a Dr^a Sandra Lucinei Balbo

Dedico este trabalho aos meus pais, Jairo e Maria Izabel, a minha tia Olga e a minha irmã Jaysa, por sempre acreditarem, confiarem e torcerem por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele não estaria aqui.

Agradeço aos meus pais, Maria Izabel, por me apresentar o mundo e me educar, sempre com muito amor, e Jairo, por me ensinar a ser curiosa, muito curiosa.

Agradeço a minha irmã Jaysa, por ser minha maior admiradora e torcedora.

Agradeço a minha tia Olga, por me ajudar durante todo este período com muita prontidão.

Agradeço a todos os meus amigos, os de perto e de longe, que sempre me incentivaram e levaram meus melhores sorrisos.

Agradeço a minha orientadora Professora Dra. Sabrina Grassioli por não me negar o conhecimento, pela confiança, oportunidade e por me fazer apaixonar pela academia.

Agradeço a Professora Dra. Márcia Appel, pelas inúmeras explicações e demonstrações.

Agradeço a Professora Dra. Henriette Emílio, pela paciência e disposição.

Agradeço ao Professor Dr. Paulo Mathias, por colaborar com nosso trabalho.

Agradeço as técnicas do biotério, pela disponibilidade e amabilidade.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, pela grande ajuda nas partes práticas da pesquisa.

Agradeço ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro.

“Por mais longa que seja a caminhada o mais importante é dar o primeiro passo.” – Vinícius de Moraes.

RESUMO

A obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento do diabetes tipo 2. O exercício físico reduz o tecido adiposo, modula a secreção e ação da insulina preservando a homeostase glicêmica. A administração de glutamato monossódico (MSG) induz lesões hipotalâmicas que levam a obesidade. O controle da secreção de insulina depende da formação do ATP nas células β pancreáticas, processo acoplado a rotas metabólicas glicolíticas e mitocondriais. O presente estudo investigou o efeito do exercício físico no metabolismo da glicose em ilhotas pancreáticas de ratos MSG-obesos. A obesidade foi induzida pela administração de MSG (4g/Kg). Controles (CON) receberam salina. Aos 21 dias os animais foram separados em 4 grupos CON-SED (sedentários); CON-EXE (exercitados); MSG-SED e MSG-EXE. O exercício consistiu em natação (3x/semana/30min). As ilhotas foram isoladas e incubadas com glicose (16,7 mM) na presença ou ausência dos seguintes bloqueadores do metabolismo da glicose: 1-Ácido Iodoacético (IAA, 1mM), bloqueia a glicólise; 2- Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (α -CHC, 1mM), evita o metabolismo do piruvato; 3- Fluoroacetato de Sódio (SF, 2 mM) inibe o ciclo do ácido tricarboxílico (AT); 4- Rotenona (ROT, 1 μ M) e 5- Antimicina (ANT, 50nM), inibidores respectivamente dos complexos mitocondriais I e III. A expressão proteica do transportador GLUT₂ foi avaliada em ilhotas pancreáticas. Os dados foram avaliados por análises de variância (ANOVA) ou Teste t de Student ($p < 0,05$). Ratos MSG-SED desenvolveram obesidade, resistência à insulina e hipersecreção de insulina em relação aos ratos CON-SED. A natação evitou a hiperinsulinemia, corrigiu a resistência à insulina e atenuou o excesso de tecido adiposo em ratos MSG. Ilhotas pancreáticas de ratos MSG-SED apresentam hipertrofia, aumentada expressão do GLUT₂, secretando cerca de 25% mais insulina em relação a ilhotas de ratos CON-SED. Em ambos os grupos a natação reduziu em média 25% a secreção de insulina estimulada por glicose. A natação atenuou a hipertrofia dos adipócitos, das ilhotas pancreáticas, bem como corrigiu a expressão do GLUT₂ em ratos MSG-obesos. O efeito do bloqueador glicolítico foi mais acentuado em ilhotas de ratos MSG-SED, indicando maior ativação desta via. O bloqueio do complexo I mitocondrial teve efeito similar entre os grupos. Todavia a inibição do complexo III foi menos acentuada em ilhotas de ratos MSG-SED. Os bloqueadores do ciclo AT e transporte do piruvato não inibiram o controle secretor de insulina em ilhotas de todos os grupos; porém o α -CHC exerceu efeito paradoxal em ilhotas de ratos MSG-SED. Alterações da glicólise; do ciclo do AT e do complexo I mitocondrial parecem não estar envolvidas na menor resposta a glicose encontrada em ilhotas de ratos exercitados. Porém, aumento da participação do complexo III mitocondrial foi observado em ilhotas de ambos os grupos exercitados. O tratamento neonatal com MSG induz obesidade, dislipidemia e resistência à insulina, eventos atenuados e/ou revertidos pela natação. A hipersecreção de insulina é corrigida pelo exercício sem alterar a via glicolítica e/ou do ciclo do AT. Todavia, a natação parece elevar a participação do complexo III mitocondrial.

Palavras Chave: Obesidade, exercício, ilhotas pancreáticas, metabolismo.

ABSTRACT

Obesity is a risk factor for development of type 2 diabetes. Exercise reduces adipose tissue, modulates insulin action and secretion maintaining glucose homeostasis. The administration of monosodium glutamate (MSG) induces hypothalamic lesions that lead to obesity. The control of insulin secretion depends on the formation of ATP in the pancreatic β cells, a process coupled to glycolytic and mitochondrial metabolic pathways. The present study investigated the effect of exercise on glucose metabolism in pancreatic islets of MSG-obese rats. Obesity was induced by administration of MSG (4g/Kg). Controls (CON) received saline. At 21 days, the animals were divided into 4 groups CON-SED (sedentary), CON-EXE (exercised); MSG-SED and MSG-EXE. The exercise consisted of swimming (3x/semana/30min). The islets were isolated and incubated with glucose (16.7 mM) in the presence or absence of the following blockers of glucose metabolism: 1-iodoacetic acid (IAA, 1 mM) blocks glycolysis, 2 - alpha-cyano-4-hydroxycinnamic (α -CHC, 1 mM) prevents the metabolism of pyruvate, 3 - Sodium fluoroacetate (SF, 2 mM) inhibits the tricarboxylic acid cycle (TA); 4 - Rotenone (ROT, 1 μ M) and 5 - Antimycin (ANT, 50nM), respectively inhibitors of mitochondrial complex I and III. The expression of transporter GLUT2 has been evaluated in pancreatic islets. Data were evaluated by analysis of variance (ANOVA) or Student's t test ($p < 0.05$). MSG-SED rats developed obesity, insulin resistance and insulin hypersecretion compared to CON-SED. Swimming prevented hyperinsulinemia, insulin resistance corrected and attenuated the excess adipose tissue in rats MSG. Pancreatic islets of rats MSG-SED present hypertrophy, increased expression of GLUT2, secreting approximately 25% more insulin in the islets from rats compared CON-SED. In both groups the swimming reduced on average 25% insulin secretion stimulated by glucose. Swimming attenuated the hypertrophy of adipocytes, pancreatic islets, and corrected the expression of GLUT2 in MSG-obese rats. The effect of the glycolytic blocker was more pronounced in islets from MSG-SED rats, indicating greater activation of this pathway. Blockade of mitochondrial complex I had similar effect between the groups. However inhibition of complex III was less pronounced in islets of MSG-SED rats. Blockers TA cycle and transport of pyruvate did not inhibit the secretory control of insulin in the islets from all groups, but the α -CHC exerted paradoxical effect in rat islets MSG-SED. Changes in glycolysis; TA cycle and mitochondrial complex I seem not to be involved in response to low glucose found in the islets of exercised rats. However, increased participation of mitochondrial complex III islets was observed in both groups exercised. The neonatal treatment with MSG induces obesity, dyslipidemia and insulin resistance, attenuated events and / or reversed by swimming. The hypersecretion of insulin is corrected by exercise without changing the glycolytic pathway and / or cycle TA. However, swimming appears to increase the participation of mitochondrial complex III.

Keywords: Obesity, exercise, pancreatic islets, metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de Sinalização da Insulina no miócito e adipócito:	22
Figura 2. Metabolismo da Glicose:.....	34
Figura 3. Efeito da natação na histomorfologia do tecido adiposo:	53
Figura 4. Efeito da natação na histomorfologia do fígado e ilhotas pancreáticas:	54
Figura 5. Efeito da Natação Regular sobre o Consumo Hídrico e de Ração:.....	56
Figura 6. Secreção de Insulina estimulada por Glicose:	60
Figura 7. Efeito do bloqueio da glicólise e ciclo do AT na secreção de insulina estimulada por glicose:	62
Figura 8. Efeito de inibidores mitocondriais na secreção de insulina estimulada por glicose:	63
Figura 9. Expressão do GLUT₂ em ilhotas isoladas de ratos MSG-obesos e CON submetidos a natação:	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros Biométricos e Obesidade:	51
Tabela 2. Efeito da natação regular sobre os parâmetros bioquímicos:	58

LISTA DE SIGLAS

Ach	Acetilcolina
ADP	Difosfato de Adenosina
AGEs	Produtos Finais de Glicação Avançada
AgRP	Proteína Relacionada ao gene Agouti
Akt/PKB	Proteína Quinase B
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPK	Proteína Quinase Ativada por AMP
ANT A	Antimicina A obtida de <i>streptomyces sp.</i>
ANT	Adenina Nucleotídeo Translocase
ARQ	Núcleo Arqueado do Hipotálamo
ASC	Área sobre a curva
AT	Ácido Tricarboxílico
ATP	Trifosfato de Adenosina
Canais K ⁺ ATP	Canais de K ⁺ sensíveis ao ATP
CART	Transcrito Relacionado à Anfetamina e Cocaína
Cbl	Cas-Br-Murine ecotropic retroviral transforming sequence
CCK	Colecistocinina
Cit	Citrato
CNA	Comprimento Naso-Anal
Col	Colesterol
CON	Controle
CON-EXE	CON-exercitados
CON-SED	CON-sedentários
CS	Citrato Sintase
DM	Diabetes Mellitus
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMV	Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FADH ₂	Dinucleotídeo de flavina-adenina
GEF	Guanine Nucleotide Exchange Fator
GH	Hormônio do Crescimento
GHRH	Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento
GK	Glicoquinase
GLP-1	Peptídeo Semelhante ao Glucagon
GLUT	Transportador de glicose
GSK-3	Glicogênio Sintase Quinase-3
GTP	Trifosfato de Guanosina
H&E	Hematoxilina e Eosina
H ⁺	Prótons
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HOMA-IR	<i>Homeostasis Model Assessment</i>
IAA	Ácido Iodoacético
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia Estatística
IDH	Isocitrato Desidrogenase
IL	Índice de Lee
IL6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
INS 1	Células de Linhagens Secretoras de Insulina

IRS	Substrato para o receptor de Insulina
LDH	Lactato Desidrogenase
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LH	Núcleo Lateral do Hipotálamo
M3	Receptores Muscarínicos subtipo 3
MSG	Glutamato Monossódico
MSG-EXE	MSG-exercitados
MSG-SED	MSG-sedentários
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NMDR	Receptores N-Metil-D-Aspartato
NPY	Neuropeptídeo Y
NOS	Núcleo Supraóptico do Hipotálamo
OAA	Oxaloacetato
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDH	Piruvato Desidrogenase
PFK	Fosfofrutoquinase
Pi	Fosfato Inorgânico
PI-3-K	Fosfatidil-Inositol-3-Quinase (PI-3-K)
PIP ₂	Fosfoinositol-2-Fosfato
PIP ₃	Fosfoinositol-3-Fosfato
PK	Piruvato quinase
PKC	Proteína Quinase C
PKCz	Atípica Proteína Quinase C
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
POMC	Pró-opio Melanocortina
PVN	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
RI	Resistência à Insulina
RIE	Radioimunoensaio
ROT	Rotenona
SF	Fluoroacetato de Sódio
Shc	<i>for SH₂ and collagen-like</i>
SM	Síndrome Metabólica
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Parassimpático
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SOCS-3	Proteínas Supressoras da Sinalização de Citocinas
TAG	Triglicerídeos
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
UCP	Proteína desacopladora do gradiente de prótons
VLDL	<i>verylow density lipoprotein</i>
α -CHC	Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico
α -KGDH	α -cetogluturato desidrogenase
α -MSH	Hormônio Estimulante de Melanócito α

Sumário

1.1 Obesidade	13
1.2 Sistema Nervoso Central (SNC).....	16
1.3 Sinalização da Insulina nos tecidos periféricos	19
1.4 Hiperinsulinemia e Resistência à Insulina	24
1.5 O Principal Estimulador da Secreção de Insulina: Glicose.....	26
1.6 Metabolismo da Glicose	28
1.6.1 Metabolismo Glicolítico Anaeróbico	29
1.6.2 Metabolismo Glicolítico Aeróbico	30
1.6.3 Características Bioquímicas Especiais das Células β	31
1.7 Obesidade e Exercício Físico	34
1.8 Modelo de Obesidade: Glutamato Monossódico (MSG).....	39
2. OBJETIVO GERAL.....	42
2.1 Objetivos Específicos	42
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1 Modelo Experimental	42
3.3 Treinamento Físico.....	43
3.4 Avaliação da resistência à insulina	43
3.6 Isolamento de ilhotas pancreáticas	44
3.6 Pré-Incubação.....	44
3.7 Incubação.....	45
3.8 Dosagem de Insulina	45
3.9 Expressão Protéica	46
3.10 Curvas de crescimento e consumo alimentar	47
3.11 Obesidade	48
3.13 Análise Histológica	48
3.13 Análise Estatística.....	49
4. RESULTADOS	49
4.1 Parâmetros biométricos e obesidade	50
4.2 Histomorfologia.....	51
4.3 Consumo Alimentar	55
4.4 Dados Bioquímicos.....	57
4.5 Secreção de Insulina Estimulada por Glicose	58

4.6 Efeito dos Bloqueadores do Metabolismo da Glicose	60
4.7 Western Blotting	61
5. DISCUSSÃO	65
5.1 Modelo de Obesidade MSG	65
5.2 O Efeito do Exercício Físico sobre a Obesidade	70
5.3 Metabolismo da glicose, Secreção de Insulina e Exercício Físico	73
5.3.1 Glicólise	80
5.3.2 Ciclo do AT	82
5.3.3 Cadeia de Transporte de Elétrons	85
6. CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	90
ANEXOS	108

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

A obesidade é definida como acúmulo excessivo de gordura corporal. Um parâmetro para avaliar a obesidade em humanos é o Índice de Massa Corporal (IMC) o qual leva em consideração o peso e a altura do indivíduo, de acordo com a seguinte equação: $IMC = \text{Peso (Kg)} / \text{Altura (m}^2\text{)}$. Em termos clínicos, valores de IMC entre 25 e 29,9 Kg/m^2 caracterizam sobrepeso, enquanto valores de IMC maiores que 30 Kg/m^2 indicam obesidade. Para estabelecer o percentual de gordura corporal outras medidas devem ser adicionadas ao IMC, tais como, mensuração das pregas cutâneas ou impedância bioelétrica. Considerando estes métodos, a obesidade é definida quando o percentual de gordura corporal é maior que 25% para homens e 35% para mulheres. Apesar da menor confiabilidade a forma mais adotada na clínica é o cálculo do IMC, por ser a maneira mais prática (ROTHMAN, 2008).

A obesidade é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) um problema de saúde pública que afeta milhões de indivíduos em todo o mundo, independente da faixa etária, raça ou sexo. Inicialmente a epidemia de obesidade era considerada um problema somente de países com alta renda, atualmente a obesidade e o sobrepeso têm aumentado dramaticamente também em países de média e baixa renda, particularmente em zonas urbanas (DINSA *et al.*, 2012).

O elevado consumo de dietas ricas em gordura, associado ao baixo nível de atividade física favorece o acúmulo de tecido adiposo, promovendo um desajuste na homeostase energética que culmina na instalação da obesidade. Embora dados clínicos e epidemiológicos indiquem que o estilo de vida sedentário, bem como, o comportamento alimentar são fatores centrais no ganho de peso corporal, outros elementos podem favorecer a instalação da obesidade (HEITMANN *et al.*, 2012). A adiposidade excessiva resulta de uma interação complexa de influências genéticas, ambientais, metabólicas, fisiológicas, comportamentais e sociais (GRUNDY, 1998).

No entanto, o estilo de vida contemporâneo, é um dos principais contribuidores para desenvolvimento de obesidade e suas patologias, tais como diabetes. Enfatizando estes dados, estudos mostram que tanto a reeducação alimentar como a prática de atividade física atenuam a obesidade, porém a magnitude deste efeito é muito maior quando ambas as variáveis são combinadas (HUBÁČEK, 2009).

O problema do excesso de peso e da obesidade tem alcançado proporções epidêmicas no mundo todo, incluindo a população brasileira. A Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009, realizada em parceria entre o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia Estatística) e o Ministério da Saúde, analisando dados de 188 mil pessoas brasileiras em todas as idades, mostrou que a obesidade e o excesso de peso têm aumentado rapidamente nos últimos anos, em todas as faixas etárias. Neste levantamento, 50% dos homens e 48% das mulheres se encontram com excesso de peso, sendo que 12,5% dos homens e 16,9% das mulheres apresentam obesidade. Ambos, excesso de peso e obesidade aumentaram com a faixa etária nos dois sexos. Em homens, excesso de peso e obesidade foram mais frequentes nas regiões sudeste, sul e centro-oeste. Em mulheres, a maior prevalência foi na região sul. Esses marcadores expressam essencialmente o desequilíbrio entre ingestão e utilização de calorias, a explicação para o aumento dessas condições deve ser procurada em mudanças nos padrões de alimentação e atividade física da população.

O excesso do tecido adiposo, principalmente visceral é a base para instalação de uma síndrome complexa, denominada de síndrome metabólica (SM), caracterizada por resistência à insulina (RI), intolerância à glicose, hipertensão arterial e dislipidemia. Esta patologia aumenta significativamente o risco do desenvolvimento de diabetes tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares como também alguns tipos de cânceres (BALISTRERI *et al.*, 2011). Segundo a OMS (2011) cerca de 346 milhões de pessoas em todo o mundo são diabéticas. Somente em 2004, 3,4 milhões de pessoas morreram em consequência da doença. Além disso, as doenças cardiovasculares são a maior causa de morte em todo o mundo, representando cerca de 30% delas. Todas estas patologias podem ser atenuadas ou mesmo

evitadas pela prática regular de atividade física, aliada a hábitos alimentares saudáveis.

O balanço energético é determinado pelo consumo calórico e o gasto energético, sendo que este saldo pode ser positivo, levando ao ganho de peso ou negativo, culminando na perda de peso corporal. O corpo pode lidar de diferentes formas com o excesso de calorias advindos da dieta. Os nutrientes em excesso podem ser desviados para a produção de calor (termogênese), convertidos a glicogênio (fígado e músculo) ou ácidos graxos (tecido adiposo) ou usados durante a atividade física. O controle da aquisição e/ou distribuição dos substratos energéticos é coordenado por um complexo conjunto de sinais nutricionais, hormonais e neurais integrados no sistema nervoso central (SNC) determinando o equilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético – homeostase energética (LUQUET; MAGNAN, 2009).

Os mecanismos específicos que podem levar da obesidade a complicações metabólicas de alto risco como RI e DM2 permanecem obscuros. A preferida hipótese é a expansibilidade do tecido adiposo, uma vez que o aumento do tecido adiposo acarreta um aumento do perfil inflamatório local. A crescente epidemia de obesidade, bem como sua íntima correlação com inúmeras patologias reconstrói o conceito funcional do tecido adiposo, o qual deixa de ser um mero depósito de gordura para atuar como participante ativo no controle de processos fisiológicos e patológicos (SUN *et al.*, 2012).

O tecido adiposo é composto por adipócitos embebidos em um tecido conectivo contendo precursores de adipócitos, fibroblastos, células imunes e vários outros tipos celulares (RABE *et al.*, 2008). O aumento em tamanho (hipertrofia) e número (hiperplasia) dos adipócitos, infiltração de macrófagos e fibrose do tecido adiposo caracterizam a obesidade (BALISTRERI *et al.*, 2010). Hoje sabemos que o tecido adiposo não somente atua como reserva de gordura, mas também como um órgão endócrino produzindo hormônios peptídicos, conhecidos como adipocinas, os quais podem agir localmente, ação parácrina e autócrina, ou sistematicamente, caracterizando a ação endócrina, modulando o funcionamento de outros tecidos, e

determinando no SNC a homeostase energética. As adipocinas produzem mudanças no metabolismo energético, alterando o controle da ingesta alimentar e do gasto energético, determinando o peso corporal final (RABE *et al.*, 2008).

1.2 Sistema Nervoso Central (SNC)

O SNC integra sinais oriundos dos ambientes externos e internos determinando respostas apropriadas a diferentes estados fisiológicos. O SNC pode desta forma, detectar alterações nos estímulos e gerar respostas adequadas, as quais podem ser motoras, como durante a contração muscular, ou secretoras, como a liberação de hormônios. O SNC é anatômico e funcionalmente dividido em medula espinhal, tronco encefálico (bulbo, ponte e mesencéfalo), cerebelo, diencefalo (tálamo e o hipotálamo) e hemisférios cerebrais (córtex cerebral, substância branca, núcleos da base, formação hipocampal e amígdala) (OUSMAN; KUBES, 2012). Dentre as diferentes regiões compondo o SNC que podem afetar a homeostase energética destaca-se o hipotálamo.

Este é composto por diversos conjuntos de neurônios, denominados núcleos hipotalâmicos. A aquisição, distribuição e utilização dos substratos energéticos são coordenadas por estes núcleos, os quais interagem uma complexa rede de informações controlando a homeostase energética (ZAC-VARGHESE; TAN; BLOOM, 2010). O hipotálamo representa menos que 1% da massa encefálica, e é uma das estruturas mais importantes para o controle corporal. Ele controla a maioria das funções vegetativas e endócrinas do corpo, bem como muitos aspectos do controle emocional. Pode-se dividir o hipotálamo em posterior, o qual é composto pelos núcleos dorsomedial (DMV), lateral (LH), ventromedial (VMH) e arqueado (ARQ) e anterior, que compreende os núcleos paraventricular (PVN) e supraóptico (NSO). Experimentos demonstram que lesões no VMH promovem hiperfagia e obesidade, comprovando a existência de núcleos responsáveis pela saciedade. Além disso, a destruição de neurônios do núcleo LH torna os animais afágicos, demonstrando que este núcleo é responsável pela fome (SAWCHENKO, 1998). Os estudos de lesão eletrolítica dos núcleos VMH (centro da saciedade) e LH (centro da fome), levaram à

formação da hipótese dual, segundo a qual estes dois núcleos seriam interconectados e antagonicamente determinariam o controle do peso corporal (BRAY, 1991). Todavia, estudos posteriores demonstraram que a integração entre todos os núcleos hipotalâmicos é necessária para a correta transdução dos sinais aferentes, bem como, o acionamento das respostas motoras e hormonais apropriadas a cada estado metabólico (BLOUET; SCHWARTZ, 2010).

1.2.1 Núcleo Arqueado (ARQ)

Diversas observações levaram a descoberta do ARQ como centro de integração e distribuição de sinais responsáveis pela homeostase energética. Os neurônios do ARQ estão localizados nas paredes laterais do terceiro ventrículo e são chamados de “neurônios de primeira ordem” por receberem sinalizações diretas de saciedade e fome, e se intercomunicarem com os demais núcleos desencadeando respostas fisiológicas apropriadas aos estados de jejum ou alimentado (LUQUET; MAGNAN, 2009).

Dois grupos de neurônios do ARQ controlam a ingestão alimentar e o gasto energético, os quais são antagonicamente regulados por sinais de saciedade e fome, exercendo respostas opostas no balanço energético. Considerando o perfil antagônico de ações desencadeadas por estes grupos neurais dentro do ARQ eles foram denominados neurônios anorexigênicos e orexigênicos. Os neurônios orexigênicos estimulam a ingestão alimentar pela produção e liberação do Neuropeptídeo Y (NPY) e Proteína Relacionada ao gene Agouti (AgRP). O nível de NPY aumenta durante o jejum, gerando sensação de fome e promovendo a diminuição do gasto energético e o anabolismo, ou seja, de armazenamento de nutrientes, o que ocorre devido a ativação do Sistema Nervoso Parassimpático (SNP). Enquanto que os neurônios anorexigênicos liberam a Pró-opio melanocortina (POMC), precursor do hormônio estimulante de Melanócito α (α -MSH), e Transcrito Relacionado à Anfetamina e Cocaína (CART). A liberação do α -MSH diminui a ingestão alimentar e promove o catabolismo, aumentando o gasto energético através da ativação do Sistema Nervoso Simpático (SNS) (WOODS *et al.*, 2008; LUQUET;

MAGNAN, 2009).

As redes neurais centrais de saciedade e fome como NPY, AgRP, α -MSH podem ser ativados ou inibidos por sinais periféricos, os quais dependendo da condição do meio interno, jejum ou alimentação, modulam a produção e liberação destes sinais centrais. Os sinais periféricos podem ser divididos em duas classes: sinais de saciedade e de adiposidade. Os sinais de saciedade são aqueles produzidos pelo trato gastrointestinal como, por exemplo, o peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) e colecistocinina (CCK), conhecidos como reguladores do peso corporal a curto prazo. Estes são liberados durante a ingestão alimentar, atuando na resposta imediata para a manutenção da homeostase glicêmica e saciedade pós-prandial (FIELD, 2010). Os sinais de adiposidade são a insulina produzida no pâncreas endócrino e a leptina produzida pelos adipócitos, estes sinais são conhecidos como reguladores do peso corporal a longo prazo. Esta interconexão de sinais periféricos com sinalizadores centrais controla o balanço energético (LUQUET; MAGNAN, 2009).

A leptina é um dos sinais mais importantes para a homeostase energética e regulação da ingestão calórica. A quantidade de liberação deste hormônio pelo tecido adiposo é proporcional ao número e tamanho dos adipócitos, quando o tecido adiposo é diminuído a leptina circulante cai e a produção de NPY pelos neurônios orexigênicos aumenta, gerando sensação de fome. A leptina em altas concentrações inibe a lipogênese, induz a lipólise e ativa a termogênese, o que a longo prazo contribui para a redução da obesidade. Os efeitos da leptina sobre o metabolismo energético são mediados via sinalização hipotalâmica, primariamente através da supressão da produção de NPY pelos neurônios do ARQ e dos sinais de saciedade via AgRP (SAVOPOULOS *et al.*, 2011).

Outro regulador do peso corporal a longo prazo é a insulina, produzida e liberada pelas células β do pâncreas endócrino, ela estimula tanto a biossíntese como a secreção da leptina, estabelecendo o eixo adipo-insular (RABE *et al.*, 2008). A insulina também age centralmente, nos receptores hipotalâmicos para inibir a ingestão alimentar. Os receptores de insulina dos neurônios orexigênicos do ARQ

inibem a liberação de NPY, e os receptores nos neurônios anorexigênicos estimulam a produção de α -MSH, reduzindo desta forma a ingesta calórica e aumentando a termogênese. Além destes efeitos metabólicos centrais a insulina também é considerada o maior regulador antilipolítico e pró-lipogênico, e estes efeitos são mediados através de receptores de insulina presentes nos adipócitos (SCHERER; BUETTNER, 2011).

1.3 Sinalização da Insulina nos tecidos periféricos

A homeostase refere-se ao equilíbrio relativo do meio interno durante condições normais, ou seja, durante o repouso e na ausência de patologias, resultante de diversas ações regulatórias de compensação. A insulina é um hormônio essencial para a homeostase glicêmica, regulando-a em vários níveis, mantendo o balanço entre a sua produção e a sua utilização pelos tecidos periféricos, reduzindo a gliconeogênese e glicogenólise hepática e aumentando a captação periférica de glicose, no músculo e tecido adiposo (DIMITRIADIS *et al.*, 2011).

A sinalização intracelular da insulina é iniciada pela ligação da mesma a um receptor transmembrana específico, uma proteína integral heterotetramérica composta por duas subunidades α e duas β . A subunidade α é externa à célula, enquanto que a subunidade β comporta-se como uma proteína transmembrana. A parte citoplasmática da subunidade β possui atividade de tirosina quinase, contendo resíduos específicos de tirosina passíveis de fosforilação (PÁEZ-ESPINOSA *et al.*, 1998).

Na ausência da insulina a subunidade α inibe a atividade tirosina quinase da β , por outro lado, quando a insulina liga-se a subunidade α , a proteína sofre uma mudança conformacional, o que permite a auto-fosforilação da subunidade β em resíduos de tirosina. Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos também em tirosina, os quais pertencem à família dos substratos do receptor de insulina (IRS – Insulin Receptor Substrate, isoformas de 1 a 4), outros

substratos incluem Shc (for SH₂ and collagen-like) e Cbl (Cas-Br-Murine ecotropic retroviral transforming sequence) (WHITEHEAD *et al.*, 2000). Cada qual tem papel distinto nas vias intracelulares subsequentes dependendo do tipo celular acionado.

Um dos efeitos mais conhecidos da insulina é estimular a captação da glicose sanguínea (particularmente no músculo e tecido adiposo) e a síntese de glicogênio, proteínas e lipídeos. A captação de glicose é realizada nestes tecidos através do transportador de glicose subtipo 4 (GLUT₄) (SALTIEL; KAHN, 2001). Na ausência de insulina a captação de glicose é baixa porque os transportadores GLUT₄ não estão nas membranas celulares dos tecidos insulino-dependentes. Nesta situação, como por exemplo, durante o jejum, os transportadores estão internalizados em vesículas citoplasmáticas ancoradas a elementos do citoesqueleto. A insulina estimula a fusão destas vesículas na membrana plasmática, aumentando o número de transportadores disponíveis na membrana e promovendo assim o transporte de glicose para o interior da célula. Estes eventos de fusão requerem dois sinais, ambos são ativados pelo receptor de insulina. A ligação da fosfatidil-inositol-3-quinase (PI-3-K) ao IRS inicia o primeiro sinal. A PI-3-K sintetiza fosfoinositol-3-fosfato (PIP₃) através da fosforilação do fosfolípido de membrana fosfoinositol-2-fosfato (PIP₂), o qual ativa as proteínas quinases Akt/PKB e PKC. A fosforilação da proteína adaptadora Cbl inicia o segundo sinal (SALTIEL; KAHN, 2001; THIRONE *et al.*, 2004). A Cbl ativa a GEF (guanine nucleotide exchange factor), o qual ativa uma pequena GTPase, a TC10. Em poucos minutos de estimulação pela insulina das três quinases e o TC10-GTP cooperam para a liberação das vesículas de GLUT₄ das amarras intracelulares para subsequente fusão à membrana. Estes dois eventos são desencadeados no tecido muscular e adiposo. No fígado, a ativação da Akt também estimula a glicogênese, pela ativação da enzima glicogênio sintase através da inibição da glicogênio sintase quinase (MAARBJERG *et al.*, 2011). A prolongada exposição a altos níveis de insulina circulante são caracterizados pela desensibilização da ação da insulina pela diminuição das vias do PI-3-K, Akt e MAP quinase, sendo esta última responsável por diferenciação e proliferação celular, o que induz à diminuição da captação de

glicose, frequente em estados de resistência periférica à insulina, característica do DM2 (PIROLA *et al.*, 2003).

A insulina também age como fator de crescimento em algumas células, através da via Ras/MAP quinase. Esta via inicia-se com a fosforilação das proteínas IRS e Shc, que interage com a proteína Grb2, a qual está constitutivamente associada à SOS, proteína que troca GDP por GTP na Ras, ativando-a. Uma vez ativada, a Ras estimula a fosforilação em serina da cascata MAP quinase, o que promove diferenciação e proliferação celular. Esta via parece estar super ativada em portadores de DM2, o que pode contribuir para aterosclerose associada à RI (ZECCHIN *et al.*, 2004).

Além disso, a subunidade β do receptor de insulina pode ser fosforilada em resíduos de serina, o que atenua a capacidade do receptor em se autofosforilar em tirosina, diminuindo assim a transdução do sinal, essas fosforilações causam uma retroalimentação (*feedback*) negativa na sinalização da insulina e podem causar RI. A ação da insulina também é atenuada por proteínas fosfatases, as quais desfosforilam o receptor de insulina em resíduos de tirosina e seus substratos (KÖNNER; BRÜNING, 2012). Os mecanismos de sinalização ativados pela insulina acima descritos estão sumarizados na Figura 1.

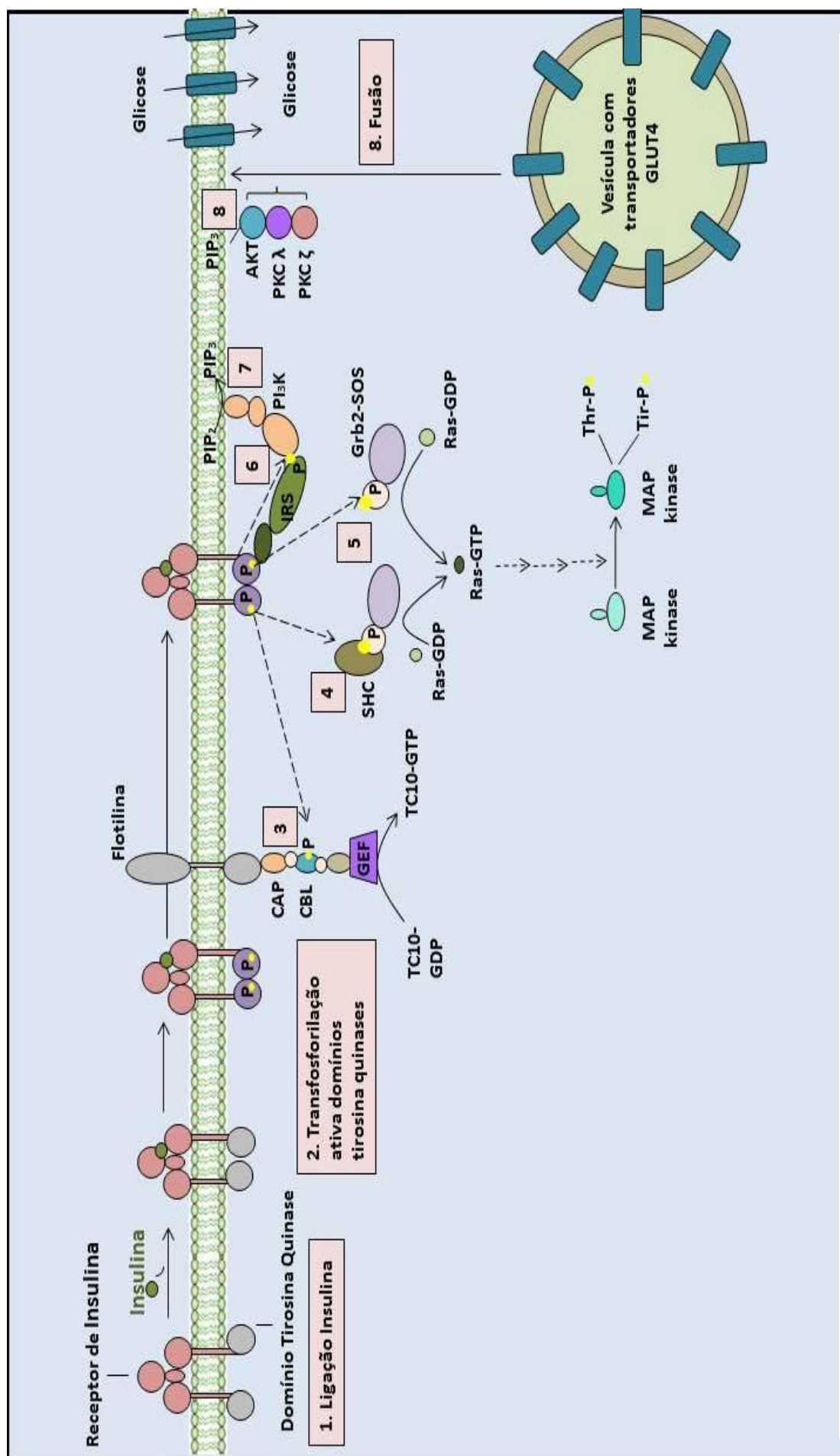


Figura 1. Vias de Sinalização da Insulina no miócito e adipócito: 1. A insulina se liga ao receptor, agrupando os domínios tirosina quinases. 2. Os domínios tirosina quinase se autofosforilam. 3. Receptores quinases são então fosforilados e fosforilam uma variedade de alvos: a proteína adaptadora Cbl, a qual ativa a nucleotídeo exchange protein (GEF), esta por sua vez ativa a GTPase TC10. 4. A proteína adaptadora SHC se liga ao Grb2-SOS e inicia lentamente a via da MAP quinase. 5. O substrato para o receptor de insulina (IRS) se liga ao Grb2-SOS e inicia rapidamente a via da MAP quinase. 6. Uma outra tirosina do IRS fosforilada se liga a fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K). 7. A PI3K fosforilada converte PIP₂ à PIP₃. 8. PIP₃ ativa a PDK, a qual ativa diversas proteínas quinases: Akt, PKCλ e PKCζ. 8. Estas quinases juntas com o TC10 ativo estimulam a fusão de vesículas portadoras dos transportadores de glicose GLUT₄ na membrana plasmática. Finalmente o GLUT₄ transporta a glicose para o interior das células.

A concentração plasmática de insulina está diretamente envolvida no controle da concentração de glicose no sangue e este é um dos efeitos que o hormônio desempenha sobre o metabolismo global. Este hormônio atua no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, regulando desta forma o destino final destes substratos. Os papéis da insulina no metabolismo de carboidratos são inúmeros, dentre eles destaca-se o aumento da taxa de transporte de glicose através da membrana celular em adipócitos e células musculares, o aumento da taxa de glicólise nos mesmos tecidos pela estimulação da atividade da hexoquinase e fosfofrutoquinase (PFK), as quais são enzimas chaves da glicólise, estimulação da síntese de glicogênio hepático e muscular, e ainda a inibição da taxa de glicogenólise e gliconeogênese hepática (KIENS *et al.*, 2011).

Apesar de alguns tecidos não apresentarem ação direta da insulina sobre a captação de glicose, como por exemplo, o fígado e o cérebro, a insulina pode influenciar indiretamente a taxa de utilização de glicose nestes tecidos. No fígado, a insulina ativa a glicogênio sintase e inativa a glicogênio fosforilase, de modo que grande parte da glicose é utilizada para a formação de glicogênio. No metabolismo de lipídeos a insulina diminui a taxa de lipólise do tecido adiposo e conseqüentemente a concentração de ácidos graxos livres, além de estimular a captação de ácidos graxos e síntese de triglicerídeos nos tecidos, sendo considerada o principal hormônio lipogênico, e ainda aumenta a taxa de captação de triglicerídeos plasmáticos no tecido adiposo e músculo. Adicionalmente a insulina ainda aumenta a taxa de síntese proteica no músculo e tecido adiposo e diminui a taxa de degradação proteica e formação de uréia (DIMITRIADIS *et al.*, 2011).

Considerando as ações anabólicas da insulina no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, uma das complicações que surge rapidamente em obesos é a hiperinsulinemia, produção exacerbada de insulina, acompanhada de RI, onde a insulina não é capaz de realizar suas ações metabólicas. A perda de sensibilidade à insulina favorece a lipólise pelo tecido adiposo, reduz a captação de glicose pelo músculo e aumenta a liberação de glicose pelo fígado, culminado com hiperglicemia e trigliceridemia (MLINAR *et al.*, 2006).

1.4 Hiperinsulinemia e Resistência à Insulina

No desenvolvimento da obesidade os tecidos insulino-dependentes, como o músculo e tecido adiposo apresentam menor responsividade à insulina, resultando em um excesso de glicose circulante, ao mesmo tempo o efeito inibitório da insulina na gliconeogênese hepática torna-se menos pronunciado. Com a finalidade de manter a normoglicemia ocorre um aumento na liberação de insulina pelas células β pancreáticas, resultando em hiperinsulinemia. Neste estágio, a maquinaria intracelular sinalizadora da insulina nos tecidos periféricos é desregulada por inúmeros eventos moleculares ainda não completamente conhecidos (PIROLA *et al.*, 2003).

A longo prazo, o aumento da secreção de insulina prejudica a função das células β , e a hiperinsulinemia exacerbada, paralela a um estado de resistência à insulina nos tecidos periféricos, altera a homeostase glicêmica e caracteriza o DM2. A hiperglicemia prolongada favorece a ligação não enzimática da glicose com proteínas em diferentes tecidos, levando a níveis supra fisiológicos de produtos finais de glicação avançada (AGEs). A glicação proteica contribui para a progressão da doença, uma vez que os AGEs interferem com a via de sinalização da insulina, modificando a molécula de insulina e conseqüentemente sua função, além de diminuir o conteúdo de insulina nos grânulos secretórios e sua secreção (PUDDU; VIVIANE, 2011). A hiperglicemia também implica em complicações da patologia, como retinopatia, nefropatia, disfunções no endotélio e ainda dano neural devido a formação das AGEs (SHEPHERD *et al.*, 1998).

A causa da RI inclui fatores genéticos e ambientais como, má alimentação, baixo nível de atividade física, idade e tabagismo. Conseqüentemente, diminuição na ingesta calórica, perda de peso e exercício físico aumentam a sensibilidade à insulina. A redução do tecido adiposo restabelece o perfil secretor fisiológico do tecido adiposo, a produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucinas são diminuídas, enquanto as citocinas benéficas

como, por exemplo, a adiponectina, são produzidas em maior quantidade (MLINAR *et al.*, 2006).

A obesidade também promove a crônica ativação de vias inflamatórias nos tecidos periféricos, as quais contribuem para a RI e desenvolvimento de DM2. O acúmulo de tecido adiposo fora do lugar habitual - os denominados depósitos ectópicos - no fígado e músculo inibem vias de sinalização da insulina nestes locais por bloquear a cascata de sinalização ativada pelo receptor de insulina e por ativar vias inflamatórias locais. Adicionalmente, o excesso de tecido adiposo nestes locais acarreta em má vascularização, gerando hipóxia, o que induz a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- α , o qual é parcialmente responsável pela RI na obesidade.

A diminuída responsividade a insulina parece ser independente de alterações na função do receptor da insulina, no entanto é correlacionada com a diminuição dos níveis proteicos dos IRS 1 e 2. Níveis diminuídos de IRS foram reportados em sujeitos resistentes à insulina e DM2, e essa diminuição pode ser relacionada com a progressão da patologia (KRAEGEN *et al.*, 2001).

Estudos focados principalmente nas isoformas do IRS 1 tem se atido nos mecanismos moleculares através dos quais as proteínas IRS são degradadas. A visão mais aceita é que a via de degradação do IRS é iniciada pela fosforilação do IRS em resíduos de serina, culminando com o direcionamento para a via proteossômica degradativa. Interessantemente, a fosforilação em serina no IRS também é conhecida por atenuar a ação da insulina. Muitas quinases que diminuem a atividade da PI3K tem sido propostas como quinases que fosforilam resíduos de serina no IRS, incluindo a glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3), mammalian target of rapamycin (mTOR), e a atípica proteína quinase C (PKC ζ) (PESSIN *et al.*, 1999). Evidências ainda sugerem que as proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS-3) podem competir com substratos do receptor de insulina, como IRS e Shc, além de mediar a ubiquitinação do IRS. Desta forma, complexos proteicos conhecidos como proteassomas identificam e englobam as proteínas marcadas com ubiquitina para conseqüente destruição. Experimentos mostram que camundongos

obesos apresentam superexpressão de SOCS-3 no tecido adiposo (PIROLA *et al.*, 2003).

Sendo assim, a integridade das vias de sinalização e ação da insulina é fundamental para a homeostase glicêmica, uma vez que a perda desta integridade de sinais pode culminar em patologias como síndrome metabólica e DM2.

1.5 O Principal Estimulador da Secreção de Insulina: Glicose

O pâncreas é formado por dois tipos principais de tecidos: os ácinos, os quais secretam o suco pancreático no duodeno e as Ilhotas de Langherans que se organizam em torno de pequenos capilares e secretam diretamente na corrente sanguínea seus hormônios, desta forma o pâncreas pode ser classificado de acordo com seus tecidos como pâncreas exócrino e endócrino, respectivamente. O pâncreas endócrino humano possui entre 1 e 2 milhões de ilhotas (SZABAT *et al.*, 2012).

As ilhotas contêm quatro tipos celulares principais, as células α , β , δ e F, que se distinguem entre si pelas características morfológicas e de coloração. As células β constituem cerca de 60% de todas as células das ilhotas, secretam insulina, peptídeo C e uma nova proteína recentemente descrita, a amilina, estas células são encontradas por toda a ilhota, mas são particularmente numerosas no centro. As células α secretam principalmente glucagon, constituem cerca de 25% do total de células da ilhota e estão localizadas na periferia da ilhota, células δ secretam somatostatina e as células F, também conhecidas como células PP, secretam o polipeptídeo pancreático (KOH; CHO; CHEN, 2012).

A insulina é um hormônio com duas cadeias polipeptídicas, é sintetizada nos ribossomos das células β pancreáticas como uma proteína precursora inativa, a pré-pró-insulina. A remoção proteolítica de sequências sinalizadoras e a formação de três ligações dissulfeto produzem a pró-insulina, que é armazenada nos grânulos secretórios nas células β pancreáticas. Quando a glicose sanguínea estiver elevada, a pró-insulina é convertida em insulina, por proteases específicas que hidrolisam

duas ligações peptídicas e a molécula de insulina madura juntamente com o polipeptídeo C são formados e liberados na corrente sanguínea (WATSON; PESSIN, 2001).

A liberação de insulina pelas células β pancreáticas é mediada por um complexo mecanismo de sinalizadores hormonais e neurais. Uma perfeita comunicação entre estes sinalizadores mantém a homeostase glicêmica. Em condições basais de glicose, não estimulatórias, canais de K^+ sensíveis ao ATP (K^+_{ATP}) permanecem abertos mantendo o potencial da membrana em valores negativos, impedindo a despolarização celular. Quando a concentração de glicose sanguínea aumenta, devido à ingesta alimentar, os transportadores de glicose do tipo 2 ($GLUT_2$) carregam a glicose para o interior da célula β , esta é fosforilada e convertida a glicose-6-fosfato. A continuidade do catabolismo da glicose impulsiona a síntese de trifosfato de adenosina (ATP). Com o aumento da taxa catabólica os níveis de ATP aumentam promovendo o fechamento dos canais K^+_{ATP} , o efluxo reduzido de K^+ despolariza a membrana, esta despolarização abre canais de Ca^{2+} voltagem dependentes, o aumento resultante na concentração de Ca^{2+} citosólico mobiliza a liberação de insulina por exocitose (CURRY; BENNETT; GRODSKY, 1968; HENQUIN, 2000; ANTINOZZI *et al.*, 2002; RAMADAN, 2011; KOH; CHO; CHEN, 2012). A glicose é o principal estimulador da secreção de insulina, porém outros nutrientes como alguns aminoácidos, por exemplo, a leucina, e lipídeos também são capazes de estimular a secreção de insulina (NEWSHOLME *et al.*, 2007; KEANE; NEWSHOLME, 2008).

Os nutrientes, principalmente a glicose, são considerados estimuladores da secreção de insulina, todavia a concentração de insulina circulante será ajustado pela ação do sistema nervoso autônomo (SNA). As ilhotas pancreáticas são ricamente inervadas por ambas as subdivisões autonômicas, o SNS e o SNP. A ativação parassimpática ocorre via nervo vago (X) com liberação do neurotransmissor acetilcolina (Ach). Os efeitos colinérgicos nas células β pancreáticas dependem da ligação a receptores muscarínicos subtipo 3 (M3), os quais potencializam a secreção estimulada por glicose (AZUA *et al.*, 2011). Por outro

lado, a estimulação do ramo simpático bem como, a ativação do eixo simpato-adrenal é predominantemente inibitória. Noradrenalina e adrenalina agem através da ligação a receptores α -adrenérgicos reduzindo a secreção de insulina desencadeada pela glicose (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006). A secreção pode ser regulada ainda por hormônios intestinais, chamados de incretinas, dentre os quais destaca-se o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) com ações insulínótropas nas células β pancreáticas, importantes durante as refeições (SEINO *et al.*, 2011). Embora diversos outros sinalizadores possam modular a secreção pancreática endócrina, os fatores descritos anteriormente são os principais moduladores fisiológicos da secreção de insulina.

1.6 Metabolismo da Glicose

O metabolismo da glicose é uma das vias bioquímicas primárias do organismo, sendo considerada uma rota metabólica essencial à obtenção de energia em todos os organismos vivos. Bioquimicamente o metabolismo da glicose inclui a glicólise, o processo de degradação anaeróbica da glicose; a oxidação aeróbica e o metabolismo das pentoses fosfato. O metabolismo da glicose não somente prove energia durante a atividade física, mas também medeia uma variedade de processos fisiológicos através da formação de complexas redes de sinalização. A glicólise anaeróbica envolve a conversão catalítica de uma molécula de glicose à piruvato, produzindo duas moléculas de ATP, enquanto que o metabolismo oxidativo catalisa a formação de CO_2 e água através da degradação completa da glicose e gera de 36 a 38 moléculas de ATP (CHANG; WEI, 2011).

Tanto a glicólise como o metabolismo oxidativo são importantes vias de geração de ATP, e estas vias estão relacionadas com processos fisiológicos e patológicos que ocorrem nos tecidos. O metabolismo da glicose apresenta papel importante em patologias como esquizofrenia, acidente vascular cerebral e no DM (RUTZ, 2004).

O controle da secreção e ação da insulina é necessário para que a

homeostase glicêmica seja mantida, o principal secretagogo para a liberação de insulina é a glicose, a qual é metabolizada para gerar sinais que estimulem a secreção de insulina. As células β pancreáticas acoplam o metabolismo da glicose a eventos de despolarização e exocitose que determinam a liberação de insulina (SEINO, 2011).

1.6.1 Metabolismo Glicolítico Anaeróbico

A via central do metabolismo anaeróbico é chamada de via glicolítica ou glicólise. É através desta via que a glicose é inicialmente degradada e libera parcialmente a energia nela contida. A glicólise ocorre no citoplasma celular e não depende da presença de oxigênio. O saldo líquido global gerado pela glicólise é de duas moléculas de ATP e duas de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzidas (NADH) para cada molécula de glicose que iniciou a via. As etapas glicolíticas estão representadas em detalhes na figura 2.

A glicose entra na célula β por difusão facilitada através dos transportadores GLUT 1 e 2 e a sua entrada na via glicolítica é regulada, assim como a velocidade desta via. Durante a via glicolítica as enzimas glicoquinase (GK), PFK e piruvato quinase (PK) são as responsáveis pela regulação da via, por se tratarem de pontos irreversíveis da via. A regulação do metabolismo é muito importante para controlar o fluxo de substratos, evitar o gasto de nutrientes no catabolismo e, particularmente na célula β manter o perfil secretório de insulina de acordo com as concentrações de glicose presentes (SARABU, 2007).

Uma característica particular de sinalização de glicose na célula β é a geração de oscilações no metabolismo, no potencial de membrana, no Ca^{2+} intracelular, e na secreção de insulina. Tem sido proposto que estas oscilações são acionadas por oscilações glicolíticas com base nas características únicas da enzima glicolítica PFK. A importância destas oscilações é baseada, em parte, em observações da perda do perfil oscilatório em pacientes com diabetes (HEART *et al.*, 2007). Apesar de a glicólise ser responsável apenas por pequena parte do ATP derivado do metabolismo completo da glicose, alguns autores acreditam que esta via pode ser a mais importante para a secreção de insulina estimulada por glicose (DUKES *et al.*, 1994; MERTZ *et al.*, 1996)

1.6.2 Metabolismo Glicolítico Aeróbico

O passo seguinte da degradação da glicose ocorre no interior da mitocôndria (matriz mitocondrial) e é chamado de Ciclo do Ácido Tricarboxílico (AT). O ciclo do AT somente ocorre em condições aeróbicas, isto é, na presença de oxigênio. Para dar início ao ciclo é necessário que o piruvato, formado na via glicolítica, seja importado para a mitocôndria através de um transportador específico e transformado em AcetilCoA pela enzima piruvato desidrogenase (PDH), a qual posteriormente será oxidado no ciclo do AT. Durante o ciclo tem-se a liberação de 3 NADH e 1 dinucleotídeo de flavina-adenina (FADH_2), 1 GTP (ATP) e ainda 2 CO_2 para cada volta completa através dos passos enzimáticos. No primeiro passo enzimático do ciclo do AT, a acetilCoA se condensa com o oxaloacetato (OAA) formando o citrato (Cit). Nas reações seguintes, ocorrerá a descarboxilação desta molécula (produção de CO_2), a oxidação (produção de NADH e FADH_2) e a liberação de energia (GTP) (WOLLHEIM, 2000).

Como todas as vias metabólicas o ciclo do AT também tem complexos enzimáticos regulatórios chaves, os quais são a citrato sintase (CS), a isocitrato desidrogenase (IDH) e α -cetoglutarato desidrogenase (α KGDH).

Com a completa oxidação da glicose muitas coenzimas (NADH e FADH_2) foram reduzidas ao captar prótons e elétrons liberados tanto do ciclo do AT como da glicólise. Estas coenzimas necessitam agora serem reoxidadas na mitocôndria para dar continuidade à quebra de mais moléculas de glicose e possibilitar a formação de ATP. Então o próximo passo no metabolismo é o transporte de elétrons através de proteínas e outros compostos que estão localizados na membrana interna da mitocôndria. Estes compostos constituem a cadeia transportadora de elétrons. São eles que irão transportar os elétrons até o oxigênio reduzindo-o e formando água. Durante este transporte, em alguns pontos da membrana mitocondrial interna, ocorre a expulsão de prótons para o espaço intermembranas (bomba de prótons). O acúmulo de prótons no espaço intermembranas gera um gradiente de prótons (H^+) entre este local e a matriz mitocondrial (MA; ZHAO; TURK, 2012).

Os prótons acumulados no espaço intermembranas fluem para a matriz mitocondrial a favor do gradiente eletroquímico através de um complexo chamado F_1F_0 ATPase ou ATP sintase, que também está localizado na membrana interna da mitocôndria. Este fluxo possibilita a liberação de energia que é utilizada para acoplar moléculas de adenosina difosfato (ADP) a fosfato inorgânico (Pi) e produzir ATP. Cerca de 90% do ATP é produzido na mitocôndria e posteriormente lançado ao citosol através de um transportador adenina nucleotídeo translocase (ANT). Uma vez no citosol das células β pancreáticas o ATP pode atuar no fechamento dos canais K^+_{ATP} da membrana disparando os eventos despolarizantes que culminam com influxo de cálcio e exocitose da insulina (FRIDLAND; PHILIPSON, 2010).

1.6.3 Características Bioquímicas Especiais das Células β

A glicose ocupa posição central no metabolismo de bactérias, plantas e animais, as rotas do metabolismo da glicose são semelhantes em diferentes organismos e tecidos. Contudo, alguns tecidos apresentam peculiaridades importantes em relação à utilização da glicose, como ocorre, por exemplo, na célula β pancreática.

Uma importante especialização da célula β é a baixa expressão de lactato desidrogenase (LDH), a enzima que catalisa a conversão de piruvato a lactato, o baixo nível de expressão de LDH é importante para que o piruvato entre preferencialmente no metabolismo mitocondrial. No entanto as baixas concentrações de LDH necessitam da ativação de mecanismos compensatórios para a reoxidação do NADH, já que esta reação geralmente é catalisada pela LDH, com isso as células β reoxidam o NADH citoplasmático principalmente pela ativação das lançadeiras malato-aspartato e glicerol-fosfato (Figura 2). (WIEDERKEHR; WOLLHEIM, 2008). A importância desta via metabólica em células β pode ser evidenciada em experimentos com ratos pancreatectomizados, (modelos de diabetes) (JONAS *et al.*, 1999) e linhagens celulares secretoras de insulina como INS-1, os quais apresentam atividade da LDH aumentada (SEKINE *et al.*, 1994), o que pode explicar

parcialmente a diminuição da sensibilidade à glicose; considerando que baixas concentrações de LDH são importantes nas células β para direcionamento do piruvato através do metabolismo mitocondrial (FRIDLAND; PHILIPSON, 2010).

A sinalização da glicose nas células β tem diversas peculiaridades, incluindo a geração de múltiplas oscilações no metabolismo, no potencial de membrana mitocondrial, no Ca^{2+} citosólico e mitocondrial, o qual pode ativar diversas desidrogenases e acelerar desta forma o metabolismo da glicose (WOLLHEIM, 2000), e finalmente as oscilações da secreção de insulina. O acoplamento destas diversas oscilações não é totalmente compreendido. Além disso, a taxa respiratória é baixa e o fluxo de prótons é alto nas mitocôndrias isoladas de células β quando comparadas a mitocôndrias do músculo esquelético (AFFOURTIT; BRAND, 2006). O trabalho mitocondrial nas células β sob baixos potenciais de membrana apresenta uma maior sensibilidade às variações do potencial de membrana resultando em maior sensibilidade à glicose. A diminuída atividade respiratória nas células β leva a uma diminuição na produção de ATP pela F_1F_0 ATPase, no entanto isso dá a célula β a habilidade de adaptar-se a mudanças na taxa ATP/ADP em resposta a mudanças na concentração de glicose (FRIDLAND; PHILIPSON, 2010).

Um dos primeiros mecanismos de controle da célula β para tentar vencer a resistência à insulina e manter a homeostase glicêmica é a hipersecreção de insulina, este quadro precede a instalação do DM2, onde a homeostase glicêmica já está perdida. Uma hipótese para esta hipersecreção compensatória é a alteração do metabolismo glicolítico. Diante disso, conhecer vias de produção e consumo de ATP são centrais para o entendimento da sinalização da glicose nas células β e sua relação com quadros patológicos como SM e DM2, uma vez que estudos já demonstram que diversos modelos de obesidade e RI apresentam disfunções metabólicas. Camundongos transgênicos MKR, os quais são modelos de RI, apresentam diminuição da expressão de proteínas na membrana interna mitocondrial, incluindo enzimas limitantes do ciclo do AT e diversos componentes envolvidos na fosforilação oxidativa (LU *et al.*, 2010). Adicionalmente, ilhotas de camundongos DBA/2, um modelo de falência de ilhotas, apresentam elevada

glicólise e oxidação mitocondrial, maior atividade da GK e alta expressão de GLUT₂. Alterações diretamente envolvidas com a desregulação e disfunção do perfil secretório da insulina (KOOPTIWUT *et al.*, 2002).

A secreção de insulina estimulada por nutrientes é debilitada em patologias como DM2. Isto também pode resultar de debilidade em elevar a taxa de ATP/ADP nas células β (MULDER; LING, 2009). Além disso, o desenvolvimento de DM2 é associado a mutações e disfunções mitocondriais (SMITS *et al.*, 2010), estudos mostram que ilhotas pancreáticas de modelos diabéticos de camundongos assim como ilhotas pancreáticas humanas de pacientes DM2 apresentam diminuição na expressão de genes envolvidos na fosforilação oxidativa, o que pode ter um papel importante na debilidade da secreção de insulina, característica encontrada em portadores de DM2 (OLSSON *et al.*, 2011).

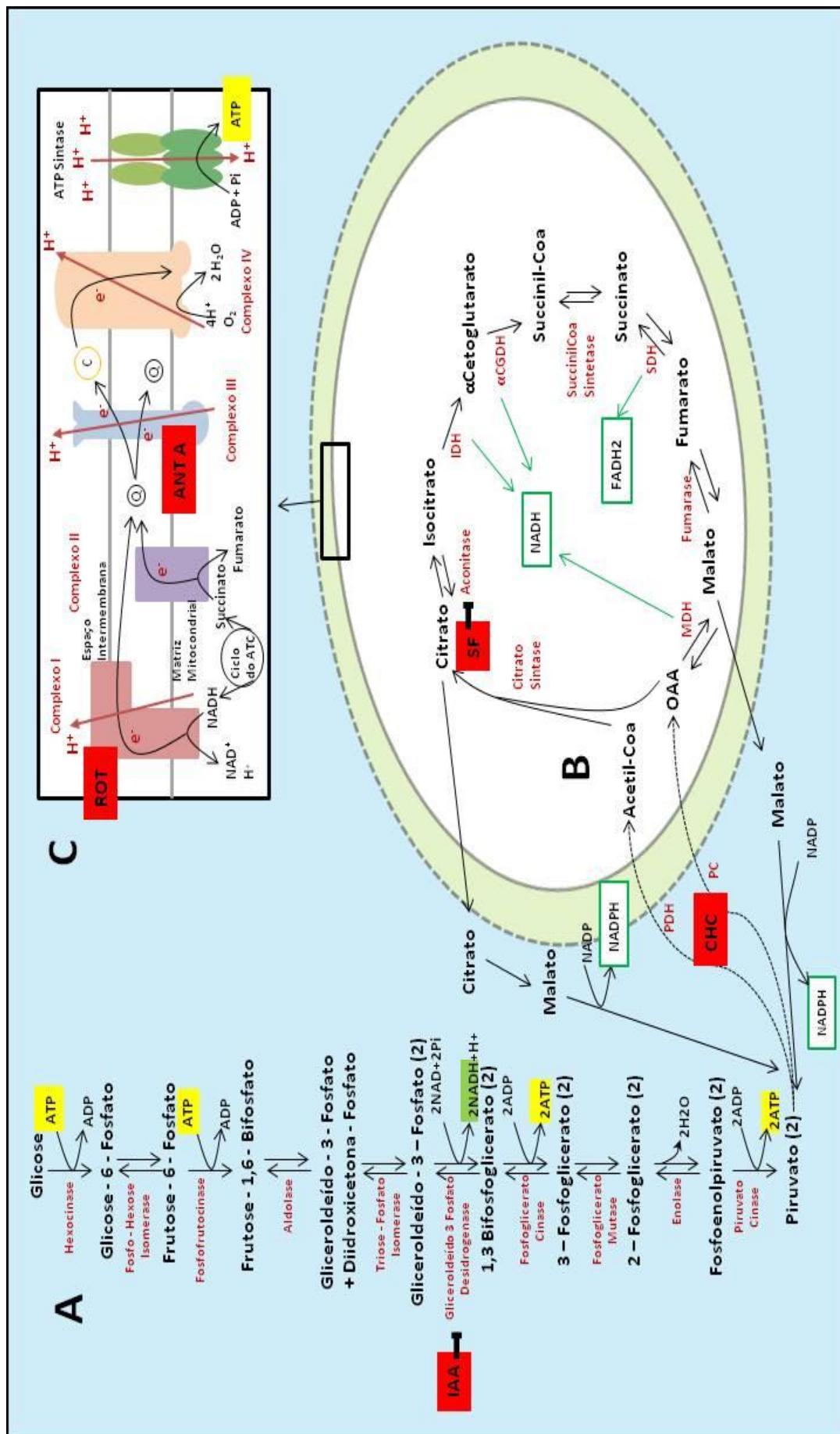


Figura 2. Metabolismo da Glicose: O metabolismo da glicose é iniciado com sua fosforilação pela enzima hexocinase no citosol (glicólise - A), a glicólise tem como produto final o piruvato, o qual é difundido para o interior da mitocôndria por um transportador específico (MCT), o piruvato pode então ser convertido a oxalacetato ou acetil-Coa pelas respectivas enzimas, piruvato carboxilase (PC) e piruvato desidrogenase (PDH), iniciando assim a fase aeróbia do metabolismo da glicose (ciclo do AT - B). Finalmente, os cofatores (NADH e FADH₂) formados tanto na glicólise como o ciclo do AT doam seus elétrons para a cadeia de transporte de elétrons - C, o que forma um gradiente de prótons e a difusão destes prótons do espaço intermembrana para o citosol mitocondrial gera ATP. Os grifos em vermelho representam os pontos de bloqueio para os determinados fármacos, sendo eles: IAA, bloqueio da enzima gliceroldeído 3 fosfato desidrogenase; α-CHC, bloqueio da importação do piruvato para o interior da mitocôndria; SF, bloqueio da enzima aconitase; ROT e ANT, bloqueio do complexo I e III da cadeia de transporte de elétrons, respectivamente.

1.7 Obesidade e Exercício Físico

A prática de exercício regular é um dos elementos chaves no tratamento da obesidade juntamente com a reeducação alimentar (FOREYT, 2005). Considerado como uma eficiente estratégia para queimar calorias, o exercício físico tem papel regulatório no balanço energético positivo, induzido pelo ganho de peso e desenvolvimento da obesidade (CHAPUT *et al.*, 2011). Além disso, melhora o bem estar psicológico e a aptidão cardiovascular, e adicionalmente trabalha na manutenção da perda de peso (HILL; WYATT, 2005). Entretanto, apesar destes efeitos positivos, um estilo de vida sedentário ainda predomina em populações obesas (PARSONS; MANOR; POWER, 2008).

Muitos estudos têm demonstrado a importância das funções do SNA nas adaptações ao exercício físico (HAUTALA *et al.*, 2009). A ativação da subdivisão autonômica simpática direta aos tecidos periféricos, bem como, a liberação endócrina das catecolaminas pelo eixo simpato-adrenal são responsáveis pela mobilização dos substratos energéticos durante o exercício. Quando o SNS é estimulado, como no caso do exercício físico, as projeções neurais dos centros hipotalâmicos podem acionar neurônios pré-ganglionares simpáticos localizados a nível torácico e lombar da medula espinhal. Parte destes neurônios através de fibras pós-ganglionares inervam vários tecidos, liberando norepinefrina diretamente na fenda sináptica. A outra parte destes neurônios chega à medula da glândula adrenal, liberando na fenda sináptica o neurotransmissor acetilcolina, o que dispara a secreção das catecolaminas resultando na liberação de epinefrina e norepinefrina na corrente sanguínea. Estes hormônios ativam diretamente a enzima lipase hormônio sensível, a qual está presente nos adipócitos e hepatócitos. Nos adipócitos esta enzima promove a degradação de triglicerídeos e mobilização de ácidos graxos, e no fígado promove a glicogenólise. O eixo simpato-adrenal representa um dos principais sistemas envolvido na resposta ao estresse, sendo assim, o exercício age como um importante modulador deste eixo (GAVRILOVIC *et al.*, 2012).

Além da mobilização dos substratos energéticos durante a atividade física,

acionada pelo ramo simpático autonômico, também ocorre um aumento da captação de glicose muscular independente de insulina. Esta via envolve a participação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK). A regulação da atividade do AMPK é independente da insulina, e envolve tanto a ativação alostérica direta através da ligação da adenosina monofosfato (AMP) na subunidade γ do AMPK, como a fosforilação da subunidade α . A fosforilação do AMPK pela Ca^{2+} /calmodulina – dependente quinase promove aumento na concentração de Ca^{2+} citosólico, e isto ocorre, por exemplo, durante a contração do músculo esquelético entrementes no exercício, indicando que o AMPK pode ser ativado sem o aumento dos níveis de AMP (VIOLLET, 2009).

É bem estabelecido que a contração muscular é um ativador típico do AMPK (HAYASHI, 1998). Parte do efeito do exercício físico em prevenir o desenvolvimento de doenças relacionadas ao sedentarismo é devido à ativação do AMPK. Portanto, a ativação do AMPK no músculo esquelético pode estimular o transporte de glicose independente de insulina. Finalmente, a ativação do AMPK em resposta ao exercício é também observada em outros tecidos, como fígado e tecido adiposo. Estudos reportam que o efeito do exercício induzindo a ativação do AMPK no músculo esquelético é diminuído em obesos e obesos com DM2, porém é mantida em pacientes magros com DM2. Isto sugere que a desregulação da via do AMPK está mais ligada com a obesidade do que com o DM2 propriamente dito (SRIWIJIKAMOL, 2007).

É sabido que o músculo esquelético é um tecido maleável capaz de sofrer alterações proteicas em resposta à quebra da homeostase. O processo de adaptação do músculo esquelético durante e depois do exercício envolve múltiplos mecanismos de sinalização. Essas adaptações funcionais são determinadas pelo volume, intensidade e frequência do treino. O treino aeróbico prolongado promove biogênese mitocondrial e aumento da vascularização tecidual. Enquanto que exercícios de resistência estimulam a síntese de proteínas contráteis responsáveis pela hipertrofia muscular e aumento da força (COFFEY; HAWLEY, 2007). Adicionalmente, o exercício físico melhora o controle glicêmico em indivíduos

magros, obesos e diabéticos, ajudando na diminuição da RI e evitando o desenvolvimento do diabetes (COLBERG, 2007). Parte dos efeitos benéficos do exercício físico está ligado ao aumento da capacidade oxidativa mitocondrial e a oxidação lipídica no músculo esquelético (HAWLEY; LESSARD, 2008). Além disso, o treinamento físico aumenta a taxa metabólica basal, ou seja, a quantidade de calorias gastas durante o repouso para a estabilização das funções vitais, promovendo assim a manutenção do peso corporal. Finalmente, o exercício melhora a sensibilidade à insulina e leptina no SNC, contribuindo para diminuição do apetite e consequente ingesta alimentar (FLORES *et al.*, 2006).

Embora as ações metabólicas do exercício em outros tecidos sejam bem conhecidas, os efeitos do exercício sobre o pâncreas endócrino ainda são escassos e contraditórios. Todavia, independente dos achados, os estudos já apontam que o exercício pode exercer modulações diretamente sobre as ilhotas pancreáticas podendo ser importante ferramenta no combate à falência de células β pancreáticas. Estudos realizados em ratos magros submetidos à corrida incremental, uma, duas ou cinco vezes por semana demonstraram que a secreção de insulina induzida por glicose (16,7mM) é diminuída em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos exercitados quando comparados a ilhotas de ratos sedentários. Adicionalmente, este estudo demonstrou que a magnitude de diminuição é proporcional a frequência do treino, ou seja, quanto maior a frequência, maior a diminuição da secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas pancreáticas isoladas (CALEGARI *et al.*, 2011). Apesar da redução da secreção de insulina, este estudo constatou que o conteúdo total de insulina na ilhota dos animais exercitados cinco vezes por semana é cerca de duas vezes maior quando comparados com os animais magros sedentários (CALEGARI *et al.*, 2012). Segundo os autores, este dado sugere uma intercomunicação entre os tecidos sensíveis à insulina e as ilhotas pancreáticas, uma vez que o treinamento físico eleva a sensibilidade periférica à insulina e o pâncreas endócrino pode liberar menos insulina.

Informações sobre aumento periférico da sensibilidade a insulina são bem abundantes na literatura, porém são raros os consensos sobre a modulação das

ilhas pancreáticas perante o exercício. Por exemplo, estudos realizados em camundongos pancreatectomizados obtiveram resultados opostos ao descrito anteriormente, neste estudo o exercício realizado em rodas durante seis semanas aumentou a secreção de insulina estimulada por glicose a 3mM e 16,6mM e o conteúdo de insulina nas ilhotas, além de promover a neogênese de células β pancreáticas (HUANG *et al.*, 2011).

Conhecer a modulação da secreção de insulina e sua comunicação com tecidos periféricos, como o músculo esquelético e o fígado, diante do exercício pode ser uma importante ferramenta para atenuar e impedir a franca instalação do DM2 (HAYES; KRISKA, 2008). Diversos estudos mostram a relação benéfica do exercício com a diminuição da prevalência da obesidade e SM, estes estudos comprovam que o exercício está inversamente associado a complicações destas patologias, como por exemplo, DM2 e doenças cardiovasculares (CARROLL; DUDFIELD, 2004). Um estudo realizado na China com 577 pessoas que apresentavam intolerância à glicose, de ambos os sexos, os quais realizavam 30 minutos de atividade física moderada ou de 5 a 10 minutos de atividade intensa por dia, demonstrou redução de 46% na prevalência do DM2 na população ativa comparada ao grupo sedentário (PAN *et al.*, 1997). O programa de prevenção ao diabetes nos Estados Unidos também realizou um estudo com mais de 3000 indivíduos de diferentes grupos étnicos com sobrepeso, os quais diminuíram o consumo de alimentos com gordura saturada e praticavam pelo menos 150 minutos de exercício físico moderado na semana, ao final de 24 semanas cerca de 50% dos participantes apresentaram perda significativa de peso e a prevalência do DM2 diminuiu em 58% (KNOWLER *et al.*, 2006).

É bem sabido que para benefícios metabólicos o exercício regular deve ser praticado de 3 a 5 vezes por semana por até 60 minutos por sessão com intensidade baixa a moderada (40 a 60% do VO_2 máximo) (BUEMANN; TREMBLAY, 1996). O efeito crônico do exercício nas comorbidades metabólicas pode ser em parte uma consequência da concomitante perda de gordura corporal, especialmente do tecido adiposo abdominal (DESPRÉS, 1997).

1.8 Modelo de Obesidade: Glutamato Monossódico (MSG)

Os estudos dos efeitos do tratamento neonatal de glutamato monossódico (MSG) em ratos começaram na década de 70. Roedores tratados neonatalmente com MSG apresentaram retardo no crescimento, mudanças na função adrenocortical, na tolerância à glicose e função reprodutiva. Posteriormente, outros estudos concluíram que o tratamento neonatal com MSG afeta o hipotálamo, particularmente o ARQ (MORRISON *et al.*, 2007).

As conexões neurais hipotalâmicas são susceptíveis a eventos que alteram o metabolismo principalmente durante a gravidez e a lactação. A administração de MSG em altas doses durante os primeiros dias após o nascimento induz, via ativação de receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDR) elevações dos níveis de cálcio citosólico e ativam a morte neural por apoptose, afetando principalmente neurônios do ARQ (OLNEY, 1969; ANDRADE *et al.*, 2006). Embora este núcleo seja central para o metabolismo energético, animais MSG sofrem uma reorganização neural que se reflete em uma nova estrutura metabólica que pré dispõe à obesidade na idade adulta (MACHO *et al.*, 2000; LEITNER; BARTNESS, 2008; LAU; TYMIANSKI, 2010).

Aos 90 dias esses animais apresentam a maioria das características marcantes da síndrome metabólica: obesidade visceral e subcutânea, altas concentrações de insulina tanto no estado de jejum quanto alimentado, resistência à insulina, intolerância à glicose e dislipidemia. Todavia, diferentemente de outros modelos de obesidade, principalmente os de origem genética como os ratos Zucker (fa/fa) e camundongos ob/ob, ratos obesos MSG não desenvolvem hiperglicemia de jejum. Desta forma, este modelo de obesidade apresenta características similares a indivíduos jovens obesos que estão em fases críticas para o desenvolvimento e instalação do DM2 (MORRISON *et al.*, 2007). Apesar da resistência à insulina o modelo de obesidade MSG ainda secreta insulina o suficiente para manter a normoglicemia de jejum e evitar a instalação do franco DM2 (LOBATO *et al.*, 2012). Adicionalmente, o acúmulo de tecido adiposo neste modelo experimental de

obesidade não está relacionado à maior ingestão alimentar (hiperfagia) (CAMERON; POON; SMITH, 1976; IWASE *et al.*, 1998).

Em quadros de obesidade a função das células β é prejudicada e a liberação de insulina estimulada por glicose é elevada, o que contribui para hiperinsulinemia. A resistência periférica à insulina na obesidade demanda um esforço maior das células β para produzir e liberar quantidades crescentes de insulina para preservar a homeostase glicêmica. No entanto, com a progressão da resistência à insulina a glicemia gradualmente eleva-se e as células β podem perder a capacidade de regular a secreção de insulina permitindo a instalação da hiperglicemia e DM2. O modelo de obesidade MSG reproduz estas características da obesidade, apresentando hiperinsulinemia e perda das funções das células β (GRASSIOLLI *et al.*, 2006; ANDREAZZI *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2011; NARDELLI *et al.*, 2011).

Diversos fatores estão envolvidos na instalação da obesidade MSG, todavia, alterações dos ramos autonômicos com reduzida atividade simpática e elevada atividade parassimpática contribuem diretamente para a hiperinsulinemia e aumento da massa adiposa em ratos tratados com MSG (ANDREAZZI *et al.*, 2011). A literatura reporta que o tratamento neonatal com MSG modula as funções autonômicas, reduzindo o *turnover* de noradrenalina no coração e no tecido marrom interescapular em camundongos MSG, o que indica baixa atividade simpática, o que pelo menos em parte explica o baixo gasto energético e a baixa mobilização do tecido adiposo (DULOO; MILLER, 1984). Além disso, modelos experimentais de obesidade, assim como humanos obesos apresentam atividade parassimpática elevada e simpática baixa (SAAD *et al.*, 1991; SCOMPARIN *et al.*, 2009). Estudos mensuraram a atividade direta do SNS em camundongos MSG através do registro da atividade dos nervos simpáticos superiores ganglionares cervicais, a taxa de disparo do nervo foi menor nos animais MSG comparados aos magros, adicionalmente este mesmo estudo demonstrou que estes animais apresentam também baixa atividade simpato-adrenal. Estas alterações contribuem para a debilidade no controle glicêmico destes animais (ANDREAZZI *et al.*, 2011). Esta reorganização pode explicar muitas das características metabólicas encontradas na

obesidade, como o acúmulo de tecido adiposo e o perfil hipersecretório de insulina. Por fim, baixas concentrações do hormônio do crescimento são encontrados em animais MSG e são responsáveis pelo tamanho reduzido dos animais e diminuída massa muscular. Insuficiente quantidade circulante do hormônio do crescimento também contribui para a redução da capacidade de lipólise, característica deste modelo. Adicionalmente estes animais apresentam hipercortisolismo o que contribui para a deposição de tecido adiposo central (MAITER *et al.*, 1991; HIRATA *et al.*, 1997).

É bem sabido que o exercício é capaz de atenuar o perfil da obesidade, diminuindo a glicemia, insulina sanguínea, hipertensão, dislipidemia e RI. Alguns estudos mostraram que o exercício físico regular em animais obesos MSG foi capaz de reestabelecer a homeostase glicêmica e lipídica, aumentar a sensibilidade à insulina, e modular a resposta das células β pancreáticas às condições estimulatórias de glicose, além de diminuir o percentual de gordura corporal. (GOBATTO *et al.*, 2002; de SOUZA *et al.*, 2003; SCOMPARIN *et al.*, 2009; ANDREAZZI *et al.*, 2009; SCOMPARIN *et al.*, 2011).

Diversos estudos mostram as disfunções no perfil secretório de ilhotas isoladas de animais MSG-obesos. Na presença de elevadas concentrações de glicose (BALBO *et al.*, 2002; GRASSIOLLI *et al.*, 2006; ANDREAZZI *et al.*, 2009) ilhotas pancreáticas de ratos MSG-obesos apresentam hipersecreção de insulina. A RI periférica e a elevada atividade parassimpática neste modelo explicam em parte esta hiperfunção pancreática (BALBO *et al.*, 2002; ANDREAZZI *et al.*, 2009). Até o presente momento não há nenhum estudo avaliando o metabolismo da glicose em ilhotas pancreáticas de ratos tratados com MSG. Considerando que ilhotas pancreáticas de ratos MSG apresentam hipersecreção de insulina, um evento chave na evolução do DM2, compreender estas alterações podem auxiliar na terapia para estas patologias. Adicionalmente nosso estudo avaliou a potencialidade do exercício regular em modular as rotas bioquímicas do controle secretor de insulina no pâncreas endócrino, mecanismos que poderiam proteger a célula β da sobrecarga de trabalho evitando a disfunção secretória precoce.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar a capacidade do exercício físico regular, iniciado precocemente, em modificar o metabolismo da glicose em ilhotas pancreáticas de ratos MSG-obesos atenuando ou evitando a hiperfunção pancreática.

2.1 Objetivos Específicos

- a) Induzir a obesidade pela administração subcutânea neonatal de glutamato monossódico.
- b) Avaliar a potencialidade do treinamento físico moderado e de baixa frequência, iniciado precocemente em impedir o desenvolvimento de resistência à insulina e preservar a homeostase glicêmica em ratos obesos-MSG,
- c) Avaliar o perfil secretor de ilhotas isoladas de animais MSG em resposta à glicose.
- d) Determinar os efeitos do exercício físico regular sobre o metabolismo da glicose em ilhotas isoladas de ratos obesos-MSG.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelo Experimental

No presente estudo foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) linhagem Wistar, machos, oriundos do Biotério Central da Universidade Estadual de Ponta Grossa, com a devida aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (02860) (Anexo 1).

Todos os animais foram alimentados com água e ração NuviLab-CR1®, *ad libitum* durante todo o experimento e mantidos em gaiolas em grupos de no máximo 6 animais, em condições controladas de luminosidade (ciclo 12h claro/escuro) e

temperatura ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

Grupo Obeso: Para indução da obesidade os animais receberam durante os primeiros 5 dias de vida injeções subcutâneas de glutamato monossódico (MSG) (4g/Kg de peso corporal). Ratos controles (CON) receberam, durante o mesmo período, solução salina equimolar.

3.3 Treinamento Físico

Aos 21 dias de vida os animais foram desmamados e subdivididos em 4 grupos experimentais: MSG-sedentários (MSG-SED); MSG-exercitados (MSG-EXE); CON-sedentários (CON-SED) e CON-exercitados (CON-EXE).

Para todos os grupos exercitados o treinamento físico iniciou-se aos 21 dias de vida e persistiu até os 90 dias, totalizando 69 dias de treinamento. O protocolo de atividade foi a natação realizada em piscina para ratos, com água aquecida ($32 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com duração de 30 minutos/3 vezes/semana. Na primeira semana os animais foram submetidos a um programa de adaptação ao meio líquido, que consistiu em natação livre de carga, durante 5', 15' e 30' nas três primeiras sessões, respectivamente. A partir da segunda semana uma carga progressiva, inicialmente equivalente a 2% do peso corporal, foi presa à cauda do animal. Depois de adaptados, a carga equivalente era de 5% do peso corporal, correspondendo a um treino de intensidade moderada, correspondente a 60% do consumo de oxigênio máximo, corroborando com estudos de GOBATTO *et al.*, 2001. As sessões tiveram início às 16h00min, e ao final de cada sessão os animais foram secos e devolvidos ao biotério (PRADA *et al.*, 2004; BRAGA, 2006; SCOMPARIN *et al.*, 2006).

3.4 Avaliação da resistência à insulina

A resistência à insulina foi determinada pelo cálculo do Índice HOMA-IR (*homeostasis model assessment*) obtido pelo produto da concentração de insulina (ng/mL) e glicose (mg/dL) em jejum dividido por 22,5 (MATTHEWS *et al.*, 1985).

3.6 Isolamento de ilhotas pancreáticas

Aos 92 dias de vida, parte dos animais treinados e sedentários de ambos os grupos experimentais sofreram eutanásia por decapitação, respeitando os princípios éticos dos estudos em animais, e submetidos à laparotomia, abertura da cavidade abdominal e localização do ducto hepático comum. Em seguida o pâncreas foi perfundido via ducto hepático com 8 mL de solução tampão Hank's pH 7,4 (1,3 mM CaCl_2 ; 0,8 mM MgSO_4 ; 5,4 mM KCl; 0,4 mM KH_2PO_4 ; 4,3 mM NaHCO_3 ; 137 mM NaCl; 0,3 mM Na_2HPO_4 ; 5,6 mM $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), contendo colagenase tipo V na concentração de 1 mg/mL. A perfusão do pâncreas foi garantida pela oclusão da porção final do ducto pancreático com auxílio de tesoura hemostática. Após a perfusão completa, o órgão ele foi imediatamente transferido para um tubo cônico contendo 5 mL de Hank's, em banho-maria a 37°C, durante 10 minutos e sob oxigenação (95% oxigênio/5% gás carbônico). Em seguida o frasco foi manualmente agitado e a solução filtrada com auxílio de uma peneira de aço inoxidável. Este filtrado contendo as ilhotas foi então submetido a sucessivas lavagens em Hank's, em banho de gelo. Com auxílio de lupa e pipeta, as ilhotas foram manualmente coletadas. No mínimo 5 animais por grupo foram usados para formar um "pool" de ilhotas que foram finalmente separadas em grupos de 4 e transferidas para poços contendo 1 mL de solução Krebs, contendo: 120 mM NaCl; 4,8 mM KCl; 2,5 mM CaCl_2 ; 1,2 mM MgCl_2 e 24 mM NaHCO_3 ; pH 7,4 (HARA *et al.*, 1988).

3.6 Pré-Incubação

Para todos os protocolos com ilhotas pancreáticas isoladas houve um período de 1h que antecedeu a incubação. Grupos de 4 ilhotas foram pré-incubadas, para estabilização ao meio *in vitro*, em 1 mL de solução Krebs, pH 7,4, suplementado com 0,1% de albumina bovina (fração V), glicose (5,6 mM) e aerado com uma mistura gasosa (95% oxigênio/ 5% de gás carbônico) à 37°C em uma incubadora de CO_2 (SANYO North America Corporation). Esta solução foi em seguida descartada e substituída pela solução de incubação.

3.7 Incubação

Após a pré-incubação grupos de 4 ilhotas foram incubadas por mais 1h em 1mL de tampão Krebs, pH 7,4, suplementado com 0,1% de albumina bovina (fração V) e aerado com uma mistura gasosa (95% oxigênio/ 5% de gás carbônico), à 37°C, em incubadora de CO₂. A concentração de glicose foi elevada para 16,7mM na presença dos seguintes inibidores do metabolismo da glicose: 1 – Ácido Iodoacético (IAA, 1mM – Sigma Aldrich), bloqueia a glicólise por inibir a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; 2 – Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (α -CHC, 1mM – Sigma Aldrich), inibe transporte mitocondrial prevenindo a importação do piruvato e seu metabolismo no ciclo do AT; 3 – Fluoroacetato de Sódio (SF, 2mM – Fluka Analytical) bloqueia a enzima aconitase do ciclo do ácido tricarboxílico; 4 – Rotenona (ROT, 1 μ M – Sigma Aldrich) e 5- Antimicina A obtida de *streptomyces sp.* (ANT, 50nM – Sigma Aldrich), inibidores dos sítios I e III da produção de ATP mitocondrial através da fosforilação oxidativa (SCHOFEL *et al.*, 2000) (Figura 2).

3.8 Dosagem de Insulina

O método de Radioimunoensaio (RIE) para dosagem de insulina consiste na interação competitiva de moléculas de insulina humana radioativa marcada com o iodo 125 (¹²⁵I) (marca Perkin Elmer), e de moléculas de insulina não radioativa, provenientes das amostras experimentais, que competem por um anticorpo específico contra insulina (anti-rato). Moléculas ligadas ao anticorpo em solução ao serem centrifugadas permanecem sobrenadantes enquanto as livres acumulam-se ao fundo do tubo de ensaio. A leitura da radiação é realizada por um contador GAMA, que detecta a quantidade de radiação emitida por cada amostra. Baseando-se na curva padrão com quantidade de radiação e de insulina não radioativa conhecidas, a leitura permite inferir a quantidade de insulina em cada amostra. Quanto maior a radioatividade maior será a quantidade de insulina não radioativa. Graças à competição, a maior concentração de insulina das amostras permitirá o maior número de ligações com o anticorpo, permanecendo a interação insulina-

anticorpo livre no sobrenadante, resultando em um maior acúmulo de insulina radioativa no fundo da solução a qual emitirá determinada radioatividade, a qual será lida em cpm/min e em seguida convertida para o log da concentração final de insulina em ng/mL (BERSON;YALOW, 1968).

3.9 Expressão Protéica

Ilhotas isoladas de todos os grupos experimentais foram solubilizadas em tampão de homogeneização contendo: Tris (pH 7,4) 100mmol/L, pirofosfato de sódio 10mmol/L, fluoreto de sódio 100mmol/L, EDTA 10 mmol/L, PMSF 1mmol/L, PHENAN 1 mmol/L, NEM 1 mmol/L e Triton X-100 1%, com pH final de 8,08. Após 30 min de gelo os lisados foram centrifugados por 5 min a 12600×g a 4°C com a finalidade de remover o material insolúvel. A concentração de proteína no sobrenadante foi quantificada usando o método de Bradford (BRADFORD, 1976), usando a curva de albumina como padrão e o reagente de Bradford (Bio-Agency Lab., São Paulo, SP, Brazil). Para o gel de eletroforese de poliacrilamida e análise do *Western blot* as amostras foram tratadas com amostras de tampão Laemmli (5x concentrado) contendo DTT(azul de bromofenol 0,1%; fosfato de sódio 1 M, pH 7,0; glicerol 50%, SDS 10% e água destilada). Depois de aquecidas a 95°C durante 5 minutos, a mistura foi submetida à eletroforese a 120 V em gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE) no sistema MINI-PROTEIN BIO-RAD®. O volume aplicado em cada poço do gel foi definido de forma a conter a mesma quantidade de proteína em todas as amostras (40 µg). Terminada a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF. A transferência das proteínas foi realizada a partir de um “sanduíche” montado da seguinte maneira: esponja, 2 folhas de papel de filtro, gel, membrana de PVDF, 2 folhas de papel de filtro e outra esponja. Este “sanduíche” foi acomodado em uma cuba de eletroforese, contendo tampão de transferência (Tris-Base 25 mM, glicina 192 mM, 200 mL de metanol 20%, SDS 0,02% e água destilada q.s.p 1000 mL). A transferência foi realizada sob corrente de 200-400 mA por cerca de 90 minutos.

Prosseguiu-se com a ligação do anticorpo específico para a proteína de interesse, sendo esta: GLUT₂.

Os sítios da membrana de PVDF sem proteína foram previamente bloqueados com proteínas do leite. As membranas foram incubadas por 2 h a temperatura ambiente, sob agitação, em solução 5% de leite desnatado em solução basal (10 mL de Tris-Base 1 M, 30 mL de NaCl 5M, 500 µL Tween 20 e água destilada q.s.p 1000 mL). O anticorpo utilizado foi anticorpo policlonal contra GLUT2 (1:1000; [cat. (H-67) sc 9117]). O anticorpo primário usado foi comprado da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). As membranas foram incubadas de 4 – 6h, temperatura ambiente, na presença do anticorpo previamente diluído em solução 3% de albumina em solução basal. Após lavagem (3x de 10 minutos cada), sob agitação, com solução basal, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente, por 1 hora, com anticorpo secundário conjugado anti-IgG de coelho marcado com peroxidase. Este anticorpo foi diluído 1:10.000 (Pierce Biotechnology, IL, USA) em solução 1% de albumina em solução basal. Finalmente, as membranas foram lavadas (3x de 10 minutos cada), sob agitação, com solução basal e, posteriormente, reveladas.

A revelação foi realizada por quimioluminescência (sistema luminol). As soluções de revelação foram previamente misturadas na proporção 1:1. As membranas foram, cuidadosamente, recobertas com a mistura e após 2 minutos de reação, o líquido excedente foi desprezado e as membranas foram ensacadas e expostas (protegidas da luz e em cassete apropriado) ao filme de raio-X por tempo variável (de 5 segundos a 30 minutos). A análise das bandas foi realizada no programa Scion Image, Frederick, MD e relacionadas com a expressão da proteína constitutiva (α -tubulina). O conteúdo proteico foi obtido de um grupo de ilhotas oriundas de 3 ratos para cada grupo. Três repetições foram realizadas para cada grupo experimental, totalizando um n de 9 animais por grupo.

3.10 Curvas de crescimento e consumo alimentar

A partir dos 21 dias, para todos os grupos experimentais, a cada 2 dias foram avaliados o peso corporal e o consumo alimentar, este foi calculado pela subtração entre a ração ofertada e a sobra, dividido pelo número de animais por caixa. Os dados de consumo foram expressos como g/g de peso corporal.

3.11 Obesidade

A obesidade foi avaliada pelo cálculo do Índice de Lee ($\sqrt[3]{\text{Peso Corporal}/\text{CNA}}$) e pela retirada de depósitos de gordura da cavidade abdominal (mesentérica, epididimal e retroperitoneal) e subcutânea (inguinal). O peso do tecido marrom inter-escapular também foi avaliado. Todos os dados foram expressos em g/100g de peso corporal.

Além disso, amostras de sangue foram coletadas para dosagens bioquímicas. As concentrações plasmáticas de triglicerídeos (mg/dL) e colesterol total (mg/dL) foram determinadas pelo método enzimático-Trinder (LabTest, BR). A concentração plasmática de HDL (*high density lipoprotein*) – colesterol (mg/dL) foi determinada pela reação de ponto final (LabTest, BR). A concentração de glicose (mg/dL) foi determinada pelo método enzimático colorimétrico (LabTest, BR). A determinação do LDL (*low density lipoprotein*) (mg/dL) foi realizada segundo a fórmula de Friedewald: $\text{LDL-C} = \text{CoIT} - \text{HDL-C} - (\text{TAG}/5)$ e a insulina plasmática (ng/mL) foi dosada pelo método de RIE.

3.13 Análise Histológica

Após o sacrifício aos 90 dias, as amostras do tecido adiposo branco e marrom, pâncreas e fígado foram fixadas em solução de Alfac (Álcool 80% 85 mL, formaldeído 40% 10mL, ácido acético glacial 5mL). Após 16 horas o material foi transferido para solução estoque (álcool 70%), posteriormente o material foi incluído em parafina (marca Paraffin Wax) conforme protocolos histológicos de rotina. As peças foram cortadas em micrótomo à 4µm de espessura, seguindo o padrão de

cuture seriado, sendo descartados aproximadamente 20 cortes entre cada lâmina ($\pm 80\mu\text{m}$) para evitar a análise das mesmas estruturas. Após as secções os cortes foram fixados em lâminas de vidro devidamente identificadas, decorrido o período mínimo de descanso (mínimo de 24 horas) as lâminas foram devidamente coradas. Os cortes foram submetidos ao protocolo de coloração Hematoxilina e Eosina (H&E). Após a secagem, as lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio de campo claro (Olympus BX41) com captura digital de imagens (Olympus DP71 equipada com o software DP-Controller). As imagens arquivadas foram tratadas com software J- Pró image. Os parâmetros avaliados em cada lâmina foram: a) pâncreas: mediu-se a área (μm^2) e quantificou-se o número total de Ilhotas de Langherans por corte, com aumento de 40 vezes; b) fígado: determinou-se um quadrante de 1mm^2 , para análise qualitativa de gotas lipídicas, com aumento de 200 vezes; c) tecido adiposo: analisou-se uma porção equivalente a um quadrante de 1mm^2 , com a finalidade de verificar a área (μm^2), hipertrofia e número dos adipócitos (hiperplasia), com aumento de 200 e 100 vezes, respectivamente. Para remoção das porções dos órgãos que seguiram para análise histológicas foram padronizadas a retirada da porção esplênica do pâncreas (cerca de 1,5 cm), porção do lobo inferioresquerdo do fígado (cerca de 2 cm), gorduras mesentérica e inguinal porções com 1,5 cm.

3.13 Análise Estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. A significância estatística entre as médias foi avaliada pela Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni e pelo Teste t de Student's. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$, utilizando o software GraphPad Prism 5.

4. RESULTADOS

Os resultados serão sempre apresentados mostrando primeiramente o efeito do tratamento neonatal com MSG (CON *versus* MSG) e em seguida o efeito do exercício físico sobre animais magros (CON-SED *versus* CON-EXE) e sobre obesos (MSG-SED *versus* MSG-EXE).

4.1 Parâmetros biométricos e obesidade

O efeito do tratamento neonatal com MSG, bem como, a influência da natação regular sobre parâmetros biométricos estão representados na tabela 1. Os animais MSG-SED apresentaram redução no peso corporal de 15% quando comparados aos CON-SED. O exercício diminuiu o peso corporal de ambos os grupos CON-EXE e MSG-EXE em aproximadamente 6% comparados aos respectivos animais sedentários. O comprimento naso-anal (CNA) foi cerca de 13% menor nos animais MSG-SED *versus* CON-SED. O exercício físico não afetou este parâmetro em ambos os grupos.

A obesidade foi avaliada pelo Índice de Lee (IL) e pelo peso de diferentes depósitos de tecido adiposo. Os animais MSG-SED apresentaram aumento de 6% no IL comparados aos animais CON-SED. O conteúdo de gorduras foi dividido em depósito subcutâneo (gordura inguinal) e visceral (gorduras mesentérica, retroperitoneal e epididimal). Os animais MSG-SED apresentaram aumento em todos os depósitos de tecido adiposo em relação ao grupo CON-SED. As gorduras viscerais tiveram um aumento de cerca de 100% e a subcutânea apresentou um aumento de 175% nos ratos MSG-SED *versus* CON-SED. O exercício novamente foi capaz de atenuar o perfil de obesidade diminuindo em cerca de 20% as gorduras viscerais (mesentérica; retroperitoneal e epididimal) e 47% a gordura inguinal (MSG-SED *versus* MSG-EXE) (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros Biométricos e Obesidade:

	CON-SED	CON-EXE	MSG-SED	MSG-EXE
Peso Corporal (g)	333,5±5,74 ^{b,cd}	315,1±4,29 ^{a,c,d}	284,7±5,73 ^{a,b,d}	264,2±3,17 ^{a,b,c}
Comprimento Naso-anal (cm)	22,9±0,13 ^{c,d}	23,0±0,15 ^{c,d}	20,1±0,29 ^{a,b}	20,5±0,27 ^{a,b}
Índice de Lee	0,296±0,002 ^c	0,297±0,002 ^c	0,313±0,003 ^{a,b}	0,303±0,005 ^{a,b}
Gordura Epididimal (g/100g)	1,20±0,09 ^{c,d}	1,33±0,07 ^{c,d}	2,48±0,11 ^{a,b,d}	1,94±0,17 ^{a,b,c}
Gordura Mesentérica (g/100g)	0,85±0,04 ^{c,d}	0,59±0,02 ^{c,d}	1,69±0,09 ^{a,b,d}	1,38±0,09 ^{a,b,c}
Gordura Retroperitoneal (g/100g)	1,66±0,16 ^{c,d}	1,51±0,17 ^{c,d}	3,76±0,17 ^{a,b,d}	3,02±0,19 ^{a,b,c}
Gordura Inguinal (g/100g)	0,28±0,02 ^c	0,28±0,02 ^c	0,77±0,08 ^{a,b,d}	0,41±0,06 ^c

Os dados representam a média ± erro padrão da média; n=10 -15 ratos para todos os grupos. O Índice de Lee foi calculado a partir do peso corporal (g) e do comprimento naso-anal (CNA) (cm), conforme a fórmula explicada nos métodos. Todos os depósitos avaliados são expressos em g/100g de peso corporal. As letras acima dos números representam diferenças significativas de $p < 0,05$ em análises de variância ANOVA com pós-teste de *Bonferroni* entre os grupos: ^aCON-SED; ^bCON-EXE, ^cMSG-SED; ^dMSG-EXE.

4.2 Histomorfologia

Conforme os dados apresentados na figura 3 (A-L) os animais MSG-SED apresentaram hipertrofia do tecido adiposo branco. A área do adipócito foi 215% e 110% maiores respectivamente no tecido adiposo inguinal (3C) e mesentérico (3G) nos ratos MSG-SED em relação aos adipócitos de ratos CON-SED ($p < 0,05$). A natação iniciada precocemente foi capaz de impedir o aumento da área dos adipócitos das gorduras inguinal (3B e 3D) e mesentérica (3F e 3H) cerca de 36% e 37% nos animais CON-EXE e 24% e 37% nos animais MSG-EXE, respectivamente em relação aos respectivos grupos sedentários. Adicionalmente, os animais MSG-

SED apresentaram menor número de adipócitos em relação aos CON-SED. O número de adipócitos foi 77% e 55% menor, respectivamente para a gordura inguinal (3C) e mesentérica (3G) no grupo MSG-SED comparado com os mesmos depósitos dos animais CON-SED ($p < 0,05$). O exercício reverteu estas alterações e aumentou o número de adipócitos da gordura mesentérica (3F e 3H) em 72% nos animais CON-EXE e 41% nos animais MSG-EXE, comparados aos respectivos pares sedentários ($p < 0,05$). Similarmente, o exercício também aumentou o número de adipócitos da gordura inguinal (3B e 3D) em 26% e 33% nos animais CON-EXE e MSG-EXE, respectivamente em relação aos grupos sedentários. O número de adipócitos do tecido adiposo marrom foi 50% menor no grupo MSG-SED comparado ao grupo CON-SED. O exercício iniciado precocemente aumentou 30% o número de adipócitos no tecido adiposo marrom em relação ao grupo MSG-SED (3K e 3L).

Observa-se também na figura 4, que o fígado de animais MSG-SED apresentaram capilares sinusóides mais tortuosos quando comparados aos CON-SED, o que pode indicar aumento de tecido fibroso no fígado deste modelo (4C). No grupo MSG-EXE o exercício físico iniciado precocemente foi capaz de diminuir as alterações histopatológicas dos capilares sinusóides, bem como, de atenuar a fibrose hepática (4D). Finalmente, os animais MSG-SED apresentaram alterações no tamanho das ilhotas pancreáticas (4G), sendo que a área das ilhotas destes animais foi cerca de 79% maior que a área das ilhotas dos animais CON-SED ($p < 0,05$). O exercício diminuiu em 81% a área das ilhotas (4H) em animais MSG-EXE, comparados com MSG-SED. Ambos, tratamento neonatal com MSG e natação não afetaram o número de ilhotas pancreáticas entre os grupos.

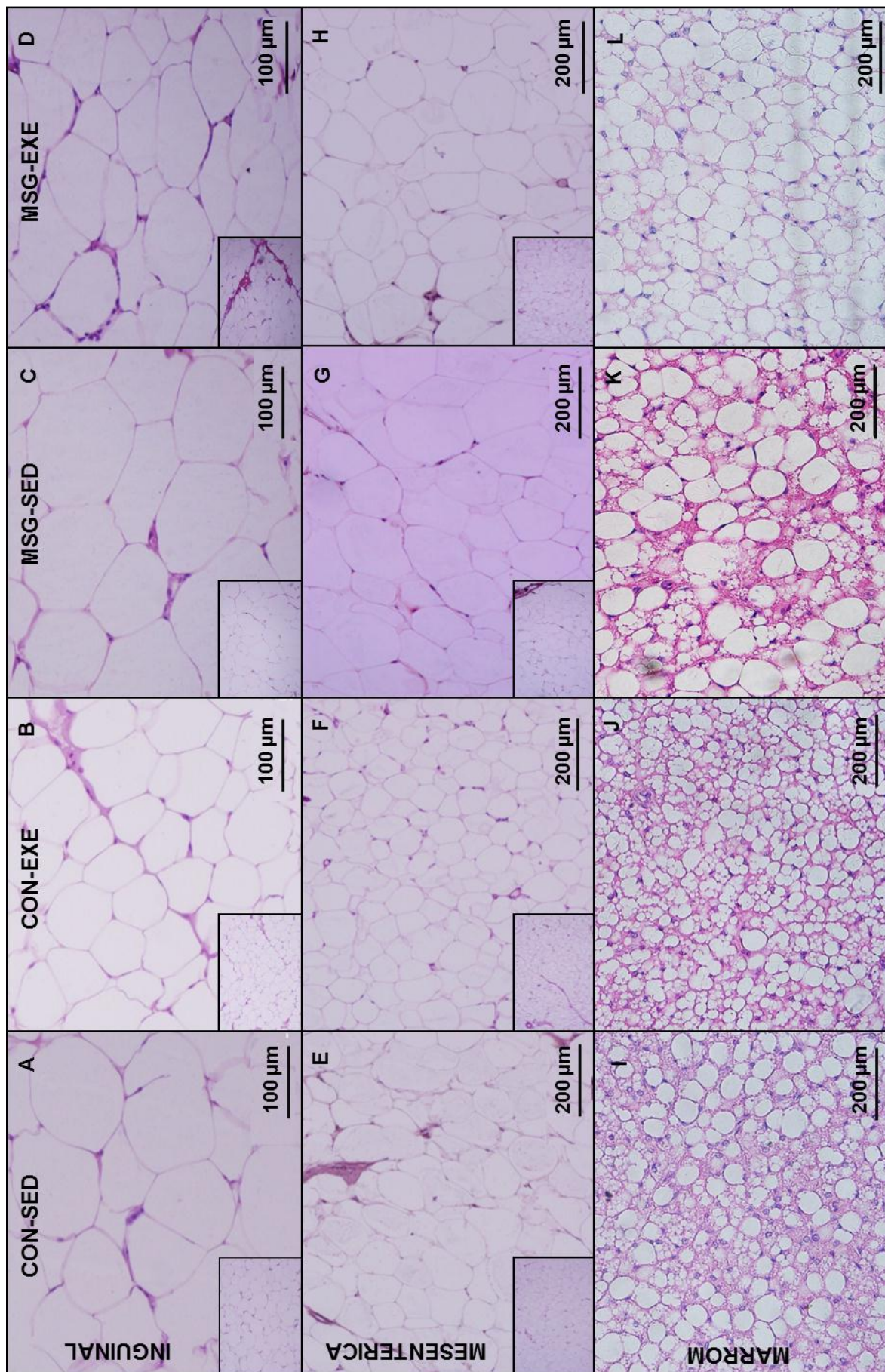


Figura 3. Efeito da natação na histomorfologia do tecido adiposo: As imagens representam o tecido adiposo inguinal (3A-D), mesentérico (3E-H) e marrom (3I-L). Todos os tecidos foram corados com Hematoxilina & Eosina (H&E). As imagens foram fotografadas com diferentes objetivas como está indicado nos métodos. Análises morfométricas da área e número foram realizadas para os adipócitos. Os respectivos valores estão apresentados em média \pm erro padrão nos resultados. As análises histológicas do fígado avaliaram a organização geral e a acumulação lipídica.

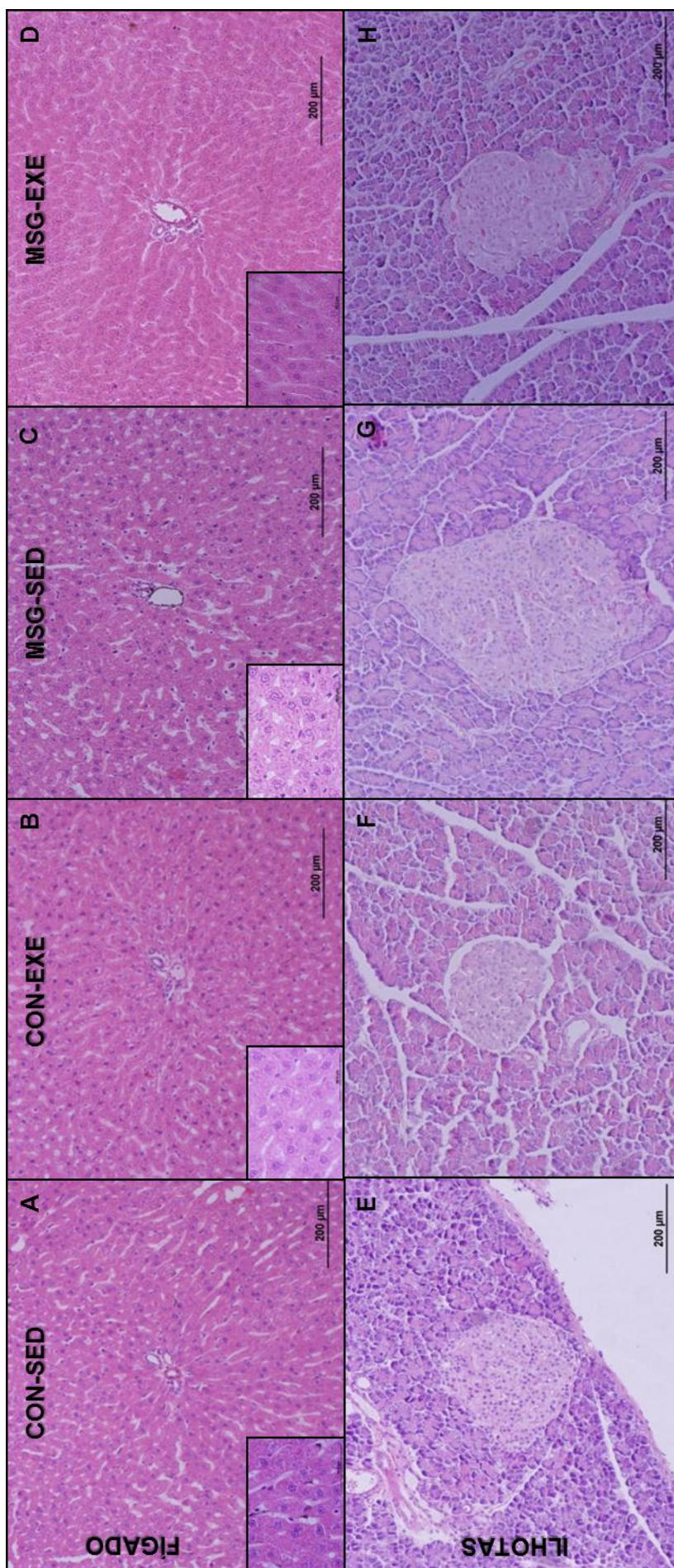


Figura 4. Efeito da natação na histomorfologia do fígado e ilhotas pancreáticas: As imagens representam o fígado (4A-D) e ilhotas pancreáticas (4E-H). Todos os tecidos foram corados com Hematoxilina & Eosina (H&E). As imagens foram fotografadas com diferentes objetivas como está indicado nos métodos. Análises morfométricas da área e número foram realizadas para as ilhotas. Os respectivos valores estão apresentados em média \pm erro padrão nos resultados. As análises histológicas do fígado avaliaram a organização geral e a acumulação lipídica.

4.3 Consumo Alimentar

As figuras 5A e 5C representam respectivamente, as curvas ponderais do consumo alimentar e hídrico entre os grupos. As respectivas análises das áreas sobre a curva (ASC) de cada gráfico estão representadas pelas barras nos inserts B e D. Independente do tratamento ou do treinamento físico o consumo alimentar foi similar entre os grupos. O consumo hídrico não foi afetado pelo tratamento neonatal com MSG. Porém os animais MSG-EXE apresentaram uma redução de 19% na ASC do consumo de água quando comparados aos animais MSG-SED (Figura 5).

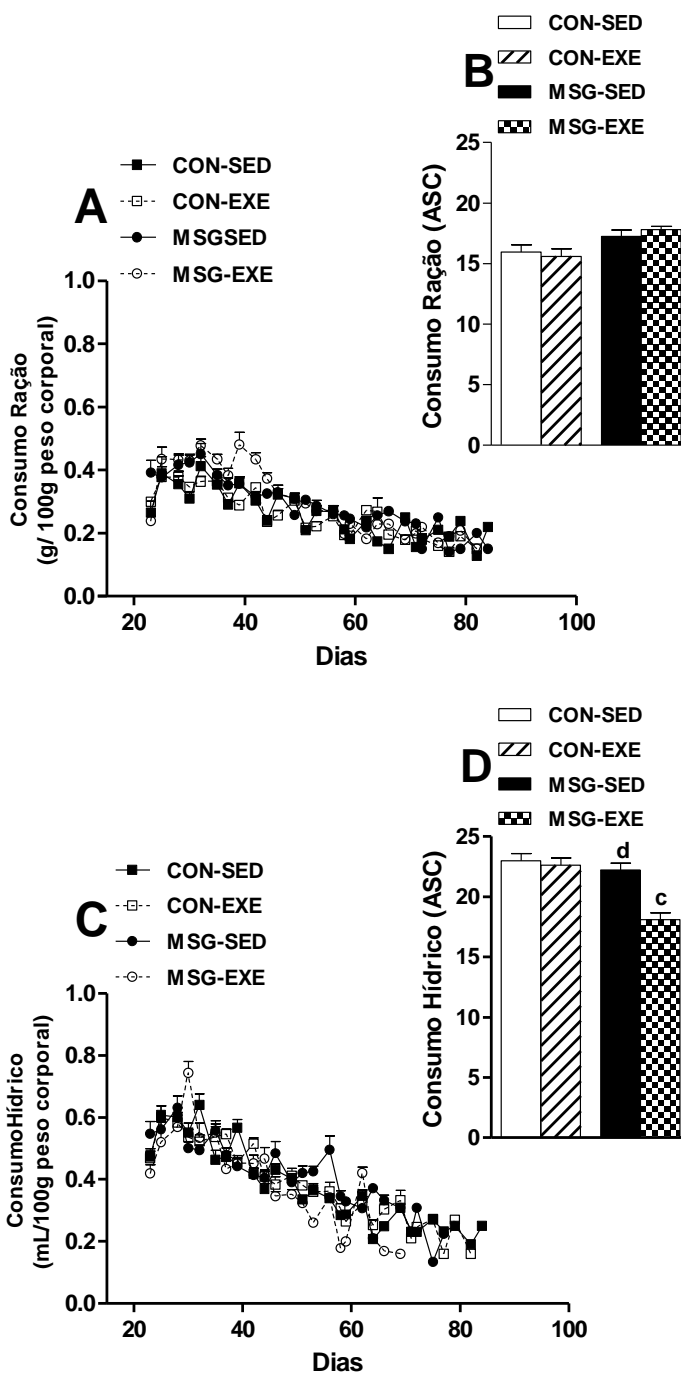


Figura 5. Efeito da Natação Regular sobre o Consumo Hídrico e de Ração: As figuras A e C representam respectivamente a evolução ponderal (21-90 dias) do consumo de ração e água para todos os grupos. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média; $n=10-15$ ratos para todos os grupos. As respectivas Áreas Sob a Curva (ASC) estão representadas nos inserts B e D. Os símbolos acima das barras representam diferenças estatísticas de $p<0,05$ no teste t de Student's. ^a CON-SED; ^b CON-EXE; ^c MSG-SED; ^d MSG-EXE.

4.4 Dados Bioquímicos

O perfil bioquímico plasmático dos grupos está representado na tabela 1. Ratos MSG-SED apresentaram concentrações plasmáticas de insulina (25%) e glicose (17%) maiores que animais CON-SED. A natação afetou significativamente o perfil insulinêmico em ambos os grupos, diminuindo em cerca de 25% este parâmetro. Adicionalmente, o exercício foi capaz de diminuir em 14% a glicemia dos ratos MSG-EXE *versus* MSG-SED ($p < 0,05$).

O perfil lipídico também foi alterado em animais MSG-SED comparados aos CON-SED. Ratos MSG-SED apresentaram aumento de 118% e 26% respectivamente nos níveis de triglicerídeos e colesterol total em relação aos ratos CON-SED. Novamente o exercício foi capaz de diminuir em 26% os triglicerídeos e 14% o colesterol total dos animais MSG-EXE quando comparados aos MSG-SED. As concentrações de HDL e LDL foram similares entre os grupos MSG-SED e CON-SED. Todavia, o exercício aumentou em 24% o HDL dos animais CON-EXE *versus* CON-SED, e diminuiu o LDL em 37% e 54% respectivamente nos grupos CON-EXE e MSG-EXE, quando comparados aos sedentários correspondentes ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito da natação regular sobre os parâmetros bioquímicos:

	CON-SED	CON-EXE	MSG-SED	MSG-EXE
Insulina Basal (ng/mL)	0,41±0,03 ^{b,c}	0,33±0,03 ^{a,c}	0,54±0,05 ^{a,b,d}	0,38±0,03 ^c
Glicose Basal (mg/dL)	110,96±2,40 ^c	109,23±3,77 ^c	129,33±3,12 ^{a,b,d}	110,89±3,35 ^c
Triglicerídeos (mg/dL)	86,56±7,70 ^{c,d}	89,67±6,90 ^{c,d}	190,44±25,51 ^{a,b,d}	139,52±7,44 ^{a,b,c}
Colesterol Total (mg/dL)	87,85±2,61 ^c	89,15±3,63 ^c	111,10±4,36 ^{a,b,d}	94,71±2,36 ^c
HDL (mg/dL)	45,26±1,61 ^b	55,86±2,86 ^a	51,29±3,75	53,21±1,94
LDL (mg/dL)	27,38±1,61 ^{d,b}	17,17±2,22 ^a	25,94±4,48 ^{a,c}	12,40 ± 3,14 ^{a,c}
Índice Homa	0,112±0,01 ^c	0,091±0,01	0,183±0,02 ^{a,d}	0,102±0,01 ^c

Os dados representam a média ± erro padrão da média. As amostras foram coletadas após 12h de jejum; n=10 -15 ratos para todos os grupos. As letras acima dos números representam diferenças significativas de $p < 0,05$ em análises de variância ANOVA com pós-teste de *Bonferroni* entre os grupos: ^aCON-SED; ^bCON-EXE, ^cMSG-SED; ^dMSG-EXE.

O índice HOMA representa uma medida indireta da resistência à insulina (RI). O efeito do treinamento físico e do tratamento neonatal com MSG sobre os valores do índice HOMA estão representados na tabela 2. Os ratos MSG-SED apresentaram valores elevados de glicemia e insulinemia, resultando no aumento de 63% do índice HOMA-RI quando comparados aos ratos CON-SED. O exercício foi capaz de diminuir tanto a glicemia como a insulinemia basal dos animais obesos, resultando na diminuição de 44% do índice HOMA-RI em ratos MSG-EXE comparados a ratos MSG-SED (tabela 2).

4.5 Secreção de Insulina Estimulada por Glicose

As ilhotas pancreáticas foram isoladas e incubadas em três concentrações distintas de glicose (5,6mM; 8,3mM e 16,7mM), de acordo os dados da figura 6. Ilhotas pancreáticas isoladas de animais MSG-SED apresentaram perfil

hipersecretório quando comparadas às ilhotas obtidas de ratos CON-SED. Na presença de glicose 8,3mM e 16,7mM a secreção de insulina liberada foi 29% e 20% maior, respectivamente em ilhotas de ratos MSG-SED comparado às ilhotas de ratos CON-SED ($p < 0,05$).

A figura 6 também demonstra o efeito da natação regular sobre a secreção de insulina estimulada por glicose. Em ilhotas isoladas de ratos CON-EXE a responsividade a glicose foi reduzida em todas as concentrações avaliadas. A magnitude da redução da secreção de insulina foi de 31% (5,6mM), 30% (8,3mM) e 39% (16,7mM) em ilhotas de ratos CON-EXE em relação à insulina liberada pelas ilhotas de ratos CON-SED na presença das mesmas condições (Figura 6). Em ilhotas isoladas de animais MSG-EXE o exercício não alterou o perfil secretório em presença de 5,6 mM de glicose. Por outro lado, nas concentrações de 8,3mM e 16,7mM o exercício também apresentou efeito supressor na secreção de insulina estimulada por glicose. A secreção de insulina estimulada por glicose 8,3mM e 16,7mM foi 43% e 19% menor em ilhotas de ratos MSG-EXE comparado à secreção em ilhotas de ratos MSG-SED (Figura 6).

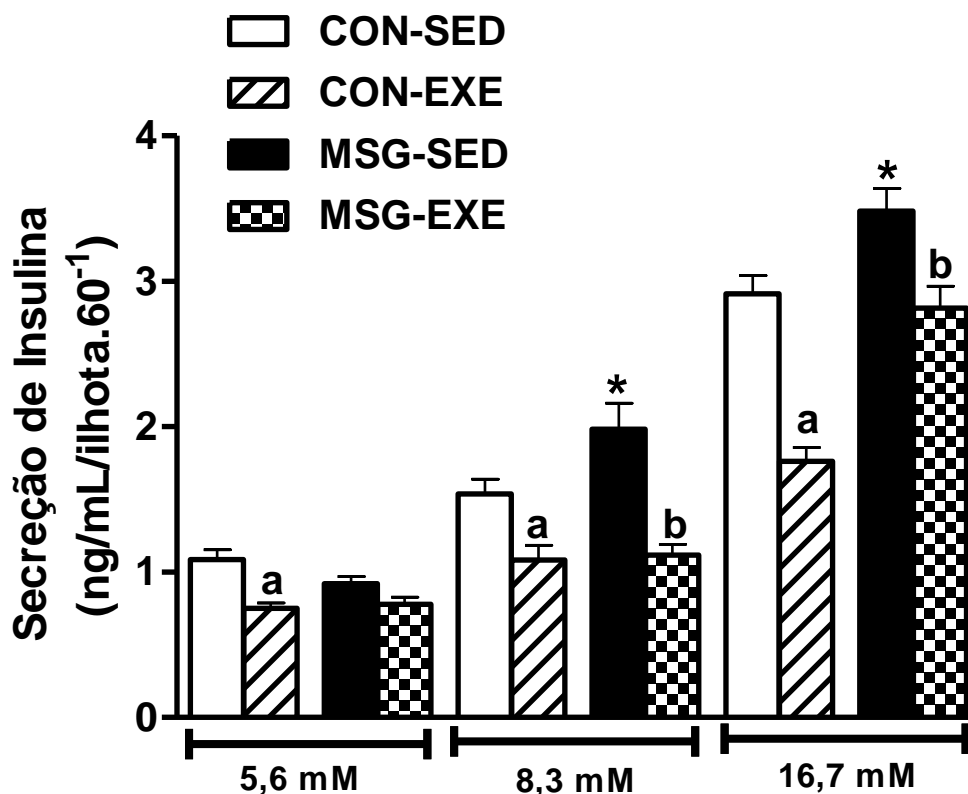


Figura 6. Secreção de Insulina estimulada por Glicose: Os dados representam a média \pm erro padrão da média. Ilhotas pancreáticas foram isoladas e incubadas em grupos de 4 com 1mL de Krebs na presença de glicose 5,6, 8,3 e 16,7mM durante 1h. As ilhotas foram obtidas a partir de um pool de ilhotas oriundas de 6 animais por grupo e tratamento. De 20-40 observações foram feitas para cada situação. Os símbolos sobre as barras representam diferenças estatísticas de $p < 0,05$ no teste t de Student's entre os grupos: *CON-SED versus MSG-SED; ^aCON-SED versus CON-EXE; ^bMSG-SED versus MSG-EXE.

4.6 Efeito dos Bloqueadores do Metabolismo da Glicose

Os efeitos dos bloqueadores da glicólise, do ciclo do AT e complexos mitocondriais sobre a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas foram avaliados na presença de elevadas concentrações de glicose (16,7mM). Os efeitos de cada fármaco são representados em porcentagem, considerando a presença de glicose (16,7mM) isoladamente como 100% (Figuras 7 e 8).

De acordo com a figura 7 a adição do bloqueador glicolítico IAA promoveu diminuição da secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas isoladas de todos os grupos. A redução foi de 46% para o CON-SED, todavia a magnitude de

inibição foi maior no grupo MSG-SED (59%). Adicionalmente em ilhotas pancreáticas de animais exercitados a presença de IAA inibiu cerca de 44% a secreção estimulada por glicose no grupo CON-EXE e 57% no grupo MSG-EXE ($p < 0,05$). Por outro lado na presença dos bloqueadores do ciclo do AT, α -CHC e SF, a secreção de insulina estimulada por glicose não foi significativamente afetada em ilhotas isoladas de ratos CON-SED; CON-EXE; MSG-SED; MSG-EXE. Todavia, contrário ao esperado a adição de α -CHC promoveu aumento de 36% na secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas de ratos MSG-SED em relação ao estímulo com 16,7 mM. Adicionalmente, na presença de α -CHC a secreção de insulina estimulada por glicose foi 68% maior no grupo MSG-SED quando comparado a ilhotas de animais CON-SED na presença do mesmo fármaco ($p < 0,05$) (Figura 7).

A figura 8 apresenta o efeito dos inibidores dos complexos mitocondriais I (ROT) e III (ANT) sobre a secreção de insulina estimulada por glicose. A ROT foi capaz de inibir em aproximadamente 56% ($p < 0,05$) a secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas pancreáticas isoladas de todos os grupos (Figura 7). Similarmente a adição de ANT também foi capaz de diminuir a secreção de insulina em ilhotas de todos os grupos, todavia com magnitudes de efeitos distintos. Em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos CON-SED e MSG-SED a presença de ANT promoveu inibição de 42% e 26% respectivamente, na secreção de insulina estimulada por glicose ($p < 0,05$). Em ilhotas obtidas de ratos exercitados a adição de ANT inibiu 55% (CON-EXE) e 65% (MSG-EXE) a secreção de insulina estimulada por glicose. O efeito da ANT foi 23% e 53% maior em ilhotas de ratos CON-EXE e MSG-EXE em relação às ilhotas dos respectivos grupos sedentários ($p < 0,05$) (Figura 8).

4.7 Western Blotting

A Figura 9 representa a análise da expressão proteica da proteína GLUT₂ pela técnica de *western blotting*. Os animais MSG-SED apresentaram 41% de aumento na expressão desta proteína em relação aos CON-SED. A natação precoce foi capaz de corrigir a expressão do GLUT₂ em animais MSG-EXE em relação aos

MSG-SED, diminuindo-a em 34%.

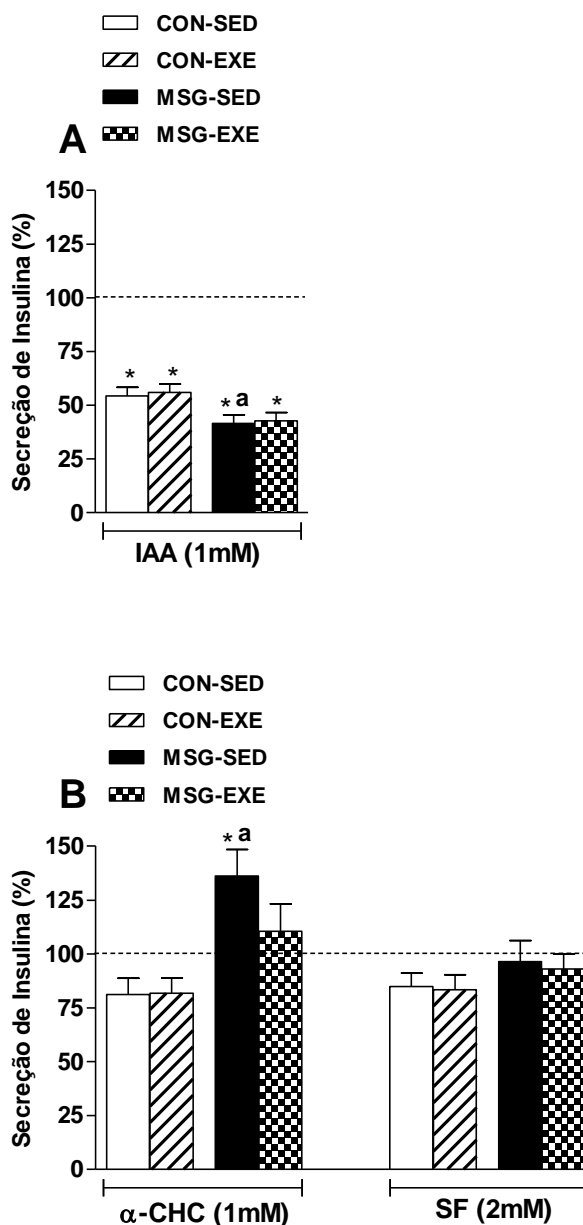


Figura 7. Efeito do bloqueio da glicólise e ciclo do AT na secreção de insulina estimulada por glicose: Ilhotas pancreáticas foram isoladas e incubadas em grupos de 4 em 1mL de Krebs contendo glicose 16,7mM na presença de IAA (1mM), α -CHC (1mM) ou SF (2mM). As ilhotas foram obtidas a partir de um pool de ilhotas oriundas de 6 animais por grupo e tratamento. De 20-40 observações foram feitas para cada situação. Os dados representam a média \pm erro padrão da média expressos em porcentagem. A linha pontilhada representa a presença apenas da glicose 16,7mM (100%). Os símbolos acima das barras representam diferenças estatísticas de $p < 0,05$ na análise de variância ANOVA, com pós teste de *Bonferroni*. * diferente de 100%; ^aCON-SED versus MSG-SED; ^bCON-SED versus CON-EXE; ^cMSG-SED versus MSG-EXE.

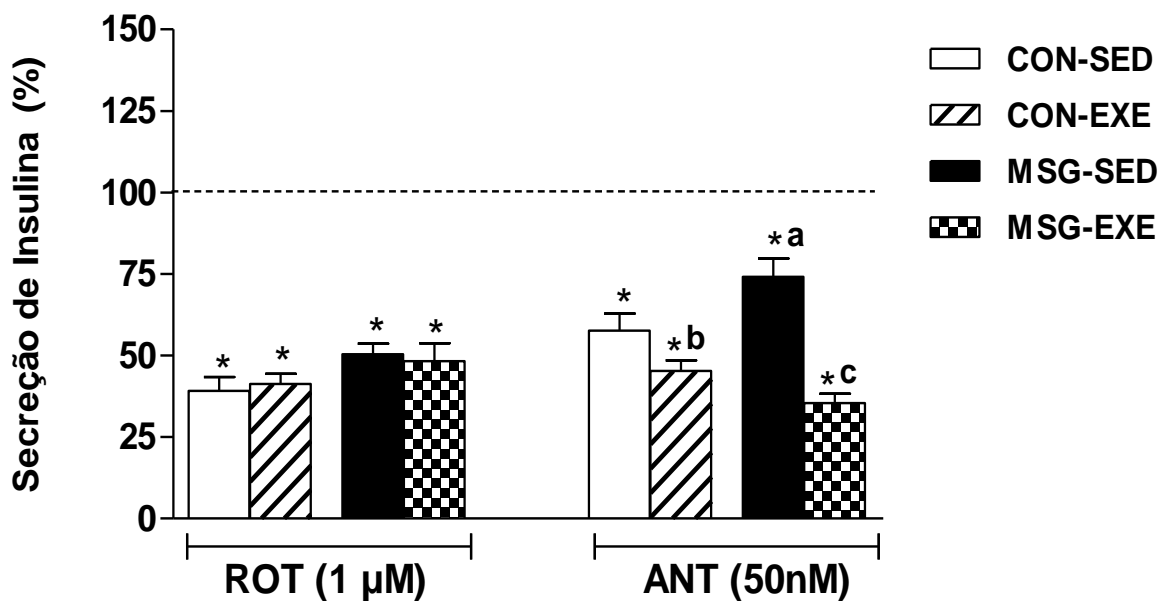


Figura 8. Efeito de inibidores mitocondriais na secreção de insulina estimulada por glicose: Ilhotas pancreáticas foram isoladas e incubadas em grupos de 4 em 1mL de Krebs contendo glicose 16,7mM na presença de ROT (1 μ M) ou ANT (50nM). As ilhotas foram obtidas a partir de um pool de ilhotas oriundas de 6 animais por grupo e tratamento. De 20-40 observações foram feitas para cada situação. Os dados representam a média \pm erro padrão da média expressos em porcentagem. A linha pontilhada representa a presença apenas da glicose 16,7mM (100%). Os símbolos acima das barras representam diferenças estatísticas de $p < 0,05$ na análise de variância ANOVA, com pós teste de *Bonferroni*. * diferente de 100%; ^aCON-SED versus MSG-SED; ^bCON-SED versus CON-EXE; ^cMSG-SED versus MSG-EXE.

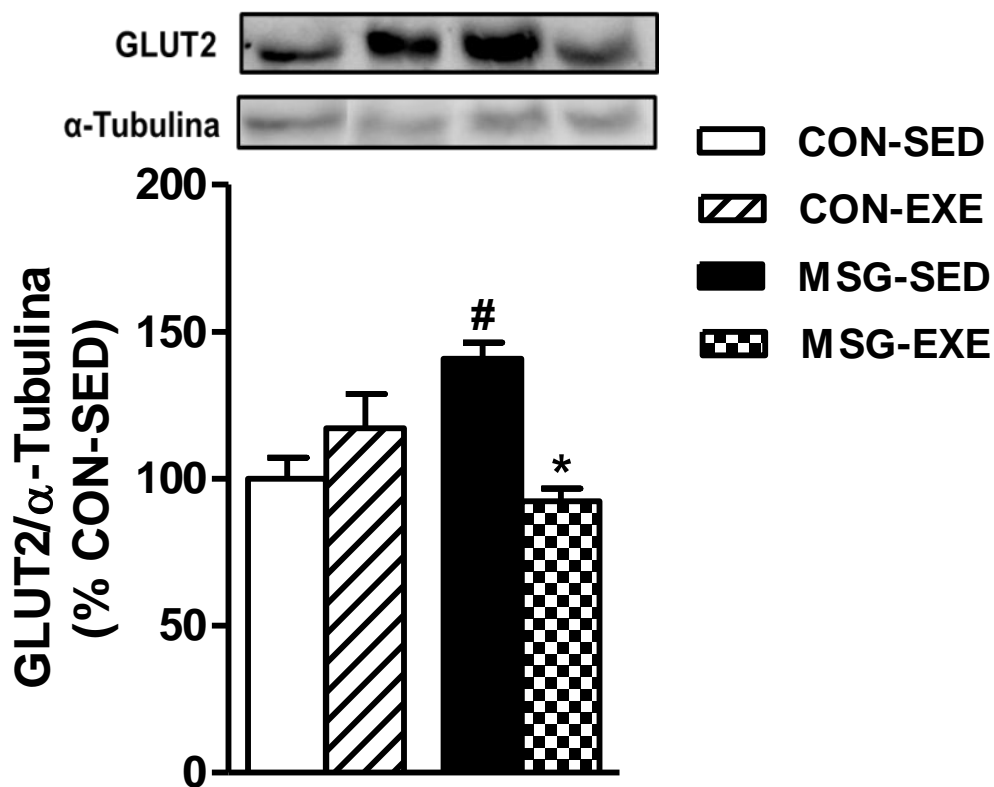


Figura 9. Expressão do GLUT₂ em ilhotas isoladas de ratos MSG-obesos e CON submetidos a natação: Análise da expressão do GLUT₂ e α -tubulina (controle interno) por western blotting em extratos proteicos oriundo de ilhotas isoladas de ratos MSG-obesos submetidos ao exercício. As barras representam média \pm erro padrão dos valores, determinados por densitometria óptica. De 100 a 150 ilhotas foram usadas para cada *pool* (n=3-6). Os símbolos acima das barras representam diferença significativa (p<0,05) no teste t de Student's. [#]CON-SED *versus* MSG-SED; ^{*}MSG-SED *versus* MSG-EXE.

5. DISCUSSÃO

5.1 Modelo de Obesidade MSG

Desde o final da década de 60, o tratamento neonatal com MSG tem sido usado para induzir a obesidade em roedores (OLNEY, 1969). O presente estudo demonstrou que animais MSG tratados apresentaram obesidade pelo aumento no Índice de Lee e elevados depósitos de tecido adiposo. Adicionalmente também foi mostrada redução do peso corporal e CNA nestes animais. Portanto este estudo confirma eficácia da administração neonatal de MSG para a indução de obesidade, assim como já reportado por outros autores (NASCIMENTO CURI *et al.*, 1991; RIBEIRO *et al.*, 1997; DOLNIKOFF *et al.*, 2001). A administração neonatal de MSG causa lesões no hipotálamo, principalmente no ARQ (OLNEY; ADAMO; RATNER, 1971) e eminência mediana. O ARQ é responsável pela síntese do hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH), então as concentrações plasmáticas do hormônio do crescimento (GH) são reduzidas em animais obesos MSG (KUBOTA; NAKAGAWA; IGARASHI, 1994). Considerando que o GH apresenta atividade lipolítica (O'NEAL *et al.*, 1999), e importantes efeitos sobre o crescimento corporal, o acúmulo de tecido adiposo e a redução do CNA encontrada em nossos ratos MSG pode ser em parte atribuído a redução do GH. Os resultados do presente estudo ainda demonstraram que ratos MSG-obesos apresentam dislipidemia, hiperinsulinemia de jejum, moderada hiperglicemia e resistência à insulina, reproduzindo o perfil da Síndrome Metabólica. Resultados similares foram obtidos com camundongos MSG-obesos que apresentam elevado nível de triglicerídeos e de VLDL (OIDA *et al.*, 1984). Estes autores sugerem que a hiperinsulinemia apresenta papel fundamental no aumento das partículas de VLDL. A dislipidemia, acompanhada de hiperinsulinemia também é observada por outros autores em ratos tratados neonatalmente com MSG (HIRATA *et al.*, 1997). Apesar do elevado nível plasmático de insulina os dados deste estudo também demonstraram leve alteração

da glicemia de jejum, indicando falha na ação homeostática da insulina e caracterizando assim um estado pré-diabético. O grau de anormalidades neuroendócrinas promovidas pelo tratamento com MSG depende da dose e da espécie (SASAKI *et al.*, 2009). Assim, frequentemente em camundongos tratados com MSG a hiperinsulinemia e hiperglicemia estão instaladas aos 90 dias (NAGATA *et al.*, 2006). Por outro lado, em ratos existem estudos mostrando hiperglicemia (MACHO *et al.*, 2000) e outros normoglicemia de jejum (BALBO *et al.*, 2007) de jejum nesta mesma idade. Independente destas variações o desajuste entre níveis de insulina circulantes e homeostase glicêmica, claramente reflete o estado de resistência à insulina. Adicionalmente, hiperinsulinemia de jejum é uma característica comum tanto em animais como humanos obesos (BRANDELERO *et al.*, 2012).

A perda da sensibilidade à insulina é um processo evolutivo ao longo do ganho de peso. Os primeiros tecidos a se tornarem resistentes à insulina são o fígado e o tecido muscular (ZEYDA; STULNIG, 2009). Corroborando com esta visão, estudos moleculares de resistência à insulina tem demonstrado que roedores MSG-obesos apresentam diminuição no conteúdo de transportadores GLUT₄ (MACHADO; SHIMIZU; SAITO, 1993) e alteração na cascata ativada pelo receptor da insulina no fígado e músculo, caracterizando a resistência nestes locais aos 90 dias (SAAD; GUNGOR; ARSLANIAN, 2005). Todavia, estes mesmos autores demonstraram que no tecido adiposo existem rotas da sinalização da insulina que estão preservadas. Este achado explica porque apesar da resistência à insulina a lipogênese é elevada nos adipócitos dos animais MSG, favorecendo o acúmulo de tecido adiposo (NASCIMENTO CURI *et al.*, 1991). É bem estabelecido o papel lipogênico da insulina (ECKEL, 1992), deste modo a hiperinsulinemia em ratos MSG-obesos induz a sobra de substratos energéticos não captados pelo fígado ou músculo a serem convertidos em triglicerídeos no tecido adiposo. Como apresentado em camundongos obesos MSG, a hiperinsulinemia pode ser causada ou agravada pela diminuição da ação da insulina nos tecidos, o que leva a RI (McMINN *et al.*, 2000).

Estudos mostram que a celularidade do tecido adiposo já está alterada em animais MSG com um mês de vida, e indicam que o desenvolvimento da obesidade

neste modelo é hipertrófica (DOLNIKOFF *et al.*, 2001), este perfil também já foi apresentado em camundongos MSG (OCHI *et al.*, 1988). Corroborando com isso, os dados deste estudo mostram que tanto depósitos de gordura visceral (mesentérica) como depósitos subcutâneos (inguinal) apresentaram elevada taxa de hipertrofia dos adipócitos, adicionalmente os dados do presente estudo também mostram diminuição no número de adipócitos dos animais MSG comparados aos CON. Estudos já demonstram que a produção de citocinas pró-inflamatórias está diretamente ligada ao tamanho do adipócito. Adipócitos pequenos tendem a ser mais sensíveis à insulina, enquanto que os adipócitos grandes se tornam mais facilmente resistentes. Isto pode ser explicado devido ao aumento exacerbado da produção de citocinas pró-inflamatórias nos adipócitos grandes, estas que agem autócrina e paracrinamente, prejudicando a cascata de sinalização da insulina neste tecido (KAHN; FLIER, 2000), sendo assim podemos sugerir que nossos animais apresentam um perfil inflamatório elevado, corroborando com ZHANG *et al.*, 2010. Em humanos e outros mamíferos o tecido adiposo branco tem função principal de armazenamento de energia, enquanto que o tecido adiposo marrom atua primariamente na produção de calor. Por sua ação termogênica o tecido adiposo marrom contribui para elevar o gasto energético, um mecanismo modulado pela atividade do SNS. Não existem estudos que apresentem o perfil histomorfológico do tecido adiposo marrom em animais obesos MSG, porém já se sabe que neste modelo este tecido é termogenicamente inativo, ou seja, sua capacidade termogênica é debilitada (YOSHIOKA; YOSHIDA; KONDO, 1991), como apresentado também em animais geneticamente obesos. Adicionalmente, estudos em modelos de obesidade induzidos por dieta hiperlipídica demonstram que o tecido adiposo marrom destes animais contém gotículas lipídicas grandes, as quais se acumulam nas células circundantes vasos, e são correlacionado com inadequado gasto energético e ganho de peso destes roedores (SAMPEY *et al.*, 2009). Estes achados corroboram com nossos resultados em adipócitos do tecido adiposo marrom de animais MSG. Adicionalmente, estes achados histomorfológicos podem também explicar a baixa taxa metabólica basal deste modelo, o que favorece a

instalação da obesidade. Esta ideia é reforçada por estudos mostrando que animais obesos apresentam redução das proteínas desacopladora do gradiente de prótons (UCP1) no tecido adiposo marrom, as quais são as principais responsáveis pela termogênese neste tecido (KOZAK; ANUNCIADO-KOZA, 2008).

Anormalidades no fígado também já foram apresentadas em animais MSG, os quais apresentam esteatose hepática macrovacuolar (MACHO *et al.*, 2000), a qual não progride para formas mais graves da doença. Estudos recentes mostram que fígados de ratos MSG apresentam acúmulo de gotas lipídicas, este mesmo estudo mensurou o conteúdo de lipídeos totais do fígado e os animais MSG apresentaram elevada taxa de lipídeos hepáticos comparado aos CON, o que caracteriza a esteatose (LAZARIN *et al.*, 2011). Estudos também mostraram que o fígado de camundongos MSG com 56 semanas de vida apresenta fibrose com infiltração de macrófagos e neutrófilos (SASAKI *et al.*, 2009). Todas estas características se assemelham ao quadro de esteatose não alcoólica encontrada em humanos obesos (LAZARIN *et al.*, 2011).

Diferentemente da obesidade induzida por *gold thioglucose* ou por *bipiperidyl mustard* as quais são associadas com hiperfagia, a obesidade nos animais MSG não é um resultado do consumo alimentar excessivo (DOLNIKOFF *et al.*, 2001). Corroborando com dados da literatura, nossos resultados mostram que ratos obesos MSG não apresentam consumo alimentar alterados, outros estudos também não atribuem a hiperfagia como fator responsável pela obesidade para este modelo (DAWSON *et al.*, 1989; BALBO *et al.*, 2000). Apesar de o núcleo ARQ ser considerado porta de entrada para os sinais oriundos do tecido adiposo, pâncreas e TGI que controlam a ingestão alimentar, a interconexão com outros núcleos hipotalâmicos é em parte responsável pela manutenção do peso corporal, como por exemplo, as conexões do LH e VMH. Assim, mesmo com a destruição do ARQ estes animais ainda mantêm a normofagia. Adicionalmente, estudos demonstram que em camundongos obesos MSG, a produção do peptídeo CART no ARQ lesionado é abalada, porém a ação anorexigênica do CART exógeno ainda é preservada (ZELEZNÁ *et al.*, 2009). Nestes animais, os peptídeos exógenos CART e NPY

podem agir através dos núcleos PVN ou LH via circuitos neuronais intactos, o que é crucial para mediar a resposta de saciedade e evitar assim a hiperfagia neste modelo.

Embora a obesidade seja uma patologia multifatorial alguns elementos são frequentes em indivíduos obesos, dentre eles destacam-se o desajuste da atividade autonômica. Indivíduos obesos e/ou resistentes à insulina apresentam elevada atividade do SNP, acompanhado de redução da atividade SNS (SAAD; GUNGOR; ARSLANIAN, 2005). Similarmente, ratos MSG-obesos também apresentam um desequilíbrio autonômico. O nervo vago (X) é o principal ramo parassimpático para o pâncreas endócrino modulando a secreção de insulina. A hiperatividade vagal é responsável pela hiperinsulinemia de jejum em ratos MSG-obesos. A vagotomia subdiafragmática em ratos MSG jovens (30 dias) impediu a hiperinsulinemia de jejum, aumentou a tolerância à glicose, a sensibilidade periférica à insulina e reduziu os depósitos de gordura, sem alterar o consumo alimentar (BALBO *et al.*, 2007). Recentemente usando uma medida direta de registro neural, estudos comprovaram a hiperatividade vagal em camundongos MSG-obesos (SCOMPARIN *et al.*, 2009). Adicionalmente, a redução da atividade simpática, bem como, do eixo simpato-adrenal encontrada em ratos e camundongos MSG-obesos explica a redução da taxa metabólica basal e favorece o acúmulo do tecido adiposo (SCOMPARIN *et al.*, 2006; ANDREAZZI *et al.*, 2011). Deste modo, o desequilíbrio autonômico tem um papel importante na instalação da obesidade e suas anormalidades em ratos tratados com MSG.

Finalmente, outros elementos participam da instalação da obesidade em ratos MSG, dentre os quais podemos citar alterações na responsividade a leptina no hipotálamo, elevados níveis de cortisol circulantes e alterações na ação e/ou liberação de hormônios incretínicos (DOLNIKOFF *et al.*, 2001; LARSEN *et al.*, 2001; FLORES *et al.*, 2006; AHRÉN, 2009).

5.2 O Efeito do Exercício Físico sobre a Obesidade

Nosso protocolo de treinamento físico não afetou o consumo alimentar. Estudos confirmam o fato do exercício físico não mudar o consumo alimentar (IRANI *et al.*, 2005), todavia o exercício foi efetivo em causar diminuição no acúmulo de tecido adiposo nos animais obesos MSG. Similares resultados foram obtidos com camundongos MSG obesos submetidos à natação iniciada precocemente (15 minutos/sessão, 3 vezes/semana, carga 2,5% do peso corporal peso corporal) (ANDREAZZI *et al.*, 2009). A magnitude da redução do tecido adiposo promovida pelo treinamento físico em roedores MSG-obesos pode ser dependente da fase do desenvolvimento do animal na qual o exercício é inserido. Camundongos MSG-obesos que iniciaram a natação logo após o desmame (21 dias) apresentam menor conteúdo de gordura quando comparados a animais sedentários e a camundongos MSG-obesos que iniciaram o treinamento aos 60 dias de vida (SCOMPARIN *et al.*, 2006), embora os dois grupos tenham nadado o mesmo período (2 meses). Outros estudos em animais obesos MSG também demonstram que a natação iniciada precocemente e mantida durante 12 semanas, com protocolos de treino contínuo (5 vezes/semana durante 45 minutos com incremento de 5% do peso corporal) ou intermitente (5 vezes/semana durante 45 minutos, sendo alternados 15 segundos de trabalho suportando sobrecarga de 15% do peso corporal com 15 segundos de repouso), foi capaz de diminuir o peso corporal e o teor de gordura na carcaça de ratos MSG-obesos (BRAGA *et al.*, 2006).

Nosso estudo demonstrou que a natação também normalizou os níveis de triglicerídeos, colesterol, insulinemia e glicemia. Roedores e humanos hiperinsulinêmicos submetidos a diferentes tipos de atividade física apresentam redução nestes parâmetros, mas a taxa de diminuição depende da duração e intensidade do treino (TORGAN *et al.*, 1993; KRETSCHMER *et al.*, 2005). A diminuição dos depósitos de tecido adiposo é relacionada à normalização dos níveis plasmáticos da insulina de jejum, uma vez que já se sabe que a insulina é um sinal de adiposidade, assim como a leptina (SCHWARTZ; PORTE, 2005). Em adição, o

exercício físico também diminui o nível de citocinas pró-inflamatórias e aumenta o nível das anti-inflamatórias liberadas pelos adipócitos (BRANDT; PEDERSEN, 2010).

Durante o exercício físico ocorrem modulações do SNA como o aumento da atividade do SNS e concomitante ativação do eixo simpato-adrenal, o que promove elevação da concentração de norepinefrina e noradrenalina. Já é bem descrito o papel das catecolaminas em promover lipólise e glicogenólise, mobilizando desta forma substratos energético para sustentar a demanda requerida pelo exercício (SCHEURINK *et al.*, 1992). Assim, a redução de tecido adiposo nos animais exercitados pode ser justificada pela ativação do SNS. Animais MSG obesos apresentam desregulação autonômica, com super ativação do SNP e diminuição do SNS (SCOMPARIN *et al.* 2006), esta desregulação contribui para a baixa taxa metabólica basal e para o acúmulo de tecido adiposo. Estudos em camundongos MSG mostram que a natação regular aumenta a atividade do SNS, e restaura o eixo simpato-adrenal (SCOMPARIN *et al.* 2006). Adicionalmente, os nossos animais exercitados apresentaram redução nos níveis de insulina plasmática, o que pode contribuir em parte pela redução de tecido adiposo nestes animais, uma vez que este hormônio é lipogênico, e sua diminuição favorece a lipólise (SCHERER *et al.*, 2011).

Um dos maiores benefícios que o exercício físico regular promove para indivíduos com obesidade e DM2 é a manutenção da homeostase glicêmica, através do aumento da sensibilidade periférica dos tecidos à insulina (BAJPEYI *et al.*, 2009). A diminuição da concentração de insulina plasmática de jejum mostrada no presente estudo em ratos exercitados pode ser explicada pelo aumento da sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos. Sugere-se que dois mecanismos podem estar envolvidos no aumento da sensibilidade à insulina promovida pelo exercício. A primeira possibilidade esta relacionada à diminuição da produção das citocinas pró-inflamatórias oriundas do tecido adiposo, visto que, a natação reduz o tecido adiposo (GUILHERME *et al.*, 2008). A segunda possibilidade envolve a ativação da enzima AMPK durante o exercício principalmente no músculo esquelético. A enzima AMPK medeia diversos processos celulares e metabólicos, dentre eles destaca-se sua

capacidade de promover a oxidação de ácidos graxos e o aumento da captação de glicose pelo músculo independentemente da insulina (RICHTER; RUDERMAN, 2009). Obesos e indivíduos com DM2 apresentam atenuada indução do AMPK durante o exercício, e diminuição da atividade total e fosforilação do AMPK (SRIWIJITKAMOL *et al.*, 2006). Estudos demonstram que o exercício aumenta a atividade do AMPK dependentemente da duração e intensidade do treino, estes mesmos autores sugerem que o exercício de moderada a alta intensidade estimulam a via de ativação do AMPK em obesos nos mesmos níveis que em indivíduos magros (SRIWIJITKAMOL *et al.*, 2007).

O protocolo de exercício utilizado no presente diminuiu a taxa de hipertrofia e aumentou o número de adipócitos em ambos depósitos, mesentérico e inguinal, tanto em animais CON como MSG, reforçando novamente a capacidade do exercício físico iniciado precocemente em atenuar os distúrbios da obesidade. Estudos recentes demonstram os efeitos benéficos do exercício não somente na redução da massa do tecido adiposo, mas também na diminuição do tamanho dos adipócitos e da acumulação lipídica no fígado em camundongos obesos (JEONG; YOON, 2012), corroborando com nossos resultados. Além disso, Liang *et al.*, 2012 mostraram que a natação regular realizada diariamente com duração de 1 hora em ratos foi capaz de aumentar a densidade de GLUT₄ nas membranas totais dos adipócitos, indicando melhora nas vias de sinalização da insulina.

Recentes estudos ainda sugerem que o conteúdo e a funcionalidade do tecido adiposo marrom pode ser um preditor independente de sensibilidade à insulina e sendo assim apresenta papel fundamental na proteção contra a obesidade em humanos (CYPESS *et al.*, 2009). Adicionalmente, estudos reportam que camundongos obesos submetidos à corrida apresentam diminuição da hipertrofia do tecido adiposo marrom acompanhado do aumento da expressão da proteína UCP1. Estas alterações podem melhorar a função do tecido adiposo marrom, diminuindo a adiposidade, anormalidades metabólicas e ainda promover adipogênese destas células (XU *et al.*, 2010). Em humanos, a UCP1 é presente em neonatos, mas foi considerada até recentemente diminuída ou inexistente em adultos, evidências

demonstram que um tipo adipócitos de marrom distinto existe dentro de depósitos de gordura branca, além disso, estes depósitos adiposos aparentemente brancos podem ser submetidos a uma mudança de cor a partir do esbranquiçado ao acastanhado. Este processo de "escurecimento" é acompanhado por um grande aumento na expressão do gene da UCP1 (WU *et al.*, 2012). Sendo assim, sugere-se que o exercício físico pode estar de certa forma modulando a organização celular do tecido adiposo branco e marrom, contribuindo para atenuação da instalação da obesidade e síndrome metabólica.

O presente trabalho também demonstrou que a natação regular promove uma melhora no perfil morfológico hepático em ratos MSG obesos. Confirmando os resultados deste trabalho, estudos com modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica demonstram a capacidade de o exercício físico regular diminuir o acúmulo de gotas lipídicas no fígado, combatendo a esteatose hepática não alcoólica (BERGLUND *et al.*, 2011).

Em suma, os resultados deste trabalho mostram que a natação moderada, iniciada logo após o desmame, atenua a instalação da obesidade induzida pelo tratamento neonatal com MSG, melhora o controle glicêmico, restaura o perfil funcional do tecido adiposo e do fígado, combate a dislipidemia e restabelece a sensibilidade a insulina.

5.3 Metabolismo da glicose, Secreção de Insulina e Exercício

Físico

A RI e a hipersecreção de insulina são características da obesidade e DM2. Os mecanismos fisiológicos que determinam esta compensação nas células β pancreáticas permanecem obscuros, porém eles têm sido amplamente estudados em modelos de obesidade em roedores, os quais também apresentam as mesmas características que humanos obesos e DM2 (MEZGHENNA *et al.*, 2011).

Experimentos demonstram que ilhotas isoladas de camundongos MSG apresentam aumento na secreção de insulina estimulada por glicose a 16,7 mM

comparados a ilhotas de animais CON (BALBO *et al.*, 2000). De acordo com os autores a hipersecreção de insulina pelas ilhotas sustenta a hiperinsulinemia plasmática destes animais (BALBO *et al.*, 2002).

Ilhotas pancreáticas isoladas de ratos MSG-obesos também apresentam maior responsividade a glicose (BALBO *et al.*, 2007; ANDREAZZI *et al.*, 2011) um achado confirmado em nosso estudo. Estudos indicam que hipersecreção de insulina pelo pâncreas endócrino é uma adaptação fisiológica inicial no intuito de superar a resistência periférica a insulina e preservar a homeostase glicêmica, evitando a instalação definitiva do DM2 (CARVALHEIRA *et al.*, 2002). Porém, a sobrecarga de trabalho das células β pancreáticas pode acelerar o processo de deterioração da função secretora induzindo a apoptose de células β (NAGATA *et al.*, 2006).

Até o presente momento não existem estudos que expliquem as causas da hipersecreção de insulina em ilhotas de ratos MSG-obesos. Porém alguns dados indicam que o aumento da atividade parassimpática pode estar envolvido neste processo. A vagotomia subdiafragmática precoce evita as alterações na responsividade a glicose em ilhotas de ratos MSG-obesos. Adicionalmente, estudos têm demonstrado que ilhotas pancreáticas de ratos MSG-obesos também apresentam alterações na responsividade aos efeitos colinérgicos e adrenérgicos (MARÇAL *et al.*, 2006; GRASSIOLLI; GRAVENA; FREITAS MATHIAS, 2007).

A secreção de insulina estimulada por glicose é desencadeada na célula β por meio da geração e amplificação de sinais. A via de desencadeamento é bem caracterizada e também conhecida como via dependente, a qual envolve o fechamento dos canais de K^+_{ATP} e influxo de Ca^{+2} . Esta via somente ocorre quando a glicose é metabolizada e tem-se a geração de ATP e o fechamento dos canais de K^+_{ATP} (HENQUIN, 2000). Os mecanismos celulares subjacentes à via de amplificação independente ainda são em grande parte desconhecidos, independente porque mesmo sem o fechamento dos canais K^+_{ATP} e sem o influxo de Ca^{2+} a mobilização dos grânulos de insulina ocorre. Estudos recentes, contudo, mostram que esta via de amplificação, a via independente, é envolvida em ambas as fases de

secreção de insulina e poderia ser responsável por não menos do que 50% da resposta (HENQUIN, 2009).

Estudando as vias dependentes e independentes da glicose sobre os canais de K^+_{ATP} em ilhotas isoladas de ratos MSG-obesos Grassioli *et al.* 2006 demonstraram que a participação dos canais de K^+_{ATP} estão normais em ilhotas isoladas. Todavia, estes autores encontraram uma redução da via independente dos canais de K^+_{ATP} em ilhotas de ratos MSG-obesos. Deste modo estudos sobre o metabolismo da glicose poderiam explicar as anormalidades secretoras em ilhotas de ratos MSG-obesos. Conforme discutido posteriormente, usando bloqueadores do metabolismo da glicose, o presente trabalho apresenta diferenças entre ilhotas de ratos MSG-obesos e magros. Estes dados são os primeiros a demonstrarem que o metabolismo da glicose está alterado em ilhotas de ratos MSG-obesos e pode, portanto explicar, pelo menos em parte, a hipersecreção de insulina encontrada neste modelo.

Os benefícios do exercício citados anteriormente se referem ao efeito indireto da melhora da homeostase glicêmica e perfil lipídico na função da célula β , poucos estudos avaliam o efeito direto do exercício físico sobre a função das ilhotas pancreáticas, em especial da célula β . Existem evidências que o exercício físico modula outras funções do pâncreas endócrino, como o metabolismo da glicose, reduzindo a secreção de insulina estimulada por glicose, apesar de apresentar elevado conteúdo de insulina total na ilhota (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Os efeitos do exercício nas adaptações da célula β e na secreção de insulina não são bem estabelecidos, porém parecem estar ligados ao tipo, frequência e duração do treinamento (BRAGA *et al.*, 2006).

O protocolo de exercício utilizado induziu a diminuição da liberação de insulina em ilhotas de ratos isoladas, porém a magnitude desta diminuição foi maior em ilhotas de animais CON-EXE que em MSG-EXE. Alguns estudos sugerem que a diminuição da secreção também pode estar relacionada com o aumento da sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina, poupando desta forma a produção exacerbada da mesma e preservando assim a função das ilhotas através da redução

do estresse associado ao processo secretório da insulina (CALEGARI *et al.*, 2012), uma vez que já é bem descrito o efeito do exercício no aumento da sensibilidade periférica à insulina (JAMES *et al.*, 1983; KENNEDY *et al.*, 1999; LUCIANO *et al.*, 2002; ZOPPI *et al.*, 2011).

Além disso, a secreção de insulina *in vivo* é modulada por diversos fatores, os quais incluem o eixo simpático e parassimpático. Uma explicação para a diminuição da secreção de insulina nos animais exercitados seria o aumento da atividade do eixo simpático (SCHEURINK *et al.*, 1989), o que promoveria a inibição da secreção de insulina *in vivo*, a longo prazo esta adaptação poderia promover a plasticidade da ilhota pancreática à elevadas concentrações de glicose circulante, o que de certa forma pouparia a ilhota da sobrecarga de trabalho. Estudos em ilhotas isoladas de animais submetidos ao exercício contínuo tem demonstrado inibição da secreção de insulina estimulada por glicose devido a estimulação dos receptores α_2 adrenérgicos, os quais são aumentados na presença de epinefrina e norepinefrina (URANO *et al.*, 2004).

O efeito do exercício na diminuição da secreção de insulina estimulada por glicose em animais magros é evidenciada em diversos trabalhos (CALEGARI *et al.*, 2011; ZOPPI *et al.*, 2011). ZOPPI *et al.*, 2011 reporta que a corrida em esteira com duração de 60 minutos e com 5 sessões semanais diminuiu a secreção de insulina estimulada por glicose em cerca de 50% (2,8mM e 16,7 mM). Corroborando com nossa hipótese de elevada ativação simpática envolvida nesta resposta adaptativa, Scomparin *et al.* 2009 e 2011, reportam que camundongos MSG submetidos a natação tem aumento da atividade simpática, bem como do eixo simpato-adrenal. Este aumento da atividade do SNS promovido pela prática do exercício físico poderia desta forma modular a secreção de insulina em roedores exercitados, diminuindo assim a secreção de insulina estimulada por glicose. Entretanto, alguns estudos contestam a participação simpática na redução da secreção de insulina em ilhotas de ratos exercitados. Estes estudos demonstram que a secreção de insulina estimulada por glicose ou arginina pode sofrer dessensibilização dos efeitos inibitórios provocados pela norepinefrina (DELA *et al.*, 2004). Adicionalmente, a

diminuição da secreção de insulina em animais submetidos ao treinamento físico pode ser devido a diminuição da atividade da glicoquinase e utilização de glicose, o que reduz conseqüentemente a produção de ATP na célula β , reduzindo assim a secreção de insulina estimulada por glicose em ratos exercitados (KORANYI *et al.*, 1991).

Entretanto, os efeitos do exercício sobre a secreção de insulina em ilhotas isoladas de animais obesos e DM2 não tem sido tão consistentes quanto em ilhotas de ratos magros. Por exemplo, estudos em ratos Zucker, os quais apresentam obesidade e DM2 demonstram a capacidade do exercício voluntário em aumentar a secreção de insulina estimulada por glicose (DELGHINGARO-AUGUSTO *et al.*, 2011). Estudos de Park *et al.*, 2007 demonstram que a diferença de responsividade a glicose em ilhotas de ratos obesos e/ou diabéticos ao exercício físico pode estar envolvida na capacidade de reserva funcional da célula β pancreática. Segundo estes autores o estado prévio da célula β pancreática ao iniciar a atividade pode ser importante para as adaptações ao treinamento, ou seja, as respostas podem oscilar se o indivíduo for pré ou diabético.

Reforçando a observação de Park *et al.*, 2007 outros autores tem demonstrado diferentes respostas a glicose em roedores MSG submetidos ao exercício. Andreazzi *et al.*, 2009, submeteram camundongos MSG a natação e as ilhotas apresentaram maior responsividade à glicose quando comparados aos animais sedentários. A diferença de resposta ao exercício em diferentes estudos pode ser explicada pela diferença do estágio do quadro patológico dos roedores. Camundongos tratados neonatalmente com MSG desenvolvem DM2 mais rápido que ratos tratados com MSG, indicando que a disfunção pancreática é mais severa em ilhotas de camundongos MSG obesos. Desta forma, sugere-se que o impacto do exercício físico na secreção de insulina estimulada por glicose é dependente do protocolo de treinamento aplicado e do estado funcional das células β pancreáticas. A modulação da secreção de insulina e a preservação da sensibilidade periférica ao hormônio pelo programa de exercício pode representar um caminho para o tratamento não farmacológico da obesidade e DM2.

Existem poucos estudos sobre a histomorfologia e a quantidade de células β em ratos MSG. Estudos realizados em 1985 demonstraram que o conteúdo de insulina imunorreativa no pâncreas de camundongos MSG de 3 a 5 meses de vida é elevado em relação aos controles (NAKAJIMA *et al.*, 1985). Estudos mais recentes contrapõem estes resultados e apresentam que o número de células β imunorreativas à insulina é preservado em ilhotas de camundongos MSG aos 70 dias de vida (MORRISON *et al.*, 2007). Adicionalmente, estudos mostram que a morfologia das ilhotas de ratos controle são mais regulares e arredondadas do que as de animais MSG, e que as ilhotas deste modelo de obesidade aos 6 meses de idade apresentam fibrose, acúmulo de gotas lipídicas e diminuição de tamanho (LI *et al.*, 2006). Estas diferenças podem estar relacionadas com a espécie dos animais e o tempo de vida no ato do experimento.

Em outros modelos de obesidade em roedores a hiperplasia e a hipertrofia das ilhotas pancreáticas contribuem para os elevados níveis de insulina circulantes (HARISHANKAR *et al.*, 2011; JAWORSKI *et al.*, 2011). Uma das estratégias que o pâncreas endócrino utiliza para vencer a RI é aumentar a massa das células β (VIVAS *et al.*, 2011). O presente estudo demonstrou que ilhotas pancreáticas de ratos MSG-obesos apresentam hipertrofia em relação aos controles. A hiperatividade vagal pode promover hiperplasia das células β pancreáticas (LAUSIER *et al.*, 2010), deste modo, sugerimos que o aumento da atividade parassimpática característica de ratos MSG-obesos pode estar envolvido neste processo de proliferação das células β e pode ser em parte responsável pelo perfil hiperinsulinêmico destes animais.

Adicionalmente, o nosso protocolo de exercício foi capaz de reduzir a hipertrofia de ilhotas pancreáticas. Trabalhos que mostrem o efeito do exercício na morfologia de ilhotas de animais obesos e DM são escassos e contraditórios. Estudo realizado por Huang *et al.*, 2011 demonstrou que o exercício voluntário em camundongos DM não alterou a morfologia nem o diâmetro das ilhotas, porém o conteúdo de insulina total foi aumentado em animais exercitados. Em contra partida, corroborando com nossos resultados Park; Hong; Sung, 2008 também demonstraram que a corrida em esteira reduz a hipertrofia das ilhotas e estimula a proliferação das

células β em ratos diabéticos. Estudos reportam que o treinamento físico melhora a sobrevivência das células β através da ativação das vias de sinalização das proteínas AKT e ERK 1/2, o que está relacionado com a melhora das vias anti-apoptóticas e com a supressão das vias pró-apoptóticas (CALEGARI *et al.*, 2011).

O controle da secreção de insulina pela célula β pancreática pode ser modulado pela captação da glicose via transportador GLUT₂. A diminuição da expressão dos transportadores de glicose GLUT₂ é observada na instalação do franco DM2 e está correlacionado com a diminuição de secreção de insulina nestes pacientes a longo prazo (GUERRA *et al.*, 2005), porém este efeito já pode ser observado na célula β em humanos e roedores os quais apresentam obesidade e pré-diabetes, com concomitante hiperglicemia e alterada responsividade à glicose (OHNEDA *et al.*, 1993). Interessantemente a diminuição do GLUT₂ neste estágio patológico não se correlaciona com a hipersecreção de insulina nestes indivíduos, desta forma a expressão do GLUT₂ nem sempre pode estar relacionada diretamente ao perfil secretório de insulina de ilhotas pancreáticas. Até o presente momento não existem estudos que demonstrem a expressão de GLUT₂ em ilhotas pancreáticas de animais obesos MSG. Conforme demonstram nossos dados, ilhotas de ratos MSG-obesos apresentam maior expressão do GLUT₂ o que pode estar envolvido com a hipersecreção de insulina. Adicionalmente, o exercício modula a expressão de GLUT₂ em ilhotas em diversos modelos de roedores, porém não existe consenso sobre o efeito do exercício nesta modulação, reforçando esta observação, Ueda *et al.*, 2003 submeteram ratos diabéticos Goto-Kakazaki ao treinamento físico de corrida durante 9 semanas e a expressão de GLUT₂ foi significativamente reduzida em ilhotas isoladas. Por outro lado, Calegari *et al.*, 2011 os quais submeteram ratos magros ao treino em esteiras, mostraram que a expressão de GLUT₂ é proporcional a frequência do treino, ou seja, quanto mais treinado o animal, maior é a expressão dos transportadores de glicose GLUT₂. Os dados de Ueda *et al.*, 2003 em ilhotas de ratos diabéticos corroboram com a diminuição da expressão do GLUT₂ em ilhotas de ratos treinados em relação aos seus respectivos sedentários. Interessantemente em ambos os trabalhos, corroborando novamente com nossos dados, a secreção de

insulina estimulada por glicose foi reduzida em animais exercitados. Assim, a expressão de GLUT₂ em ilhotas isoladas de roedores exercitados não necessariamente está relacionada com a responsividade à glicose nestes animais.

A captação de glicose nas ilhotas pancreáticas inicia uma cascata de eventos culminando na liberação de insulina pelas células β . Um componente chave para este processo de liberação de insulina é a geração de ATP oriundo do metabolismo da glicose (HOWELL; MONTAGUE; TYHURST, 1975; SPEIER *et al.*, 2005; TARASOVI *et al.*, 2012). A produção de ATP citosólico é oriunda de duas reações na porção distal da glicólise, através das enzimas fosfoglicerato quinase e piruvato quinase. O ATP citosólico bloqueia os canais K^+_{ATP} levando a despolarização da membrana celular e abrindo os canais de Ca^{2+} voltagem dependentes o que promove o influxo de Ca^{2+} . A despolarização também induz a liberação de Ca^{2+} oriundo do retículo endoplasmático, contribuindo assim para elevação do Ca^{2+} intracelular (ROE *et al.*, 1993; SEINO, 2012). A secreção de insulina resulta destas mudanças no Ca^{2+} intracelular. Adicionalmente, os cofatores NADH e $FADH_2$ oriundos da glicólise também são responsáveis pela produção do ATP mitocondrial, estes co-fatores são disponibilizados à cadeia transportadora de elétrons mitocondrial pelas lançadeiras malato-aspartato e gliceraldeído-fosfato, as quais são extremamente ativas nas ilhotas. Finalmente a maior porção da produção de ATP vem da oxidação mitocondrial do piruvato derivado da glicólise (ANTINOZZI *et al.*, 2002).

5.3.1 Glicólise

O fluxo glicolítico é regulado por enzimas chaves, dentre estas a GK (MATSCHINSKY, 1996). Os passos iniciais da glicólise foram bioquimicamente caracterizados e modelados computacionalmente, levando a proposta que a atividade destas enzimas chaves determinam os padrões secretórios oscilatórios da célula β (JUNG *et al.*, 2000). Camundongos induzidos ao DM1 pelo tratamento com aloxana e ratos obesos Zucker apresentam diminuição da expressão da enzima GK

(DHANESHA *et al.*, 2012; FUTAMURA *et al.*, 2012) o que pode estar pelo menos em parte, relacionado com a alteração da responsividade à glicose nestes modelos. Não existem estudos demonstrando a expressão desta enzima em ilhotas de ratos MSG, tão pouco estudos que reportem o efeito do exercício nas vias de metabolismo da glicose neste modelo.

Os resultados do presente trabalho demonstram que na presença do bloqueador glicolítico IAA a secreção de insulina estimulada pela glicose foi reduzida pela metade em ilhotas de todos os grupos experimentais, comprovando a importância da glicólise para a secreção de insulina. Este fármaco bloqueia a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, responsável pela conversão do gliceraldeído-3-fosfato a 1,3 bifosfoglicerato e formação conseguinte de piruvato, conseqüentemente a geração de ATP e NADH glicolítico é bloqueada. Desta forma, corroborando com MERTZ *et al.*, 1996 podemos enfatizar a importância do ATP glicolítico no processo de secreção de insulina. Apesar da glicólise na célula β produzir somente 1/6 do total de ATP derivado da oxidação completa da glicose, o fato da contribuição deste ATP ser muito maior que o ATP oriundo do ciclo AT ainda permanece controversa (MATSCHINSKY; ELLERMAN, 1973; MALAISSE; SENER, 1987; NEWGARD; MCGARRY, 1995).

Já foi reportado que o NADH proveniente da glicólise e processado a ATP pela operação das lançadeiras transmitocondriais é essencial para o aumento do ATP citosólico e subsequente fechamento dos canais K^+_{ATP} e indução da despolarização da membrana e oscilações na concentração intracelular de Ca^{2+} (DUKES *et al.*, 1994). Os equivalentes redutores do NADH devem atravessar a membrana mitocondrial para gerar ATP através da fosforilação oxidativa. E isto é possível através dos sistemas de lançadeiras: a lançadeira malato-aspartato e a glicerol-fosfato. As lançadeiras carregam equivalentes redutores do NADH citosólico para as mitocôndrias, a lançadeira malato-aspartato entrega os equivalentes redutores do NADH para o complexo I da cadeia de transporte de elétrons, enquanto que a lançadeira glicerol-3-fosfato os entrega para a ubiquinona e então, para o complexo III. A célula β utiliza principalmente este mecanismo para oxidar NADH a

NAD^+ e aumentar desta forma o fluxo glicolítico e sustentar a secreção de insulina. A glicerol fosfato desidrogenase mitocondrial é 60 vezes mais ativa nas ilhotas do que no fígado e 10 vezes mais ativa nas células β do que nas outras células da ilhota pancreática, sugerindo que esta desidrogenase apresenta papel fundamental na secreção de insulina (MACDONALD, 1981).

Este trabalho demonstrou que a inibição glicolítica provocada pelo IAA foi mais acentuada em ilhotas de ratos MSG-obesos em relação a ilhotas de ratos magros. Este dado demonstra pela primeira vez que o fluxo glicolítico parece estar mais acelerado em ilhotas pancreáticas de ratos MSG-obesos, um evento que poderia estar envolvido na hipersecreção de insulina existente neste modelo. Similares resultados também foram obtidos pela adição de IAA em ilhotas isoladas de camundongos ob/ob, um modelo de obesidade e diabéticos de origem genética (WESTERLUND; BERGSTEN, 2001). Nossos resultados também corroboram com Liu *et al.*, 2002 demonstrando que ilhotas pancreáticas de ratos Zucker obesos apresentam vias glicolíticas e oxidativa aceleradas, segundo estes autores esta aceleração pode ser responsável para a hiperfunção pancreática em modelos de obesidade.

Finalmente, nós não encontramos alterações na responsividade ao bloqueador glicolítico IAA em ilhotas de ratos exercitados em ambos os grupos experimentais. Este dado sugere que a redução da resposta a glicose observada em ilhotas de ratos treinados não pode ser atribuída a alterações da via glicolítica. Não existem estudos abordando esta regulação em ilhotas de ratos exercitados, magros ou obesos. Outros elementos podem estar envolvidos na adaptação do pâncreas ao exercício, conforme mostraremos a seguir alterações nas vias mitocôndriais parecem participar destes processos.

5.3.2 Ciclo do AT

A importância do ciclo do AT na secreção de insulina estimulada por glicose apresenta resultados contraditórios, autores como Mertz *et al.*, 1996 e Dukes *et al.*,

1994, defendem a supremacia da glicólise na secreção de insulina estimulada por glicose, enquanto que Ortstater; Liss; Akerman, 2002 defendem a importância do metabolismo oxidativo. Adicionalmente, outros autores ainda sugerem que certos intermediários do ciclo do AT não estimulam a secreção de insulina quando aplicados isoladamente como combustíveis em ilhotas isoladas, em contra partida quando estes intermediários são aplicados em combinação uns com os outros eles podem estimular fortemente a secreção de insulina (MacDONALD *et al.*, 2007). Corroborando com Mertz *et al.*, 1996 nossos resultados demonstram que a secreção de insulina estimulada por glicose não foi significativamente afetada na presença dos fármacos α -CHC e SF, os quais bloqueiam o ciclo do AT em ilhotas pancreáticas de animais CON-SED. A ausência de efeitos dos fármacos α -CHC e SF no controle secretor de insulina em ilhotas de ratos magros também foi confirmada por Schofl *et al.* 2000. α -CHC e SF atuam diretamente no bloqueio do ciclo do AT, já que o α -CHC inibe a importação do piruvato para o interior da mitocôndria e o SF bloqueia a enzima aconitase, inibindo assim a metabolização do Acetil-Coa. Conseqüentemente, os equivalentes reduzidos (NADH e FADH₂) do ciclo do AT não são gerados, tão pouco as moléculas de GTP oriundas do mesmo. Estudos já demonstram que o ATP gerado indiretamente durante o ciclo do AT através dos coeficientes reduzidos não atua no fechamento dos canais K⁺_{ATP}, e não promove o aumento do Ca²⁺ citossólico (DUKES *et al.*, 1994), segundo mensageiro chave para a mobilização dos grânulos de insulina na célula β . Desta forma, nós sugerimos que o ciclo do AT não apresenta papel crucial na geração de energia para a secreção de insulina estimulada por glicose. Similarmente estudos têm demonstrado que a adição do piruvato, mesmo em elevadas concentrações não afeta a secreção de insulina (ALCAZAR; TIEDGE; LENZEN, 2000). Considerando a importância dos cofatores NADH e FADH₂ oriundos do ciclo do AT para a fosforilação oxidativa esta contradição tem sido denominada de “Paradoxo do Piruvato” (MACDONALD; JOSEPH; RORSMAN, 2005). Em contraste o gliceraldeído, o qual age tanto como combustível citossólico como mitocondrial é um potente secretagogo (ASHCROFT; WEERASINGHE; RANDLE; 1973; ALCÁZAR *et al.*, 1995). O piruvato derivado da

glicólise, o qual é importado a mitocôndria e então convertido a Acetil-Coa ou Oxalacetado dando assim entrada ao ciclo do AT tem sido então apresentado como um não estimulador da secreção de insulina (ZAWALICH; ZAWALICH, 1997), ou seja, o ponto crucial do metabolismo da glicose para o disparo da secreção da insulina está embutido no metabolismo da glicose até a formação do piruvato. Entretanto, apesar da incapacidade do piruvato em estimular a secreção de insulina ele apresenta a propriedade de potencializar a mesma em adição a glicose (SENER *et al.*, 1978), fato que não pode ser explanado com clareza. O paradoxo do piruvato ajuda a afirmar a importância da glicólise para a secreção de insulina estimulada por glicose, como apresentado em nossos resultados.

Nosso estudo ainda demonstra pela primeira vez que a presença do α -CHC e SF não altera a secreção de insulina em ilhotas de animais exercitados CON-EXE e MSG-EXE e, portanto alterações do ciclo do AT, não parecem estar envolvidas na redução da responsividade a glicose encontrada em nossos dados.

Além disso, em ilhotas de ratos MSG-SED a adição de α -CHC apresentou uma ação antagonica, potencializando a secreção de insulina estimulada por glicose. Tal efeito pode ser explicado pelas diferentes rotas bioquímicas para o metabolismo do piruvato. A adição do α -CHC bloqueia a importação do piruvato a mitocôndria impedindo sua conversão a Acetil-Coa pela PDH, bem como evita sua conversão a oxalacetato pela PC, visto que ambas enzimas são mitocôndrias. Deste modo, na presença do α -CHC o piruvato acumula no citosol onde poderá ser convertido a lactato pela enzima LDH. A importância desta rota citosólica do piruvato para o controle secretor de insulina é contraditória. Existem estudos que demonstram baixa expressão de LDH em linhagens secretoras de insulina INS-1 e em células β (SEKINE *et al.*, 1994). Segundo estes autores isto pode ser importante para garantir o direcionamento do piruvato oriundo do fluxo glicolítico para o ciclo do AT e consequente manutenção do metabolismo mitocondrial oxidativo (FRIDLAND; PHILIPSON, 2010) e sustentação da secreção de insulina. Porém estudos demonstram que a superexpressão de LDH em células INS-1 não altera secreção de insulina estimulada por glicose (ISHIHARA *et al.*, 1999), considerando que esta seja

uma linhagem celular são necessários mais estudos para averiguar a importância da expressão da LDH na célula β e a sua influência na modulação da secreção de insulina. Desta forma, sugere-se que ilhotas pancreáticas de ratos MSG-obesos apresentam alteração na via da LDH, o que poderia aumentar a renovação dos cofatores NAD^+ e conseqüentemente acelerar o fluxo glicolítico e assim aumentar a produção de ATP derivada da glicólise o que estimularia a secreção de insulina.

5.3.3 Cadeia de Transporte de Elétrons

A função crucial da mitocôndria na secreção de insulina estimulada por glicose tem sido destacada em investigações de DNA mitocondrial em cultura de células de linhagens secretoras de insulina (INS-1). Em humanos raras mutações no DNA mitocondrial estão relacionadas com a debilidade da secreção de insulina e ao surgimento do diabetes mitocondrial. No DM2 polimorfismos de genes mitocondriais específicos são associados à diminuição da resposta a glicose. Adicionalmente, anormalidades morfométricas e diminuição do número de mitocôndrias têm sido observadas em portadores do DM2 (DENG *et al.*, 2004).

A cadeia de transporte de elétrons é responsável pela geração da maior parte do ATP em todos os tipos celulares, inclusive na célula β , além disso através da hiperpolarização da membrana mitocondrial, durante o aumento do fluxo na cadeia de transporte de elétrons, a concentração de Ca^{2+} na matriz mitocondrial aumenta o que ativa desidrogenases sensíveis ao Ca^{2+} as quais atuam no metabolismo da glicose, o que de certa forma modula a secreção de insulina estimulada por glicose (WOLLHEIM, 2000).

É bem demonstrado que ilhotas de sujeitos com DM2 apresentam baixa produção de ATP em resposta a estimulação aguda com glicose. Conseqüentemente, a razão ATP/ADP aumenta somente em 60% em ilhotas de diabéticos comparadas a ilhotas controle, e isto pode contribuir para a resposta debilitada de secreção de insulina ao estímulo da glicose (ANELLO, 2005). Além disso, as células β de indivíduos com DM2 exibem reduzido número de mitocôndrias. Isto indica que células β de DM2 exibem anormalidades no

metabolismo da glicose e na estrutura mitocondrial o que resulta na falha da produção de ATP e secreção de insulina estimulada por glicose (MARCHETTI, 2010). A função debilitada da célula β já pode ser observada em estados pré-diabéticos. Interessantemente, este defeito não se limita a indivíduos com níveis anormais de glicose após o teste de sobrecarga de glicose, mas também pode ser observado em indivíduos com leve incremento da glicemia plasmática de jejum (CRETTI *et al.*, 2001).

Nosso trabalho é o primeiro a investigar o metabolismo mitocondrial em ilhotas de animais MSG, bem como, a avaliar o efeito do exercício sobre o metabolismo mitocondrial neste modelo. Os fármacos ROT e ANT bloqueiam respectivamente os sítios I e III da cadeia de transporte de elétrons (RAGAN, 1973; SUGANO, 1974), estudos prévios reportaram que estes fármacos impedem a produção de ATP oriunda da cadeia transportadora de elétrons, consequentemente impedindo o fechamento dos canais de K^+_{ATP} e o aumento do Ca^{2+} citossólico em ilhotas isoladas de camundongos inibindo a secreção de insulina estimulada por glicose (DUKES *et al.*, 1994). Corroborando com estes dados nosso estudo demonstrou que a adição de ROT ou ANT inibem a secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas pancreáticas isoladas de todos os grupos experimentais. Adicionalmente, nossos achados com estes bloqueadores mitocondriais também reforçam a importância das lançadeiras malato-aspartato e glicerol-fosfato nas ilhotas pancreáticas, visto que, conforme descrito anteriormente estas lançadeiras transferem os NADH da glicólise para os complexos mitocondriais (MACDONALD, 1990; MACDONALD, 1995). Estudos demonstram que a inibição destas lançadeiras concomitantemente diminui a secreção de insulina (MACDONALD; JOSEPH; RORSMAN, 2005).

Os efeitos dos bloqueadores mitocondriais foram similares entre ilhotas de ratos magros e MSG-obesos, indicando que alterações no metabolismo mitocondrial parecem não estar envolvidas na hipersecreção de insulina. Até o presente momento nenhum estudo avaliou a função mitocondrial isolada em ilhotas pancreáticas de ratos MSG-obesos. Estudo realizado por Nardelli *et al.*, 2011

reportou que ilhotas isoladas de animais MSG apresentam hipersecreção de insulina na presença de glicose a 16,7mM acompanhada de menor oxidação da glicose. Este achado indiretamente reforça nossa hipótese de que alterações no metabolismo oxidativo mitocondrial não estão associadas a alterada responsividade a glicose em ilhotas de ratos MSG-obesos. Corroborando com nossa sugestão Lazarin *et al.*, 2011 demonstraram que o metabolismo oxidativo de mitocôndrias isoladas de hepatócitos de ratos MSG está íntegro.

Não existem estudos que demonstrem o efeito do exercício sobre a ação ou expressão dos complexos da cadeia de transporte de elétrons em ilhotas pancreáticas isoladas, tanto em ratos magros como obesos. Nosso estudo demonstra pela primeira vez que o exercício pode afetar a participação dos complexos mitocondriais em ilhotas pancreáticas isoladas. A adição de ANT em ilhotas pancreáticas de animais exercitados reduziu de maneira mais pronunciada a secreção de insulina estimulada por glicose indicando maior participação do complexo III da cadeia de transporte de elétrons. Dois mecanismos podem explicar estes achados. Primeiro, a maior atividade da lançadeira gliceraldeído-3 fosfato, já que a mesma é responsável por doar elétrons oriundos dos cofatores reduzidos durante a glicólise diretamente para o complexo III (SUGANO, 1974). Todavia, nossos achados com o fármaco IAA descartam esta possibilidade, uma vez que a adição do bloqueador da glicólise teve similares efeitos em ilhotas de ratos sedentários e exercitados em ambos os grupos experimentais. O segundo mecanismo pode envolver a aceleração da cadeia transportadora de elétrons como um todo, visto que, todos os elétrons transportados pelos complexos I, II e pelas lançadeiras convergem ao complexo III. Bioquimicamente, este aumento da velocidade da cadeia transportadora de elétrons elevaria o gradiente de H^+ no espaço intermembranas, promovendo maior potencial eletroquímico e favorecendo a formação de ATP. Todavia, nossos dados parecem indicar que apesar deste aumento do complexo III não há elevação dos níveis de ATP, uma vez que a secreção de insulina estimulada por glicose foi inibida em ilhotas de ratos exercitados. Assim, especula-se que este aumento do gradiente de H^+ gerado pelo

complexo III pode estar sendo dissipado. Estudos recentes indicam que ilhotas pancreáticas apresentam expressão das proteínas desacopadoras, as UCPs mitocondriais. Acredita-se que a expressão da UCP possa estar elevada nas mitocôndrias de ilhotas de ratos exercitados desacoplando o gradiente de H^+ e assim reduzindo a produção de ATP. Corroborando com nossa hipótese, recentemente Calegari *et al.*, 2011 demonstraram que animais magros submetidos à corrida apresentam aumento da expressão da proteína UCP₂ em ilhotas isoladas e redução da secreção de insulina estimulada por glicose .

Além disso, estudos mostram que a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), através do fluxo na cadeia de transporte de elétrons, contribui para defeitos na secreção de insulina e para complicações a longo prazo no DM2 (SIVITZ; YOREK, 2010). Em portadores de DM2, o elevado fluxo de nutrientes e consequente produção de EROs parecem mediar a perda de função da célula β . As UCPs₂ nas ilhotas pancreáticas tem papel crucial na patogênese do DM2 (KRAUSS *et al.*, 2003). Estas proteínas aparecem como protetoras dos danos causados pelas EROs. Em contra partida, o custo desta proteção é a diminuição da produção de ATP e consequente diminuição da secreção de insulina. Sendo assim, o exercício tem papel chave na modulação da produção de EROs, uma vez que aumenta a expressão das UCPs, atuando assim como uma ferramenta na atenuação das debilidades encontradas na fisiopatologia da obesidade e DM2.

Finalmente, as melhoras na função da ilhota pancreática, o aumento da sobrevivência e a redução da apoptose das mesmas podem ser os mecanismos mais importantes mediados pelo exercício, atuando assim no tratamento da obesidade e DM2. Adicionalmente, fatores oriundos de outros tecidos durante a atividade física, tais como a interleucina 6 (IL 6) liberada pelo músculo esquelético e o GLP-1 liberado pelas células L intestinais podem modular a resposta a glicose e consequentemente a secreção de insulina em ratos exercitados (ELLINGSGAARD *et al.*, 2011).

6. CONCLUSÃO

As lesões hipotalâmicas provocadas pelo tratamento neonatal com MSG induziram ao acúmulo de tecido adiposo com hipertrofia dos adipócitos, resistência à insulina e dislipidemia, reproduzindo as características centrais da síndrome metabólica.

Ratos tratados neonatalmente com MSG apresentam hipersecreção de insulina, um evento relacionado à maior responsividade a glicose e a hipertrofia das ilhotas pancreáticas, e aumento da expressão do GLUT₂.

Maior ativação da via glicolítica em ilhotas de ratos MSG-obesos pode participar da hipersecreção de insulina, todavia alterações no metabolismo mitocondrial parecem não estar envolvidas neste processo.

A natação regular atenuou a instalação da obesidade, reduziu a hipertrofia dos adipócitos, bem como, normalizou as complicações metabólicas em ratos MSG-obesos.

O exercício foi também capaz de normalizar a secreção de insulina estimulada por glicose, corrigir a hipertrofia, bem como a expressão do GLUT₂ em ilhotas pancreáticas de ratos MSG-obesos.

Finalmente, o exercício não alterou as vias glicolíticas em ilhotas pancreáticas de ambos os grupos, mas parece aumentar a participação do complexo mitocondrial III.

REFERÊNCIAS

- AFFOURTIT, C.; BRAND, M. D. Stronger control of ATP/ADP by proton leak in pancreatic beta-cells than skeletal muscle mitochondria. **The Biochemical journal**, v. 393, n. Pt 1, p. 151-9, 1 jan 2006.
- ALCÁZAR, O.; GINÉ, E.; QIU-YUE, Z.; TAMARIT-RODRÍGUEZ, J. The stimulation of insulin secretion by D-glyceraldehyde correlates with its rate of oxidation in islet cells. **The Biochemical journal**, v. 310 (Pt 1), p. 215-20, 15 ago 1995.
- ALCAZAR, O.; TIEDGE, M.; LENZEN, S. Importance of lactate dehydrogenase for the regulation of glycolytic flux and insulin secretion in insulin-producing cells. **The Biochemical journal**, v. 352 Pt 2, p. 373-80, 1 dez 2000.
- ANDRADE, I. S. DE; GONZALEZ, J. C. G.; HIRATA, A. E. *et al.* Central but not peripheral glucoprivation is impaired in monosodium glutamate-treated rats. **Neuroscience Letters**, v. 398, n. 1-2, p. 6-11, 2006.
- ANDREAZZI, A E.; SCOMPARIN, D. X.; MESQUITA, F. P. *et al.* Swimming exercise at weaning improves glycemic control and inhibits the onset of monosodium L-glutamate-obesity in mice. **The Journal of endocrinology**, v. 201, n. 3, p. 351-9, jun 2009.
- ANDREAZZI, A. E.; GRASSIOLLI, S.; MARANGON, P. B. *et al.* Impaired sympathoadrenal axis function contributes to enhanced insulin secretion in prediabetic obese rats. **Experimental diabetes research**, v. 2011, p. 947917, jan 2011.
- ANELLO, M.; LUPI, R.; SPAMPINATO, D. *et al.* Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. **Diabetologia**, v. 48, n. 2, p. 282-9, fev 2005.
- ANTINOZZI, P. A; ISHIHARA, H.; NEWGARD, C. B. *et al.* Mitochondrial metabolism sets the maximal limit of fuel-stimulated insulin secretion in a model pancreatic beta cell: a survey of four fuel secretagogues. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 14, p. 11746-55, 5 abr 2002.
- ASHCROFT, S. J.; WEERASINGHE, L. C.; RANDLE, P. J. Interrelationship of islet metabolism, adenosine triphosphate content and insulin release. **The Biochemical journal**, v. 132, n. 2, p. 223-31, fev 1973.
- AZUA, I. R.; GAUTAM, D.; GUETTIER, J.; WESS, J. Novel insights into the function of B-cell M3 muscarinic acetylcholine receptors: therapeutic implications. **Trends in endocrinology and metabolism**, v. 22, n. 2, p. 74-80, 2011.
- BAJPEYI, S.; TANNER, C. J.; SLENTZ, C.A; *et al.* Effect of exercise intensity and volume on persistence of insulin sensitivity during training cessation. **Journal of applied physiology**, v. 106, n. 4, p. 1079-85, abr 2009.

BALBO, S. L.; BONFLEUR, M. L.; CARNEIRO, E. M. *et al.* Parasympathetic activity changes insulin response to glucose and neurotransmitters. **Diabetes metabolism**, v. 28, n. 6 Pt 2, p. 3S13-S17; discussion 3S108-S112, 2002.

BALBO, S. L.; GRASSIOLLI, S.; RIBEIRO, R. A. *et al.* Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. **Endocrine**, v. 31, n. 2, p. 142-148, 2007.

BALBO, S. L.; MATHIAS, P. C.; BONFLEUR, M. L. *et al.* Vagotomy reduces obesity in MSG-treated rats. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, v. 108, p. 291–296, 2000.

BALISTRERI, C. R.; CARUSO, C.; CANDORE, G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. **Mediators of inflammation**, v. 2010, p. 802078, jan 2010.

BERGLUND, E. D.; LUSTIG, D. G.; BAHEZA, R. A; *et al.* Hepatic glucagon action is essential for exercise-induced reversal of mouse fatty liver. **Diabetes**, v. 60, n. 11, p. 2720-9, nov 2011.

BERSON, S.A; YALOW, R. S. General principles of radioimmunoassay. **Clinica chimica acta**, v. 369, p. 125-43, 23 jul 1968.

BLOUET, C.; SCHWARTZ, G. J. Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. **Behavioural brain research**, v. 209, n. 1, p. 1-12, 1 maio 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-54, 1976.

BRAGA, L.; MELLO, M.; MANCHADO, F. *et al.* Exercício contínuo e intermitente: Efeitos do treinamento e do destreinamento sobre o peso corporal e o metabolismo muscular de ratos obesos. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v. 6, n. 2, p. 160-169, 2006.

BRANDELERO, S.; BONFLEUR, M. L.; RIBEIRO, R. A. *et al.* Decreased TNF- α gene expression in periodontal ligature in MSG-obese rats: a possible protective effect of hypothalamic obesity against periodontal disease? **Archives of oral biology**, v. 57, n. 3, p. 300-6, mar 2012.

BRANDT, C.; PEDERSEN, B. K. The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2010, p. 520258, jan 2010.

BUEMANN, B.; TREMBLAY, A. Effects of exercise training on abdominal obesity and related metabolic complications. **Sports Medicine**, v. 21, n. 3, p. 191-212, 1996.

CALEGARI, V. C.; ABRANTES, J. L.; SILVEIRA, L. R. *et al.* Endurance training stimulates growth and survival pathways and the redox balance in rat pancreatic islets. Endurance training stimulates growth and survival pathways and the redox balance in rat pancreatic islets. **Journal of applied physiology**, v. 112, p. 711-718, 2012.

CALEGARI, V. C.; ZOPPI, C. C.; REZENDE, L. F. *et al.* Endurance training activates AMP-activated protein kinase, increases expression of uncoupling protein 2 and reduces insulin secretion from rat pancreatic islets. **The Journal of endocrinology**, v. 208, n. 3, p. 257-64, mar 2011.

CAMERON, D. P.; POON, T. K.; SMITH, G. C. Effects of monosodium glutamate administration in the neonatal period on the diabetic syndrome in KK mice. **Diabetologia**, v. 12, n. 6, p. 621-626, 1976.

CARROLL, S.; DUDFIELD, M. What is the relationship between exercise and metabolic abnormalities? A review of the metabolic syndrome. **Sports medicine**, v. 34, n. 6, p. 371-418, jan 2004.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CHANG, X.; WEI, C. Glycolysis and rheumatoid arthritis. **International journal of rheumatic diseases**, v. 14, n. 3, p. 217-22, ago 2011.

CHAPUT, J.-P.; KLINGENBERG, L.; ROSENKILDE, M. *et al.* Physical activity plays an important role in body weight regulation. **Journal of obesity**, v. 2011, jan 2011.

COFFEY, V. G.; HAWLEY, J. A. The molecular bases of training adaptation. **Sports Medicine**, v. 37, n. 9, p. 737-763, 2007.

COLBERG, S. R. Physical activity, insulin action, and diabetes prevention and control. **Current Diabetes Reviews**, v. 3, n. 3, p. 176-184, 2007.

CRETI, A.; LEHTOVIRTA, M.; BONORA, E. *et al.* Assessment of b-cell function during the oral glucose tolerance test by a minimal model of insulin secretion. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 31, n. January, p. 405-416, 2001.

CURRY, D. L.; BENNETT, L. L.; GRODSKY, G. M. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. **Endocrinology**, v. 83, n. 3, p. 572-84, sep 1968.

CYPESS, A. M.; LEHMAN, S.; WILLIAMS, G.; *et al.* Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humand. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 15, p. 1509-1517, 2010.

DAWSON, R.; WALLACE, D. R.A Pharmacological Analysis of Food Intake Regulation in Rats Trated Neonatally With Monosodium L-Glutamate (MSG). **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, v. 32, p. 391-398, 1989.

DELA, F.; LINSTOW, M. E. VON; MIKINES, K. J.; GALBO, H. Physical training may enhance beta-cell function in type 2 diabetes. **American journal of physiology**, v. 287, n. 5, p. E1024-31,

nov 2004.

DELGHINGARO-AUGUSTO, V.; DÉCARY, S.; PEYOT, M.-L. *et al.* Voluntary running exercise prevents β -cell failure in susceptible islets of the Zucker diabetic fatty rat. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 302, n. 2, p. E254-64, jan 2012.

DENG, S.; VATAMANIUK, M.; HUANG, X. *et al.* Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. **Diabetes**, v. 53, n. 3, p. 624-32, mar 2004.

DESPRÉS, J. P. Visceral obesity, insulin resistance, and dyslipidemia: contribution of endurance exercise training to the treatment of the plurimetabolic syndrome. **Exercise and Sport Sciences Reviews**. 1997;25:271-300.

DHANESHA, N.; JOHARAPURKAR, A.; SHAH, G. *et al.* Exendin-4 activates glucokinase. **Journal of Diabetes**. 2012 Feb 2012.

DIMITRIADIS, G.; MITROU, P.; LAMBADIARI, V. *et al.* Insulin effects in muscle and adipose tissue. **Diabetes research and clinical practice**, v. 93 Suppl 1, p. S52-9, ago 2011.

DINSA, G. D.; GORYAKIN, Y.; FUMAGALLI, E.; SUHRCKE, M. Obesity and socioeconomic status in developing countries: a systematic review. **Obesity reviews**, n. 4, p. 1-13, 5 jul 2012.

DOLNIKOFF, M.; MARTÍN-HIDALGO, A; MACHADO, U. F. *et al.* Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. **International journal of obesity and related metabolic disorders**, v. 25, n. 3, p. 426-33, mar 2001.

DUKES, I. D.; MCINTYRE, M. S.; MERTZ, R. J. *et al.* Dependence on NADH produced during glycolysis for beta-cell glucose signaling. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 15, p. 10979-82, 15 abr 1994.

DULOO, A. G.; MILLER, D. S. Unimpaired thermogenic response to noradrenaline in genetic (ob/ob) and hypothalamic (MSG) obese mice. **Bioscience Reports**, v. 4, n. 4, p. 343-349, 1984.

ECKEL, R. H. Insulin resistance: an adaptation for weight maintenance. **The Lancet**, v. 340, p. 1452-1453, 1992.

ELLINGSGAARD, H.; HAUSELMANN, I.; SCHULER, B. *et al.* Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. **Nature medicine**, v. 17, n. 11, p. 1481-9, jan 2011.

FIELD, B. C. T.; CHAUDHRI, O. B.; BLOOM, S. R. Bowels control brain: gut hormones and obesity. **Nature reviews Endocrinology**, v. 6, n. 8, p. 444-453, 2010.

FLORES, M. B. S.; FERNANDES, M. F. A; ROPELLE, E. R. *et al.* Exercise improves insulin and leptin sensitivity in hypothalamus of Wistar rats. **Diabetes**, v. 55, n. 9, p. 2554-61, set 2006.

FLORES, M. B. S.; FERNANDES, M. F. A; ROPELLE, E. R. *et al.* Exercise improves insulin and

leptin sensitivity in hypothalamus of Wistar rats. **Diabetes**, v. 55, n. 9, p. 2554-61, set 2006.

FOLKERS, I. G.; GOITEIN, M.; JOHN, B. *et al.* Hydrodynamic Consequences of Glycolysis. Thermodynamic Basis and Clinical Relevance. **Cancer Biology e Therapy**, v. 3, n. September, p. 812-815, 2004.

FOREYT, J. P. Need for lifestyle intervention: how to begin. **The American Journal of Cardiology**, v. 96, n. 4A, p. 11E-14E, 2005.

FRIDLAND, L. E.; PHILIPSON, L. H. Glucose sensing in the pancreatic beta cell: a computational systems analysis. **Theoretical biology & medical modelling**, v. 7, p. 15, jan 2010.

FUTAMURA, M.; YAO, J.; LI, X. *et al.* Chronic treatment with a glucokinase activator delays the onset of hyperglycaemia and preserves beta cell mass in the Zucker diabetic fatty rat. **Diabetologia**, v. 55, n. 4, p. 1071-80, abr 2012.

GAVRILOVIC, L.; SPASOJEVIC, N.; DRONJAK, S. Modulation of catecholamine-synthesizing enzymes in adrenal medulla and stellate ganglia by treadmill exercise of stressed rats. **European journal of applied physiology**, v. 112, n. 3, p. 1177-82, mar 2012.

GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R.; SOUZA, C. T.; RIBEIRO, I. A. The monosodium glutamate (MSG) obese rat as a model for the study of exercise in obesity. **Research communications in molecular pathology and pharmacology**, v. 111, n. 1-4, p. 89-101, 2002.

GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R. DE.; SIBUYA, C. Y. *et al.* Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 130, n. 1, p. 21-7, ago 2001.

GRASSIOLLI, S.; BONFLEUR, M. L.; SCOMPARIN, D. X. *et al.* Pancreatic islets from hypothalamic obese rats maintain K⁺ATP channel-dependent but not -independent pathways on glucose-induced insulin release process. **Endocrine**, n. 2, p. 191-6, oct 2006.

GRASSIOLLI, S.; GRAVENA, C.; FREITAS MATHIAS, P. C. DE. Muscarinic M2 receptor is active on pancreatic islets from hypothalamic obese rat. **European journal of pharmacology**, v. 556, n. 1-3, p. 223-8, 5 fev 2007.

GRUNDY, S. M. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. **The American journal of clinical nutrition**, v. 67, n. 3 Suppl, p. 563S-72S, mar 1998.

GUERRA, S. D.; LUPI, R.; MARSELLI, L. *et al.* Functional and Molecular Defects of Pancreatic Islets in Human Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 54, n. March, p. 727-735, 2005.

GUILHERME, A.; VIRBASIU, J. V.; PURI, V.; CZECH, M. P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature reviews**, v. 9, n. 5, p. 367-77, maio 2008.

HARA, Y.; TANIGUCHI, H.; YAMASHIRO, Y. *et al.* An improved method for the isolation of islets from the rat pancreas. **Experimental and clinical endocrinology**, v. 91, n. 2, p. 171-175, 1988.

HARISHANKAR, N.; KUMAR, P. U.; SESIKERAN, B.; GIRIDHARAN, N. Obesity associated pathophysiological & histological changes in WNIN obese mutant rats. **The Indian journal of medical research**, v. 134, n. September, p. 330-40, set 2011.

HAUTALA, A. J.; KIVINIEMI, A. M.; TULPPO, M. P. Individual responses to aerobic exercise: the role of the autonomic nervous system. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 33, n. 2, p. 107-15, mar 2009.

HAWLEY, J. A.; LESSARD, S. J. Exercise training-induced improvements in insulin action. **Acta physiologica (Oxford, England)**, v. 192, n. 1, p. 127-35, jan 2008.

HAYASHI, T.; HIRSHMAN, M. F.; KURTH, E. J.; WINDER, W. W.; GOODYEAR, L. J. Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. **Diabetes**, v. 47, n. 8, p. 1369-1373, 1998.

HAYES, C.; KRISKA, A. Role of physical activity in diabetes management and prevention. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 108, n. 4 Suppl 1, p. S19-23, abr 2008.

HEART, E.; YANEY, G. C.; CORKEY, R. F. *et al.* Ca^{2+} , NAD(P)H and membrane potential changes in pancreatic beta-cells by methyl succinate: comparison with glucose. **The Biochemical journal**, v. 403, n. 1, p. 197-205, 1 abr 2007.

HEITMANN, B. L.; WESTERTERP, K. R.; LOOS, R. J. F. *et al.* Obesity: lessons from evolution and the environment. **Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity**, p. 1-13, 29 maio 2012.

HENQUIN, J. C. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. **Diabetologia**, v. 52, n. 5, p. 739-51, maio 2009.

HENQUIN, J. C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. **Diabetes**, v. 49, n. 11, p. 1751-60, nov 2000.

HILL, J. O.; WYATT, H. R. Role of Exercise in Reducing the Risk of Diabetes Role of physical activity in preventing and treating obesity. **Journal of applied physiology**, v. 99, n. 2, p. 765-770, 2005.

HIRATA, A. E.; ANDRADE, I. S.; VASKEVICIUS, P.; DOLNIKOFF, M. S. Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 30, n. 5, p. 671-674, 1997.

HOWELL, S. L.; MONTAGUE, W.; TYHURST, M. Calcium distribution in islets of Langerhans: a study of calcium concentrations and of calcium accumulation in B cell organelles. **Journal of cell science**, v. 19, n. 2, p. 395-409, nov 1975.

HUANG, H.-H.; FARMER, K.; WINDSCHEFFEL, J. *et al.* Exercise increases insulin content and basal secretion in pancreatic islets in type 1 diabetic mice. **Experimental diabetes research**, v. 2011, n. 1, p. 481427, jan 2011.

HUBÁČEK, J. A. Eat less and exercise more - is it really enough to knock down the obesity pandemia? **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 58 Suppl 1, p. S1-6, jan 2009.

IRANI, B. G.; XIANG, Z.; MOORE, M. C.; MANDEL, R. J.; HASKELL-LUEVANO, C. Voluntary exercise delays monogenetic obesity and overcomes reproductive dysfunction of the melanocortin-4 receptor knockout mouse. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 326, n. 3, p. 638-44, 21 jan 2005.

ISHIHARA, H.; WANG, H.; DREWES, L. R.; WOLLHEIM, C. B. Overexpression of monocarboxylate transporter and lactate dehydrogenase alters insulin secretory responses to pyruvate and lactate in beta cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 104, n. 11, p. 1621-9, dez 1999.

IWASE, M.; YAMAMOTO, M.; IINO, K. *et al.* Obesity induced by neonatal monosodium glutamate treatment in spontaneously hypertensive rats: an animal model of multiple risk factors. **Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 21, n. 1, p. 1-6, mar 1998.

JAMES, D. E.; BURLEIGH, K. M.; KRAEGEN, E. W.; CHISHOLM, D. J. Effect of acute exercise and prolonged training on insulin response to intravenous glucose in vivo in rat. **Journal of Applied Physiology**, v. 55, n. 6, p. 1660-1664, 1983.

JAWORSKI, D. M.; SIDELEVA, O.; STRADECKI, H. M. *et al.* Sexually dimorphic diet-induced insulin resistance in obese tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2)-deficient mice. **Endocrinology**, v. 152, n. 4, p. 1300-13, abr 2011.

JEONG S, YOON M. Swimming's prevention of ovariectomy-induced obesity through activation of skeletal-muscle PPAR α . **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 1-10, 2012.

JONAS, J. C.; SHARMA, A; HASENKAMP, W. *et al.* Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 20, p. 14112-21, 14 maio 1999.

JUNG, S. K.; KAURI, L. M.; QIAN, W. J.; KENNEDY, R. T. Correlated oscillations in glucose consumption, oxygen consumption, and intracellular free Ca⁽²⁺⁾ in single islets of Langerhans. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 9, p. 6642-50, 3 mar 2000.

KAHN, B. B.; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 106, n. 4, p. 473-481, 2000.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin

resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840-6, 14 dez 2006.

KEANE, D.; NEWSHOLME, P. Saturated and unsaturated (including arachidonic acid) non-esterified fatty acid modulation of insulin secretion from pancreatic β -cells. **Biochemical Society Transactions**, v. 36 (pt 5), p. 955–958, 2008.

KENNEDY, J. W.; HIRSHMAN, M. F.; GERVINO, E. V. *et al.* Acute Exercise Induces GLUT4 Translocation in Skeletal Muscle of Normal Human Subjects and Subjects With Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 48, n. 5, p. 1-6, 1999.

KIENS, B.; ALSTED, T. J.; JEPPESEN, J. Factors regulating fat oxidation in human skeletal muscle. **Obesity reviews**, v. 12, n. 10, p. 852-8, out 2011.

KNOWLER, W. C.; BARRETT-CONNOR, E.; FOWLER, S. E. *et al.* Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 6, p. 393-403, 2006.

KOH, D.-S.; CHO, J.-H.; CHEN, L. Paracrine Interactions Within Islets of Langerhans. **Journal of Molecular Neuroscience**, n. January, 13 abr 2012.

KÖNNER, A. C.; BRÜNING, J. C. Selective Insulin and Leptin Resistance in Metabolic Disorders. **Cell Metabolism**, v. 16, n. 2, p. 144-152, 8 ago 2012.

KOOPTIWUT, S.; ZRAIKA, S.; THORBURN, A. W. *et al.* Comparison of insulin secretory function in two mouse models with different susceptibility to beta-cell failure. **Endocrinology**, v. 143, n. 6, p. 2085-92, jun 2002.

KORANYI, L. I.; BOUREY, R. E.; SLENTZ, C. A.; HOLLOSZY, J. O.; PERMUTT, M. A. Coordinate reduction of rat pancreatic islet glucokinase and proinsulin mRNA by exercise training. **Diabetes**, v. 40, n. 3, p. 401-404, 1991.

KOZAK, L. P.; ANUNCIADO-KOZA, R. UCP1: its involvement and utility in obesity. **International Journal of Obesity**, v. 32, n. 7, p. S32–38, 2008.

KRAEGEN, E. W.; COONEY, G. J.; YE, J.; THOMPSON, A. L. Triglycerides, fatty acids and insulin resistance--hyperinsulinemia. **Experimental and clinical endocrinology diabetes**, v. 109, n. 4, p. S516-S526, 2001.

KRAUSS, S.; ZHANG, C.-YU; SCORRANO, L. *et al.* Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic β cell dysfunction. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1831-1842, 2003.

KRETSCHMER, B. D.; SCHELLING, P.; BEIER, N. *et al.* Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. **Life sciences**, v. 76, n. 14, p. 1553-73, 18 fev 2005.

KUBOTA, A.; NAKAGAWA, Y.; IGARASHI, Y. Studies of gene expression in liver of insulin-like

growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3 and growth hormone (GH) receptor/GH binding protein in rats treated neonatally with monosodium glutamate. **Hormone and Metabolic Research**, v. 26, n. 11, p. 497-503, 1994.

LAU, A.; TYMIANSKI, M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. **European journal of physiology**, v. 460, n. 2, p. 525-42, jul 2010.

LAUSIER, J.; DIAZ, W. C.; ROSKENS, V. *et al.* Vagal control of pancreatic β -cell proliferation. **American journal of physiology**, v. 299, n. 5, p. E786-93, dez 2010.

LAZARIN, M. D. O.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; YAMAMOTO, N. S. *et al.* Liver mitochondrial function and redox status in an experimental model of non-alcoholic fatty liver disease induced by monosodium L-glutamate in rats. **Experimental and molecular pathology**, v. 91, n. 3, p. 687-94, dez 2011.

LEITNER, C.; BARTNESS, T. J. Food deprivation-induced changes in body fat mobilization after neonatal monosodium glutamate treatment. **American Journal of Physiology**, v. 294, p. 775-783, 2008.

LIANG, Y.; SHENG, S.; FANG, P. *et al.* Exercise-induced galanin release facilitated GLUT4 translocation in adipocytes of type 2 diabetic rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 100, n. 3, p. 554-9, jan 2012.

LI, P.-P.; SHAN, S.; CHEN, Y.-T. *et al.* The PPAR α /gamma dual agonist chiglitazar improves insulin resistance and dyslipidemia in MSG obese rats. **British journal of pharmacology**, v. 148, n. 5, p. 610-8, jul 2006.

LIU, S.-NAN; LIU, Q.; LI, L.-YI; *et al.* Long-term fenofibrate treatment impaired glucose-stimulated insulin secretion and up-regulated pancreatic NF-kappa B and iNOS expression in monosodium glutamate-induced obese rats: is that a latent disadvantage? **Journal of translational medicine**, v. 9, n. 1, p. 176, jan 2011.

LIU, Y. Q.; JETTON, T. L.; LEAHY, J. L. beta-Cell adaptation to insulin resistance. Increased pyruvate carboxylase and malate-pyruvate shuttle activity in islets of nondiabetic Zucker fatty rats. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 42, p. 39163-8, 18 out 2002.

LOBATO, N. S.; FILGUEIRA, F. P.; HAGIHARA, G. N. *et al.* Improvement of metabolic parameters and vascular function by metformin in obese non-diabetic rats. **Life sciences**, v. 90, n. 5-6, p. 228-35, 30 jan 2012.

LU, H.; KOSHKIN, V.; ALLISTER, E. M.; GYULKHANDANYAN, A. V.; WHEELER, M. B. Molecular and Metabolic Evidence for Mitochondrial Defects Associated With B-Cell Dysfunction in a Mouse Model of Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 59, n. February, 2010.

LUCIANO, E.; CARNEIRO, E. M.; CARVALHO, C. R. O. *et al.* **European journal of endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 149-57, jul 2002.

LUQUET, S.; MAGNAN, C. The central nervous system at the core of the regulation of energy homeostasis. **Frontiers in bioscience scholar edition**, v. 1, p. 448-465, 2009.

MA, Z. A.; ZHAO, Z.; TURK, J. Mitochondrial dysfunction and β -cell failure in type 2 diabetes mellitus. **Experimental diabetes research**, v. 2012, p. 703538, jan 2012.

MAARBJERG, S. J.; SYLOW, L.; RICHTER, E. A. Current understanding of increased insulin sensitivity after exercise - emerging candidates. **Acta physiologica (Oxford, England)**, v. 202, n. 3, p. 323-35, jul 2011.

MACDONALD, M. J. Elusive proximal signals of beta-cells for insulin secretion. **Diabetes**, v. 39, n. 12, p. 1461-1466, 1990.

MACDONALD, M. J. Feasibility of a Mitochondrial Pyruvate Malate Shuttle in Pancreatic Islets. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 34, p. 20051-20058, 1995.

MACDONALD, M. J. High Content of Mitochondrial Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase in Pancreatic Islets and Its Inhibition by Diazoxide. **The Journal of biological chemistry**, v. 256, n. 16, p. 8287-8290, 1981.

MACDONALD, M. J.; LONGACRE, M. J.; STOKER, S. W. *et al.* Acetoacetate and beta-hydroxybutyrate in combination with other metabolites release insulin from INS-1 cells and provide clues about pathways in insulin secretion. **American journal of physiology**, v. 294, n. 2, p. C442-50, fev 2008.

MACDONALD, P. E.; JOSEPH, J. W.; RORSMAN, P. Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v. 360, n. 1464, p. 2211-25, 29 dez 2005.

MACHADO, U. F.; SHIMIZU, Y.; SAITO, M. Decreased glucose transporter (GLUT 4) content in insulin-sensitive tissues of obese aurothioglucose- and monosodium glutamate-treated mice. **Hormone and metabolic research**, v. 25, n. 9, p. 462-465, 1993.

MACHO, L.; FICKOVÁ, M.; JEZOVÁ, D.; ZÓRAD, S. Late Effects of Postnatal Administration of Monosodium Glutamate on Insulin Action in Adult Rats. **Physiological research**, v. 49, n. 1, p. S79-S85, 2000.

MAITER, D.; UNDERWOOD, L. E.; MARTIN, J. B. *et al* Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. **Endocrinology**, v. 128, n. 2, p. 1100-1106, 1991.

MAITER, D.; UNDERWOOD, L. E.; MARTIN, J. B.; KOENIG, AND J. I. Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. **Endocrinology**, v. 128, n. 2, p. 1100-1106, 1991.

MALAISSÉ, W. J.; SENER, A. Glucose-induced changes in cytosolic ATP content in pancreatic

islets. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 927, p. 190-195, 1987.

MARÇAL, A. C.; GRASSIOLLI, S.; ROCHA, D. N. *et al.* The dual effect of isoproterenol on insulin release is suppressed in pancreatic islets from hypothalamic obese rats. **Endocrine**, v. 29, n. 3, p. 445-449, 2006.

MARCHETTI, P.; LUPI, R.; DEL GUERRA, S. *et al.* The beta-cell in human type 2 diabetes. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 654, p. 501–514, 2010.

MATSCHINSKY, F. M. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. **Diabetes**, v. 45, n. 2, p. 223-241, 1996.

MATSCHINSKY, F. M.; ELLERMAN, J. Dissociation of the Insulin Release and the Metabolic Function of hexoses in islets of Langerhans. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 50, n. 2, p. 193-199, 1973.

MATTHEWS, D. R.; HOSKER, J. P.; RUDENSKI, A. S. *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412-419, 1985.

MCMINN, J. E.; BASKIN, D. G.; SCHWARTZ, M. W. Neuroendocrine mechanisms regulating food intake and body weight. **Obesity reviews**, v. 1, n. 1, p. 37-46, maio 2000.

MERTZ, R. J.; WORLEY, J. F.; SPENCER, B. *et al.* Activation of Stimulus-Secretion Coupling in Pancreatic β -Cells by. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 9, p. 4838-4845, 1996.

MEZGHENNA, K.; POMIÈS, P.; CHALANÇON, A. *et al.* Increased neuronal nitric oxide synthase dimerisation is involved in rat and human pancreatic beta cell hyperactivity in obesity. **Diabetologia**, v. 54, n. 11, p. 2856-66, nov 2011.

MLINAR, B.; MARC, J.; JANEZ, A. *et al.* Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. **Clinica chimica acta**, v. 375, n. 1-2, p. 20-35, jan 2007.

MORRISON, J. F. B.; SHEHAB, S.; SHEEN, R. *et al.* Sensory and autonomic nerve changes in the monosodium glutamate-treated rat: a model of type II diabetes. **Experimental Physiology**, v. 93, n. 2, p. 213-222, 2008.

MULDER, H.; LING, C. Mitochondrial dysfunction in pancreatic beta-cells in Type 2 diabetes. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 297, n. 1-2, p. 34-40, 15 jan 2009.

NAGATA, M.; SUZUKI, W.; IIZUKA, S. *et al.* Type 2 Diabetes Mellitus in Obese Mouse Model Induced by Monosodium Glutamate. **Experimental animal**, v. 55, n. October 2005, p. 109-115, 2006.

NARDELLI, T. R.; RIBEIRO, R. A.; BALBO, S. L. *et al.* Taurine prevents fat deposition and ameliorates plasma lipid profile in monosodium glutamate-obese rats. **Amino Acids**, v. 41, n. 4,

p. 901-908, 2011.

NASCIMENTO CURI, C. M.; MARMO, M. R.; EGAMI, M. *et al.* Effect of monosodium glutamate treatment during neonatal development on lipogenesis rate and lipoprotein lipase activity in adult rats. **Biochemistry International**, v. 24, n. 5, p. 927-935, 1991.

NEWGARD, C. B.; MCGARRY, J. D. Metabolic coupling factors in pancreatic b-cell signal transduction. **Annual review biochemistry**, v. 64, p. 689-719, 1995.

NEWSHOLME, P.; BENDER, K.; KIELY, A. *et al.* Aminoacid metabolism, insulin secretion and diabetes. **Biochemical Society Transactions**.v.35 (pt 5), p. 1180–1186, 2007.

O'NEAL, D. N.; HEW, F. L.; BEST, J. D. *et al.* The effect of 24 months recombinant human growth hormone (rh-GH) on LDL cholesterol, triglyceride-rich lipoproteins and apo [a] in hypopituitary adults previously treated with conventional replacement therapy. **Growth hormone IGF research**, v. 9, n. 3, p. 165-173, 1999.

OHNEDA, M.; JOHNSON, J. H.; INMAN, L. R. *et al.* GLUT2 Expression and Function in beta-Cells of GK Rats with NIDDM - Dissociation Between Reductions in Glucose Transport and Glucose-Stimulated Insulin Secretion. **Diabetes**, v. 42, n. 7, p. 1065-1072, 1993.

OIDA, K.; NAKAI, T.; HAYASHI, T. *et al.* Plasma lipoproteins of monosodium glutamate-induced obese rats. **International Journal of Obesity**, v. 8, n. 5, p. 385-391, 1984.

OLIVEIRA, C. A. M. D.; PAIVA, M. F.; MOTA, C. A. S. *et al.* Exercise at anaerobic threshold intensity and insulin secretion by isolated pancreatic islets of rats. **Islets**, v. 2, n. 4, p. 240-6, 2010.

OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 164, n. 880, p. 719-721, 1969.

OLNEY, J. W.; ADAMO, N. J.; RATNER, A. Monosodium glutamate effects. **Science**. v. 172, p.294, 1971.

OLSSON, A. H.; YANG, B. T.; HALL, E. *et al.* Decreased expression of genes involved in oxidative phosphorylation in human pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. **European journal of endocrinology**, v. 165, n. 4, p. 589-95, out 2011.

ORTSÄTER, H.; LISS, P.; AKERMAN, K. E. O.; BERGSTEN, P. Contribution of glycolytic and mitochondrial pathways in glucose-induced changes in islet respiration and insulin secretion. **European journal of physiology**, v. 444, n. 4, p. 506-12, jul 2002.

OUSMAN, S. S.; KUBES, P. Immune surveillance in the central nervous system. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 8, p. 1096-1101, 26 jul 2012.

PAN, X. R.; LI, G. W.; HU, Y. H. *et al.* Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. The Da Qing IGT and Diabetes Study. **Diabetes Care**, v. 20, n.

4, p. 537-544, 1997.

PARK, S.; HONG, S. M.; LEE, J. E.; SUNG, S. R. Exercise improves glucose homeostasis that has been impaired by a high-fat diet by potentiating pancreatic beta-cell function and mass through IRS2 in diabetic rats. **Journal of applied physiology**, v. 103, n. 5, p. 1764-71, nov 2007.

PARK, S.; HONG, S. M.; SUNG, S. R. Exendin-4 and exercise promotes beta-cell function and mass through IRS2 induction in islets of diabetic rats. **Life sciences**, v. 82, n. 9-10, p. 503-11, 27 fev 2008.

PARSONS, T. J.; MANOR, O.; POWER, C. Television viewing and obesity: a prospective study in the 1958 British birth cohort. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 12, p. 1355-1363, 2008.

PESSIN, J. E.; THURMOND, D. C.; ELMENDORF, J. S. *et al.* Molecular Basis of Insulin-stimulated GLUT4 Vesicle Trafficking. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 5, p. 2593-2596, 1999.

PIROLA, L.; BONNAFOUS, S.; JOHNSTON, A. M. *et al.* Phosphoinositide 3-kinase-mediated reduction of insulin receptor substrate-1/2 protein expression via different mechanisms contributes to the insulin-induced desensitization of its signaling pathways in L6 muscle cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 18, p. 15641-51, 2 maio 2003.

PIROLA, L.; JOHNSTON, A. M.; OBBERGHEN, E. VAN. Modulators of insulin action and their role in insulin resistance. **International journal of obesity and related metabolic disorders**, v. 27 Suppl 3, p. S61-4, dez 2003.

PRADA, F. J. A.; VOLTARELLI, F. A.; OLIVEIRA, C. A. M. O. *et al.* Condicionamento aeróbio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbio Aerobic condition and oxidative stress in rats swim-trained. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 12, n. 2, p. 29-34, 2004.

PUDDU, A. e VIVIANE, G. L. Advanced glycation end products and diabetes. Beyond vascular complications. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v. 11, p. 132-140, 2011.

RABE, K.; LEHRKE, M.; PARHOFER, K. G. *et al.* Adipokines and insulin resistance. **Molecular medicine**, v. 14, n. 11-12, p. 741-51, 2008.

RAGAN, I. C.; RACKER, E. Resolution and Reconstitution of the Mitochondrial Electron Transport System. **The Journal of biological chemistry**, v. 248, n. 19, p. 6876-6884, 1973.

RAMADAN, J. W.; STEINER, S. R.; O'NEILL, C. M. *et al.* The central role of calcium in the effects of cytokines on beta-cell function: implications for type 1 and type 2 diabetes. **Cell calcium**, v. 50, n. 6, p. 481-90, dez 2011.

RIBEIRO, E. B.; NASCIMENTO, C. M. DO; ANDRADE, I. S.; HIRATA, A. E.; DOLNIKOFF, M. S.

Hormonal and metabolic adaptations to fasting in monosodium glutamate-obese rats. **Journal of comparative physiology**, v. 167, n. 6, p. 430-437, 1997.

RICHTER, E. A.; RUDERMAN, N. B. AMPK and the biochemistry of exercise: Implications for human health and disease. **Biochemical Journal**, v. 418, n. 2, p. 261-275, 2009.

ROE, M. W.; LANCASTER, M. E.; MERTZ, R. J.; WORLEY, J. F.; DUKES, I. D. Voltage-dependent intracellular calcium release from mouse islets stimulated by glucose. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 14, p. 9953-6, 15 maio 1993.

ROTHMAN, K. J. BMI-related errors in the measurement of obesity. **International journal of obesity**, v. 32 Suppl 3, n. S3, p. S56-S59, 2008.

SAAD, M. F.; ALGER, S. A.; ZURLO, F. *et al.* Ethnic differences in sympathetic nervous system-mediated energy expenditure. **American Journal of Physiology**, v. 261, n. 6 Pt 1, p. E789-E794, 1991.

SAAD, R.; GUNGOR, N.; ARSLANIAN, S. Progression from normal glucose tolerance to type 2 diabetes in a young girl: longitudinal changes in insulin sensitivity and secretion assessed by the clamp technique and surrogate estimates. **Pediatric diabetes**, v. 6, n. 2, p. 95-9, jun 2005.

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

SAMPEY, B. P.; VANHOOSE, A. M.; WINFIELD, H. M. *et al.* Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation : Comparison to High-Fat Diet. **Obesity**, v.19, n.6, p.1109–1117, 2009.

SARABU, R.; TAUB, R.; GRIMSBY, J. Glucokinase activation—a strategy for T2D therapy: recent developments. **Drug Discovery Today**, v. 4, n. 2, p. 111-115, jun 2007.

SASAKI, Y.; SUZUKI, W.; SHIMADA, T. *et al.* Dose dependent development of diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis in monosodium glutamate-induced obese mice. **Life sciences**, v. 85, n. 13-14, p. 490-8, 23 set 2009.

SAVOPOULOS, C.; MICHALAKIS, K.; APOSTOLOPOULOU, M. *et al.* Adipokines and stroke: a review of the literature. **Maturitas**, v. 70, n. 4, p. 322-7, dez 2011.

SAWCHENKO, P. E. Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: the anatomists weigh in. **The Journal of comparative neurology**, v. 402, n. 4, p. 435-41, 28 dez 1998.

SCHERER, T.; BUETTNER, C. Yin and Yang of hypothalamic insulin and leptin signaling in regulating white adipose tissue metabolism. **Reviews Endocrinology Metabolism Disorder**, v. 12, n. 3, p. 235-243, 2012.

SCHERER, T.; HARE, J. O.; DIGGS-ANDREWS, K. *et al.* Brain insulin controls adipose tissue

lipolysis and lipogenesis. **Cell metabolism**, v. 13, n. 2, p. 183-194, 2011.

SCHEURINK, A. J.; STEFFENS, A. B.; ROOSSIEN, B.; BALKAN, B. Sympathoadrenal function in genetically obese Zucker rats. **Physiology & behavior**, v. 52, n. 4, p. 679-85, out 1992.

SCHEURINK, A. J.; STEFFENS, A. B.; BOURITIUS, H. *et al.* Adrenal and sympathetic catecholamines in exercising rats. **American Journal of Physiology**, v. 256, n. 1 Pt 2, p. R155-60, 1989.

SCHOFL, C.; BORGER, J.; LANGE, S. *et al.* Energetic Requirement of Carbachol-Induced Ca^{2+} Signaling in Single Mouse β -Cells*. **Endocrinology**, v. 141, n. 11, p. 4065-4071, 2000.

SCHWARTZ, M. W.; PORTE JR., D. Diabetes, obesity, and the brain. **Science**, v. 307, n. 5708, p. 375-379, 2005.

SCOMPARIN, D. X.; GOMES, R. M.; GRASSIOLLI, S. *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. 510-7, dez 2009.

SCOMPARIN, D. X.; GRASSIOLLI, S.; GOMES, R. M. *et al.* Low-Intensity swimming training after weaning improves glucose and lipid homeostasis in MSG hypothalamic obese mice. **Endocrine Research**, v. 36, n. 2, p. 83-90, 2011.

SCOMPARIN, D. X.; GRASSIOLLI, S.; MARÇAL, A. C. *et al.* Swim training applied at early age is critical to adrenal medulla catecholamine content and to attenuate monosodium L-glutamate-obesity onset in mice. **Life sciences**, v. 79, n. 22, p. 2151-6, 26 out 2006.

SEINO, S. Cell signalling in insulin secretion: the molecular targets of ATP, cAMP and sulfonylurea. **Diabetologia**, v. 55, n. 8, p. 2096-108, 4 maio 2012.

SEINO, S.; SHIBASAKI, T.; MINAMI, K. Review series Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 6, p. 2118-2125, 2011.

SEKINE, N.; CIRULLIS, V.; REGAZZI, R. *et al.* Low Lactate Dehydrogenase and High Mitochondrial Glycerol Phosphate Dehydrogenase in Pancreatic P-Cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 7, p. 4895-4902, 1994.

SENER, A.; KAWAZU, S.; HUTTON, J. *et al.* The Stimulus-Secretion Coupling of Glucose-Induced Insulin Release. **Biochemical Journal**, v. 176, p. 217-232, 1978.

SHEPHERD, P. R.; WITHERS, D. J.; SIDDLE, K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. **The Biochemical journal**, v. 333 (Pt 3), p. 471-90, 1 ago 1998.

SIVITZ, W. I.; YOREK, M. A. Mitochondrial Dysfunction in Diabetes: and Therapeutic Opportunities. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 12, n. 4, p. 537-577, 2010.

SMITS, P.; SMEITINK, J.; HEUVEL, L. V. D. Mitochondrial translation and beyond: processes

implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2010, p. 737385, jan 2010.

SOUZA, C. T. DE; NUNES, W. M. S.; GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R. DE. Insulin secretion in monosodium glutamate (MSG) obese rats submitted to aerobic exercise training. **Physiological chemistry and physics and medical NMR**, v. 35, n. 1, p. 43-53, 2003.

SPEIER, S.; YANG, S.-B.; SROKA, K.; ROSE, T.; RUPNIK, M. KATP-channels in beta-cells in tissue slices are directly modulated by millimolar ATP. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 230, n. 1-2, p. 51-58, 2005.

SRIWIJITKAMOL, A.; COLETTA, D. K.; WAJCBURG, E. *et al.* Effect of acute exercise on AMPK signaling in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes: a time-course and dose-response study. **Diabetes**, v. 56, n. 3, p. 836-48, mar 2007.

SRIWIJITKAMOL, A.; COLETTA, D. K.; WAJCBURG, E. *et al.* Effect of acute exercise on AMPK signaling in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes: a time-course and dose-response study. **Diabetes**, v. 56, n. 3, p. 836-48, mar 2007.

SRIWIJITKAMOL, A.; IVY, J. L.; CHRIST-ROBERTS, C. *et al.* LKB1-AMPK signaling in muscle from obese insulin-resistant Zucker rats and effects of training. **American journal of physiology**, v. 290, n. 5, p. E925-32, maio 2006.

SUGANO, T.; OSHINO, N.; CHANCE, B. Mitochondrial functions under hypoxic conditions. The steady states of cytochrome c reduction and of energy metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 347, p. 340-358, 1974.

SUN, S.; JI, Y.; KERSTEN, S.; QI, L. Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. **Annual review of nutrition**, v. 32, p. 261-86, 21 ago 2012.

SZABAT, M.; LYNN, F. C.; HOFFMAN, B. G. *et al.* Maintenance of β -cell maturity and plasticity in the adult pancreas: developmental biology concepts in adult physiology. **Diabetes**, v. 61, n. 6, p. 1365-71, jun 2012.

TARASOV, A. I.; SEMPLICI, F.; RAVIER, M. A; *et al.* The Mitochondrial Ca^{2+} Uniporter MCU Is Essential for Glucose-Induced ATP Increases in Pancreatic β -Cells. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e39722, jan 2012.

THIRONE, A. C. P.; CARVALHEIRA, J. B. C.; HIRATA, A. E. *et al.* Regulation of Cbl-associated protein/Cbl pathway in muscle and adipose tissues of two animal models of insulin resistance. **Endocrinology**, v. 145, n. 1, p. 281-93, jan 2004.

TORGAN, C. E.; BROZINICK, J. T.; BANKS, E. A. *et al.* Exercise training and clenbuterol reduce insulin resistance of obese Zucker rats. **American Journal of Physiology**, v. 264, n. 3 Pt 1, p. E373-E379, 1993.

UEDA, H.; URANO, Y.; SAKURAI, T. *et al.* Enhanced expression of neuronal nitric oxide synthase

in islets of exercise-trained rats. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 312, n. 3, p. 794-800, 19 dez 2003.

URANO, Y.; SAKURAI, T.; UEDA, H. *et al.* Desensitization of the inhibitory effect of norepinephrine on insulin secretion from pancreatic islets of exercise-trained rats. **Metabolism**, v. 53, n. 11, p. 1424-1432, nov 2004.

VIOLLET, B.; LANTIER, L.; DEVIN-LECLERC, J. *et al.* Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. **Frontiers of Bioscience**, v. 14, n. 1, p. 3380-3400, 2009.

VIVAS, Y.; MARTÍNEZ-GARCÍA, C.; IZQUIERDO, A. *et al.* Early peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulated genes involved in expansion of pancreatic beta cell mass. **BMC medical genomics**, v. 4, n. 1, p. 86, jan 2011.

XU, X.; YING, Z.; CAI, M. *et al.* Exercise ameliorates high-fat diet-induced metabolic and vascular dysfunction , and increases adipocyte progenitor cell population in brown adipose tissue Exercise ameliorates high-fat diet-induced metabolic and vascular dysfunction , and increases adipocytes. **American Journal of Physiology**, v. 300, n. 5, p. R1115-25, 2011.

WATSON, R. T.; PESSIN, J. E. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. **Recent progress in hormone research**, v. 56, p. 175-93, jan 2001.

WESTERLUND, J.; BERGSTEN, P. Glucose Metabolism and Pulsatile Release From Isolated Islets. **Diabetes**, v. 50, p. 1785-1790, 2001.

WHITEHEAD, J. P.; CLARK, S. F.; URSO, B. *et al.* Signalling through the insulin receptor. **Current opinion in cell biology**, v. 12, n. 2, p. 222-8, abr 2000.

WIEDERKEHR, A.; WOLLHEIM, C. B. Impact of mitochondrial calcium on the coupling of metabolism to insulin secretion in the pancreatic beta-cell. **Cell calcium**, v. 44, n. 1, p. 64-76, jul 2008.

WOLLHEIM, C. B. Beta-cell mitochondria in the regulation of insulin secretion: a new culprit in type II diabetes. **Diabetologia**, v. 43, n. 3, p. 265-77, mar 2000.

WOODS, S. C.; SEELEY, R. J.; COTA, D. Regulation of food intake through hypothalamic signaling networks involving mTOR. **Annual review of nutrition**, v. 28, p. 295-311, jan 2008.

WU, J.; BOSTROM, P.; SPARKS, L. M. *et al.* Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 366-376, 2012.

YOSHIOKA, K.; YOSHIDA, T.; KONDO, M. Reduced brown adipose tissue thermogenesis and metabolic rate in pre-obese mice treated with monosodium-L-glutamate. **Endocrinologia Japonica**, v. 38, n.1, p.75-79, 1991.

ZAC-VARGHESE, S. Hormonal Interactions Between Gut and Brain. **Brain**, p. 1-7, 2011.

ZAWALICH, W. S.; ZAWALICH, K. C. Influence of Pyruvic Acid Methyl Ester on Rat Pancreatic

Islets. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 6, p. 3527-3531, 1997.

ZECCHIN, H. G.; CARVALHEIRA, J. B. C.; SAAD, M. J. A. Mecanismos Moleculares de Resistência à Insulina na Síndrome Metabólica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 14, n. 4, p. 574-589, 2004.

ZELEZNÁ, B.; MAIXNEROVÁ, J.; MATYSKOVÁ, R. *et al.* Anorexigenic effect of cholecystokinin is lost but that of CART (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript) peptide is preserved in monosodium glutamate obese mice. **Physiological research**, v. 58, n. 5, p. 717-23, jan 2009.

ZEYDA, M.; STULNIG, T. M. Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. **Gerontology**, v. 55, n. 4, p. 379-86, jan 2009.

ZHANG, N.; HUAN, Y.; HUANG, H. *et al.* Atorvastatin improves insulin sensitivity in mice with obesity induced by monosodium glutamate. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 1, p. 35-42, jan 2010.

ZOPPI, C. C.; CALEGARI, V. C.; SILVEIRA, L. R.; CARNEIRO, E. M.; BOSCHERO, A. C. Exercise training enhances rat pancreatic islets anaplerotic enzymes content despite reduced insulin secretion. **European journal of applied physiology**, v. 111, n. 9, p. 2369-74, set 2011.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 02 Fev. 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/xml/pof_2008_2009.shtm>. Acesso em: 05 Fev. 2012.



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-UEPG