

Curso de Inverno PBC 2013
Laboratório de Biologia Celular da Secreção

**Curso 11. O papel do exercício físico no tratamento da obesidade como
possível reprogramador metabólico**

Docente: Gabriel Sergio Fabricio
Laize Peron Tófolo

Prof. Paulo Cesar de Freitas Mathias

Junho – 2013

Introdução

Estudos epidemiológicos vêm mostrando que o aumentado grau de sobrepeso e obesidade na população mundial está associado a morbidade e a redução da expectativa de vida (Bellanger & Bray 2005; de Oliveira et al. 2003; Deitel 2003; Kopelman 2000). Sugere-se que o aumento da disponibilidade de alimentos e o sedentarismo são as causas principais do aumento mundial da prevalência da obesidade (Pi-Sunyer 2003). Todavia, os mecanismos fisiopatológicos que determinam a sua instalação e desenvolvimento ainda não são suficientemente conhecidos para que tratamentos e métodos preventivos efetivos sejam desenvolvidos.

O controle central da ingestão alimentar e do peso corporal é feito principalmente pelas duas subdivisões do sistema nervoso autônomo (SNA): sistema nervoso simpático (SNS) e sistema nervoso parassimpático (SNP), as quais são controladas diretamente por áreas cerebrais, localizadas predominantemente no hipotálamo. Essas áreas agem reciprocamente no controle do metabolismo e também modulam a proliferação e a diferenciação celular, incluindo tecidos diretamente envolvidos no controle do metabolismo e do peso corporal: como por exemplo o tecido adiposo e as ilhotas pancreáticas.

Enquanto o SNP promove principalmente anabolismo, o SNS estimula o catabolismo. A interação entre estes sistemas autonômicos regula os estoques, a mobilização e a utilização de diferentes reservas energéticas, induzindo modificações no metabolismo. Assim, na obesidade tem sido amplamente observado alterações no metabolismo associadas ao desequilíbrio da atividade do SNA (Ahren 2000; Scheurink & Steffens 1990).

Evidências experimentais e clínicas indicam que, independente da origem da obesidade, o SNS encontra-se em baixa atividade e o SNP em alta atividade. (Rohner-Jeanrenaud et al. 1983; Vozarova de Courten et al. 2004). Na situação de desequilíbrio do SNA, alterações hormonais características estão presentes, destacando-se principalmente a hiperinsulinemia, a qual é constatada tanto em modelos animais como em humanos obesos; e vem sendo considerada como uma das principais características da síndrome metabólica envolvendo a obesidade (Vozarova de Courten, Weyer 2004).

O exercício físico estimula o uso de metabólitos circulantes provenientes de reservas para fornecer energia para o organismo. Apesar de durante o exercício os níveis sanguíneos de glicose e ácidos graxos livres permanecerem constantes, a produção hepática de glicose e a lipólise estão aumentados. Estes processos são facilitados principalmente, pela redução da secreção de insulina nas fases iniciais do exercício,

acompanhado dos efeitos do glucagon na produção de glicose, principalmente pela ativação do sistema simpatoadrenal (SSPA) (Scheurink et al. 1989).

A importância das alterações autonômicas que acompanham as disfunções do controle do peso corporal tem sido demonstrada recentemente por técnicas de biologia molecular que comprovaram que camundongos geneticamente deficientes em noraepinefrina/epinefrina são hiperinsulinêmicos e apresentam baixos níveis de glicose no plasma, enquanto camundongos que não apresentam o receptor muscarínico M3 são hipofágicos e magros (Ste Marie & Palmiter 2003; Yamada et al. 2001).

Um modelo experimental de obesidade central, que está sendo produzido no Laboratório de Biologia Celular da Secreção-UEM (LBCS-UEM), é obtido pela redução das ninhadas (RN). Normalmente ratas parem ninhadas em torno de 12 ± 4 filhotes, porém para que se garanta um volume de leite adequado para todos os filhotes, as ninhadas são padronizadas em um número, alguns laboratórios usam 12, outros 9 ou 6 filhotes (Davidowa & Plagemann 2004; Xiao et al. 2007; Young 2006). Depois de padronizadas, uma redução para 3 filhotes no início da lactação promove uma hiperalimentação dos filhotes. Depois do desmame, aos 21 dias, os filhotes se alimentando de ração balanceada com 18-24% de proteína (ração comercial para roedores) comem mais e ganham mais peso do que os filhotes oriundos de ninhadas maiores. Esses animais na vida adulta mostram hiperfagia, hiperinsulinemia, resistência periférica à insulina e obesidade (Bray 1984; Kageyama et al. 2002). Foi observado que a redução da ninhada provoca diminuição na densidade de neurônios na área ventromedial do hipotálamo (VMH) e redução na atividade do SNS (Schmidt et al. 2001).

Classicamente, sabe-se que o VMH compõe com outras regiões hipotalâmicas, uma área central que regula o peso corporal. Roedores adultos que sofrem lesão no VMH desenvolvem obesidade, hiperfagia e hiperinsulinemia, e apresentam um nítido desequilíbrio do SNA (Bray 1984).

Em resultados ainda não publicados, nosso laboratório, mostra que camundongos obesos obtidos pela redução da ninhada também apresentam redução da atividade do SSPA. É interessante ressaltar que este modelo experimental de obesidade é diferente daquele obtido com o tratamento neonatal com MSG. Não só na origem, o primeiro apresenta comprometimento do VMH e o segundo lesão do ARC, como também em características fisiopatológicas: o primeiro é hiperglicêmico e o segundo não. Em ratos, a obesidade MSG não promove hiperglicemia na vida adulta, pelo menos

até 210 dias (Thirone et al. 2002), porém ratos oriundos da redução de ninhada, aos 90 dias já mostra ligeira hiperglicemia (Schmidt, Fritz 2001).

Até o presente momento, ainda não se conhecem precisamente os mecanismos que induzem a obesidade, todavia há um senso comum de que o padrão genético, hábitos alimentares e vida sedentária, em conjunto ou separadamente são candidatos focalizados nos estudos apresentados pela literatura (Laclaustra et al. 2007; Stolar 2007).

Parece que está claro que não há um só tipo de obesidade. Embora mostrem características semelhantes, diferenças na origem e no comportamento fisiopatológico, caracterizam também os diferentes modelos experimentais (Lafontan 2005), e mais recentemente ratificado por estudos com animais transgênicos (Burcelin 2005; Kahn et al. 2000). Estudos clínicos e epidemiológicos sugerem também que existem vários tipos de obesidade em humanos (Bray 1999).

Atividade física e alimentação equilibrada são medidas importantes, uma vez que a obesidade é caracterizada como uma doença crônica, ou seja, desenvolve-se ao longo dos anos e na maioria dos casos está associada a mudanças de comportamentos. Vários estudos epidemiológicos apontam para diminuição do nível de atividade física e aumento do peso corporal a partir dos 20 anos de idade (Mondini L. Monteiro, C. et al., 1998; Leslie, E. et al. 2004; Pitanga, F.Lessa, I. 2007; Silva, K.Nahas, M. et al. 2008) indicando assim que essas mudanças de comportamento influenciam o aparecimento de sobrepeso e obesidade. Todavia, não se sabe ainda que tipo adequado de exercício, seu início e sua duração para de maneira eficaz combater a galopante epidemia mundial de obesidade, considerando suas diferentes origens, no entanto, parece ser primordial que os hábitos da atividade física e alimentação adequada acompanhem o sujeito no decorrer da vida, possibilitando assim um melhor controle do peso corporal.

Metodologia

Animais

Ratos Wistar com 70-80 dias de vida serão transferidos do Biotério Central da Universidade Estadual para o Biotério Setorial do Departamento de Biologia Celular e Genética. Depois de um período de 5-10 dias de adaptação 3 fêmeas cruzarão com um macho. Constatando a prenhez, aproximadamente depois de 12 dias, as fêmeas serão separadas em caixas individuais. Após o nascimento, uma das ninhadas serão padronizadas com nove animais e a outra será padronizadas com três animais três

animais. O período de amamentação será de 21 dias, após esse período os filhotes serão separados da mãe e colocados em caixa em um número de três animais, somente os machos serão utilizados após o desmame e farão parte do protocolo experimental. As mães serão sacrificadas e descartadas após o período de amamentação.

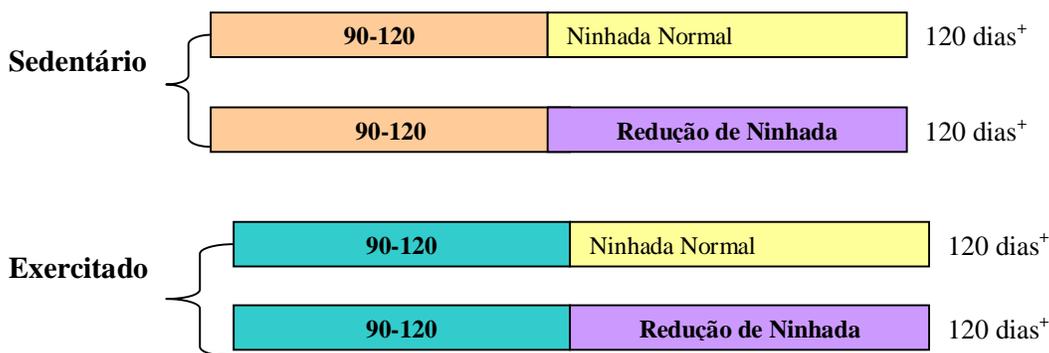
Programa de exercício

Grupos experimentais

Para tentar responder se a introdução do programa de treinamento em fase precoce da vida do animal é importante para atenuar ou mesmo bloquear o desenvolvimento da obesidade; aleatoriamente, dos grupos de ninhada normal (NN) e outro grupo Ninhada Reduzida (NR), serão escolhidos ratos para fazerem o programa de exercícios, divididos em sedentários e exercitados. Destes grupos alguns animais (12 para cada sub grupo) serão exercitados dos 90 aos 120 dias. Outros animais não farão qualquer tipo de exercício, e serão divididos em NN e NR. De cada ninhada independente do tipo de tratamento sempre será escolhido aleatoriamente animais para o programa de exercício e sedentários. Durante todo o tempo, no Biotério Setorial os ratos receberão água e ração comercial (Nuvital-Curitiba) à vontade e estarão submetidos a um ciclo fotoperiódico de 12 h (07:00-19:00 h) e temperatura constante de 22 ± 2 °C.

Todos os animais serão duas vezes por semana pesados e avaliado o consumo de ração até 90 dias de vida.

Diagrama dos Protocolos de exercício e divisão dos grupos



Para a realização dos testes e nas determinações do V_{O_2} e coeficiente de trocas respiratórias R (O_2/CO_2), Será utilizado um analisador de gases Havard Apparatus® e esteira individual própria para roedores (Panlab®).

O VO_{2max} será mensurado pela média pela análise durante o protocolo de exercício progressivo, com velocidade inicial de 6m/min e incremento de 3m/min a cada 3 minutos. O VO_{2max} será definido quando não ocorrer incremento de VO_2 ($\pm 5\%$) em dois diferentes estágios de carga, (Rodrigues et al. 2007).

Período de adaptação: uma semana de treinamento consistindo de 03 sessões com velocidade inicial em 50% do VO_{2max} durante 10 minutos evoluindo para sessões com tempo de 20 minutos. As sessões iniciar-se-ão sempre no período da tarde. Os ratos que não se adaptarem ao exercício, ou seja, aqueles que não conseguirem realizar a sessões de exercício por três sessões consecutivas serão descartados do estudo.

Período de treinamento: 03 sessões de treinamento por semana A velocidade inicial será de 55% do VO_{2max} com tempo total da sessão de treino de 20 minutos evoluindo ate 75% do VO_{2max} com tempo de 50 minutos. A variação de tempo e velocidade no período de treinamento será feita de acordo com o número de sessões de protocolo de treino 21 a 50 dias e dos 60 aos 90 dias. Os animais envolvidos com o programa de exercício proposto serão submetidos à avaliação no inicio e no final do programa de exercício.

Registro da Atividade Elétrica do Nervo Vago e do Nervo Simpático da Região Retroperitoneal.

Com o objetivo de se avaliar diretamente a atividade das duas subdivisões do SNA, será isolado nervos principais do SNA nos animais previamente anestesiados para registrar suas atividades elétricas. No mesmo animal, será realizado o registro da atividade do simpática será no através do isolamento do nervo simpático do tecido adiposo retroperitoneal; o ramo torácico do nervo vago será usado para medir a atividade parassimpática. Depois da abertura do tórax e identificação, cuidadosamente será inserido um eletrodo de prata (0.6mm de diâmetro). Os eletrodos serão conectados a uma sonda de grande impedância e o sinal, depois de filtrado para baixas e altas frequências (de 1 a 80 kHz), será amplificado 100000 vezes (Leon-Quinto et al. 1998) e armazenado e processado em computador. Os resultados serão expressos pela frequência de picos de atividade por segundo.

Avaliação da obesidade

As gorduras perigonadal e retroperitoneal serão retiradas, lavadas e pesadas. O percentual dessas gorduras em relação ao peso total dos animais será usado como estimativa da acumulação de gordura total do animal.

Bibliografia

Ahren B. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia*. 2000; **43**: 393-410.

Bellanger TM, Bray GA. Obesity related morbidity and mortality. *J La State Med Soc*. 2005; **157 Spec No 1**: S42-49; quiz 49.

Bray GA. Hypothalamic and genetic obesity: an appraisal of the autonomic hypothesis and the endocrine hypothesis. *Int J Obes*. 1984; **8 Suppl 1**: 119-137.

Bray GA. Etiology and pathogenesis of obesity. *Clin Cornerstone*. 1999; **2**: 1-15.

Bray GA, Paeratakul S, Popkin BM. Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical and epidemiological studies. *Physiol Behav*. 2004; **83**: 549-555.

Burcelin R. The incretins: a link between nutrients and well-being. *Br J Nutr*. 2005; **93 Suppl 1**: S147-156.

Davidowa H, Plagemann A. Hypothalamic neurons of postnatally overfed, overweight rats respond differentially to corticotropin-releasing hormones. *Neurosci Lett*. 2004; **371**: 64-68.

de Oliveira AM, Cerqueira Ede M, de Oliveira AC. [Prevalence of overweight and childhood obesity in Feira de Santana-BA: family detection vs. clinical diagnosis]. *J Pediatr (Rio J)*. 2003; **79**: 325-328.

Deitel M. Overweight and obesity worldwide now estimated to involve 1.7 billion people. *Obes Surg*. 2003; **13**: 329-330.

El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbaek C, Flier JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest*. 2000; **105**: 1827-1832.

Gravena C, Mathias PC, Ashcroft SJ. Acute effects of fatty acids on insulin secretion from rat and human islets of Langerhans. *J Endocrinol*. 2002; **173**: 73-80.

Kageyama A, Hirano T, Kageyama H, Osaka T, Namba Y, Tsuji M, Adachi M, Inoue S. Distinct role of adiposity and insulin resistance in glucose intolerance: studies in ventromedial hypothalamic-lesioned obese rats. *Metabolism*. 2002; **51**: 716-723.

Kahn CR, Bruning JC, Michael MD, Kulkarni RN. Knockout mice challenge our concepts of glucose homeostasis and the pathogenesis of diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2000; **13 Suppl 6**: 1377-1384.

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000; **404**: 635-643.

Laclaustra M, Corella D, Ordovas JM. Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007; **17**: 125-139.

Lafontan M. Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005: **45**: 119-146.

Leon-Quinto T, Magnan C, Portha B. Altered activity of the autonomous nervous system as a determinant of the impaired beta-cell secretory response after protein-energy restriction in the rat. *Endocrinology*. 1998: **139**: 3382-3389.

Marçal AC, Grassioli S, Rocha DN, Puzzi MA, Gravena C, Scomparin DX, Mathias PCF. The dual effect of isoproterenol on insulin release is suppressed in pancreatic islets from hypothalamic obese rats. *Endocrine*. 2006: **29**: in press.

Moura AS, Carpinelli AR, Barbosa FB, Gravena C, Mathias PC. Undernutrition during early lactation as an alternative model to study the onset of diabetes mellitus type II. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1996: **92**: 73-84.

Pi-Sunyer X. A clinical view of the obesity problem. *Science*. 2003: **299**: 859-860.

Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr*. 2004: **23**: 447-456.

Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2007: **6**: 38.

Rohner-Jeanrenaud F, Bobbioni E, Ionescu E, Sauter JF, Jeanrenaud B. Central nervous system regulation of insulin secretion. *Adv Metab Disord*. 1983: **10**: 193-220.

Scheurink AJ, Steffens AB. Central and peripheral control of sympathoadrenal activity and energy metabolism in rats. *Physiol Behav*. 1990: **48**: 909-920.

Scheurink AJ, Steffens AB, Dreteler GH, Benthem L, Bruntink R. Experience affects exercise-induced changes in catecholamines, glucose, and FFA. *Am J Physiol*. 1989: **256**: R169-173.

Schmidt I, Fritz A, Scholch C, Schneider D, Simon E, Plagemann A. The effect of leptin treatment on the development of obesity in overfed suckling Wistar rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001: **25**: 1168-1174.

Ste Marie L, Palmiter RD. Norepinephrine and epinephrine-deficient mice are hyperinsulinemic and have lower blood glucose. *Endocrinology*. 2003: **144**: 4427-4432.

Stolar M. Metabolic syndrome: controversial but useful. *Cleve Clin J Med*. 2007: **74**: 199-202, 205-198.

Thirone AC, Scarlett JA, Gasparetti AL, Araujo EP, Lima MH, Carvalho CR, Velloso LA, Saad MJ. Modulation of growth hormone signal transduction in kidneys of streptozotocin-induced diabetic animals: effect of a growth hormone receptor antagonist. *Diabetes*. 2002: **51**: 2270-2281.

Vicentic A, Jones DC. The CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) system in appetite and drug addiction. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007: **320**: 499-506.

Vozarova de Courten B, Weyer C, Stefan N, Horton M, DelParigi A, Havel P, Bogardus C, Tataranni PA. Parasympathetic blockade attenuates augmented pancreatic polypeptide but not insulin secretion in Pima Indians. *Diabetes*. 2004; **53**: 663-671.

Xiao XQ, Williams SM, Grayson BE, Glavas MM, Cowley MA, Smith MS, Grove KL. Excess weight gain during the early postnatal period is associated with permanent reprogramming of brown adipose tissue adaptive thermogenesis. *Endocrinology*. 2007; **148**: 4150-4159.

Yamada M, Miyakawa T, Duttaroy A, Yamanaka A, Moriguchi T, Makita R, Ogawa M, Chou CJ, Xia B, Crawley JN, Felder CC, Deng CX, Wess J. Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature*. 2001; **410**: 207-212.

Young JB. Developmental origins of obesity: a sympathoadrenal perspective. *Int J Obes (Lond)*. 2006; **30 Suppl 4**: S41-49.

Zorzano A, Palacin M, Guma A. Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 2005; **183**: 43-58.