

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana Aplicada (PRONUT)

Potencial do treinamento físico aeróbio para minimizar os efeitos da deficiência de leptina em um modelo experimental de camundongos fêmeas

Daniela Boschetti

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Prof^a. Dr^a Anna Karenina Azevedo Martins

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Fabiana de Sant'Anna Evangelista

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana Aplicada (PRONUT)

Potencial do treinamento físico aeróbio para minimizar os efeitos da deficiência de leptina em
um modelo experimental de camundongos fêmeas

Daniela Boschetti

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Prof^a. Dr^a Anna Karenina Azevedo Martins
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Fabiana de Sant'Anna Evangelista

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Boschetti, Daniela

B742p Potencial do treinamento físico aeróbio para minimizar os efeitos da
deficiência de leptina em um modelo experimental de camundongos
fêmeas. / Daniela Boschetti. -- São Paulo, 2019.
67p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da USP. Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade
da USP. Faculdade de Saúde Pública da USP. Curso Interunidades
em Nutrição Humana Aplicada.

Orientadora: Martins, Anna Karenina Azevedo

Co-orientadora: Evangelista, Fabiana de Sant'Anna

1. Atividade física : Programa de perda de peso. 2. Diabete. I. T.
II. Martins, Anna Karenina Azevedo, orientador. III. Evangelista,
Fabiana de Sant'Anna, co-orientadora.

613.71 CDD

Daniela Boschetti

Potencial do treinamento físico aeróbio para minimizar os efeitos da deficiência de leptina em um modelo experimental de camundongos fêmeas

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr^a.Anna Karenina Azevedo Martins

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2019.

“Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração, do que medo na minha cabeça.”

Cora Coralina

Dedicatória

Dedico esse trabalho a meus pais, José Luiz e Vera Lúcia, meus irmãos, Tatiana e Leonardo, meu esposo Álvaro e meus filhos Victor e Gabriela. Sem o apoio de vocês nada seria possível.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Anna Karenina, por ser uma das poucas pessoas que acreditaram em mim. Pelo incentivo e aprendizado constantes. Muito obrigada!

À minha co-orientadora Fabiana, que não mediu esforços, para o desenvolvimento desse projeto. Muito obrigada!

Agradeço minha rede de apoio, familiares, amigos que me ajudaram direta e indiretamente para a realização desse sonho. Através de ajuda com as crianças, com a rotina do dia a dia, financeiramente, ou simplesmente com palavras de conforto nos momentos difíceis. Muito obrigada!

Agradeço a duas grandes amigas, Marielza e Flávia, sem elas esse projeto de vida não teria nem começado. Muito obrigada pelo carinho e incentivo sempre!

Aos amigos e companheiros de laboratório, Cynthia, Anna Laura, Bruno, Luiz Felipe, Marília, Renatinha, sem dúvidas, esse trabalho seria impossível sem vocês ao meu lado. Muito obrigada!

Às técnicas do laboratório de Biomedicina e Biotério da EACH, Lucimara e Isabel, pela disponibilidade e agilidade sempre. Muito obrigada!

Aos parceiros do Núcleo de estudos em biociências (NEB), Rafael, Luana, Debora, Mayara, Letícia, Fernanda, Flávia, Giovana e Andressa, pelas aulas, debates e conversas que agregam ao meu aprendizado profissional e pessoal. Muito obrigada!

Aos parceiros do laboratório de Histologia da Universidade Presbiteriana Mackenzie, ao laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor. Muito obrigada!

À CAPES pelo apoio financeiro. Muito obrigada!

E finalmente, aos meus pais, José Luiz e Vera Lúcia, aos meus irmãos, Tatiana e Leonardo, a meu esposo Álvaro e meus filhos, Victor e Gabriela, que sentiram na pele o que foi toda a trajetória do mestrado em minha vida, e permaneceram sempre ao meu lado. Muito obrigada!

Resumo

BOSCHETTI D. Potencial do treinamento físico aeróbio para minimizar os efeitos da deficiência de leptina em um modelo experimental de camundongos fêmeas. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Economia e Administração, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2019.

O treinamento físico aeróbio (TFA) tem sido cada vez mais recomendado para a prevenção e tratamento de comorbidades, que podem ter em comum a resistência periférica à insulina (RI), como o diabetes tipo 2 (DM2) e a obesidade. Caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo, a obesidade também implica a disfunção endócrina desse tecido. Leptina e adiponectina são hormônios secretados pelos adipócitos que desempenham importante função no metabolismo energético, cujo desequilíbrio está fortemente relacionado à obesidade e à RI. Fisiologicamente, mulheres apresentam maiores níveis de leptina e adiponectina comparados aos de homens. Contudo, em condições como a obesidade e/ou DM2 esses níveis diminuem, deixando o organismo de fêmeas sem os efeitos protetores dessas adipocinas. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos do TFA sobre as características morfofuncionais de TAB e pâncreas de camundongos fêmeas com deficiência de leptina. Para isso, camundongos fêmeas com oito semanas de idade C57BL/J6 selvagem (C57) ou com deficiência de leptina ob/ob (Lep^{ob}) foram separadas nos grupos sedentárias (S) e treinadas (T): C57S (n = 6), C57T (n = 6), Lep^{ob}S (n = 5) e Lep^{ob}T (n = 8). O TFA foi realizado durante oito semanas, com corrida a 60% da capacidade máxima, 1 h/dia, 5 x/semana. Água e ração foram administradas *ad libitum*. Os procedimentos foram aprovados pelo CEUA da EACH-USP (#001/2017). O acompanhamento do peso corporal e consumo de ração foi realizado semanalmente. Na 7ª semana de protocolo foram realizados os testes de tolerância à glicose (TTG) e à insulina (TTI). Ao final do protocolo de treinamento foram avaliados parâmetros metabólicos de repouso e de esforço através da calorimetria indireta. A eutanásia dos animais foi realizada com injeção intraperitoneal de anestésico e, em seguida, foram coletados os tecidos adiposos branco (TAB) subcutâneo e retroperitoneal e a porção esplênica do pâncreas, utilizados, posteriormente, para análises morfológicas. A determinação de adiponectina sérica foi realizada através de kit ELISA. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias mais o teste *post-hoc* de Bonferroni. O protocolo de TFA não foi eficaz em reduzir a adiposidade e hiperfagia dos animais Lep^{ob}S e Lep^{ob}T, contudo o grupo Lep^{ob}T apresentou tamanho reduzido de adipócitos do TAB-SC comparado ao grupo Lep^{ob}S. O TFA não afetou o metabolismo glicêmico dos animais. Os parâmetros metabólicos de repouso não apresentaram alteração, contudo, no teste de esforço físico máximo, o grupo Lep^{ob}T apresentou maiores tempo em teste até a exaustão e iVO_2 comparado ao grupo Lep^{ob}S. Por fim, embora o TFA não tenha aumentado a secreção de adiponectina, o que poderia regular positivamente o metabolismo glicêmico de camundongos deficientes em leptina, melhorou a condição metabólica desses animais e reduziu a hipertrofia dos adipócitos do TAB-SC.

Palavras-chaves: Camundongo fêmea Lep^{ob}; Diabetes tipo 2; Obesidade; Treinamento físico aeróbio.

Abstract

BOSCHETTI D. **Potential of aerobic physical training to minimize the effects of leptin deficiency in an experimental model of female mice.** 2019. Thesis (Master's Degree) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Economics, Administration and Accounting, Faculty of Public Health, University of São Paulo; 2019.

Aerobic physical training (APT) has become an important strategy for the prevention and treatment of comorbidities, which may have in common the peripheral resistance to insulin (RI), such as type 2 diabetes and obesity. Characterized by the excessive accumulation of adipose tissue, obesity also implies endocrine dysfunction of this tissue. Leptin and adiponectin are hormones secreted by adipocytes that play an important role in energy metabolism, whose imbalance is strongly related to obesity and RI. Physiologically, women have higher levels of leptin and adiponectin compared to men. However, in conditions such as obesity and/or type 2 diabetes these levels decrease, leaving the body of females without the protective effects of these adipokines. Thus, the present study aimed to investigate the effects of APT on the morphofunctional characteristics of white adipose tissue (WAT) and pancreas in leptin-deficient female mice. For this, 8-week-old wild C57BL/J6 (C57) or leptin-deficient ob/ob (Lep^{ob}) female mice were separated into the groups sedentary (S) and trained (T): C57S (n = 6), C57T (n = 6), Lep^{ob}S (n = 5) and Lep^{ob}T (n = 8). Mice were housed in a temperature-controlled (22 ± 2 °C) and 12-h light/12-h dark cycle, with free access to tap water and food *ad libitum*. The APT was performed for 1 h/day at 60% of maximal velocity achieved in the running capacity test, five times per week for eight weeks. The procedures were performed in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation and were approved by the Ethics Committee of the School of Arts, Sciences and Humanities of University of Sao Paulo (Process number 001/2017). Body weight and feed intake were evaluated weekly. In the 7th week of protocol, the glucose and insulin tolerance tests (GTT and ITT) were performed. At the end of the training protocol, metabolic parameters of resting and maximal exertion were evaluated through indirect calorimetry. The euthanasia of the animals was performed by intraperitoneal injection of anaesthetic and then the subcutaneous and retroperitoneal WAT and the splenic portion of the pancreas were collected, and subsequently used for morphological analysis. Serum adiponectin quantification was performed by ELISA kit. The results were analyzed by two-way ANOVA plus the Bonferroni *post-hoc* test. The APT protocol was not effective in reducing the adiposity and hyperphagia of the animals Lep^{ob}S and Lep^{ob}T, however the Lep^{ob}T group presented a reduced size of WAT-SC adipocytes compared to the Lep^{ob}S group. Also, APT did not affect the glycemic metabolism of these animals. Although the resting metabolic parameters were not different, in the maximal physical exercise test, the Lep^{ob}T group had longer time to exhaustion test and $\dot{V}O_2$ compared to the Lep^{ob}S group. Finally, although APT did not increase adiponectin plasma concentration, which could positively regulate the glycemic metabolism of leptin-deficient mice, it improved the metabolic condition of these animals and reduced the adipocyte hypertrophy of WAT-SC.

Keywords: Lep^{ob} female mice; Type 2 diabetes; Obesity; Aerobic physical training.

Lista de figuras

Figura 1. Principais adipocinas secretadas pelos adipócitos do TAB.....	16
Figura 2. Principais ações da leptina no organismo	18
Figura 3. Vias de sinalização da leptina para a inibição da secreção de insulina na célula β pancreática	19
Figura 4. Desenho experimental.....	26
Figura 5. Identificação das fases do ciclo estral	27
Figura 6. Evolução do peso corporal.....	34
Figura 7. Evolução do consumo de ração.....	37
Figura 8. Cinética do custo relativo de corrida durante o teste máximo	40
Figura 9. Glicemia de jejum (A); teste de tolerância à glicose (B); área sob a curva (C)	41
Figura 10. Teste de tolerância à insulina (A) e curva de decaimento – kITT (B)	42
Figura 11. Imagens ilustrativas de adipócitos do TAB-SC (A); medidas de diâmetro (B) e área (C) de adipócitos	43
Figura 12. Imagens ilustrativas de adipócitos do TAB-RP (A); medidas de diâmetro (B) e área (C) de adipócitos	44
Figura 13. Imagens ilustrativas do pâncreas (A); área de ilhota em relação a área de pâncreas - AI/AP (B).....	45
Figura 14. Correlação entre área de ilhota em relação a área de pâncreas - AI/AP e curva de decaimento – %kITT.....	46
Figura 15. Concentração sérica de adiponectina	46
Figura 16. Correlação entre o diâmetro do adipócito do TAB-SC e adiponectina (A) e correlação entre o diâmetro do adipócito do TAB-RP e adiponectina (B).....	47

Lista de tabelas

Tabela 1. Peso corporal, ganho de peso, peso de pâncreas e de tecidos.....	36
Tabela 2. Parâmetros metabólicos em repouso.....	38
Tabela 3. Parâmetros metabólicos em teste de esforço máximo	39

Lista de abreviaturas

AdipoR1 - Receptor de Adiponectina 1

AdipoR2 - Receptor de Adiponectina 2

AMPc - Adenosina monofosfato cíclico

AMPK - Proteína quinase ativada por monofosfato adenosina

AUC - Área sob a curva

DCNT - Doenças crônicas não transmissíveis

DM2 - Diabetes Mellitus tipo 2

GLUT 2 - Transportador de glicose tipo 2

GLUT 4 - Transportador de glicose tipo 4

HMW - Alto peso molecular

IL-6 - Interleucina 6

IL-10 - Interleucina 10

JAK/STAT - Janus Kinase / Transdutores de sinal e ativadores de transcrição

kITT - Constante de decaimento da glicose

LMW - Baixo peso molecular

MAPK - Proteína quinase ativadas por mitogênio

MMW - Médio peso molecular

NFkB - Fator nuclear kB

ObR - Receptos de Leptina

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAI-1 - Inibidor 1 do ativador de plasminogênio

PGC1 α - Coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma

PI3K - Fosfatidil inosital 3 quinase

PKA - Proteína quinase A

PKC - Proteína quinase C

PLC - Fosfolipase C

PIB - Produto interno bruto

PNAD - Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios

PNS - Pesquisa Nacional de Saúde

PPAR- α - Receptor alfa ativado pro proliferador de peroxissoma

PPAR γ - Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma

TAB - Tecido adiposo branco

TAM - Tecido adiposo marrom

TFA - Treinamento Físico Aeróbio

TNF- α - Fator de necrose tumoral Alfa

TTG - Teste de tolerância à glicose

TTI - Teste de tolerância à insulina

Sumário

1. Introdução	15
2. Objetivos	24
2.1. Objetivo geral	24
2.2. Objetivos específicos	24
3. Material e métodos	25
3.1 Modelo animal	25
3.2 Desenho experimental	25
3.3 Identificação da fase do ciclo estral.....	26
3.4 Treinamento físico aeróbio (TFA)	27
3.5 Teste de esforço máximo.....	28
3.6 Determinação do peso corporal e do consumo de ração	28
3.7 Calorimetria indireta.....	28
3.8 Avaliações glicêmicas.....	30
3.9 Procedimento de morte e coleta de sangue e tecidos.....	30
3.10 Quantificação sérica de adiponectina.....	31
3.11 Análises morfológicas.....	32
3.12 Análise estatística.....	33
3.13 Financiamento.....	33
4. Resultados	34
4.1 Peso corporal e peso dos tecidos	34
4.2 Evolução do consumo de ração	36
4.3 Parâmetros metabólicos	37
4.4 Metabolismo glicêmico	40

4.5 Morfologia	43
4.5.1 Tecido adiposo branco	43
4.5.2 Pâncreas	45
4.6. Correlação %kITT e AI/AP.....	46
4.7. Concentração sérica de adiponectina	46
4.8. Correlações diâmetros TABs e adiponectina	47
5. Discussão	48
6. Conclusão	54
7. Bibliografia	55
Anexo	67

1. INTRODUÇÃO

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS/2015) mostram que 22,1% da população mundial adulta não praticam atividade física suficiente. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, 46% da população é insuficientemente ativa (IBGE - Pesquisa Nacional de Saúde - PNS 2013). Esses dados epidemiológicos justificam o fato de que o sedentarismo está entre os principais fatores que contribuem para os altos índices de mortalidade e morbidade em todo o mundo, e em particular para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), tais como obesidade, diabetes tipo 2, hipertensão arterial, entre outras (BOOTH; ROBERTS; LAYE, 2011; GONZÁLEZ; FUENTES; MÁRQUEZ, 2017).

O aumento do sedentarismo da espécie humana data de, aproximadamente, 10 mil anos atrás (EATON; EATON III, 2003), quando a agricultura e a pecuária, no período Neolítico, substituíram a caça, a luta e a fuga que se faziam necessárias para a alimentação e a sobrevivência das tribos nômades do período Paleolítico (GUALANO; TINUCCI, 2011; PADEZ, 2002). Mais recentemente, as revoluções industrial e tecnológica marcaram momentos de alterações abruptas na saúde pública proporcionando maior longevidade da população humana (EATON; EATON III, 2003; GOTTLIEB; MORASSUTTI; DA CRUZ, 2011). Em contrapartida, a oferta de transporte e o surgimento de ferramentas tecnológicas para facilitar as tarefas cotidianas contribuíram para o aumento do sedentarismo da população.

Dentre as DCNT está a obesidade. Há cerca de 20 anos o tema obesidade passou a estar no alvo de várias investigações científicas (KOPELMAN, 2000; MOKDAD et al., 2003; WHITAKER et al., 1997). Em 2016, a OMS apontou que mais de 1,9 bilhão de pessoas, acima de 18 anos, apresentavam sobrepeso e mais de 650 milhões eram consideradas obesas. Esta prevalência se traduz em um custo global de saúde equivalente a 2,8% do produto interno bruto (PIB) mundial, ou aproximadamente US\$ 2 trilhões (TREMMELE et al., 2017). No Brasil, segundo pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde, o sobrepeso e a obesidade atingem 55,7% e 19,8% da população, respectivamente (Vigitel Brasil, 2018).

A obesidade caracteriza-se pelo armazenamento excessivo de tecido adiposo, sendo o principal órgão responsável em estocar lipídios. Distinguem-se dois tipos de tecido adiposo: o tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM), os quais apresentam características funcionais, morfológicas e moleculares diferentes (BÓDIS; RODEN, 2018; IBRAHIM, 2010). O TAB deixou de ser considerado somente um armazenador de energia, passando a ser estudado também como um órgão endócrino com

funções de sintetizar e liberar peptídios biologicamente ativos, denominados adipocinas (GOLBIDI; LAHER, 2014). Tais peptídios bioativos regulam uma grande diversidade de funções orgânicas que vão desde o balanço do metabolismo energético e sistema reprodutor até alterações no sistema imune e vascular (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; LEE; LEE; CHOUE, 2013). Na **Figura 1** são mencionadas as principais adipocinas.

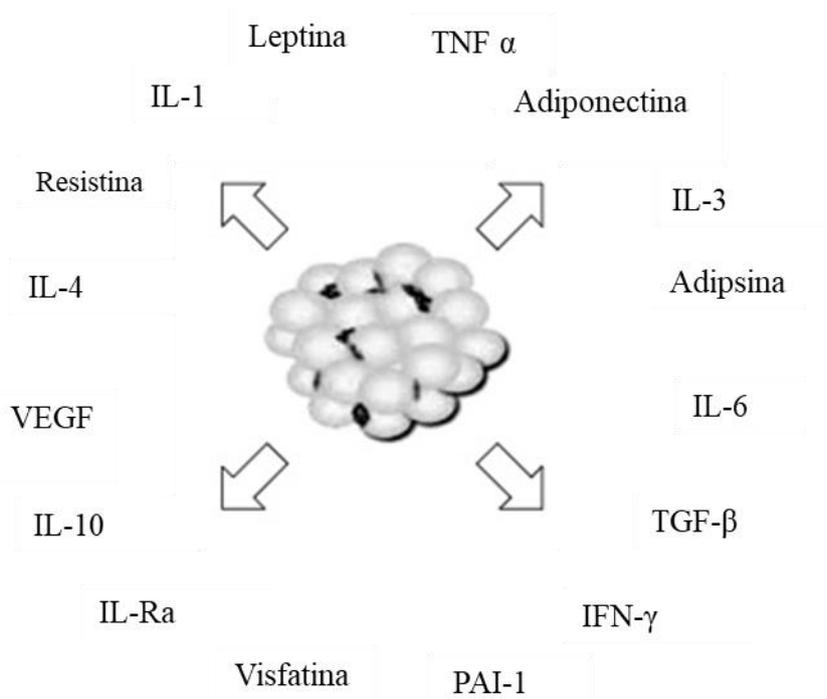


Figura 1. Principais adipocinas secretadas pelos adipócitos. TNF α : fator de necrose tumoral alfa; IL:interleucinas; TGF- β : fator transformador de crescimento beta; INF- γ : interferom gama; PAI1:inibidor 1 do ativador de plasmiogênio; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular. (Adaptado de LEE; LEE; CHOUE, 2013).

O TAB pode ser dividido em dois principais depósitos, o subcutâneo, localizado sob a pele e principalmente, nas regiões superficiais e profundas do abdômen e na região gluteofemoral, e o visceral, que incluem os depósitos retroperitoneal, mesentérico, omental, gonadal e pericárdico. A diferença entre esses depósitos não está apenas em sua localização, mas também no desempenho de diferentes funções metabólicas (ZWICK et al., 2018). A proporção desses dois depósitos varia de acordo com a idade, o sexo, estado nutricional, estatus energético e genética. O TAB visceral (TAB-V) corresponde a 6 a 20% enquanto o TAB subcutâneo (TAB-SC) por 80 a 90% de TAB do corpo inteiro (BÓDIS; RODEN, 2018;

SHUNGIN et al., 2015). Diferente do TAB, o TAM é um tecido especializado no gasto energético, devido ao alto conteúdo de mitocôndrias em seus adipócitos e por ser altamente vascularizados e inervados, apresentam alta capacidade para dissipar energia na forma de calor, atuando, principalmente, na termogênese não dependente do tremor e no balanço energético (BÓDIS; RODEN, 2018; SCHOETTL; FISCHER; USSAR, 2018). O principal depósito de TAM em camundongos é na região interescapular (SYMONDS, 2012), enquanto em humanos adultos estão localizados nas regiões supraclavicular, cervical e mediastina superior (COHEN; SPIEGELMAN, 2015; CYPESS et al., 2009).

Os depósitos de TAB-V e TAB-SC apresentam diferenças metabólicas significativas. Os depósitos viscerais apresentam maior secreção de adipocinas ligadas aos processos pró-inflamatórios como a interleucina 6 (IL-6), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1), enquanto a secreção de leptina e adiponectina são maiores nos depósitos subcutâneos (FURUKAWA et al., 2017; IBRAHIM, 2010; KERSHAW; FLIER, 2004; TCHKONIA et al., 2013). As células adiposas dos depósitos viscerais apresentam maior sensibilidade à lipólise induzida por catecolaminas, e os ácidos graxos provenientes da hidrólise dos triglicerídeos são secretados diretamente no sistema porta hepático, ocasionando um impacto direto no metabolismo energético do fígado (BÓDIS; RODEN, 2018; FONSECA-ALANIZ et al., 2006; TCHKONIA et al., 2013). Além das funções metabólicas, a função endócrina do tecido adiposo, tem se tornado mais e mais complexa, na medida em que um número cada vez maior de adipocinas é conhecido.

Leptina e adiponectina são as adipocinas mais abundantes produzidas pelos adipócitos brancos. Ambas apresentam forte relação com a obesidade e resistência à insulina quando estão em desequilíbrio (BOLIN; OTTON, 2018; TAHAPARY et al., 2017). Em meados da década de 90, o grupo do pesquisador Jeffrey Friedman identificou o gene *ob* como origem da expressão do peptídeo Ob (denominado mais tarde como leptina) produzido por adipócitos com a função de suprimir o apetite (FAULKNER; DE CHANTEMÈLE, 2019).

Poduzida também em outros tecidos, tais como TAM, músculo esquelético, placenta, ovários, medula óssea e estômago (WANG, B.; CHARUKESHI CHANDRASEKERA; J PIPPIN, 2014), a leptina atua sobre o hipotálamo, desempenhando importante função no controle do apetite e aumento do gasto energético, regulando assim o peso corporal (GOLBIDI; LAHER, 2014). Além disso, a leptina desempenha outras atividades, incluindo a regulação da função endócrina, da reprodução e da imunidade (AL-HAMODI et al., 2014). Controla o consumo e o gasto energético total, contribuindo para o

balanço energético (MORTON et al., 2010), atua na termorregulação (DÖRING et al., 1998), além de mediar possível ativação do TAM e a termogênese (MARTINS et al., 2017), como ilustrado na **Figura 2**.

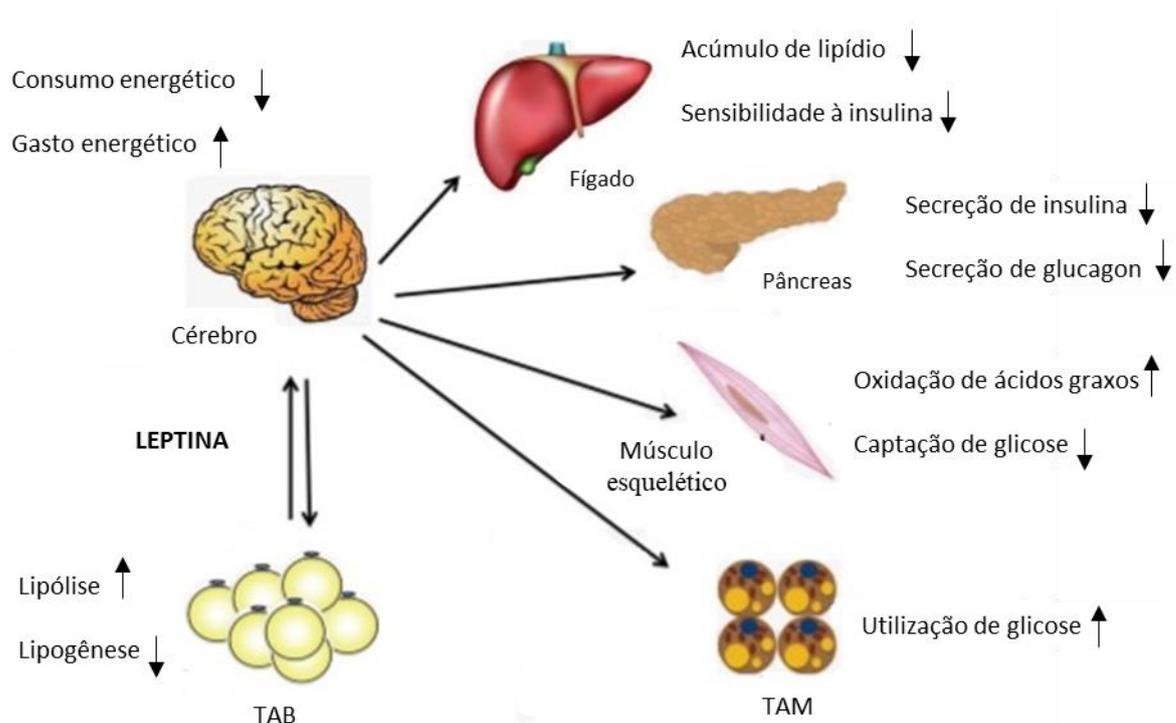


Figura 2. Principais ações da leptina no organismo. Adaptado de LI, SHUFEN; LI (2016).

Nos seres humanos, a obesidade está associada com níveis elevados de leptina circulante, provavelmente, refletindo um estado de resistência a esse hormônio (AL-HAMODI et al., 2014). As principais vias de sinalização da leptina são a cascata de transdução JAK/STAT, a cascata da proteína quinase mitogênica (MAPK), as vias da fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K) e da proteína quinase ativada por monofosfato adenosina (AMPK). Receptores de leptina (ObR) apresentam seis isoformas diferentes. O de maior comprimento (ObRb) está envolvido na sinalização de JAK/STAT e está presente no tecido adiposo, músculo, fígado e ilhotas pancreática (MARROQUÍ et al., 2012).

Precisamente na ilhota pancreática, receptores de leptina ObRb estão presentes, e sua ativação desempenha um importante papel na inibição da secreção de insulina (LI, SHUFEN; LI, 2016). Vários mecanismos estão envolvidos nesse processo, tais como a ativação de canais de K_{ATP} levando a diminuição do influxo de Ca^{2+} , e bloqueio da excitose

de insulina, assim como a ativação da fosfodiesterase 3B (PDE3B) dependente de PI3K reduzindo os níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), inibindo a via da proteína quinase A (PKA) envolvida na regulação de canais de Ca^{2+} e excitose, além de inibir a via da fosfolipase C/proteína quinase C (PLC/PKC) quando essa rota é ativada (MARROQUÍ et al., 2012) (**Figura 3**).

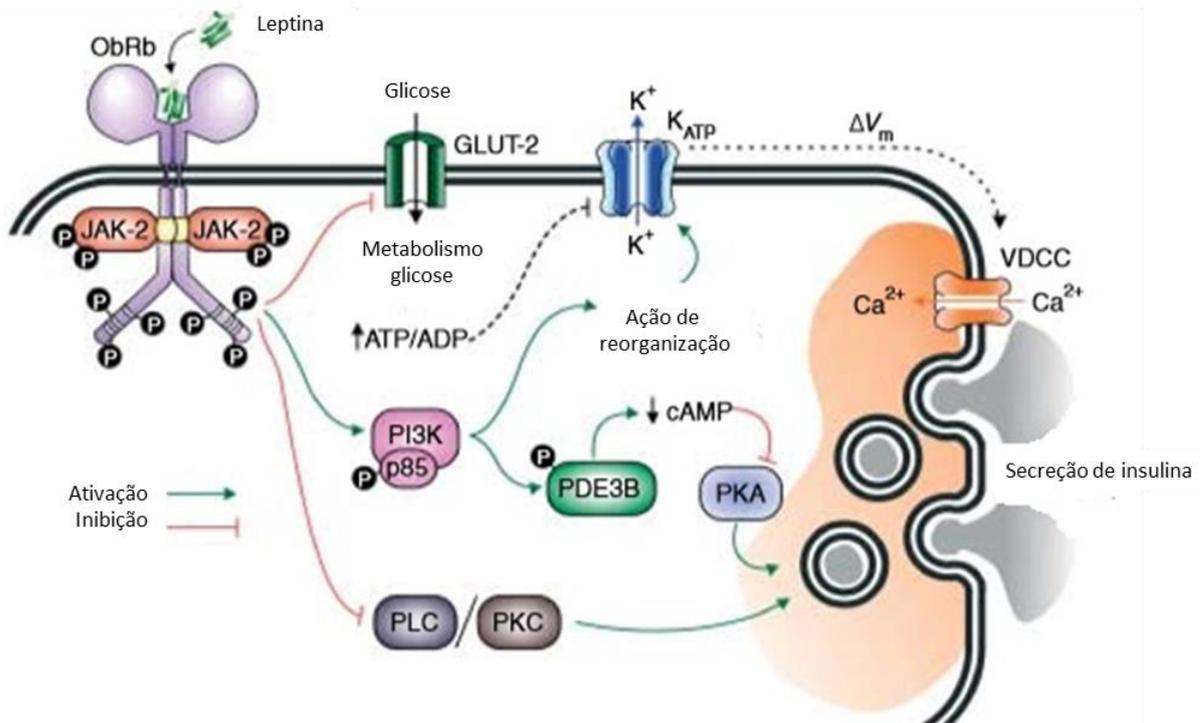


Figura 3. Vias de sinalização da leptina para a inibição da secreção de insulina pela célula β pancreática.

Adaptado de MARROQUÍ et al. (2012).

Outra importante adipocina secretada pelo TAB é a adiponectina, cujo mecanismo de ação se dá através da ativação de dois tipos de receptores, receptor de adiponectina 1 (AdipoR1) e receptor de adiponectina 2 (AdipoR2). Os receptores AdipoR1 são encontrados em diferentes tecidos e estão conectados à ativação de vias da proteína quinase cAMP (AMPK), enquanto os receptores AdipoR2 são, principalmente, expressos no fígado e estão ligados à ativação do receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomas (PPAR- α), reduzindo a inflamação e estresse oxidativo (GOLBIDI; LAHER, 2014). A adiponectina existe em isoformas circulantes de baixo peso molecular (LMW), médio peso molecular (MMW) e alto peso molecular (HMW). O aumento da adiponectina HMW tem sido relatado

como um biomarcador de estresse metabólico ainda melhor do que a adiponectina total (COIMBRA et al., 2014).

Entre as funções da adiponectina estão o aumento da oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético, através da ativação do PPAR- γ e da AMPK (YOON et al., 2011), aumento da captação de glicose no músculo esquelético (YAMAUCHI et al., 2002), aumento da secreção de insulina, com conseqüente redução da concentração plasmática de glicose (WU et al., 1999), proteção do endotélio vascular, com efeitos anti-inflamatórios (HORÁKOVÁ et al., 2015), e modulação nos níveis de leptina através da preservação da massa de tecido adiposo no estado insulinopênico (YE et al., 2015). A concentração de adiponectina está reduzida em indivíduos obesos assim como em pessoas com doenças cardiovasculares (KADOWAKI et al., 2006) e o baixo nível de adiponectina está associado com maior risco em desenvolver diabetes tipo 2 (DM2) (LI, SHANSHAN et al., 2009)

O desequilíbrio na relação entre leptina e adiponectina está associado a condições pró-inflamatórias e à resistência à insulina (LIN et al., 2015; TAHAPARY et al., 2017). Nesta condição, observam-se alterações intracelulares que resultam em prejuízos na translocação de vesículas contendo GLUT4 para a membrana celular, diminuindo a capacidade de células do músculo esquelético e tecido adiposo em captar glicose, levando ao acúmulo desta no sangue (SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006), podendo levar à progredção do DM2 (IACOBINI et al., 2018; SORIGUER et al., 2013). Segundo a Federação Internacional de Diabetes, quando não tratado, o DM2 pode causar doenças cardiovasculares, cegueira, insuficiência renal, amputação de membros inferiores (2017).

Um importante fator que necessita atenção especial quando estudamos a relação entre obesidade, resistência à insulina e DM2, é o sexo. No Brasil, dados do Vigitel (2018), apontam que o índice de obesidade entre as mulheres cresceu 71 %, assim como o diagnóstico de DM2 aumentou 29% entre 2006 e 2018. Considerando que a obesidade em mulheres aumenta o risco de desenvolver o DM2 (JUNG, 1997), e que o DM2 confere maior risco cardiovascular para mulheres (PETERS; HUXLEY; WOODWARD, 2014) aumentando o risco de infarto do miocárdio seguido de morte em 3,5 vezes enquanto em homens o aumento é de 2 vezes (DING et al., 2016). Torna-se, portanto, cada vez mais importante estudar métodos de tratamento dessas comorbidades em mulheres.

Diferentes modelos experimentais são utilizados para o estudo dos mecanismos fisiopatológicos da obesidade e do DM2, dentre os quais estão os camundongos com

deficiência de leptina (Lep^{ob}) (WANG, B. et al., 2014). Esses animais derivam da linhagem C57Bl/6J, e foram identificados em 1949 por um grupo de pesquisadores no Laboratório Roscoe B. Jackson Memorial, na cidade de Bar Harbor, EUA (INGALLS; DICKIE; SHELL, 1950). Os pesquisadores observaram que determinados animais de uma mesma ninhada apresentavam obesidade e carregavam uma mutação espontânea recessiva autossomal no cromossomo 6 (LINDSTRÖM, 2007; TOMITA et al., 1992).

Esses animais apresentam obesidade precoce, hiperglicemia, resistência à insulina, neuropatia diabética e diminuída sensibilidade de barorreflexo (SARTORI et al., 2017). São hiperfágicos, apresentam infertilidade e têm funções imunológicas prejudicadas, devido ao menor número de linfócitos (LINDSTRÖM, 2007). Além disso, apresentam prejuízo no mecanismo de termorregulação e um comportamento mais letárgico (BOCK; PAKKENBERG; BUSCHARD, 2003). Porém não há um consenso na literatura se este é um modelo que desenvolve o DM2 ou somente de resistência à insulina associada a obesidade (CHOO et al., 2006; KENNEDY et al., 2010).

A partir de 1 mês de vida os camundongos Lep^{ob} já apresentam um grande volume de ilhotas pancreáticas com alta proporção de células beta em sua constituição, embora, também já nesse período, a resistência à insulina esteja instalada (BOCK et al., 2003; TOMITA et al., 1992). A resistência à insulina está ligada à inibição da via de sinalização dependente de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), resultando numa comunicação prejudicada de insulina induzida pela glicose nos tecidos periféricos (ZAWALICH; TESZ; ZAWALICH, 2002). A atividade da glicose-6-fosfatase é maior nas ilhotas dos camundongos Lep^{ob} (KHAN; HONG-LIE; LANDAU, 1995) e suas células β são mais sensíveis ao efeito estimulatório da acetilcolina e ao efeito inibitório da noradrenalina (TASSAVA; OKUDA; ROMSOS, 1992).

FRÜHBECK et al. (2017) observaram redução na expressão e secreção de adiponectina em animais Lep^{ob} , que foi revertida após a administração de leptina em doses reduzidas. Esses autores demonstraram que o aumento da adiponectina promoveu redução sistêmica do estresse oxidativo e da inflamação, diminuindo o risco cardiometabólico. Isso revela que o aumento da adiponectina pode ser uma ferramenta terapêutica para melhorar a disfunção metabólica na obesidade e no DM2.

Já está bem estabelecido que existe uma forte relação entre inatividade física e a presença de fatores de risco à saúde, tais como, hipertensão arterial, resistência à insulina,

diabetes, dislipidemia e obesidade (ALOUKI et al., 2016; GORDON et al., 2013; TREMBLAY et al., 2010). A OMS (2015) recomenda a prática de 150 minutos de atividade física leve ou moderada, ou pelo menos 75 minutos de atividade física vigorosa, ou então a combinação de atividades moderadas e vigorosas que somadas correspondam a 150 minutos semanais. Além de um estilo de vida ativo, a prática do exercício físico, que é caracterizado como uma atividade planejada, estruturada e repetitiva (CASPERSEN; POWELL; CHRISTENSON, 1985), se faz necessária para uma efetiva prevenção e tratamento das comorbidades relacionadas ao comportamento sedentário.

O treinamento físico aeróbio (TFA) é uma ferramenta não farmacológica importante para provocar alterações benéficas nos parâmetros glicêmicos, perfil lipídico e composição corporal (LEHNIG; STANFORD, 2018; MADDEN, 2013; SHAW et al., 2006). O TFA melhora a resposta glicêmica associada ao controle de peso corporal (MALIN; KIRWAN, 2012) e essa resposta pode ser atribuída à melhora na sinalização intracelular da insulina (KLIMCAKOVA et al., 2006), melhora na função mitocondrial e capacidade oxidativa no músculo esquelético (KELLEY; KELLEY, 2001), aumento da expressão de proteínas como GLUT4 e glicogênio sintase (KIM; LEE; KIM, 2004), redução da adiposidade corporal, principalmente abdominal (ROSS; BRADSHAW, 2009) e finalmente, modificações na secreção de adipocinas pelo TAB, diretamente relacionadas com o controle glicêmico (BENATTI et al., 2008). RAZA et al. (2016) mostraram que o TFA melhora o balanço redox através do aumento da defesa antioxidante e da função respiratória mitocondrial no pâncreas de animais diabéticos. Esse efeito foi mediado pela sinalização do fator nuclear kappa B (NFkB), aumentando tanto a expressão de receptores GLUT2 quanto a fosforilação da glicose através da atividade da enzima glicoquinase.

O TFA é indicado para o tratamento da obesidade por promover aumento do gasto energético e da oxidação lipídica. Através do aumento da hidrólise de triglicerídeos contidos nos adipócitos, o TFA melhora a disponibilidade de ácidos graxos para a utilização como fonte energética pelo músculo esquelético (KWOK; LAM; XU, 2016; SAKURAI et al., 2017). MAZZUCATTO et al. (2014), observaram que o TFA foi capaz de aumentar o gasto energético de repouso e atividade lipolítica do TAB, reduzindo o peso corporal e a adiposidade. A redução da adiposidade contribui fortemente para melhorar a ação anti-inflamatória do TFA por meio da menor secreção de adipocinas pró-inflamatórias e maior secreção de adipocinas anti-inflamatórias como adiponectina e IL-10 (GLEESON et al., 2011; SPERETTA; LEITE; DE OLIVEIRA DUARTE, 2014).

Além disso, o TFA tem ação anti-inflamatória através do estímulo da secreção de miocinas pelo músculo esquelético que inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias em indivíduos saudáveis (PETERSEN; PEDERSEN, 2005), pacientes com predisposição a síndrome metabólica (RING-DIMITRIOU et al., 2006) e diabéticos (BALDUCCI et al., 2010). Dados prévios publicados por HIGA et al. (2014) mostraram que o TFA preveniu a obesidade e a resistência à insulina induzidas por dieta de cafeteria, e que entre os possíveis mediadores dessa resposta, foram apontados o aumento na concentração de adiponectina e a redução na concentração de leptina próximo aos níveis apresentados pelos animais controles.

Em outro estudo, EVANGELISTA et al. (2015) observaram que animais *Lep^{ob}* submetidos ao TFA apresentaram menor ganho de peso corporal em função do balanço energético negativo e aumentaram a tolerância ao esforço físico. Esses achados reforçam a ideia de que o TFA promove adaptações importantes que contribuem para a prevenção e o tratamento de doenças metabólicas. No entanto, assim como a maioria dos estudos publicados na literatura, os efeitos do TFA e os mecanismos envolvidos na prevenção e no tratamento das doenças metabólicas foram avaliados em animais machos. Uma avenida investigatória ainda precisa ser percorrida para conhecermos e entendermos os efeitos do TFA em modelos experimentais de fêmeas.

Diante do exposto, uma lacuna de conhecimento surgiu quando se buscou na literatura evidências sobre o potencial do TFA para promover adaptações morfofuncionais em TAB e pâncreas de camundongos fêmeas com deficiência de leptina que pudessem contribuir para prevenir ou reduzir a obesidade e os distúrbios do metabolismo glicêmico. Assim, o presente estudo foi delineado para testar a hipótese de que o TFA melhora a adiposidade e a função secretória do TAB, bem como as características morfológicas de pâncreas, e que esses efeitos contribuem para melhorar a condição metabólica de camundongos fêmeas com deficiência de leptina.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar os efeitos do TFA sobre as características morfofuncionais em TAB e pâncreas de camundongos fêmeas com deficiência de leptina.

2.2 Específicos

Estudar em camundongos fêmeas C57Bl/6J ou com deficiência de leptina (Lep^{ob}) submetidas ou não ao TFA:

- A evolução do peso corporal e do consumo de ração;
- O metabolismo energético em repouso e no exercício físico máximo;
- O metabolismo glicêmico;
- A morfologia das ilhotas pancreáticas e do TAB;
- A concentração plasmática de adiponectina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelo animal

Foram utilizadas fêmeas da linhagem C57Bl/6J magras (C57, n = 12) e obesas por deficiência de leptina (Lep^{ob}, n = 13) fornecidas pela Prof^a. Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira do Dept^o. de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo sob o número 001/2017 (Anexo 1).

As fêmeas, com 7 semanas de vida, foram separadas em quatro grupos, de acordo com o genótipo e se submetidas ou não ao TFA (sedentárias e treinadas): ob/ob sedentária (Lep^{ob}S, n = 5), ob/ob treinada (Lep^{ob}T, n = 8), C57 sedentária (C57S, n = 6), C57 treinada (C57T, n = 6). A distribuição dos animais nos grupos respeitou o pareamento por peso. Todas as fêmeas foram mantidas em local com temperatura ambiente controlada entre 22 a 24°C e, ciclo claro-escuro invertido de 12/12 h, com início da fase escura às 7 h e início da fase clara às 19 h. Água e ração foram administradas *ad libitum*.

3.2 Desenho Experimental

Os animais foram recebidos com sete semanas de vida, distribuídos em caixas (3 animais por caixa) e identificados. A identificação foi feita com chip subcutâneo, após anestesia por inalação com isoflurano (Cristália, Itapira, Brasil). Antes do início do protocolo, os animais passaram por um período de adaptação ao biotério e à esteira, durante 10 min a 0,3 Km/h. Na **Figura 1** estão apresentadas as etapas de realização do TFA e indicados os momentos de análise dos parâmetros metabólicos e a coleta de material biológico.

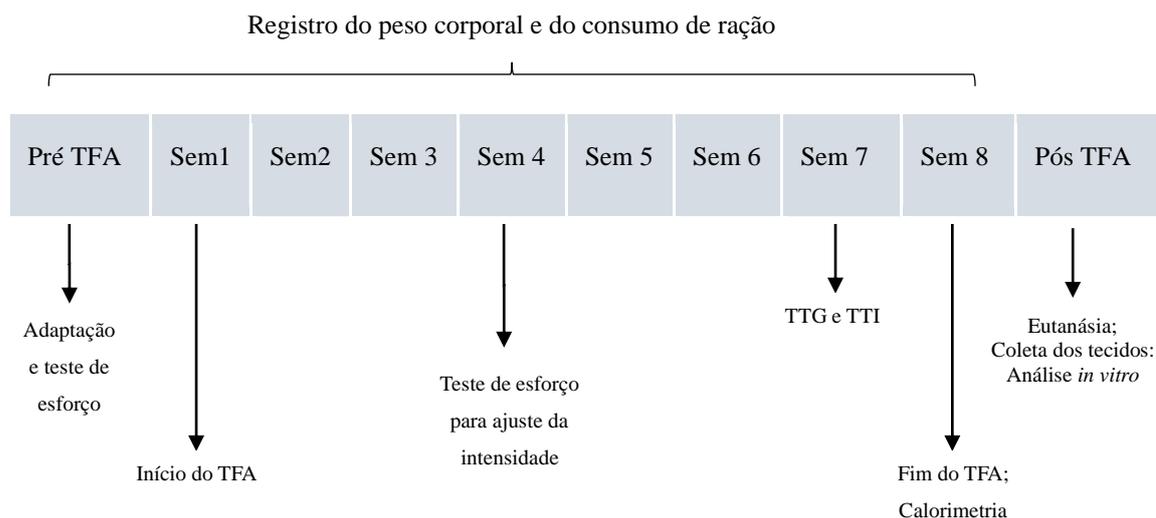


Figura 4. Desenho experimental. Para responder às perguntas deste trabalho foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6J magras e obesas deficientes em leptina. Estes animais foram distribuídos em dois grupos: sedentárias e treinadas. O TFA durou 8 semanas, ao longo das quais foram realizadas análises metabólicas e registros do ganho de peso corporal e do consumo de ração e água, em ambos os grupos. Após esse período, foi realizado o procedimento de morte e a coleta dos diversos tecidos para as análises, como detalhado na seção Material e Métodos.

3.3 Identificação da Fase do Ciclo Estral

Com o fim de identificar as possíveis influências das oscilações dos hormônios sexuais femininos sobre os parâmetros estudados, foi realizada a identificação da fase do ciclo estral dos camundongos antes de todas as avaliações (teste de esforço aeróbio, calorimetria indireta, teste de tolerância à glicose, teste de tolerância à insulina e eutanásia). Para adaptar o animal ao procedimento, foi realizada a coleta 2 dias antes de cada análise. A secreção vaginal foi coletada, delicadamente, com uma ponteira de plástico, após a introdução superficial de um pequeno volume de água na vagina do camundongo. O fluido vaginal foi colocado em uma lâmina de vidro e corado com violeta cristal (MCLEAN et al., 2012) para observação do material em microscópio óptico, em aumentos de 100x e 400x. A caracterização da fase do ciclo estral foi baseada na proporção de três tipos de células na secreção vaginal: células epiteliais, células corneificadas e leucócitos como observado na **Figura 5** abaixo.

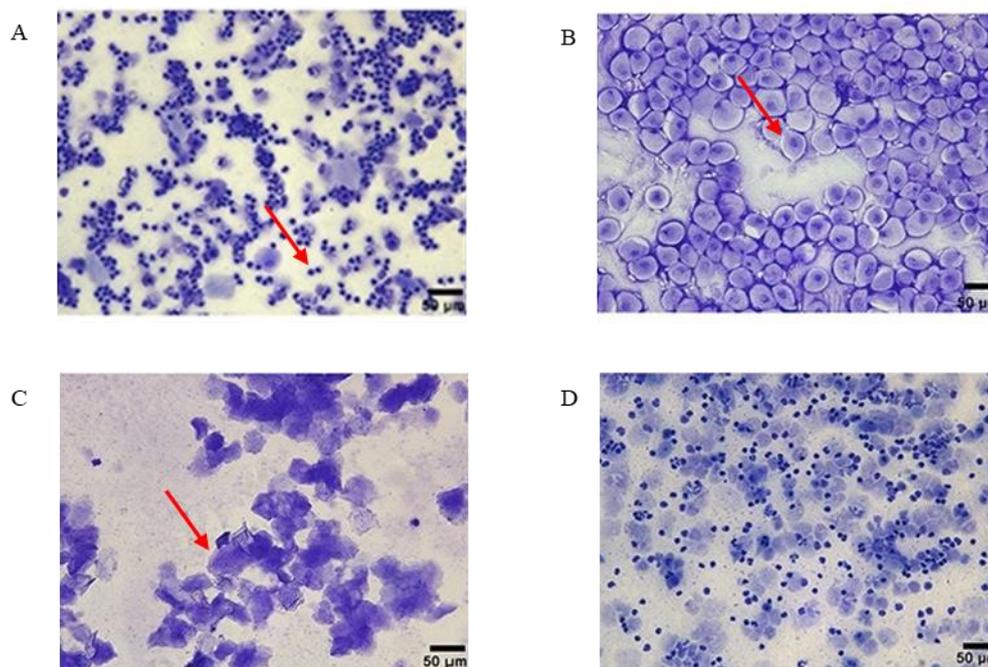


Figura 5. Identificação das fases do ciclo estral. Os animais foram submetidos ao lavado vaginal, 2 dias antes e no dia das avaliações para identificação da fase do ciclo estral. Diestro (A) fase caracterizada com predominância de leucócitos; Proestro (B) fase caracterizada com predominância de células epiteliais; Estro (C) fase caracterizada com predominância de células corneificadas e ausência de leucócitos e Metaestro (D) fase caracterizada por igual proporção de células epiteliais, células corneificadas e leucócitos. As setas indicam os diferentes tipos de célula. Figura A: leucócito; Figura B: célula epitelial e Figura C: célula corneificada.

Segundo NG; YONG; CHAKRABORTY (2010), os animais Lep^{ob} são estéreis e não apresentam um ciclo estral contínuo, permanecendo em estro, porém mantendo os níveis de beta estradiol parecido com as selvagens em fase proestro. Para os animais do grupo C57 as avaliações foram realizadas nas fases não ovulatórias do ciclo estral das fêmeas: diestro (predominância de leucócitos) e metaestro (igual proporção de leucócitos, células corneificadas e epiteliais) (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

3.4 Treinamento Físico Aeróbio (TFA)

O protocolo de TFA foi realizado em esteira rolante, 5 vezes por semana, durante 8 semanas. As sessões de treinamento tiveram intensidade de 60% da velocidade máxima atingida no teste de esforço físico máximo. A duração foi progressivamente aumentada, iniciando com 30 minutos na primeira semana e atingindo 60 minutos na quarta semana, conforme descrito por FERREIRA et al. (2007). Essa duração de treinamento foi mantida até o término do protocolo. As fêmeas sedentárias foram submetidas à caminhada na esteira, 3 vezes por semana, durante 5 minutos a 0,2 km/h para o grupo Lep^{ob} e 0,3 km/h para o grupo

C57. Essa diferença de velocidade se aplica devido à grande diferença de peso corporal entre os grupos, mantendo assim um padrão de caminhada para o grupo Lep^{ob}, evitando qualquer interferência do estresse gerado pela esteira.

3.5 Teste de esforço físico máximo

A capacidade de execução de exercício físico foi avaliada no início do protocolo, na 4^a semana e ao final do TFA através de um teste progressivo escalonado, sem inclinação até a exaustão, em esteira rolante FERREIRA et al. (2007). A velocidade inicial da esteira foi de 0,4 km/h, e a cada três minutos, a velocidade da esteira foi aumentada em 0,2 km/h até atingir a exaustão do animal, que foi caracterizada pela impossibilidade de manutenção do padrão da corrida. Na 4^a semana de protocolo foi realizado o teste somente nos grupos treinados para reajuste da intensidade do TFA.

3.6 Determinação do peso corporal e do consumo de ração

A pesagem dos animais foi realizada semanalmente em balança digital (Gehaka/modelo BG4001, São Paulo, Brasil), no mesmo dia e horário. Além da evolução do peso corporal, foi calculado o ganho de peso através da diferença entre o peso corporal final (semana 8) e o peso corporal inicial (semana 0). O consumo de ração foi avaliado, semanalmente, pesando-se a ração no início e final de 24 horas em grupos de animais mantidos na mesma caixa (2 a 3 animais por caixa) ao longo de todo o protocolo experimental.

3.7 Calorimetria indireta

A taxa metabólica de repouso dos animais foi determinada através da avaliação do consumo de oxigênio por calorimetria indireta (Panlab, Barcelona, Espanha) após o período de TFA. Para a adaptação ao protocolo, os animais foram colocados na esteira por 15 minutos durante os dois dias que antecederam o teste. Para a avaliação em repouso, o animal foi submetido a jejum de 2 horas, previamente, e mantido no sistema durante 5 minutos para adaptação. Posteriormente, foram registrados o consumo de oxigênio (VO₂, mL/min/kg), a produção de gás carbônico (VCO₂, mL/min/kg), o coeficiente respiratório (QR) e o gasto

energético (kcal/kg/min) pelo programa Metabolism® (Oxylet System, Panlab, Barcelona, Espanha) durante 30 minutos. Para o cálculo do VO_2 , VCO_2 , QR, gasto energético durante o repouso, foram considerados os 5 últimos minutos da avaliação em repouso (BROOKS; WHITE, 1978). Em seguida, o animal foi submetido ao teste de esforço físico utilizando o protocolo descrito anteriormente (item 3.5). Foram registrados o VO_2 (mL/min/kg), o VCO_2 (mL/min/kg), o QR e o gasto energético (kcal/min/kg). Após a obtenção dos resultados, foram calculados o $VO_{2\text{máx}}$ (mL/min/kg) e $VCO_{2\text{máx}}$ (mL/min/kg) e o gasto energético a partir dos valores médios obtidos durante o último estágio do teste de esforço. O VO_2 pico (mL/min/kg) foi considerado o maior valor segundo-segundo de VO_2 obtido no último estágio (EVANGELISTA, F. et al., 2005), o iVO_2 (Km/h) foi definido como a intensidade de exercício correspondente ao $VO_{2\text{máx}}$ (MACHADO; CAPUTO; DENADAI, 2004). Adicionalmente, o limiar anaeróbio foi determinado a partir do aumento abrupto da cinética do QR (PETROSINO et al., 2016; WASSERMAN; MCILROY, 1964), enquanto o custo relativo da corrida foi definido como a porcentagem do $VO_{2\text{máx}}$ mensurado nas cargas submáximas do exercício físico e, o $VO_{2\text{reserva}}$ como o delta entre o $VO_{2\text{máx}}$ e o VO_2 de repouso. Os valores absolutos de VO_2 , VCO_2 e gasto energético foram calculados de acordo com as seguintes equações:

$$VO_2 = \frac{(F \times [O_2]_e) - [O_2]_s \times F \times (1 - [O_2]_e/100)}{(1 - [O_2]_s/100 - [CO_2]_s/100)}$$

$$VCO_2 = \frac{F \times [O_2]_e/100 \times [CO_2]_s - [CO_2]_e \times F}{(1 - [O_2]_s/100 - [CO_2]_s/100)}$$

$$\text{Gasto energético} = [3,815 + (1,232 \times RQ)] \times VO_2 \times 1,44$$

Onde:

$[O_2]_e$ = concentração de oxigênio inicial

$[O_2]_s$ = concentração de oxigênio dentro da caixa

$[CO_2]_e$ = concentração de dióxido de carbono inicial

$[CO_2]_s$ = concentração de dióxido de carbono dentro da caixa

F = fluxo de ar

RQ = coeficiente respiratório

O iVO2 (Km/h) foi calculado utilizando a seguinte fórmula adaptada de MACHADO et al. (2004):

$$iVO2 = vel_{con} + (t/180) \times 0,2 \text{ km/h}$$

Onde:

vel_{con} = velocidade do último estágio concluído.

t = tempo que permaneceu no último estágio não-concluído.

180 = Tempo de duração de cada estágio.

0,2 = Taxa de incremento da velocidade a cada estágio.

3.8 Avaliações glicêmicas

As avaliações glicêmicas foram realizadas na 7ª semana do protocolo de TFA. A glicemia de jejum (8 h) foi determinada através de glicosímetro (AccuChek Advantage Roche Diagnostics®) em amostras de sangue retiradas da cauda dos animais, no momento antecedente aos testes glicêmicos. O teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTG) foi realizado através da determinação da glicemia em amostras de sangue retiradas da cauda dos animais nos tempos 0 (basal), 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração intraperitoneal de glicose (2 g/kg de peso corporal para o grupo C57 e 1 g/kg de peso corporal para o grupo Lep^{ob}). Os valores obtidos entre 15 e 120 min foram utilizados para calcular a área sob a curva (AUC) glicêmica. O teste de tolerância à insulina (TTI) foi realizado 72 h após o TTG. Para isso, a curva glicêmica foi determinada após a administração intraperitoneal de insulina (0,75 U/kg peso corporal; Novo Nordisk®, Paraná, Brasil), em amostras de sangue retiradas da cauda nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a administração do hormônio. Os valores obtidos entre os tempos de 5 e 30 minutos foram usados para calcular a constante da taxa de desaparecimento da glicose plasmática (kITT), mediante análise da curva de decaimento segundo BONORA et al. (1989).

3.9 Procedimento de morte, coleta de sangue e tecidos

Os animais foram submetidos ao procedimento de morte quarenta e oito horas após a última sessão de TFA. Para isso, os animais permaneceram oito horas em jejum e em

seguida foram anestesiados por injeção intraperitoneal de Tiopental de Sódio (3 mg/g/de peso corporal para o grupo C57 e 9 mg/g/peso corporal). No momento em que o animal não demonstrou sinais de reflexo nas patas traseiras, foi feita a pesagem em balança digital (Gehaka/modelo BG4001, São Paulo, Brasil) e em seguida iniciada a coleta do sangue através de punção na veia cava inferior. Para as análises histológicas, o pâncreas foi coletado e pesado, manteve-se o lóbulo esplênico do órgão e descartou-se os demais lóbulos. Em seguida, foi dividido em 2 amostras, sendo uma fixada em paraformaldeído (PFA) 4% durante 24 h, em seguida, armazenada em álcool 70% e posteriormente processada em resina sintética para coloração com hematoxilina e eosina, e a outra amostra foi congelada a -80 °C.

Os depósitos de TAB (retroperitoneal e subcutâneo) e do TAM interescapular foram coletados e pesados, e divididos em 2 partes para armazenamento. Uma parte foi fixada em PFA 4% durante 24 h e em seguida processada em resina sintética para coloração em hematoxilina e eosina, e a outra parte congelada a -80 °C.

Os músculos gastrocnêmio, plantar e sóleo de ambas as patas traseiras, foram coletados, pesados individualmente, colocados em nitrogênio líquido e posteriormente congelados a -80 °C. Após o procedimento de coleta, as carcaças foram congeladas e armazenadas no biotério para posterior incineração realizada por empresa especializada.

3.10. Quantificação sérica de adiponectina

A concentração sérica de adiponectina foi determinada por meio de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay), utilizando-se kit comercial (RAB1115 – Sigma, St Louis, EUA). Neste ensaio, o anticorpo específico para adiponectina está previamente fixado à placa de 96 poços. A adiponectina presente nas amostras se liga ao anticorpo de captura e é detectada, na sequência, por um anticorpo primário. Os padrões e amostras (diluídas 1:20000) foram pipetados nos poços, em duplicata, e foram incubadas por 2 h 30 min. Após a remoção de quaisquer substâncias não ligadas pelo anticorpo imobilizado, adicionou-se aos poços o anticorpo com biotina e incubou-se por mais 1 h. Após a lavagem, a peroxidase conjugada com avidina (HRP) foi adicionada, incubando-se por mais 45 min, nova lavagem foi realizada para remover qualquer resquício de avidina não ligada, uma solução de substrato foi adicionada aos poços. Após 30 min de incubação no escuro, as amostras apresentaram uma coloração amarelada, que é proporcional à quantidade presente do peptídeo de interesse. Após 30 min interrompeu-se a reação enzimática e a

intensidade da cor foi determinada pela leitura da absorbância em 450 nm. Os resultados foram apresentados em $\mu\text{g/mL}$.

3.11 Análises morfológicas

Parte dos depósitos de tecido adiposo retroperitoneal e subcutâneo foram destinados a avaliação do diâmetro e área dos adipócitos. As ilhotas pancreáticas foram avaliadas em sua densidade no tecido pancreático, através razão da área total de ilhota e área total de pâncreas. Para isso, os tecidos foram colocados em cassetes e desidratados em uma sequência de álcoois em ordem crescente de concentração (95% e 100%). Em seguida, foram imersos em xilol (diafanização), preparando o tecido para a parafinização que é o processo de imersão do material em resina sintética (Paraplast - Leica Biosystems, Richmond, EUA), preservando assim, as estruturas celulares intactas. A etapa seguinte é a inclusão, na qual é feito um bloco de resina sintética com o tecido incluído. Em seguida, os tecidos foram cortados em fatias de 4 μm de espessura, utilizando micrótomo (MICROM HM 340 E, Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Alemanha) e mergulhadas, rapidamente, em solução de 1g/L de gelatina incolor diluída em água, mantida a 40 °C, para manter o tecido esticado e fixado sobre a lâmina de vidro (26 mm x 76 mm). As lâminas foram mantidas em estufa, por 24 horas, na temperatura de 60 °C, para remover o excesso da resina sintética.

Antes da coloração, foi realizada a desparafinização, utilizando-se xilol, para remoção total da resina Paraplast, e a rehidratação do tecido, com uma sequência decrescente de álcoois, iniciando em álcool etílico 100% e seguindo para 95%, 80%, 70% e 50%. Para a coloração, foi utilizado o complexo de corante hematoxilina-eosina (H-E), para as avaliações da morfologia dos tecidos. Após a coloração, as lâminas passaram por mais um processo de desidratação com álcoois em sequência crescente, de 95% a 100%, e uma nova diafanização com xilol para remover outros resíduos e possibilitar a montagem de lâminas com lamínulas. As imagens das lâminas coradas foram obtidas por meio de microscopia óptica digitalizada (Axio observer. A1, Zeiss, Jena, Alemanha), em aumento de 400x, e a análise das imagens no programa Image Pro-Plus 4.1 (Media Cybernetics Inc, Rockville, EUA). As variáveis diâmetro (μm) e área (μm^2) dos adipócitos foram obtidas a partir da mensuração de 50 adipócitos por animal. Para o cálculo da razão área de ilhota por área de pâncreas (AI/AP), foram mensuradas as áreas de todas as ilhotas observadas em 3 cortes de tecido de cada animal, no

aumento de 400x, e a área total do pâncreas no aumento de 100x. O dado foi representado pela média dos valores de razão de cada animal em μm^2 .

3.12 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), e analisados por ANOVA de duas vias. Na presença de diferenças estatísticas significantes, foi utilizado o teste *post-hoc* de Bonferroni. Em todos os casos foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A análise estatística foi realizada através do software PRISM 7.0 (GrafPad software Inc, Califórnia, EUA).

3.13 Financiamento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

4. RESULTADOS

4.1 Peso corporal e peso dos tecidos

Os animais iniciaram o protocolo experimental com 8 semanas de vida. Nessa fase, já se observa diferença nos pesos corporais iniciais entre os grupos C57 e Lep^{ob}: C57S = $17,41 \pm 0,42$ g, C57T = $17,48 \pm 0,38$ g, Lep^{ob}S = $35,65 \pm 1,26$ g e Lep^{ob}T = $34,29 \pm 1,42$ g (**Figura 6**). Esta diferença já é prevista em função do fato dos animais Lep^{ob} apresentarem obesidade precoce a partir da 4^a semana de vida e se manteve durante todo o protocolo. No entanto, não houve diferença no peso corporal final entre os animais C57 e os animais Lep^{ob}: C57S = $22,01 \pm 0,76$ g, C57T = $20,07 \pm 0,42$ g, Lep^{ob}S = $50,28 \pm 1,38$ g e Lep^{ob}T = $48,86 \pm 1,42$ g.

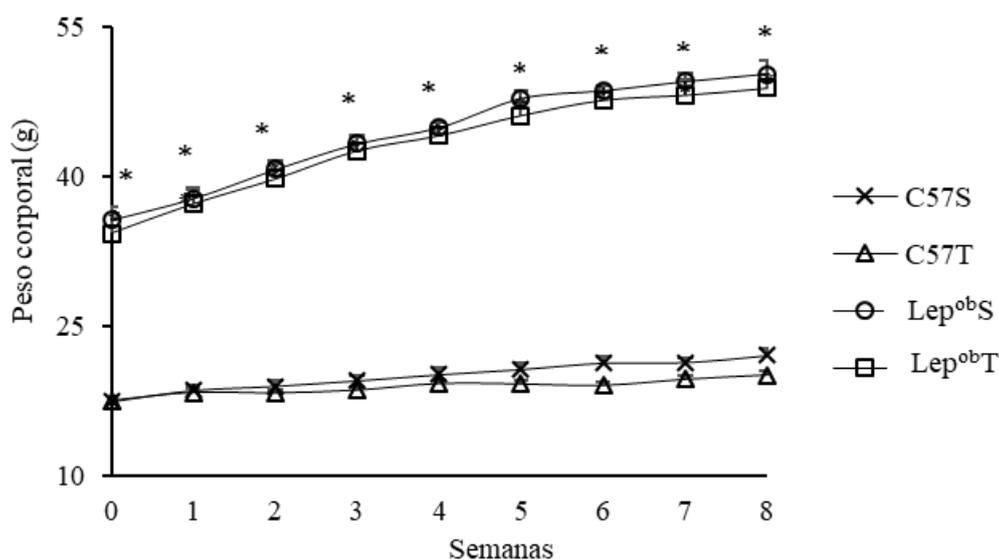


Figura 6. Evolução do peso corporal. Os animais foram pesados uma vez por semana, durante as oito semanas de TFA. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), e foram analisados por ANOVA de duas vias para medidas repetidas, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). C57S n = 6, C57T n = 6, Lep^{ob}S n = 5 e Lep^{ob}T n = 8. * $p < 0,05$ vs. C57S e C57T.

Na **Tabela 1**, pode-se observar que mesmo o grupo C57T, apresentando um ganho de peso corporal 56% menor ($2,59 \pm 0,26$ g) comparado com o grupo C57S ($4,61 \pm 0,47$ g),

não foi estatisticamente significativo. Como esperado, o ganho de peso corporal dos grupos Lep^{obS} ($14,63 \pm 1,51$ g) e Lep^{obT} ($14,57 \pm 1,43$ g) foi superior ao ganho de peso dos animais C57S e C57T. O peso relativo do pâncreas foi semelhante entre grupos C57S e C57T. Já nos grupos Lep^{obS} ($21,64 \pm 8,86$ mg/g) e Lep^{obT} ($18,85 \pm 5,73$ mg/g) o peso relativo desse órgão variou sutilmente, porém, sem significância estatística. Os TABs foram mais pesados nos grupos Lep^{obS} e Lep^{obT} comparados aos grupos C57S e C57T. O peso do depósito subcutâneo nos grupos Lep^{obS} ($104,07 \pm 2,08$ mg/g) e Lep^{obT} ($110,11 \pm 6,35$ mg/g) foi, aproximadamente, 5x maior do que nos grupos C57S ($17,47 \pm 2,43$ mg/g) e C57T ($19,17 \pm 3,79$ mg/g). Já o depósito retroperitoneal apresentou peso semelhante entre os grupos C57S ($5,75 \pm 1,08$ mg/g) e C57T ($5,57 \pm 0,77$ mg/g), enquanto no grupo Lep^{obT} ($35,63 \pm 2,41$ mg/g) o peso do tecido foi 18% menor comparado ao grupo Lep^{obS} ($43,53 \pm 8,45$ mg/g) (**Tabela 1**).

O peso do tecido adiposo marrom (TAM) foi maior nos grupos Lep^{obS} ($17,06 \pm 4,90$ mg/g) e Lep^{obT} ($21,00 \pm 5,63$ mg/g) comparados com os grupos C57S ($3,57 \pm 0,49$ mg/g) e C57T ($3,63 \pm 0,50$ mg/g). Contudo, apresentou diferença significativa somente entre o grupo Lep^{obT} e os grupos C57S e C57T. O TFA induziu um pequeno aumento no peso do músculo gastrocnêmio em ambos os grupos treinados (C57T $8,30 \pm 0,86$ mg/g e Lep^{obT} $3,59 \pm 0,22$ mg/g), quando comparados aos grupos sedentários (C57S $7,93 \pm 0,55$ mg/g e Lep^{obS} $2,37 \pm 0,18$ mg/g), embora sem diferença estatística. O grupo Lep^{obS} apresentou menor peso do músculo plantar ($0,33 \pm 0,05$ mg/g), diferença esta estatisticamente significativa, comparado aos grupos C57S ($1,12 \pm 0,11$ mg/g) e C57T ($1,19 \pm 0,20$ mg/g). Já no grupo Lep^{obT} ($0,64 \pm 0,15$ mg/g) esse músculo apresentou peso 94% maior comparado ao seu grupo controle Lep^{obS}. Com relação ao músculo sóleo, o peso no grupo Lep^{obT} ($0,96 \pm 0,26$ mg/g) foi cerca de três vezes maior que no grupo Lep^{obS} ($0,30 \pm 0,04$ mg/g) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Peso corporal, ganho de peso, peso do pâncreas e de tecidos.

	C57S n=6	C57T n=6	Lep ^{ob} S n=5	Lep ^{ob} T n=8
PC Inicial (g)	17,41 ± 0,42	17,48 ± 0,38	35,65 ± 1,26 *	34,29 ± 1,42 *
PC Final (g)	22,01 ± 0,76	20,07 ± 0,42	50,28 ± 1,38 *	48,86 ± 1,42 *
Ganho de PC (g)	4,61 ± 0,47	2,59 ± 0,26	14,63 ± 1,51 *	14,57 ± 1,43 *
Pâncreas (mg/g)	20,09 ± 3,89	20,60 ± 4,36	21,64 ± 8,86	18,85 ± 5,73
TAB-SC (mg/g)	17,47 ± 2,43	19,17 ± 3,79	104,07 ± 2,08 *	110,11 ± 6,35 *
TAB-RP (mg/g)	5,75 ± 1,08	5,57 ± 0,77	43,53 ± 8,45 *	35,63 ± 2,41 *
TAM (mg/g)	3,57 ± 0,49	3,63 ± 0,50	17,06 ± 4,90	21,00 ± 5,63 *
Gastrocnemio(mg/g)	7,93 ± 0,55	8,30 ± 0,86	2,37 ± 0,18 *	3,59 ± 0,22 *
Plantar (mg/g)	1,12 ± 0,11	1,19 ± 0,20	0,33 ± 0,05 *	0,64 ± 0,15
Sóleo (mg/g)	0,78 ± 0,14	0,77 ± 0,13	0,30 ± 0,04	0,96 ± 0,26

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). O peso do pâncreas e do músculo plantar foram analisados por Kruskal-Wallis e os demais analisados por ANOVA de duas vias, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). C57S, n = 6; C57T, n = 6; Lep^{ob}S, n = 5 e Lep^{ob}T, n = 8. TAB-SC, tecido adiposo branco subcutâneo, TAB-RP, tecido adiposo branco retroperitoneal, TAM, tecido adiposo marrom. * $p < 0,05$ vs. C57S e C57T.

4.2 Evolução do consumo de ração

O consumo médio de ração dos grupos C57S e C57T foi menor comparado aos grupos Lep^{ob}S e Lep^{ob}T durante as 8 semanas de TFA (C57S 2,31 ± 0,12 g, C57T 2,95 ± 0,11 g, Lep^{ob}S 5,55 ± 0,20 g e Lep^{ob}T 4,78 ± 0,86 g). Conforme mostra a Figura 7, há diferença significativa no consumo de ração na 3^a, 5^a e 6^a semanas entre os grupos C57S e C57T comparado ao grupo Lep^{ob}S. O grupo Lep^{ob}T apresentou uma tendência de consumo menor de ração a partir da 5^a semana.

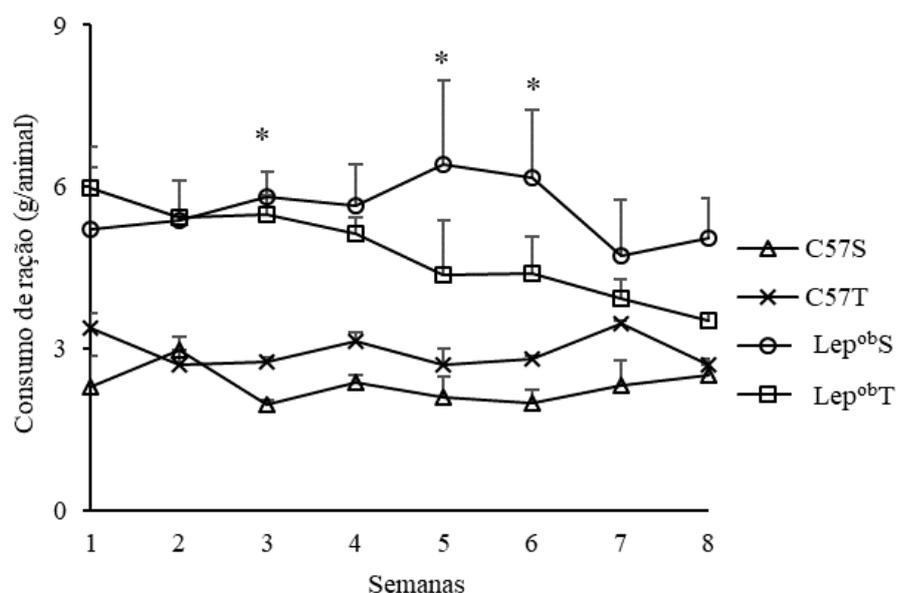


Figura 7. Evolução do consumo de ração. O consumo de ração foi registrado semanalmente através do peso de ração encontrado na caixa no período de 24h, durante o protocolo de TFA. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e foram analisados por ANOVA de duas vias para medidas repetidas, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). C57S, n = 6, C57T, n = 6, Lep^{ob}S, n = 5 e Lep^{ob}T, n = 8. * $p < 0,05$ Lep^{ob}S vs. C57S e C57T.

4.3 Parâmetros metabólicos

Na **Tabela 2** estão apresentados os dados metabólicos observados durante o repouso dos animais. Nenhuma diferença estatística foi encontrada nas variáveis VO_2 , VCO_2 , QR e GE entre os grupos estudados durante o repouso.

Tabela 2. Parâmetros metabólicos em repouso

	C57S	C57T	Lep ^{ob} S	Lep ^{ob} T
	n = 5	n = 6	n = 5	n = 8
VO ₂ (mL/kg/min)	36,08 ± 4,77	29,01 ± 4,92	28,38 ± 3,15	31,07 ± 1,81
VCO ₂ (mL/kg/min)	28,96 ± 3,75	23,41 ± 3,81	22,32 ± 2,37	23,93 ± 1,47
QR	0,81 ± 0,04	0,82 ± 0,03	0,79 ± 0,04	0,71 ± 0,09
GE (kcal/kg/min)	249,58 ± 32,36	200,88 ± 33,63	195,21 ± 21,22	216,40 ± 13,43

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média (EPM), e foram analisados por ANOVA de duas vias, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). C57S, n = 5, C57T, n = 6, Lep^{ob}S, n = 5 e Lep^{ob}T, n = 8; VO₂, consumo de oxigênio; VCO₂, produção de gás carbônico; QR, quociente respiratório; GE, gasto energético.

A **Tabela 3** mostra os resultados do teste de esforço físico até exaustão. O grupo C57T apresentou maiores valores de tempo e velocidade máxima comparados ao grupo C57S. Ambos os grupos Lep^{ob}S e Lep^{ob}T obtiveram menores valores de tempo e velocidade máxima comparados aos grupos C57S e C57T, no entanto, o TFA induziu melhora em ambas as variáveis no grupo Lep^{ob}T comparado ao Lep^{ob}S. As variáveis VO_{2max}, VO_{2pico}, VCO_{2max} e GE no VO_{2max} foram menores nos grupos Lep^{ob}S e Lep^{ob}T comparados aos grupos C57S e C57T. A intensidade correspondente ao VO_{2max} (iVO_{2max}) foi maior no grupo C57T comparado ao C57S, e embora os grupos Lep^{ob}S e Lep^{ob}T tenham apresentado menores valores comparados aos grupos C57S e C57T, o TFA promoveu melhora na iVO_{2max} do grupo Lep^{ob}T comparado ao Lep^{ob}S. O QR não diferiu entre os grupos estudados e os valores de consumo de oxigênio de reserva (VO_{2reserva}) dos animais Lep^{ob}S e Lep^{ob}T foram significativamente menores comparados aos grupos C57S e C57T.

Tabela 3. Parâmetros metabólicos em teste de esforço máximo

	C57S n = 6	C57T n = 6	Lep ^{ob} S n = 5	Lep ^{ob} T n = 8
Tempo máx (min)	35,17 ± 1,08	41,33 ± 1,48*	15,20 ± 1,36 #	21,25 ± 1,54 # \$
Vel. máx (cm/s)	57 ± 1,87	71 ± 3,39*	23 ± 2,09 #	34 ± 2,81 #
VO ₂ máx (mL/kg/min)	46,78 ± 2,11	57,74 ± 4,04*	29,81 ± 1,48 #	31,05 ± 2,18 #
VO ₂ pico (mL/kg/min)	52,24 ± 2,57	61,11 ± 3,57 *	34,24 ± 1,36 #	34,02 ± 1,36 #
IVO ₂ (km/h)	2,06 ± 0,06	2,57 ± 0,08*	0,70 ± 0,06 #	1,13 ± 0,12 # \$
VCO ₂ máx (mL/kg/min)	45,47 ± 1,65	48,50 ± 2,06	26,53 ± 2,20 #	27,67 ± 0,97 #
QR no VO ₂ máx	0,98 ± 0,06	0,85 ± 0,04	0,89 ± 0,05	0,94 ± 0,07
GE no VO ₂ máx (kcal/kg/min)	324,93 ± 20,54	403,27 ± 25,38*	210,82 ± 11,04 #	224,28 ± 12,13 #
VO ₂ reserva (ml/kg/min)	10,70 ± 5,35	25,18 ± 4,05	1,43 ± 4,26 &	0,91 ± 1,90 &

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média (EPM), e foram analisados por ANOVA de duas vias, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). C57S, n = 6 C57T, n = 6, Lep^{ob}S, n = 5 e Lep^{ob}T, n = 8; VO_{2max}, consumo máximo de oxigênio; VO_{2pico}, consumo de oxigênio pico; iVO₂, intensidade correspondente ao VO_{2max}; VCO_{2max}, produção máxima de gás carbônico; QR, quociente respiratório; GE, gasto energético; VO_{2reserva}, consumo de oxigênio de reserva. * $p < 0,05$ vs. C57S; # $p < 0,05$ vs. C57S e C57T; \$ $p < 0,05$ vs. Lep^{ob}S; & $p < 0,05$ vs. C57T.

O custo relativo de corrida (%VO_{2max}) para cada grupo pode ser observado na **Figura 8**. Aos 10 minutos de teste os animais do grupo C57T realizaram o exercício físico com menor percentual do VO_{2max} comparado aos animais Lep^{ob} e aos animais do grupo C57S. Nos minutos 20, 25 e 30 a diferença manteve-se somente entre os grupos C57T e C57S.

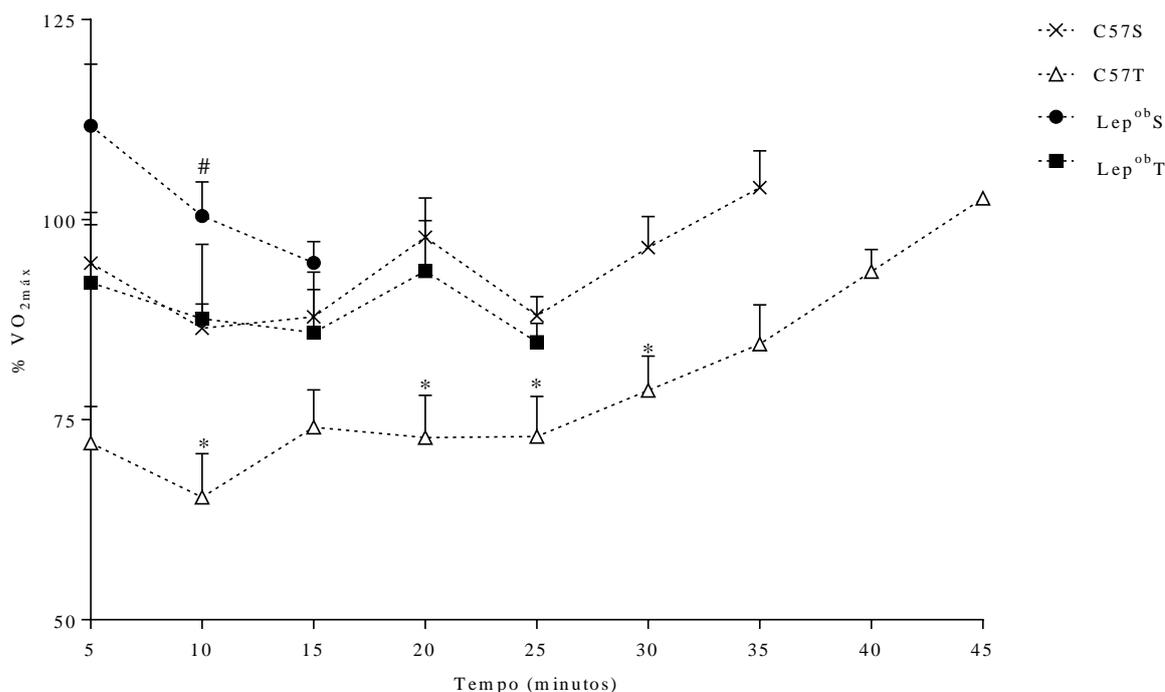


Figura 8. Cinética do custo relativo de corrida durante teste máximo. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e foram analisados por ANOVA de duas vias, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). C57S, n = 6, C57T, n = 6, Lep^{ob}S, n = 5 e Lep^{ob}T, n = 8. * $p < 0,05$ C57S vs. C57T; # $p < 0,05$ C57T vs. Lep^{ob}S e Lep^{ob}T.

4.4 Metabolismo glicêmico

Na sétima semana de protocolo experimental, após 8 h de jejum, foi avaliada a glicemia de jejum dos animais. O grupo Lep^{ob}S apresentou hiperglicemia de jejum ($131 \pm 1,02$ mg/dL) e intolerância à glicose (AUC: 31.522 ± 1148 mg/dL/120min) comparado ao C57S ($92 \pm 2,51$ mg/dL; AUC: 20.339 ± 1857 mg/dL/120min), como mostrado nas **Figuras 9A e 9C**. O TFA não modificou esse quadro, uma vez que o grupo Lep^{ob}T também apresentou hiperglicemia de jejum ($114 \pm 6,11$ mg/dL) e intolerância à glicose (AUC: 30.085 ± 547 mg/dL/120min). Na **Figura 9 B** o grupo Lep^{ob}T apresentou uma ligeira queda na glicemia a partir dos 30 min comparado ao grupo Lep^{ob}S. Porém não conseguiu baixar seus níveis próximo ao basal, após 120 min de teste. A partir dos 30 min, até o final do teste, a diferença entre os grupos C57S e C57T e os grupos Lep^{ob}S e Lep^{ob}T mostrou-se significativa. O TFA não modificou os valores de glicemia de jejum e de área sob a curva do grupo C57T comparado ao grupo C57S.

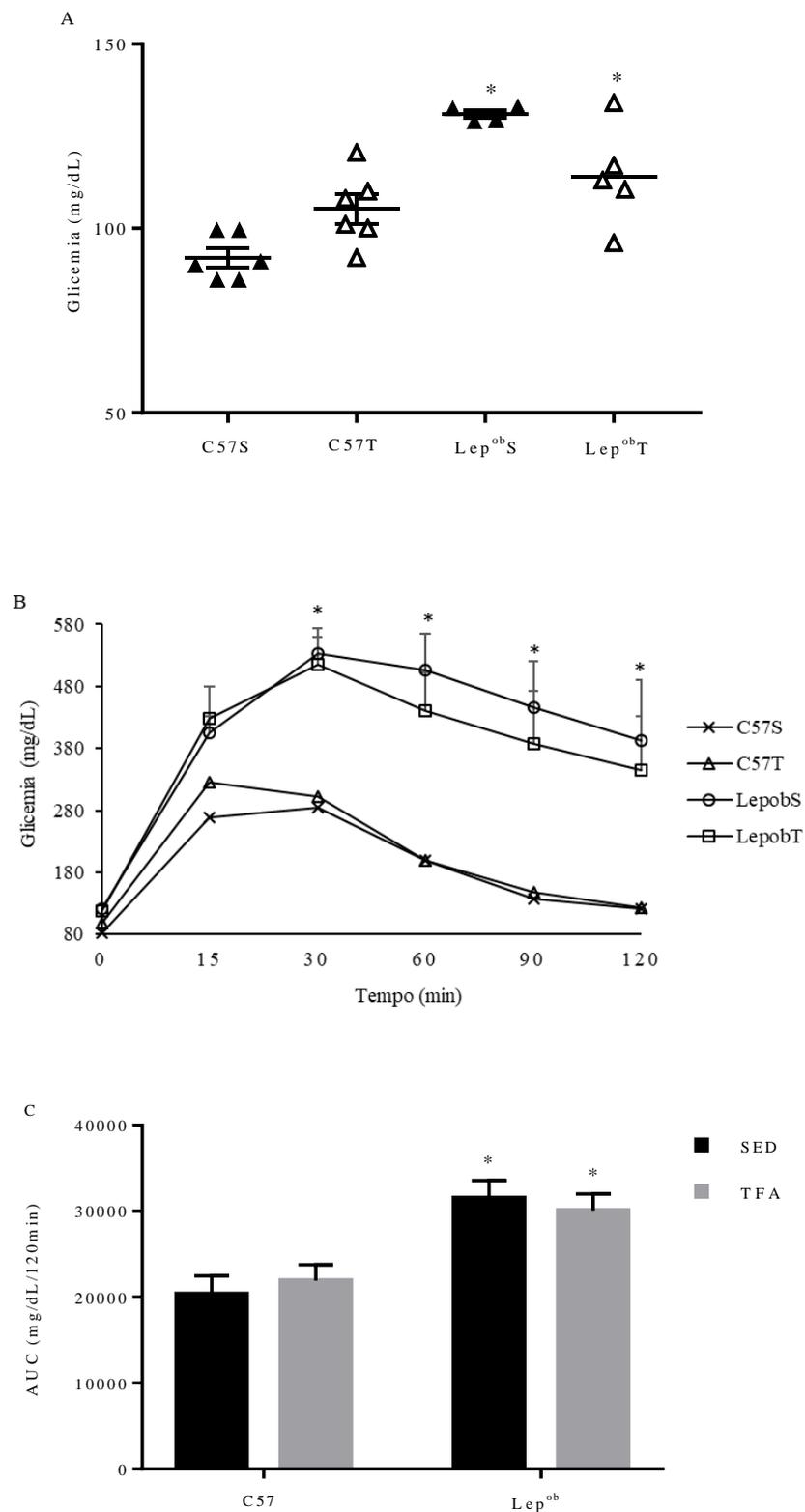


Figura 9. Glicemia de jejum (A), teste de tolerância à glicose (B) e área sob a curva (C). O teste de tolerância à glicose (TTG) foi realizado na 7ª semana do protocolo experimental. Através da determinação da glicemia em amostras de sangue retiradas da cauda dos animais nos tempos 0 (basal), 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração intraperitoneal de glicose. C57S, n = 6, C57T, n = 6, Lep^{ob}S, n = 5 e Lep^{ob}T, n = 4. * $p < 0,05$ Lep^{ob}S e Lep^{ob}T vs. C57S e C57T.

Já no teste de tolerância à insulina (TTI) (**Figura 10A**), observou-se que os grupos Lep^{obS} e Lep^{obT} apresentaram um padrão de decaimento da glicemia durante o teste muito parecido, e que diferiu a partir dos 15 minutos de teste dos grupos C57S e C57T. Embora o grupo Lep^{obT} tenha apresentado maior decaimento da glicose comparado ao grupo Lep^{obS} a partir dos 15 minutos até o final do teste, tais valores não foram diferentes estatisticamente. O mesmo pode ser evidenciado através do cálculo de decaimento da glicose (kITT) ilustrado na **Figura 10B**, o que revela que o TFA não melhorou a resistência à insulina apresentada pelos animais Lep^{ob}.

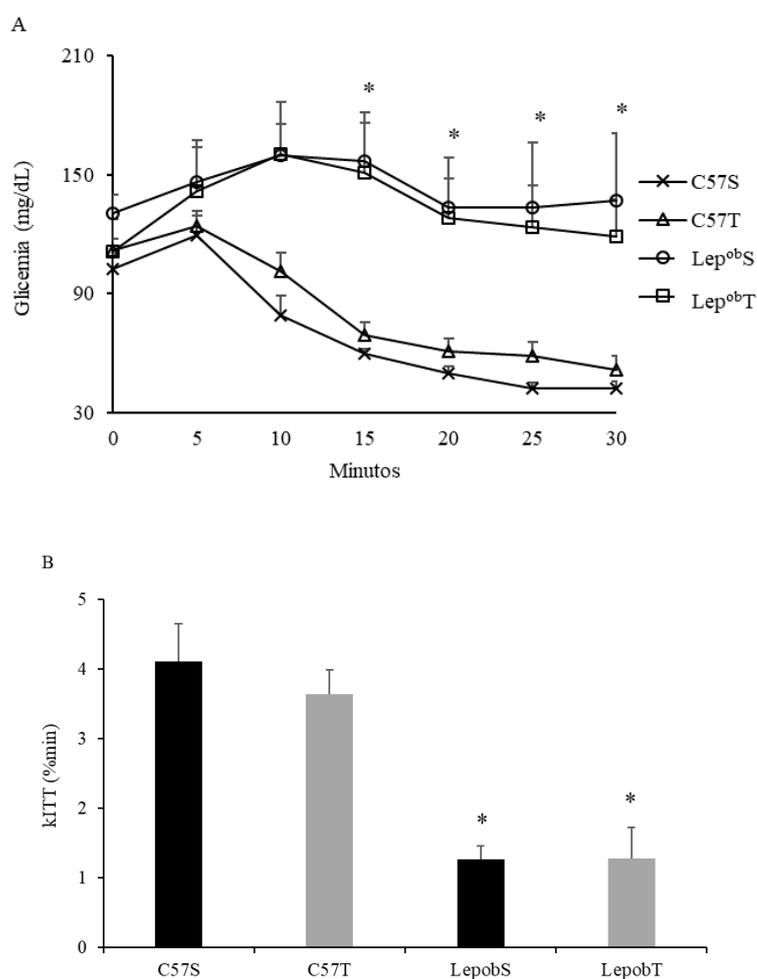


Figura 10. Teste de tolerância à insulina (A) e curva de decaimento (kITT) (B). O teste de tolerância à insulina (TTI) foi realizado na 7ª semana do protocolo experimental. O TTI foi realizado 72 h após o TTG. Para isso, a curva glicêmica foi determinada após a administração intraperitoneal de insulina (0,75 U/kg peso corporal), em amostras de sangue retiradas da cauda nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a administração de insulina. Os valores obtidos entre os tempos de 5 e 30 minutos foram usados para calcular curva de decaimento. Adotou-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). C57S, n = 6, C57T, n = 6, Lep^{obS}, n = 5 e Lep^{obT}, n = 5. * $p < 0,05$ vs. C57S e C57T. 4.6 Morfometria

4.5 Morfologia

4.5.1 Tecido adiposo branco

Na Figura 11 estão apresentados cortes histológicos de TAB-SC corados com hematoxilina e eosina, nos quais observa-se a presença de adipócitos hipertrofiados nos grupos Lep^{ob}S e Lep^{ob}T (Figura 11A). Como esperado, os grupos Lep^{ob}S e Lep^{ob}T apresentaram maiores diâmetro (Figura 11B) e área (Figura 11C) quando comparados aos grupos C57S e C57T. O TFA não interferiu nas medidas de adipócitos de animais magros, porém foi eficiente em diminuir tanto o diâmetro quanto a área dos adipócitos nos animais Lep^{ob}T comparados ao Lep^{ob}S.

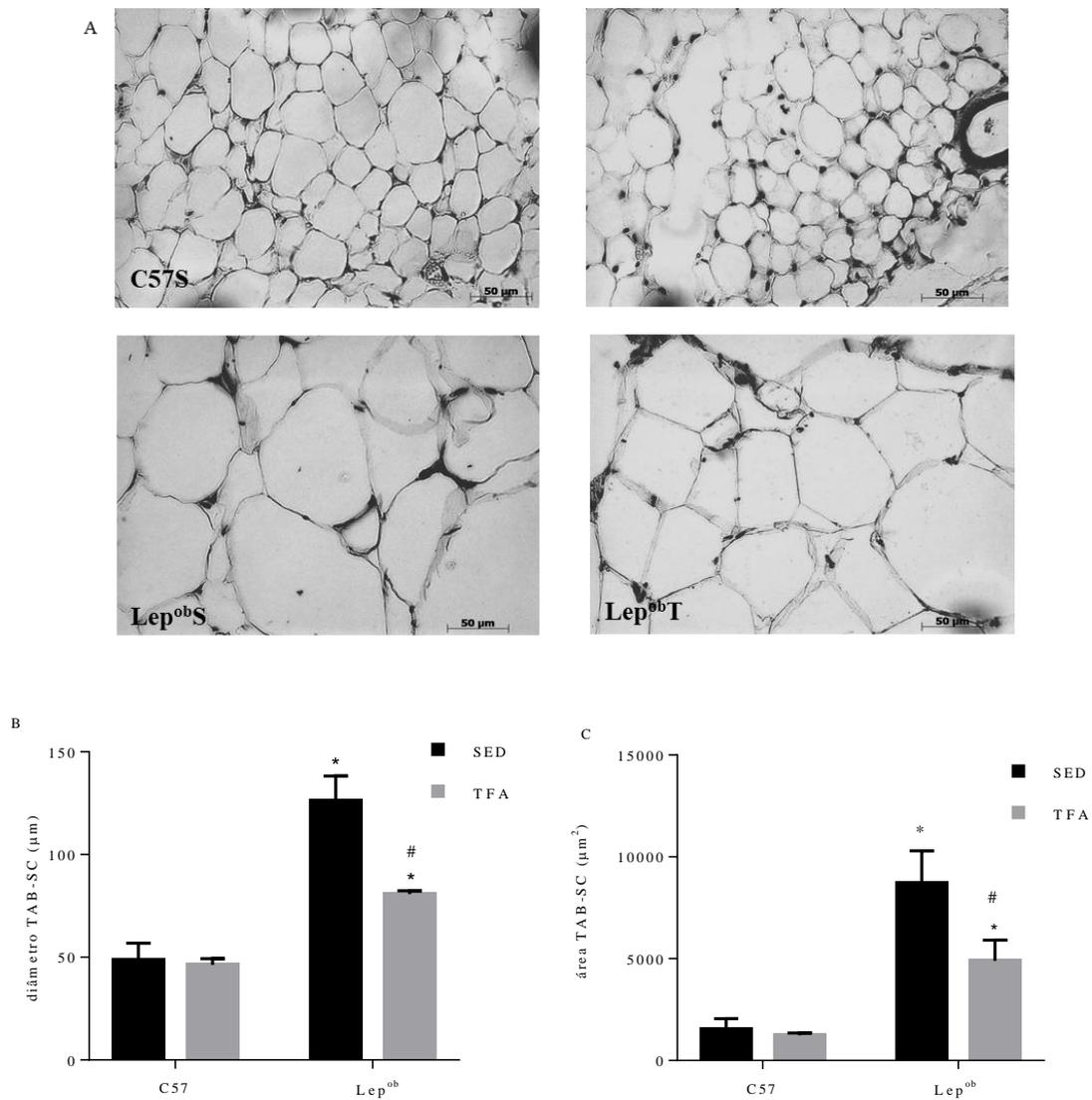


Figura 11. Imagens ilustrativas de adipócitos do TAB-SC (A); medidas de diâmetro (B) e área (C) de adipócitos TAB-SC. Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média (EPM), adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). C57S, n = 5, C57T, n = 5, Lep^{ob}S, n = 3 e Lep^{ob}T, n = 4. * $p < 0,05$ vs. C57S e C57T; # $p < 0,05$ vs. Lep^{ob}S.

Já na **Figura 12** observamos os cortes histológicos de TAB-RP corados com hematoxilina e eosina. As imagens revelam presença de adipócitos hipertrofiados nos grupos Lep^{ob}S e Lep^{ob}T (Figura 12A). Como esperado, os grupos Lep^{ob}S e Lep^{ob}T apresentaram maiores diâmetro (Figura 12B) e área (Figura 12C) quando comparados aos grupos C57S e C57T. E, diferente do que foi observado no TAB-SC, não foi encontrada diferença entre os animais Lep^{ob}S e Lep^{ob}T. Esse resultado revelou que o TFA não promoveu alteração na morfológica nas células adiposas de depósito visceral.

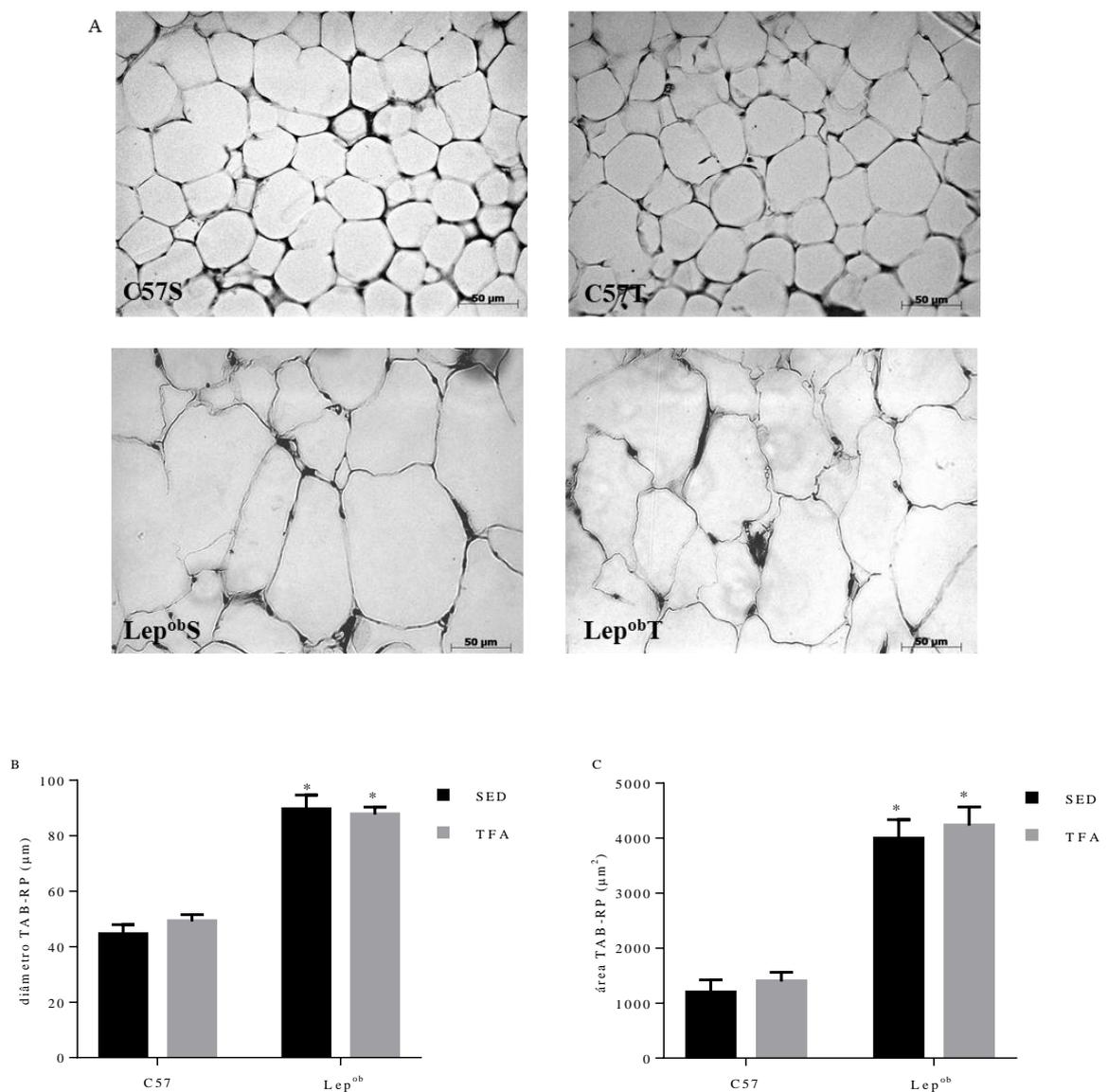


Figura 12. Imagens ilustrativas de adipócitos do TAB-RP (A); medidas de diâmetro (B) e área (C) de adipócitos TAB-RP. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). C57S n=4, C57T n=4, Lep^{ob}S n=4 e Lep^{ob}T n=4. * $p < 0,05$ vs. C57S e C57T.

4.5.2 Pâncreas

Na **Figura 13A** estão apresentados cortes histológicos de pâncreas corados com hematoxilina e eosina, nas quais podem ser observadas as ilhotas pancreáticas. Como esperado, os grupos Lep^{ob}S e Lep^{ob}T apresentaram ilhotas pancreáticas maiores comparados com os grupos C57S e C57T. A **Figura 13B** representa a relação de área de ilhota por área total de pâncreas.

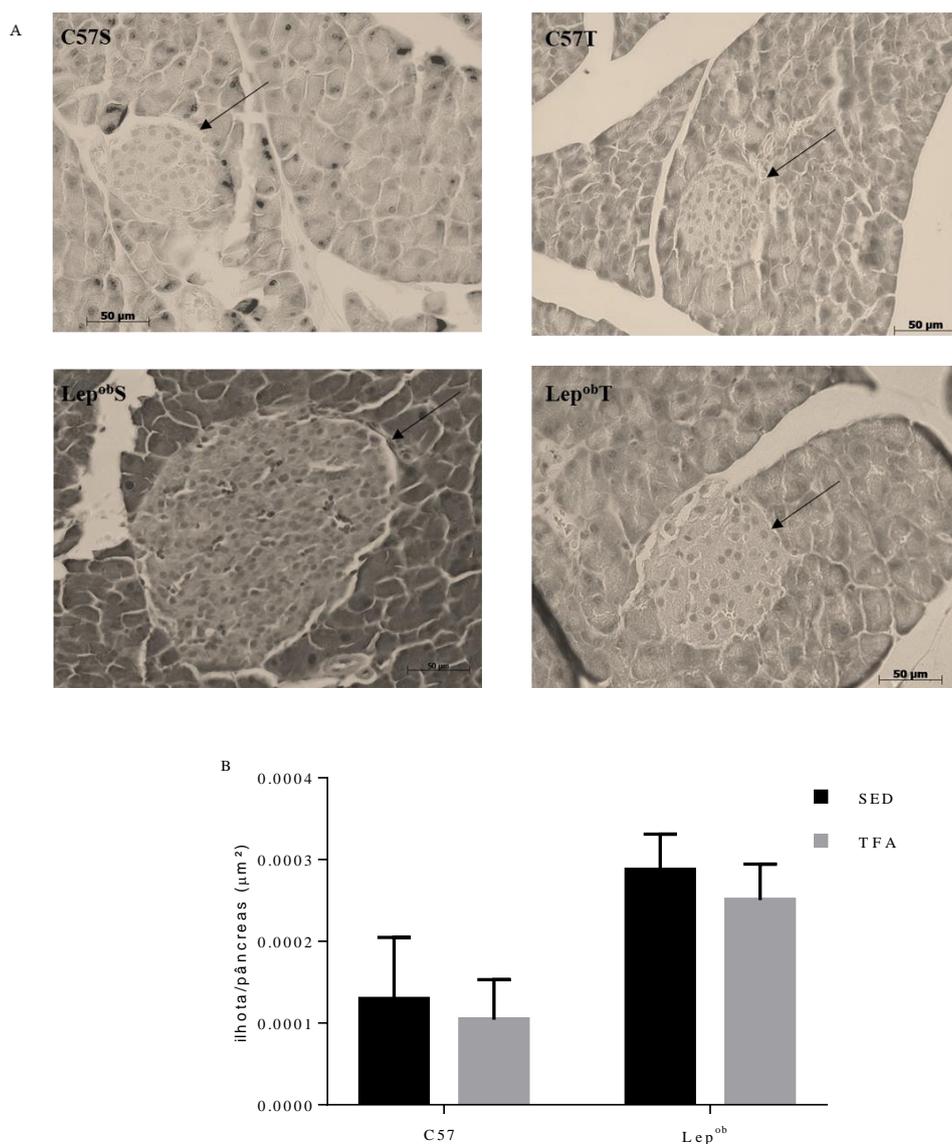


Figura 13. Imagens ilustrativas do pâncreas (A); Área de ilhota em relação a área de pâncreas (AI/AP) (B). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), e foram analisados por ANOVA de duas vias, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As setas apontam as ilhotas pancreáticas, cortes corados com hematoxilina/eosina. C57S, $n = 4$, C57T, $n = 4$, Lep^{ob}S, $n = 4$ e Lep^{ob}T, $n = 4$.

A **Figura 14** apresenta a correlação entre a relação de área de ilhota por área total de pâncreas (AI/AP) e a constante de decaimento da glicose (%kITT). Observamos que houve correlação entre esses parâmetros no estudo realizado.

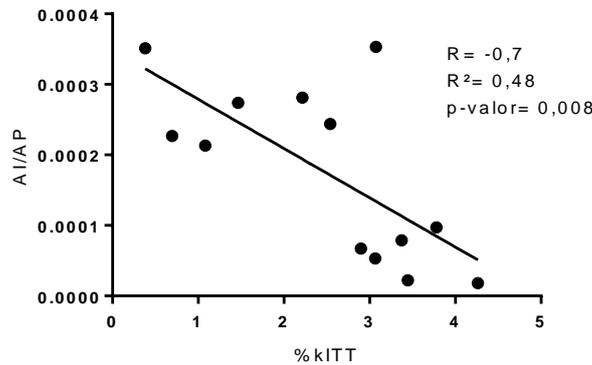


Figura 14. Correlação entre a AI/AP e %kITT C57S, n = 4, C57T n = 4, Lep^{ob}S n = 4 e Lep^{ob}T n = 4.

4.6 Concentração sérica de adiponectina

Na **Figura 15** estão apresentados os valores da concentração sérica de adiponectina. Houve uma tendência ao aumento dos níveis séricos de adiponectina (no grupo C57T $22,6 \pm 4,6 \mu\text{g/mL}$) comparado ao grupo C57S ($15,8 \pm 3,2 \mu\text{g/mL}$), o que não foi observado no grupo dos animais com deficiência de leptina (Lep^{ob}S: $20,9 \pm 4,9 \mu\text{g/mL}$ e Lep^{ob}T: $15,5 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$). Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos estudados.

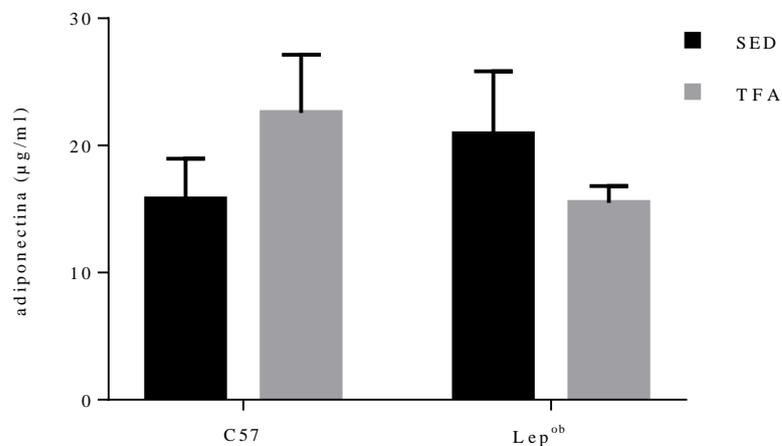


Figura 15. Concentração sérica de adiponectina. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e foram analisados usando ANOVA de duas vias com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). C57S n = 6, C57T n = 6, Lep^{ob}S n = 5 e Lep^{ob}T n = 5.

A **Figura 16** apresenta a correlação entre o diâmetro de adipócitos do TAB-SC e a concentração de adiponectina (A), assim como a correlação entre o diâmetro de adipócitos do TAB-RP e a concentração de adiponectina (B). Conforme pode ser observado, não houve correlação entre esses parâmetros no estudo realizado.

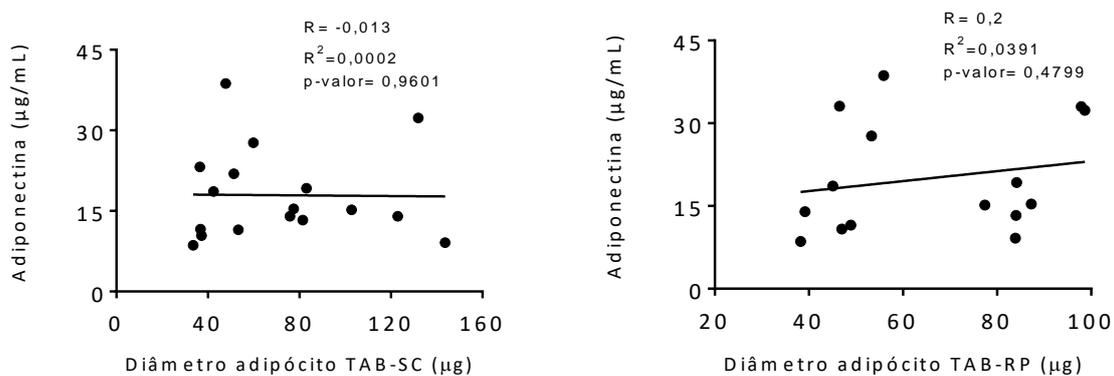


Figura 16. Correlação entre o diâmetro do adipócito do TAB-SC e adiponectina (A) e correlação entre o diâmetro do adipócito do TAB-RP e adiponectina (B) TAB-SC: C57S, n = 5, C57T, n = 5, Lep^{ob}S, n = 3 e Lep^{ob}T, n = 4. TAB-RP: C57S n=4, C57T n=4, Lep^{ob}S n=4 e Lep^{ob} n=4.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho foi delineado para testar a hipótese de que o TFA melhora a adiposidade e a função secretória do TAB, bem como as características morfológicas do pâncreas, e que esses efeitos contribuem para melhorar a condição metabólica de camundongos fêmeas com deficiência de leptina. A deficiência desse hormônio provoca um quadro severo de obesidade em animais homozigotos recessivos (Lep^{ob}). Além da obesidade precoce, decorrente, em parte, da hiperfagia, esses animais apresentam hiperglicemia, resistência à insulina, neuropatia diabética, diminuída sensibilidade de barorreflexo (SARTORI et al., 2017), infertilidade, prejuízo em funções imunológicas (LINDSTRÖM, 2007), no mecanismo de termorregulação e um comportamento mais letárgico (BOCK et al., 2003). Nossos achados apontam que o TFA foi benéfico para a condição metabólica desses animais, principalmente em função do aumento na capacidade aeróbia e redução do tamanho dos adipócitos no TAB-SC, contudo não foi eficaz para reduzir a hiperfagia, melhorar o metabolismo glicêmico, o gasto energético em repouso e a morfologia de ilhotas pancreáticas desses animais.

Desde o início do protocolo experimental (animais com oito semanas de vida) aplicado neste projeto, as fêmeas Lep^{ob} já apresentavam peso duas vezes maior que as fêmeas eutróficas, corroborando a obesidade precoce que se instala nesse modelo a partir da 4ª semana (GENUTH; PRZYBYLSKI; ROSENBERG, 1971). Além disso, a amplitude do ganho de peso foi maior, semana após semana, de modo que ao final do protocolo experimental os grupos Lep^{obS} e Lep^{obT} apresentavam um incremento de cerca de 43% no peso inicial, enquanto nas fêmeas dos grupos C57S e C57T, esse incremento foi de 26 e 15%, respectivamente.

Diferente de outros estudos realizados com animais Lep^{ob} (CUNHA et al., 2015; EVANGELISTA et al., 2015; SARTORI et al., 2017), ao final das oito semanas de TFA, as fêmeas Lep^{obT} não apresentaram redução significativa no ganho de peso corporal. É possível que essa diferença nos achados se deva ao fato de que fêmeas apresentam maior adiposidade do que os machos (MOYER et al., 2017). Além disso, nos estudos em que fêmeas tiveram menor ganho de peso corporal, o TFA teve início já na 5ª ou 6ª semanas de vida, quando a obesidade ainda não estava completamente instalada (BRITO, 2014; CONTI, 2013; SARTORI et al., 2017). Quando comparadas a machos da mesma linhagem e idade, o ganho de peso das fêmeas mostrou-se maior tanto para o grupo sedentário (41%), quanto para o grupo treinado (23%) (EVANGELISTA et al., 2015).

O TFA nas fêmeas deficientes em leptina não reduziu o peso dos depósitos de TAB-SC, contudo promoveu melhora na morfologia desse tecido, reduzindo o tamanho dos adipócitos. Adipócitos hipertrofiados são metabolicamente disfuncionais, causando aumento na produção de citocinas inflamatórias que podem induzir a resistência à insulina devido a prejuízos na sua sinalização (SCHOETTL; FISCHER; USSAR, 2018; SMITH; KAHN, 2016). Em um estudo recente de nosso grupo, AMÉRICO et al. (2019) demonstraram o efeito positivo do TFA ao reduzir o diâmetro e área de adipócitos de TAB-SC em animais que consumiram dieta de cafeteria e aumento na expressão de marcadores de lipólise no TAB-SC tanto em animais que consumiram dieta de cafeteria, quanto nos que não consumiram. Os depósitos de TAB-SC são mais suscetíveis aos efeitos do TFA aumentando atividade mitocondrial, o metabolismo da glicose e genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos, comparado aos outros depósitos (TAB-V e TAM) (LEHNIG et al., 2019).

Outra característica de camundongos Lep^{ob} é que apresentam atrofia muscular (BARAZZONI et al., 2018; BERGEN et al., 1975; ROUBENOFF, 2004; TROSTLER et al., 1979; VILLAREAL et al., 2004), em função da ausência de leptina. SÁINZ, et al (2009) trataram animais Lep^{ob} machos com leptina endógena e observaram a inibição da degradação proteica miofibrilar e o aumento na proliferação de células musculares. Em nosso estudo, obtivemos um resultado do TFA comparável ao da reposição com leptina. Avaliando o peso dos músculos gastrocnêmio, plantar e sóleo, observamos aumentos de 51%, 94% e 220%, respectivamente, nas fêmeas do grupo Lep^{obT} , sugerindo uma prevenção da sarcopenia característica desse modelo animal.

Considerando que a deficiência de leptina aumenta o consumo alimentar (RIBEIRO et al., 2011), os dados dos animais Lep^{obS} e Lep^{obT} corroboram tais achados, uma vez que ambos os grupos apresentaram hiperfagia. Interessante que, o efeito da leptina para modular o apetite é tão importante que, após o tratamento com leptina, foi verificado por outros autores que tanto machos quanto fêmeas reduzem o consumo alimentar (BAICY et al., 2007; LALONDE et al., 2004). Já no que se refere aos efeitos do TFA sobre o consumo alimentar, observa-se que os dados na literatura obtidos com outros modelos de animais são antagônicos, pois alguns autores mostram que o TFA aumenta o consumo (HIGA et al., 2012; MAZZUCATTO et al., 2014; ZHANG, N.; BI, 2018) enquanto outros afirmam que o TFA não altera o consumo alimentar (AMÉRICO et al., 2019; EGUCHI et al., 2008; MULLER et al., 2018).

É importante ressaltar que o consumo alimentar do grupo Lep^{ob}T não foi diferente dos grupos C57S e C57T em três semanas de TFA (3^a, 5^a e 6^a semanas), no entanto, não foi suficiente para refletir na redução do consumo médio de ração calculado durante as oito semanas da TFA. Possivelmente a manutenção da hiperfagia junto com a inalteração do gasto energético de repouso sejam responsáveis pelos resultados de ganho de peso corporal e de adiposidade dos animais Lep^{ob}T.

Com o objetivo de entender melhor os efeitos do genótipo e do TFA sobre o metabolismo energético de repouso e durante o esforço físico máximo, realizamos os testes em calorimetria indireta. Durante o repouso, nenhuma alteração foi observada nas variáveis mensuradas nos grupos experimentais. Considerando que uma das ações da leptina é ativar o metabolismo energético, imaginamos que os animais Lep^{ob}S pudessem apresentar redução no gasto energético de repouso e que isso justificaria o ganho de peso corporal desse grupo. Imaginamos ainda que o TFA, por classicamente aumentar o gasto energético de repouso, pudesse prevenir a redução no gasto energético do grupo Lep^{ob}T, e conseqüentemente, melhorar a resposta de peso corporal.

No entanto, nossos resultados mostraram que tanto o TFA quanto a deficiência de leptina não causaram modificações no metabolismo de repouso. Possivelmente, o potencial do TFA para modular o gasto energético em repouso de animais Lep^{ob} seja menor do que quando administrada a leptina. De fato, REZAI-ZADEH et al. (2014) identificaram uma população de neurônios que expressam receptores ObRb no interior do hipotálamo que estão relacionados a circuitos que controlam a termogênese do TAM, e observaram que o gasto energético aumentou depois de aplicações de leptina endógena.

No teste de esforço, os animais que realizaram o TFA permaneceram mais tempo em teste, aumentaram a intensidade na qual o VO₂max foi atingido (iVO₂) e atingiram maior velocidade máxima em teste. Mesmo o grupo Lep^{ob}T apresentando peso corporal 2 vezes maior do que os animais eutróficos, demonstrou uma tendência em atingir maior velocidade máxima em teste comparado ao grupo Lep^{ob}S (*p*-valor 0,08). Destaca-se que o TFA foi capaz de promover adaptações aeróbias tanto nos animais C57 quanto nos animais Lep^{ob}, e para os animais Lep^{ob} esse efeito é muito importante, haja vista que animais deficientes de leptina apresentam a função contrátil cardíaca prejudicada (DONG et al., 2006), reduzida sensibilidade barorreflexo (SARTORI et al., 2017) e elevada adiposidade corporal comparado aos seus pares magros.

Considerando que, a maior economia de corrida (BORGEM, 2018), a maior tolerância ao esforço (PANDEY et al., 2015), a maior intensidade associada ao VO_2 (iVO_2) (MACHADO et al., 2004), retardo do limiar anaeróbico (BORGEM, 2018) e maior velocidade durante o esforço são parâmetros que estão diretamente associados com a melhora da capacidade aeróbia, é possível afirmar que o TFA realizado no presente estudo melhorou a capacidade aeróbia dos animais C57T e Lep^{ob}T. Esse efeito pode ser associado diretamente com a melhora da qualidade de vida, e com a redução de doenças cardiovasculares e metabólicas (NETO et al., 2004).

A partir da 4ª semana de vida, fêmeas Lep^{ob} já apresentam intolerância à glicose e níveis elevados de insulina (D'SOUZA et al., 2014). Nossos resultados corroboram os prejuízos em metabolismo glicêmico desse modelo de animal, visto que o grupo Lep^{ob}S apresentou glicemia de jejum mais elevada, intolerância à glicose e resistência à insulina. Considerando que outros estudos mostraram que o TFA, foi eficiente para retardar o surgimento da hiperglicemia (MUNOZ et al., 2018), melhorar o perfil lipídico e a resistência à insulina (HIGA et al., 2014), esperávamos que os animais Lep^{ob}T apresentassem melhora em tais variáveis. No entanto, o grupo Lep^{ob}T apresentou apenas tendência de redução da glicemia de jejum (valor de *p* de 0,08), e manutenção dos prejuízos glicêmicos observados no TTG e no TTI.

Estudos prévios na literatura mostraram que fêmeas Lep^{ob} apresentaram redução no quadro hiperglicêmico após realizarem TFA em esteira, exercícios resistidos ou combinado, e a maior redução foi vista nos grupos que realizaram exercícios resistidos e combinado (CONTI, 2013; SARTORI, 2015). Contudo, em ambos os estudos, os animais iniciaram o protocolo de treinamento físico assim que se instalou a intolerância à glicose e hiperinsulinemia nesses animais. Esse aspecto pode justificar a ausência de efeito do TFA no metabolismo glicêmico do grupo Lep^{ob}T do presente estudo, uma vez que o TFA foi iniciado tardiamente, quando as disfunções metabólicas já estavam bem instaladas.

No que se refere às análises histológicas do TAB, os animais Lep^{ob}S apresentaram adipócitos hipertrofiados tanto em depósito subcutâneo quanto em visceral. Tais achados corroboram os estudos prévios realizados com o mesmo modelo de animal (BECERILL et al., 2018; XU et al., 2015). Quando submetidos ao TFA, observamos que o grupo Lep^{ob}T manteve as características morfológicas do TAB-V, no entanto, reduziu significativamente o tamanho dos adipócitos de depósito subcutâneo. Esse dado é relevante para o controle metabólico do organismo, pois a redução da adiposidade torna esse tecido mais saudável (GHIGLIOTTI et

al., 2014). No entanto, considerando que o TFA não induziu redução dos adipócitos do depósito visceral, é possível que a ausência de efeito do TFA no metabolismo glicêmico dos animais Lep^{obT} seja decorrente, pelo menos em parte, da manutenção da hipertrofia de adipócitos viscerais.

Em estudos realizados com camundongos machos eutróficos e obesos (obesidade induzida por dieta de cafeteria), o TFA foi capaz de prevenir o ganho de massa adiposa subcutânea e visceral (AMÉRICO et al., 2019; HIGA et al., 2014). Em estudo realizado com mulheres obesas, DESPRES et al. (1991) observaram que o TFA diminuiu o depósito abdominal subcutâneo, mas não o visceral. Esses dados revelam que os efeitos do TFA não apenas são depósito-dependentes, mas também são dependentes da amostra estudada e do protocolo de treinamento físico aplicado.

Com relação às análises histológicas do pâncreas, nosso estudo se limitou a avaliar a área de ilhotas por tecido pancreático (AI/AP). Embora a análise estatística não tenha detectado diferença significativa entre os animais magros e os animais com deficiência de leptina, as médias da AI/AP nos grupos Lep^{obS} e Lep^{obT} foram mais que o dobro daquelas observadas nos grupos C57S e C57T, corroborando estudos que demonstraram maior volume de ilhotas pancreáticas nos animais Lep^{ob} (BOCK et al., 2003; IRLES et al., 2015; TOMITA et al., 1992). Ainda, há tendência de menor AI/AP nos grupos C57T e Lep^{obT} comparados a seus correspondentes sedentários, o que poderia estar associado à menor demanda por secreção de insulina, já que o TFA é capaz de aumentar a captação de glicose, através do GLUT4 contido no músculo esquelético, independente da secreção de insulina (DINÇER et al., 2016; RICHTER; HARGREAVES, 2013). CUNHA et al. (2015) observaram em animais Lep^{ob} machos que praticaram natação 3 vezes/semana, um aumento no conteúdo de GLUT4 no músculo gastrocnêmio e redução na hiperglicemia de jejum após 8 semanas de treinamento.

Fêmeas apresentam maiores níveis de adiponectina quando comparadas a machos, tanto em modelo animal quanto em humanos. Contudo, em quadros de obesidade (DESPRES et al., 1991), DM2 (NOVELLE; DIÉGUEZ, 2019) e menopausa (ZHANG, H. et al., 2007), observa-se diminuição significativa nos níveis dessa adipocina. Isso pode estar associado ao aumento da adiposidade visceral e consequente aumento de adipocinas pró inflamatórias (ZHANG, H. et al., 2007). Especificamente, no modelo Lep^{ob}, os animais apresentam baixos níveis de adiponectina (NG et al., 2010). Contudo, no presente estudo os animais Lep^{ob} não apresentaram níveis inferiores aos animais eutróficos.

Em estudos realizados com camundongos machos eutróficos e obesos, com obesidade induzida por dieta de cafeteria ou rica em gordura, o TFA aumentou as concentrações de adiponectina, porém, em estudo com mulheres menopausadas, com sobrepeso ou obesas, (WANG, X. et al., 2015) observou-se um aumento nos níveis de adiponectina somente quando combinaram restrição alimentar e TFA. Enquanto FRÜHBECK et al. (2017) demonstraram através de aplicação de leptina endógena em camundongos Lep^{ob} machos, os níveis de adiponectina aumentaram, o que talvez explique, pelo menos em parte, que para esse modelo animal somente o TFA não é suficiente para restaurar ou aumentar os níveis de adiponectina.

Embora o estudo tenha demonstrado evidências de que o TFA melhorou a condição metabólica de animais Lep^{ob} fêmeas, principalmente com o aumento da capacidade aeróbia e redução da hipertrofia de adipócitos do TAB-SC, mais estudos se fazem necessários para compreender algumas questões, tais como, a relação dos hormônios femininos e a ausência de leptina após o protocolo de TFA, assim como a correlação dos níveis de insulina e o tamanho da ilhota pancreática nesse modelo.

6. CONCLUSÕES

As conclusões a que se pode chegar ao final desse trabalho são:

- O TFA foi capaz de reduzir o tamanho dos adipócitos do TAB-SC, embora não tenha aumentado os níveis de adiponectina;
- O TFA não foi capaz de promover alterações na morfologia do pâncreas;
- Contudo, melhorou a condição metabólica de camundongos fêmeas com deficiência de leptina, através da melhora na capacidade aeróbia.

7. BIBLIOGRAFIA

AL-HAMODI, Z. et al. Association of adipokines, leptin/adiponectin ratio and C-reactive protein with obesity and type 2 diabetes mellitus. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 6, n. 1, p. 99, 2014.

ALOUKI, K. et al. Lifestyle interventions to prevent type 2 diabetes: a systematic review of economic evaluation studies. **Journal of diabetes research**, v. 2016, 2016.

AMÉRICO, A. L. V. et al. Aerobic exercise training prevents obesity and insulin resistance independent of the renin angiotensin system modulation in the subcutaneous white adipose tissue. **PLoS one**, v. 14, n. 4, p. e0215896, 2019.

BAICY, K. et al. Leptin replacement alters brain response to food cues in genetically leptin-deficient adults. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 46, p. 18276-18279, 2007.

BALDUCCI, S. et al. Anti-inflammatory effect of exercise training in subjects with type 2 diabetes and the metabolic syndrome is dependent on exercise modalities and independent of weight loss. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, n. 8, p. 608-617, 2010.

BARAZZONI, R. et al. Sarcopenic obesity: Time to meet the challenge. **Obesity facts**, v. 11, n. 4, p. 294-305, 2018.

BECERRIL, S. et al. Targeted disruption of the iNOS gene improves adipose tissue inflammation and fibrosis in leptin-deficient ob/ob mice: role of tenascin C. **International Journal of Obesity**, p. 1, 2018.

BENATTI, F. et al. Swimming training down-regulates plasma leptin levels, but not adipose tissue ob mRNA expression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 10, p. 866-871, 2008.

BERGEN, W. et al. Growth of adipose and lean tissue mass in hindlimbs of genetically obese mice during preobese and obese phases of development. **The American journal of clinical nutrition**, v. 28, n. 2, p. 157-161, 1975.

BOCK, T.; PAKKENBERG, B.; BUSCHARD, K. Increased islet volume but unchanged islet number in ob/ob mice. **Diabetes**, v. 52, n. 7, p. 1716-1722, 2003.

BÓDIS, K.; RODEN, M. Energy metabolism of white adipose tissue and insulin resistance in humans. **European journal of clinical investigation**, v. 48, n. 11, p. e13017, 2018.

BOLIN, A. P.; OTTON, R. **Investigação do potencial termogênico e metabólico da planta *Camellia sinensis* em camundongos obesos-repercussão sistêmica do fenótipo bege**. 2018. Universidade de São Paulo

BONORA, E. et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 68, n. 2, p. 374-378, 1989.

BOOTH, F. W.; ROBERTS, C. K.; LAYE, M. J. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 2, p. 1143-1211, 2011.

BORGEN, N. T. Running Performance, VO₂max, and Running Economy: The Widespread Issue of Endogenous Selection Bias. **Sports Medicine**, v. 48, n. 5, p. 1049-1058, 2018.

BRITO, J. D. O. Mecanismos associados às disfunções cardiometabólicas em um modelo experimental de menopausa e síndrome metabólica: papel do treinamento físico aeróbio ou resistido. 2014.

BROOKS, G. A.; WHITE, T. P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **Journal of applied physiology**, v. 45, n. 6, p. 1009-1015, 1978.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public health reports**, v. 100, n. 2, p. 126, 1985.

CHOO, H.-J. et al. Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice. **Diabetologia**, v. 49, n. 4, p. 784-791, 2006.

COHEN, P.; SPIEGELMAN, B. M. Brown and beige fat: molecular parts of a thermogenic machine. **Diabetes**, v. 64, n. 7, p. 2346-2351, 2015.

COIMBRA, S. et al. Adiponectin, leptin, and chemerin in elderly patients with type 2 diabetes mellitus: a close linkage with obesity and length of the disease. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

CONTI, F. F. Efeitos do treinamento físico combinado em modelo experimental de disfunções cardiometabólicas associadas à privação dos hormônios ovarianos. 2013.

CUNHA, V. N. et al. Role of exercise intensity on GLUT4 content, aerobic fitness and fasting plasma glucose in type 2 diabetic mice. **Cell biochemistry and function**, v. 33, n. 7, p. 435-442, 2015.

CYPESS, A. M. et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 15, p. 1509-1517, 2009.

D'SOUZA, A. M. et al. Leptin deficiency in rats results in hyperinsulinemia and impaired glucose homeostasis. **Endocrinology**, v. 155, n. 4, p. 1268-1279, 2014.

DESPRES, J. P. et al. Loss of abdominal fat and metabolic response to exercise training in obese women. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 261, n. 2, p. E159-E167, 1991.

DİNÇER, S. et al. Effects Of A Regular Exercise Program On Life Quality Of Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. **Spor Hekimligi Dergisi/Turkish Journal of Sports Medicine**, v. 51, n. 3, 2016.

DING, D. et al. The economic burden of physical inactivity: a global analysis of major non-communicable diseases. **The Lancet**, v. 388, n. 10051, p. 1311-1324, 2016.

DONG, F. et al. Impaired cardiac contractile function in ventricular myocytes from leptin-deficient ob/ob obese mice. **Journal of Endocrinology**, v. 188, n. 1, p. 25-36, 2006.

DÖRING, H. et al. Leptin selectively increases energy expenditure of food-restricted lean mice. **International journal of obesity**, v. 22, n. 2, p. 83, 1998.

EATON, S. B.; EATON III, S. B. An evolutionary perspective on human physical activity: implications for health. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 136, n. 1, p. 153-159, 2003.

EGUCHI, R. et al. Effects of the chronic exercise on the circulating concentration of leptin and ghrelin in rats with diet-induced obesity. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 3, p. 182-187, 2008.

EVANGELISTA, F. et al. Loss of resting bradycardia with detraining is associated with intrinsic heart rate changes. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 38, n. 7, p. 1141-1146, 2005.

EVANGELISTA, F. S. et al. Physical training improves body weight and energy balance but does not protect against hepatic steatosis in obese mice. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 7, p. 10911, 2015.

FAULKNER, J. L.; DE CHANTEMÈLE, E. J. B. Leptin and Aldosterone. **Vitamins and hormones**, v. 109, p. 265-284, 2019.

FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES- FID (International Diabetes Federation -IDF), Bélgica < https://diabetesatlas.org/IDF_Diabetes_Atlas_8e_interactive_EN/ >. Acesso em: ago/2019.

FERREIRA, J. C. et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 760-765, 2007.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

FRÜHBECK, G. et al. Normalization of adiponectin concentrations by leptin replacement in ob/ob mice is accompanied by reductions in systemic oxidative stress and inflammation. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 2752, 2017.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of clinical investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752-1761, 2017.

GENUTH, S. M.; PRZYBYLSKI, R. J.; ROSENBERG, D. M. Insulin resistance in genetically obese, hyperglycemic mice. **Endocrinology**, v. 88, n. 5, p. 1230-1238, 1971.

GHIgliOTTI, G. et al. Adipose tissue immune response: novel triggers and consequences for chronic inflammatory conditions. **Inflammation**, v. 37, n. 4, p. 1337-1353, 2014.

GLEESON, M. et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nature reviews immunology**, v. 11, n. 9, p. 607, 2011.

GOLBIDI, S.; LAHER, I. Exercise induced adipokine changes and the metabolic syndrome. **Journal of diabetes research**, v. 2014, 2014.

GONZÁLEZ, K.; FUENTES, J.; MÁRQUEZ, J. L. Physical inactivity, sedentary behavior and chronic diseases. **Korean journal of family medicine**, v. 38, n. 3, p. 111, 2017.

GORDON, B. A. et al. Glycemic response varies between resistance and aerobic exercise in inactive males with long-term type 2 diabetes. **Applied physiology, nutrition, and metabolism**, v. 38, n. 8, p. 900-904, 2013.

GOTTLIEB, M. G. V.; MORASSUTTI, A. L.; DA CRUZ, I. B. M. Transição epidemiológica, estresse oxidativo e doenças crônicas não transmissíveis sob uma perspectiva evolutiva. **Scientia Medica**, v. 21, n. 2, 2011.

GUALANO, B.; TINUCCI, T. Sedentarismo, exercício físico e doenças crônicas. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v. 25, p. 37-43, 2011.

HIGA, T. S. et al. Physical training prevents body weight gain but does not modify adipose tissue gene expression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 10, p. 988-994, 2012.

HIGA, T. S. et al. Remodeling of white adipose tissue metabolism by physical training prevents insulin resistance. **Life sciences**, v. 103, n. 1, p. 41-48, 2014.

HORÁKOVÁ, D. et al. Total and high molecular weight adiponectin levels and prediction of cardiovascular risk in diabetic patients. **International journal of endocrinology**, v. 2015, 2015.

IACOBINI, C. et al. Metabolically healthy versus metabolically unhealthy obesity. **Metabolism**, 2018.

IBRAHIM, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obesity reviews**, v. 11, n. 1, p. 11-18, 2010.

INGALLS, A. M.; DICKIE, M. M.; SHELL, G. Obese, a new mutation in the house mouse. **Journal of Heredity**, v. 41, p. 317-318, 1950.

IRLES, E. et al. Enhanced glucose-induced intracellular signaling promotes insulin hypersecretion: pancreatic beta-cell functional adaptations in a model of genetic obesity and prediabetes. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 404, p. 46-55, 2015.

JUNG, R. T. Obesity as a disease. **British medical bulletin**, v. 53, n. 2, p. 307-321, 1997.

KADOWAKI, T. et al. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 7, p. 1784-1792, 2006.

KELLEY, G. A.; KELLEY, K. S. **Aerobic exercise and resting blood pressure in older adults: a meta-analytic review of randomized controlled trials**: Am Heart Assoc 2001.

KENNEDY, A. J. et al. Mouse models of the metabolic syndrome. **Disease models & mechanisms**, v. 3, n. 3-4, p. 156-166, 2010.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548-2556, 2004.

KHAN, A.; HONG-LIE, C.; LANDAU, B. R. Glucose-6-phosphatase activity in islets from ob/ob and lean mice and the effect of dexamethasone. **Endocrinology**, v. 136, n. 5, p. 1934-1938, 1995.

KIM, H. J.; LEE, J. S.; KIM, C. K. Effect of exercise training on muscle glucose transporter 4 protein and intramuscular lipid content in elderly men with impaired glucose tolerance. **European journal of applied physiology**, v. 93, n. 3, p. 353-358, 2004.

KLIMCAKOVA, E. et al. Dynamic strength training improves insulin sensitivity without altering plasma levels and gene expression of adipokines in subcutaneous adipose tissue in obese men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 12, p. 5107-5112, 2006.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635, 2000.

KWOK, K. H.; LAM, K. S.; XU, A. Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. **Experimental & molecular medicine**, v. 48, n. 3, p. e215, 2016.

LALONDE, J. et al. Additive effects of leptin and topiramate in reducing fat deposition in lean and obese ob/ob mice. **Physiology & behavior**, v. 80, n. 4, p. 415-420, 2004.

LANGER, A. et al. Women and health: the key for sustainable development. **The Lancet**, v. 386, n. 9999, p. 1165-1210, 2015.

LEE, H.; LEE, I. S.; CHOUE, R. Obesity, inflammation and diet. **Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition**, v. 16, n. 3, p. 143-152, 2013.

LEHNIG, A. C. et al. Exercise Training Induces Depot-Specific Adaptations to White and Brown Adipose Tissue. **iScience**, v. 11, p. 425-439, 2019.

LEHNIG, A. C.; STANFORD, K. I. Exercise-induced adaptations to white and brown adipose tissue. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. Suppl 1, p. jeb161570, 2018.

LI, S.; LI, X. Leptin in normal physiology and leptin resistance. **Science bulletin**, v. 61, n. 19, p. 1480-1488, 2016.

LI, S. et al. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Jama**, v. 302, n. 2, p. 179-188, 2009.

LIN, X. et al. Effects of exercise training on cardiorespiratory fitness and biomarkers of cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of the American Heart Association**, v. 4, n. 7, p. e002014, 2015.

LINDSTRÖM, P. The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. **The scientific world journal**, v. 7, p. 666-685, 2007.

MACHADO, C. E. P.; CAPUTO, F.; DENADAI, B. S. Intensidade de exercício correspondente ao VO₂max durante o ciclismo: análise de diferentes critérios em indivíduos treinados. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v. 18, n. 4, p. 333-341, 2004.

MADDEN, K. M. Evidence for the benefit of exercise therapy in patients with type 2 diabetes. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v. 6, p. 233, 2013.

MALIN, S. K.; KIRWAN, J. P. Fasting hyperglycaemia blunts the reversal of impaired glucose tolerance after exercise training in obese older adults. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 14, n. 9, p. 835-841, 2012.

MARCONDES, F.; BIANCHI, F.; TANNO, A. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian journal of biology**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.

MARROQUÍ, L. et al. Role of leptin in the pancreatic β -cell: effects and signaling pathways. **Journal of molecular endocrinology**, v. 49, n. 1, p. R9-R17, 2012.

MARTINS, F. F. et al. Thermogenesis, fatty acid synthesis with oxidation, and inflammation in the brown adipose tissue of ob/ob (-/-) mice. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 210, p. 44-51, 2017.

MAZZUCATTO, F. et al. Reversal of metabolic adaptations induced by physical training after two weeks of physical detraining. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 7, n. 8, p. 2000, 2014.

MCLEAN, A. C. et al. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, v. 67, e4389, 2012.

MOKDAD, A. H. et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. **Jama**, v. 289, n. 1, p. 76-79, 2003.

MORTON, G. J. et al. Identification of a physiological role for leptin in the regulation of ambulatory activity and wheel running in mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 300, n. 2, p. E392-E401, 2010.

MOYER, B. J. et al. Obesity and fatty liver are prevented by inhibition of the aryl hydrocarbon receptor in both female and male mice. **Nutrition research**, v. 44, p. 38-50, 2017.

MULLER, C. et al. Aerobic exercise training prevents kidney lipid deposition in mice fed a cafeteria diet. **Life sciences**, v. 211, p. 140-146, 2018.

MUNOZ, V. R. et al. Physical exercise reduces pyruvate carboxylase (PCB) and contributes to hyperglycemia reduction in obese mice. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 68, n. 4, p. 493-501, 2018.

MUTCH, D. M.; CLÉMENT, K. Unraveling the genetics of human obesity. **PLoS genetics**, v. 2, n. 12, p. e188, 2006.

NETO, M. et al. Equações de predição da aptidão cardiorrespiratória sem testes de exercício e sua aplicabilidade em estudos epidemiológicos: uma revisão sistemática. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, p. 48-56, 2004.

NG, K. Y.; YONG, J.; CHAKRABORTY, T. R. Estrous cycle in ob/ob and ovariectomized female mice and its relation with estrogen and leptin. **Physiology & behavior**, v. 99, n. 1, p. 125-130, 2010.

NOVELLE, M. G.; DIÉGUEZ, C. Updating gender differences in the control of homeostatic and hedonic food intake: Implications for binge eating disorder. **Molecular and cellular endocrinology**, p. 110508, 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS (World Health Organization - WHO) ObesityandOverweight. United Nations, Estados Unidos da América, 2016. <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso: ago/2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS (World Health Organization - WHO) PhysicalActivity. United Nations, Estados Unidos da América, 2016. <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/physical-activity>>. Acesso: ago/2019.

PADEZ, C. Atividade física, obesidade e saúde: uma perspectiva evolutiva. **Revista portuguesa de saúde pública**, n. 1, p. 11-20, 2002.

PANDEY, A. et al. Exercise training in patients with heart failure and preserved ejection fraction: meta-analysis of randomized control trials. **Circulation: Heart Failure**, v. 8, n. 1, p. 33-40, 2015.

Pesquisa Nacional de Saúde (PNS). Portal do Governo Brasileiro <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?pns/pnspb.def>>. Acesso em: ago/2019.

PETERS, S. A.; HUXLEY, R. R.; WOODWARD, M. **Diabetes as risk factor for incident coronary heart disease in women compared with men: a systematic review and meta-analysis of 64 cohorts including 858,507 individuals and 28,203 coronary events**: Springer 2014.

PETERSEN, A. M. W.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of applied physiology**, v. 98, n. 4, p. 1154-1162, 2005.

PETROSINO, J. M. et al. Graded maximal exercise testing to assess mouse cardio-metabolic phenotypes. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0148010, 2016.

RAZA, H. et al. Exercise-induced alterations in pancreatic oxidative stress and mitochondrial function in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. **Physiological reports**, v. 4, n. 8, p. e12751, 2016.

REZAI-ZADEH, K. et al. Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus are key regulators of energy expenditure and body weight, but not food intake. **Molecular metabolism**, v. 3, n. 7, p. 681-693, 2014.

RIBEIRO, A. C. et al. Contrasting effects of leptin on food anticipatory and total locomotor activity. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23364, 2011.

RICHTER, E. A.; HARGREAVES, M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. **Physiological reviews**, v. 93, n. 3, p. 993-1017, 2013.

RING-DIMITRIOU, S. et al. The effect of physical activity and physical fitness on plasma adiponectin in adults with predisposition to metabolic syndrome. **European journal of applied physiology**, v. 98, n. 5, p. 472-481, 2006.

ROSS, R.; BRADSHAW, A. J. The future of obesity reduction: beyond weight loss. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, n. 6, p. 319, 2009.

ROUBENOFF, R. Sarcopenic obesity: the confluence of two epidemics. **Obesity research**, v. 12, n. 6, p. 887-888, 2004.

SAKURAI, T. et al. Exercise training attenuates the dysregulated expression of adipokines and oxidative stress in white adipose tissue. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

SARTORI, M. **Mecanismos associados ao desenvolvimento das complicações do diabetes tipo 2 em camundongos fêmeas ob/ob: papel preventivo do treinamento físico dinâmico aeróbio, resistido ou combinado**. 2015. Universidade de São Paulo

SARTORI, M. et al. Association between diastolic dysfunction with inflammation and oxidative stress in females ob/ob mice. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 572, 2017.

SCHOETTL, T.; FISCHER, I. P.; USSAR, S. Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. Suppl 1, p. jeb162958, 2018.

SHAW, K. A. et al. Exercise for overweight or obesity. **Cochrane database of systematic reviews**, n. 4, 2006.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 7, p. 1793-1801, 2006.

SHUNGIN, D. et al. New genetic loci link adipose and insulin biology to body fat distribution. **Nature**, v. 518, n. 7538, p. 187, 2015.

SMITH, U.; KAHN, B. B. Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids. **Journal of internal medicine**, v. 280, n. 5, p. 465-475, 2016.

SORIGUER, F. et al. Factors determining weight gain in adults and relation with glucose tolerance. **Clinical endocrinology**, v. 78, n. 6, p. 858-864, 2013.

SPERETTA, G. F.; LEITE, R. D.; DE OLIVEIRA DUARTE, A. C. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF-alfa e IL-10. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 13, n. 1, 2014.

SYMONDS, M. E. **Adipose tissue biology**. Springer, 2012. ISBN 1461409659.

TAHAPARY, D. L. et al. Effect of anthelmintic treatment on leptin, adiponectin and leptin to adiponectin ratio: a randomized-controlled trial. **Nutrition & diabetes**, v. 7, n. 10, p. e289, 2017.

TASSAVA, T. M.; OKUDA, T.; ROMSOS, D. R. Insulin secretion from ob/ob mouse pancreatic islets: effects of neurotransmitters. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 262, n. 3, p. E338-E343, 1992.

TCHKONIA, T. et al. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. **Cell metabolism**, v. 17, n. 5, p. 644-656, 2013.

TOMITA, T. et al. Pancreatic islets of obese hyperglycemic mice (ob/ob). **Pancreas**, v. 7, n. 3, p. 367-375, 1992.

TREMBLAY, M. S. et al. Physiological and health implications of a sedentary lifestyle. **Applied physiology, nutrition, and metabolism**, v. 35, n. 6, p. 725-740, 2010.

TREMMELE, M. et al. Economic burden of obesity: a systematic literature review. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 4, p. 435, 2017.

TROSTLER, N. et al. Skeletal muscle accretion and turnover in lean and obese (ob/ob) mice. **Metabolism**, v. 28, n. 9, p. 928-933, 1979.

Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL). Portal do Governo Brasileiro. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/25/vigitel-brasil-2018.pdf>> Acesso em : ago/2019.

VILLAREAL, D. T. et al. Physical frailty and body composition in obese elderly men and women. **Obesity research**, v. 12, n. 6, p. 913-920, 2004.

WANG, B.; CHARUKESHI CHANDRASEKERA, P.; J PIPPIN, J. Leptin-and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. **Current diabetes reviews**, v. 10, n. 2, p. 131-145, 2014.

WANG, X. et al. Addition of exercise increases plasma adiponectin and release from adipose tissue. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 47, n. 11, p. 2450, 2015.

WASSERMAN, K.; MCILROY, M. B. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **The American journal of cardiology**, v. 14, n. 6, p. 844-852, 1964.

WHITAKER, R. C. et al. Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. **New England journal of medicine**, v. 337, n. 13, p. 869-873, 1997.

WU, Z. et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. **Cell**, v. 98, n. 1, p. 115-124, 1999.

XU, Jialin et al. Deficiency in Nr2f2 transcription factor decreases adipose tissue mass and hepatic lipid accumulation in leptin-deficient mice. **Obesity**, v. 23, n. 2, p. 335-344, 2015.

YAMAUCHI, T. et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature medicine**, v. 8, n. 11, p. 1288, 2002.

YE, R. et al. Adiponectin-mediated antilipotoxic effects in regenerating pancreatic islets. **Endocrinology**, v. 156, n. 6, p. 2019-2028, 2015.

YOON, Y. et al. Mitochondrial dynamics in diabetes. **Antioxidants & redox signaling**, v. 14, n. 3, p. 439-457, 2011.

ZAWALICH, W.; TESZ, G.; ZAWALICH, K. Inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase amplify insulin release from islets of lean but not obese mice. **Journal of Endocrinology**, v. 174, n. 2, p. 247-258, 2002.

ZHANG, H. et al. Changes in adiponectin and inflammatory genes in response to hormonal imbalances in female mice and exacerbation of depot selective visceral adiposity by high-fat diet: implications for insulin resistance. **Endocrinology**, v. 148, n. 12, p. 5667-5679, 2007.

ZHANG, N.; BI, S. Effects of physical exercise on food intake and body weight: Role of dorsomedial hypothalamic signaling. **Physiology & behavior**, v. 192, p. 59-63, 2018.

ZWICK, R. K. et al. Anatomical, physiological, and functional diversity of adipose tissue. **Cell metabolism**, v. 27, n. 1, p. 68-83, 2018.

ANEXO



Escola de Artes, Ciências e Humanidades
da Universidade de São Paulo

Comitê de Ética em Uso de Animais em Experimentação (CEUA)

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada em 27 de novembro de 2017, aprovou a ementa apresentada do Projeto de Pesquisa n. 001/2017 – **Treinamento físico aeróbio e prevenção do DM2: comunicação entre tecido adiposo branco e célula beta pancreática**, de autoria do Pesquisador Daniela Boschetti, sob responsabilidade da Profa. Dra. Anna Karenina Azevedo Martins. Solicitamos a atenção para apresentação do relatório final sobre a pesquisa no término do período de realização do curso de Pós-Graduação.

Espécie/linhagem/raça	camundongos ob/ob e selvagens C57BL/6
Número de animais	Quarenta
Peso/Idade	6 semanas
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério do Depto. de Gastroenterologia da FMUSP

São Paulo, 06 de dezembro de 2017.

Prof.ª Dr.ª Michele Schultz
Vice-Coordenadora
Comitê de Ética em Uso de Animais em Experimentação
EACH/USP